



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
UNIDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MOLECULARES

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOATIVO DE DERIVADOS
DE CHALCONAS**

Suelem Demuner Ramalho*

Orientador: Professora Dra. Caridad Noda Perez

Co-Orientador: Professor Dr. Paulo Cezar Vieira

*Bolsista CAPES

Anápolis - GO

2011



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
UNIDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MOLECULARES

Suelem Demuner Ramalho

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOATIVO DE DERIVADOS
DE CHALCONAS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Moleculares (Físico-Química Molecular).

Orientador: Professora Dra. Caridad Noda Perez

Co-Orientador: Professor Dr. Paulo Cezar Vieira

*Bolsista CAPES

Anápolis – GO

2011

Ficha catalográfica

Ramalho, Suelem Demuner.

Síntese e Avaliação do Potencial Bioativo de Derivados de Chalconas.-2011.

103 folhas. il figuras

Orientador: Profa. Dra. Caridad Noda Perez

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Goiás, 2011.

1. Química Orgânica. 2. Síntese. 3. Chalconas.
I. Título

A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido.
Não na vitória propriamente dita.

(Mahatma Gandhi)

Dedicatória

Aos meus pais e a minha irmã... por todo amor,
apoio e incentivo. Amo vocês!

Agradecimentos

A Deus por estar sempre iluminando a minha vida. Pela sabedoria, força e graças concedidas.

À Profa. Dra. Caridad Noda Pérez, por ter me aceito como sua aluna mesmo sem conhecer-me. Agradeço pela confiança depositada, amizade e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira (UFSCar) por me acolher em seu grupo. Pelos ensinamentos, paciência e tão grande colaboração para a realização deste projeto. Aos demais professores do Laboratório de Produtos Naturais (PN) e DQ-UFSCar. Obrigada!

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Severo Menezes (UEG) pelos ensinamentos e incentivo.

Aos Professores da UEG pela contribuição na minha formação.

Ao Prof. Dr. Luciano Lião (UFG), pelas análises de RMN.

Ao Prof. Dr. Guilherme Roberto de Oliveira (UFG) pelos reagentes cedidos que contribuíram para a síntese dos compostos.

Ao Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes e todos os demais membros do Laboratório de Oncologia Experimental da UFC pela realização dos ensaios de citotoxicidade.

Aos funcionários e técnicos da UEG e DQ-UFSCar, em especial Fernanda, Ediléia e Roberta pela prontidão e colaboração.

Aos colegas e amigos do PN pelo acolhimento e recepção. Pelos momentos de descontração e contribuições para conclusão deste trabalho. Impossível nomeá-los sem cometer falhas!

Ao Jame's, Caio e Roberta pelo apoio, contribuição para conclusão deste trabalho e realização dos ensaios enzimáticos.

A Marcela e ao Clayton pela ajuda, recepção, amizade e momentos de descontração.

A todos os colegas da UEG pela companhia e incentivo.

Aos alunos de IC-UEG Aline e Giulio pela dedicação.

A Miriam, que de colega de mestrado se tornou uma grande amiga. Com sua espontaneidade e alegria de viver tornaram meus momentos em Goiás mais felizes!

Ao Francisco Amigão, pequeno no tamanho, mas grande no coração! Obrigada por todo apoio e risadas diárias na UEG...

Às colegas e companheiras de mestrado, Lorena e Josi, pela compreensão e boa convivência.

Às minhas amigas (Sarah, Samara, Samira, Carol, Gheisy, Illa e Cristiane) que mesmo longe sempre estiveram presentes!

Às minhas amigas desde sempre Narjara e Cristiane. Obrigada por todo amor e carinho. A saudade e a distância nunca nos afastou...

À Kelly e Joaby pela amizade e momentos alegres

Ao Douglas por fazer parte da minha vida de um modo tão especial, tornando tudo mais prazeroso.

A todos os meus familiares pelo amor e carinho.

À Didi e Bia por todo amor, carinho e palavras de conforto.

À minha irmã Soliana pela companhia, apoio, amor e incentivo nos momentos difíceis.

À paiinho e mainha, que nunca mediram esforços para minha realização profissional. Por estarem sempre me incentivando para que não desistisse nas dificuldades, e por todo amor e dedicação.

A CAPES pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram de alguma forma para este trabalho.

Muito Obrigada!

RESUMO

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOATIVO DE DERIVADOS DE CHALCONAS. A pesquisa e o desenvolvimento de medicamentos é um processo longo e complexo que se inicia com a busca de novos compostos bioativos. O presente trabalho envolve a síntese, caracterização e a avaliação da atividade biológica de compostos derivados de chalconas. Treze compostos derivados de chalconas foram obtidos pela reação de condensação aldólica de Claisen-Schmidt e dois compostos hidroxilados através da catálise ácida. Todas as estruturas tiveram sua citotoxicidade avaliada frente a três linhagens de células tumorais de melanoma (MDA-MB-435), cólon (HCT-8) e sistema nervoso central (SF-295). Dos quinze compostos sintetizados, as chalconas (*E*)-3-(3,4-dimetoxifenil)-1-fenil-2-propen-1-ona, (*E*)-3-(4-clorofenil)-1-fenil-2-propen-1-ona, (*E*)-3-(4-metoxifenil)-1-fenil-2-propen-1-ona e (*E*)-3-(4-nitrofenil)-1-fenil-2-propen-1-ona apresentaram atividade citotóxica relevante. O composto (*E*)-3-(4-nitrofenil)-1-fenil-2-propen-1-ona apresentou elevada atividade citotóxica com IC₅₀ menor que 1 µg/mL, não apresentando seletividade entre as linhagens testadas. Avaliando a inibição da atividade enzimática os melhores resultados foram obtidos frente à catepsina K, onde os compostos (*E*)-3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-fenil-2-propen-1-ona, (*E*)-3-(4-fluorfenil)-1-fenil-2-propen-1-ona, (*E*)-3-(4-clorofenil)-1-fenil-2-propen-1-ona e (*E*)-3-(4-metoxifenil)-1-fenil-2-propen-1-ona se destacaram com inibição superior a 80 % (125 µM). Assim, os resultados químicos e biológicos promissores aqui obtidos demonstraram a viabilidade para a procura de substâncias mais ativas, as quais podem representar novas possibilidades terapêuticas.

ABSTRACT

SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY EVALUATION OF CHALCONE DERIVATIVES. The research and drug development consist of a long and complex process that begin with the search of new bioactive compounds. This work involved the synthesis, characterization and biological activity evaluation of compounds derivate from chalcones. Thirteen chalcones were obtained by Claisen-Schmidt aldolic condensation and two hydroxylated compounds by acid catalysis. All structures had their cytotoxicity evaluated against three human cancer cell lines of melanoma (MDA-MB-435), colon cancer (HCT-8) and central nervous system (SF-295). Out of the fifteen chalcones synthesized, the chalcones (*E*)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-1-phenyl-2-propen-1-one, (*E*)-3-(4-chlorophenyl)-1-phenyl-2-propen-1-one, (*E*)-3-(4-methoxyphenyl)-1-phenyl-2-propen-1-one e (*E*)-3-(4-nitrophenyl)-1-phenyl-2-propen-1-one showed relevant cytotoxic activity. The compound (*E*)-3-(4-nitrophenyl)-1-phenyl-2-propen-1-one showed high cytotoxic activity with IC₅₀ less than 1 µg/mL with no selectivity in the tumor line cells. Evaluating the inhibition of enzymatic activity the best results were obtained against the cathepsin K, where the compounds (*E*)-3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-phenyl-2-propen-1-one, (*E*)-3-(4-fluorophenyl)-1-phenyl-2-propen-1-one, (*E*)-3-(4-chlorophenyl)-1-phenyl-2-propen-1-one e (*E*)-3-(4-methoxyphenyl)-1-phenyl-2-propen-1-one highlighted with inhibition exceeding 80% (125 µM). So, the promising chemical and biological results obtained here demonstrated the viability to achieve more active substances, which might represent new therapeutic possibilities.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. Produtos Naturais como Protótipos de Novos Fármacos	2
2.2. Desenvolvimento de Novos Medicamentos	3
2.3. Flavonóides	4
2.4. Chalconas	6
2.5. Câncer	7
2.5.1. Tipos de Tratamentos Disponíveis	10
2.5.2. Dificuldades na Terapia Anti-câncer	12
2.6. Chalconas e sua Relação com Antitumorais	13
2.7. Doenças Ósseas	17
2.8. Catepsinas como Alvo Terapêutico	17
2.8.1. Catepsina B e Processos Cancerígenos	19
2.8.2. Catepsina K e Doenças Ósseas	20
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	22
3.1. Materiais e Métodos	22
3.1.1. Reagentes e Soluções	22
3.2. Solventes	22
3.3. Cromatografia em camada delgada (CCD)	23
3.4. Reveladores	23
3.5. Equipamentos	23
3.5.1. Cromatógrafo Gasoso	23
3.5.2. Espectrômetro de Infravermelho	23
3.5.3. Espectrômetro de Massas acoplado ao Cromatógrafo Gasoso (CG-EM)	24
3.5.4. Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	24
3.5.5. Espectrofluorímetro	24
3.5.6. Aparelho de Ponto de Fusão	24
3.6. Síntese dos Derivados de Chalconas	25
3.6.1. Síntese da chalcona (<i>E</i>)-3-(4-hidroxifenil)-1-(4-nitrofenil)-2-propen-1-ona (23)	25
3.6.2. Síntese da chalcona (<i>E</i>)-3-(4-hidroxifenil)-1-fenil-2-propen-1-ona (24)	25
3.6.3. Síntese da chalcona (<i>E</i>)-1,3-bis(4-nitrofenil)-2-propen-1-ona (25)	26
3.6.4. Síntese da chalcona (<i>E</i>)-3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-fenil-2-propen-1-ona (26)	26

3.6.5. Síntese da chalcona (<i>E</i>)-3-(4-clorofenil)-1-(4-nitrofenil)-2-propen-1-ona (27)	27
3.6.6. Síntese da chalcona (<i>E</i>)-3-(4-fluorfenil)-1-fenil-2-propen-1-ona (28).....	28
3.6.7. Síntese da chalcona (<i>E</i>)-3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-(4-nitrofenil)-2-propen-1-ona (29)	28
3.6.8. Síntese da chalcona (<i>E</i>)-3-(2,4-dimetoxifenil)-1-(4-nitrofenil)-2-propen-1-ona (30)	29
3.6.9. Síntese da chalcona (<i>E</i>)-3-(3,4-dimetoxifenil)-1-(4-nitrofenil)-2-propen-1-ona (31)	29
3.6.10. Síntese da chalcona (<i>E</i>)-3-(4-fluorfenil)-1-(4-nitrofenil)-2-propen-1-ona (32) ...	30
3.6.11. Síntese da chalcona (<i>E</i>)-3-(4-metoxifenil)-1-(4-nitrofenil)-2-propen-1-ona (33)	31
3.6.12. Síntese da chalcona (<i>E</i>)-3-(3,4-dimetoxifenil)-1-fenil-2-propen-1-ona (34)	31
3.6.13. Síntese da chalcona (<i>E</i>)-3-(4-clorofenil)-1-fenil-2-propen-1-ona (35).....	32
3.6.14. Síntese da chalcona (<i>E</i>)-3-(4-metoxifenil)-1-fenil-2-propen-1-ona (36).....	32
3.6.15. Síntese da chalcona (<i>E</i>)-3-(4-nitrofenil)-1-fenil-2-propen-1-ona (37)	33
3.7. Metodologia dos Ensaio Biológicos	34
3.7.1. Estudo da Atividade Citotóxica <i>in vitro</i>	34
3.7.2. Inibição Enzimática das Catapsinas B e K.....	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1. Síntese dos Derivados de Chalconas	37
4.2. Atividades Biológicas.....	45
4.2.1. Avaliação da Atividade Citotóxica <i>in vitro</i>	45
4.2.2. Avaliação da Inibição Enzimática	48
5. CONCLUSÕES	50
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
7. ANEXO	59

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS	Ácido acetilsalicílico
AR	Artrite reumatóide
°C	Grau Celsius
Cat	Catepsinas
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG	Cromatografia gasosa
CG-EM	Espectrômetro de Massas acoplado ao Cromatógrafo Gasoso
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTE	Ditioeritritol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
AcOEt	Acetato de Etila
Hz	Hertz
IARC	Agência Internacional para Pesquisa em Câncer
IC₅₀	Concentração da substância necessária para inibir 50% da resposta desejada
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento
GSH	Glutathiona
kDa	Kilodaltons
MDR	Multi- drug Resistance
MHz	Mega Hertz
mM	Mili Mol
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium
µL	Micro litro

μM	Micro molar
NCI	National Cancer Institute
nm	Nanômetros
OMS	Organização Mundial de Saúde
pH	Potencial Hidrogeniônico
ppm	Parte por milhão
QSAR	Relação Estrutura Atividade
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RNA	Ácido ribonucléico
RPMI	Meio de cultura constituído principalmente de aminoácidos, vitaminas. Foi desenvolvido pelo Instituto Roswell Park Memorial
TMS	Tetrametilsilano
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFG	Universidade Federal de Goiás
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
UV	Ultravioleta
Z-FRMCA	Carbobenzoxi-fenilalanina-arginina-7-amino-4-metilcumarina
δ	Deslocamento químico em partes por milhão

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.0. Estrutura, tempo reacional e rendimento dos derivados de chalconas (23-37).....	37
Tabela 2.0. Dados de CG-EM dos compostos derivados de chalconas (23-37).....	44
Tabela 3.0. Porcentagem de inibição das amostras (23-37) através do ensaio do MTT.....	45
Tabela 4.0. Valores de IC ₅₀ e intervalo de confiança de 95% em µg/mL das amostras testadas.....	47
Tabela 5.0. Porcentagem de inibição das B e K pelos derivados de chalconas (23-37).....	48

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.0. Dados de infravermelho dos compostos derivados de chalconas (23-37).....	39
Quadro 2.0. Dados de RMN ¹ H dos compostos derivados de chalcona que apresentam o grupo <i>p</i> -nitrobenzoíla.....	41
Quadro 3.0. Dados de RMN ¹ H dos compostos derivados de chalcona que apresentam o grupo benzoíla.....	43

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Salicilatos que marcaram o desenvolvimento de fármacos.....	2
Figura 2. Núcleo fundamental dos flavonóides (4).....	4
Figura 3. Exemplos de representantes das classes de flavonóides.....	5
Figura 4. Núcleo fundamental das chalconas (12).....	6
Figura 5. Mecanismo de condensação aldólica das chalconas.....	7
Figura 6. Relação entre a ação dos agentes antitumorais e o ciclo celular.....	9
Figura 7. Paclitaxel (13) e docetaxel (14).....	11
Figura 8. Vimblastina (15) e Vincristina (16).....	12
Figura 9. Estrutura química de análogos de chalconas que apresentaram atividade citotóxica contra o câncer de mama.....	14
Figura 10. Estrutura química da chalcona com atividade antitumoral <i>in vivo</i>	15
Figura 11. Estrutura química da chalcona substituída com atividade citotóxica frente às células K562 (leucemia).....	15
Figura 12. Reação do seqüestro da glutatona (nucleófilo bio-orgânico) pela chalcona (12).....	16
Figura 13. Papéis fisiológicos das cisteíno proteases humanas.....	18
Figura 14. Dihidrochalcona dimérica (21) da <i>Artocarpus altilis</i> inibidor da catepsina K..	21
Figura 15. Odanacatibe (22).....	21
Figura 16. Estrutura química da chalcona (<i>E</i>)-3-(4-hidroxifenil)-1-(4-nitrofenil)-2-propen-1-ona (23).....	25
Figura 17. Estrutura química da chalcona (<i>E</i>)-3-(4-hidroxifenil)-1-fenil-2-propen-1-ona (24).....	26
Figura 18. Estrutura química da chalcona (<i>E</i>)-1,3-bis(4-nitrofenil)-2-propen-1-ona (25)..	26
Figura 19. Estrutura química da chalcona (<i>E</i>)-3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-fenil-2-propen-1-ona (26).....	27
Figura 20. Estrutura química da chalcona (<i>E</i>)-3-(4-clorofenil)-1-(4-nitrofenil)-2-propen-1-ona (27).....	27

Figura 21. Estrutura química da chalcona (<i>E</i>)-3-(4-fluorfenil)-1-fenil-2-propen-1-ona (28).....	28
Figura 22. Estrutura química da chalcona (<i>E</i>)-3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-(4-nitrofenil)-2-propen-1-ona (29).....	29
Figura 23. Estrutura química da chalcona (<i>E</i>)-3-(2,4-dimetoxifenil)-1-(4-nitrofenil)-2-propen-1-ona (30).....	29
Figura 24. Estrutura química da chalcona (<i>E</i>)-3-(3,4-dimetoxifenil)-1-(4-nitrofenil)-2-propen-1-ona (31).....	30
Figura 25. Estrutura química da chalcona (<i>E</i>)-3-(4-fluorfenil)-1-(4-nitrofenil)-2-propen-1-ona (32).....	30
Figura 26. Estrutura química da chalcona (<i>E</i>)-3-(4-metoxifenil)-1-(4-nitrofenil)-2-propen-1-ona (33).....	31
Figura 27. Estrutura química da chalcona (<i>E</i>)-3-(3,4-dimetoxifenil)-1-fenil-2-propen-1-ona (34).....	32
Figura 28. Estrutura química da chalcona (<i>E</i>)-3-(4-clorofenil)-1-fenil-2-propen-1-ona (35).....	32
Figura 29. Estrutura química da chalcona (<i>E</i>)-3-(4-metoxifenil)-1-fenil-2-propen-1-ona (36).....	33
Figura 30. Estrutura química da chalcona (<i>E</i>)-3-(4-nitrofenil)-1-fenil-2-propen-1-ona (37).....	33
Figura 31. Grupamento <i>p</i> -nitrobenzoíla.....	40
Figura 32. Grupamento benzoíla.....	42
Figura 33. Espectro no IV (KBr) do composto (23).....	59
Figura 34. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz) do composto (23).....	60
Figura 35. Espectro de massas do composto (23) obtido por CG-EM.....	61
Figura 36. Espectro no IV (KBr) do composto (24).....	62
Figura 37. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz) do composto (24).....	63
Figura 38. Espectro de massas do composto (24) obtido por CG-EM.....	64
Figura 39. Espectro no IV (KBr) do composto (25).....	65

Figura 40. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz) do composto (25).....	66
Figura 41. Espectro de massas do composto (25) obtido por CG-EM.....	67
Figura 42. Espectro no IV (KBr) do composto (26).....	68
Figura 43. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz) do composto (26).....	69
Figura 44. Espectro de massas do composto (26) obtido por CG-EM.....	70
Figura 45. Espectro no IV (KBr) do composto (27).....	71
Figura 46. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz) do composto (27).....	72
Figura 47. Espectro de massas do composto (27) obtido por CG-EM.....	73
Figura 48. Espectro no IV (KBr) do composto (28).....	74
Figura 49. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz) do composto (28).....	75
Figura 50. Espectro de massas do composto (28) obtido por CG-EM.....	76
Figura 51. Espectro no IV (KBr) do composto (29).....	77
Figura 52. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz) do composto (29).....	78
Figura 53. Espectro de massas do composto (29) obtido por CG-EM.....	79
Figura 54. Espectro no IV (KBr) do composto (30).....	80
Figura 55. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz) do composto (30).....	81
Figura 56. Espectro de massas do composto (30) obtido por CG-EM.....	82
Figura 57. Espectro no IV (KBr) do composto (31).....	83
Figura 58. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz) do composto (31).....	84
Figura 59. Espectro de massas do composto (31) obtido por CG-EM.....	85
Figura 60. Espectro no IV (KBr) do composto (32).....	86
Figura 61. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz) do composto (32).....	87
Figura 62. Espectro de massas do composto (32) obtido por CG-EM.....	88
Figura 63. Espectro no IV (KBr) do composto (33).....	89
Figura 64. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz) do composto (33).....	90

Figura 65. Espectro de massas do composto (33) obtido por CG-EM.....	91
Figura 66. Espectro no IV (KBr) do composto (34).....	92
Figura 67. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz) do composto (34).....	93
Figura 68. Espectro de massas do composto (34) obtido por CG-EM.....	94
Figura 69. Espectro no IV (KBr) do composto (35).....	95
Figura 70. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz) do composto (35).....	96
Figura 71. Espectro de massas do composto (35) obtido por CG-EM.....	97
Figura 72. Espectro no IV (KBr) do composto (36).....	98
Figura 73. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz) do composto (36).....	99
Figura 74. Espectro de massas do composto (36) obtido por CG-EM.....	100
Figura 75. Espectro no IV (KBr) do composto (37).....	101
Figura 76. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz) do composto (37).....	102
Figura 77. Espectro de massas do composto (37) obtido por CG-EM.....	103
Esquema 1. Proposta de fragmentação do núcleo fundamental das chalconas.....	44

1. INTRODUÇÃO

Inúmeros fármacos disponíveis no mercado farmacêutico foram obtidos sinteticamente baseados em estruturas químicas obtidas de fontes naturais. É importante mencionar que a utilização de produtos naturais ativos como modelo ou molécula-protótipo para a síntese de análogos mais potentes e seletivos, tem contribuído significativamente para a obtenção de novos agentes terapêuticos, que podem, muitas vezes, ser adquiridos mais facilmente e a custos menores (CHIARADIA, 2006). A síntese química vem contribuindo cada vez mais com novos fármacos, principalmente depois que passou a aplicar os conhecimentos dos mecanismos de reações químicas e bioquímicas e dispor de eficientes métodos analíticos como a cromatografia, espectroscopia e difração de raios X (KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1988).

O percentual de substâncias sintéticas utilizadas como fármacos atinge cerca de 75 % do total de medicamentos empregados no mundo. A síntese orgânica, que engloba também a síntese de fármacos, representa a vertente da química orgânica capaz de construir moléculas, independente do seu grau de complexidade estrutural, explorando conceitos fundamentais que regem o comportamento químico dos diferentes grupamentos funcionais (BARREIRO, 1991). Muitas classes de compostos orgânicos têm demonstrado efeitos biológicos promissores e a literatura relata um crescimento significativo de novas moléculas com potência similar ou superior à do fármaco, sendo que muitos deles já se encontram em estudos pré-clínicos avançados (MACHADO *et al.*, 2005). Dentre essas substâncias podem-se inserir as chalconas e seus derivados.

Considerando que a síntese de fármacos representa um processo de múltiplas etapas, a pureza final do produto depende da metodologia empregada e do grau de pureza dos intermediários sintéticos e, por conseguinte, também das matérias-primas utilizadas no processo (BARREIRO, 1991).

Os objetivos do presente trabalho foram a síntese, purificação, caracterização química e a realização de ensaios biológicos com várias chalconas. A atividade citotóxica foi verificada *in vitro* frente às células MDA-MB-435 (melanoma), HCT-8 (côlon humano), SF-295 (sistema nervoso central) e HL-60 (leucemia). Além disso, também foram realizados os testes de inibição enzimática das catepsinas B e K (câncer e as doenças ósseas, respectivamente) com as chalconas sintetizadas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Produtos Naturais como Protótipos de Novos Fármacos

No final do século XIX, a busca para encontrar medicamentos menos tóxicos do que aqueles baseados em fontes naturais resultaram na introdução de substâncias sintéticas que atuam como fármacos e o seu uso foi amplamente disseminado no século XX. Inicialmente, este conhecimento estava centrado em produtos naturais isolados de material vegetal e animal, mas, à medida que o conhecimento aumentou, uma ampla faixa de compostos sintéticos passou a ser usada para tais fins (THOMAS, 2003).

O marco mais importante para o desenvolvimento dos fármacos a partir de produtos naturais foi o descobrimento dos salicilatos obtidos da planta *Salix alba*, conhecida popularmente como chorão ou salgueiro. Suas cascas foram utilizadas por séculos na Europa, Ásia e África, para tratar dor e febre, mas somente em 1763 foram estudadas cientificamente, pelo reverendo Edward Stone, na Inglaterra. Em 1828, no Instituto de Farmacologia de Munique, Johann A. Buchner isolou uma pequena quantidade de salicilina (**1**, Figura 1). Posteriormente, vários outros cientistas empenharam-se em melhorar os rendimentos e a qualidade da salicilina obtida até que em 1860, Hermann Kolbe sintetizou o ácido salicílico (**2**) e seu sal sódico a partir do fenol. Somente em 1898, Felix Hofmann descobriu o ácido acetilsalicílico (**3**), que apresentou um caráter menos ácido devido à acetilação do grupo hidroxila, o que reduziu os efeitos colaterais, como problemas estomacais e não alterou as propriedades analgésicas, antitérmicas e anti-inflamatórias do ácido salicílico. Obteve-se assim o primeiro fármaco sintético oriundo da otimização de um produto natural (VIEGAS; BOLZANI & BARREIRO, 2006).

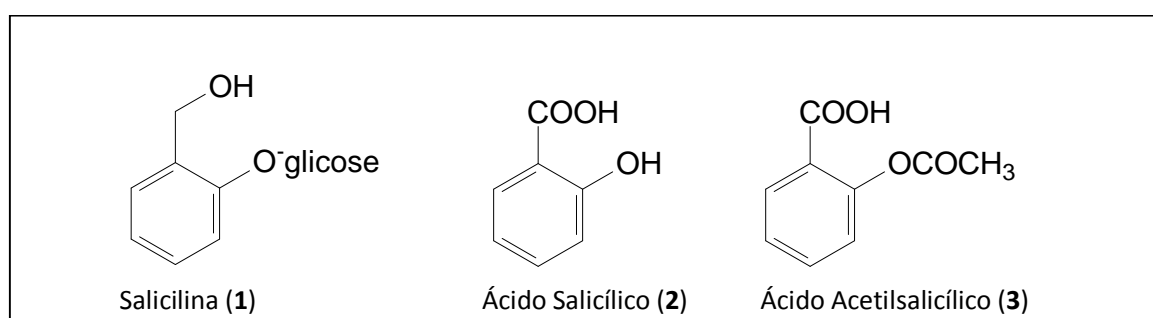


Figura 1. Salicilatos que marcaram o desenvolvimento de fármacos.

As propriedades terapêuticas do AAS levaram os laboratórios de pesquisa da Bayer a elegerem o AAS como um novo produto a ser lançado no mercado para competir com os salicilatos naturais, sob o nome de Aspirina[®] (VIEGAS; BOLZANI & BARREIRO, 2006). Após mais de 100 anos de sua descoberta, o AAS continua sendo o analgésico mais consumido e vendido no mundo e também alvo de inúmeras pesquisas sobre suas aplicações terapêuticas (MENEGATTI; MANSSOUR & BARREIRO, 2001).

2.2. Desenvolvimento de Novos Medicamentos

Os primeiros estudos sobre a relação entre estrutura química e atividade para o planejamento racional de moléculas bioativas ganharam destaque durante a II Grande Guerra Mundial. A pesquisa militar foi responsável por grandes avanços na química sintética, motivada pela necessidade de tratamento de infecções, da dor, de processos alérgicos e da depressão (VIEGAS; BOLZANI & BARREIRO, 2006).

Atualmente, o processo de desenvolvimento de fármacos incorporou profundas transformações. Com o avanço da Biologia Molecular, inúmeros processos biológicos foram identificados, fornecendo assim diversos novos alvos celulares passíveis de intervenção terapêutica que possibilitem a construção de fármacos inovadores (MOTTA, 2004).

Os elevados custos no desenvolvimento de novos fármacos estão associados a uma série de fatores que levam em consideração as várias fases dispendiosas envolvidas, desde a descoberta do fármaco até a introdução do medicamento no mercado (MOTTA, 2004). O processo de descobrimento de um novo fármaco pode ser feito através de várias estratégias, todas envolvendo diversas etapas, até que o medicamento se encontre disponível para a população (DIAS & CORRÊA, 2001). O período de tempo que transcorre entre o reconhecimento do problema, conseqüente concepção da estratégia de ataque do mesmo e a introdução de um medicamento na terapêutica variam de 10 a 12 anos (SILVA, 1998).

Dessa forma, o planejamento químico desenvolve-se em paralelo ao planejamento biológico e se apóia em extenso levantamento bibliográfico para que se estabeleçam as bases do programa de pesquisa. A seguir, no ramo químico, desenvolvem-se métodos de síntese apropriados da série de compostos inicialmente planejada. Ao mesmo tempo, são desenvolvidos métodos de ensaio para os compostos obtidos, no sentido de se efetuar a triagem preliminar dos mais ativos. Caso haja interesse, os fármacos são submetidos aos

ensaios farmacológicos e clínicos subseqüentes, prosseguindo-se até a produção industrial, que culmina com o lançamento dos mesmos no mercado (SILVA, 1998).

2.3. Flavonóides

Os flavonóides (4, Figura 2) constituem uma importante classe, sendo encontrados em relativa abundância entre os metabólitos secundários dos vegetais. Estes representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. Apresentam-se freqüentemente oxigenados e um grande número ocorre conjugado com açúcares (SIMÕES *et al.*, 2007).

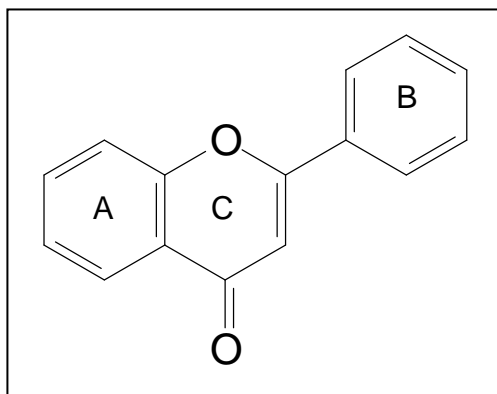


Figura 2. Núcleo fundamental dos flavonóides (4).

O interesse econômico por esta classe é decorrente de suas diferentes propriedades, como por exemplo, o fato de alguns apresentarem cor e poderem ser usados como pigmentos, na fermentação do chá-da-índia e por conferirem cor e valor nutricional para alguns alimentos (SIMÕES *et al.*, 2007). Além disso, esses compostos possuem também importância farmacológica, como resultado de diversas propriedades atribuídas a alguns representantes da classe, tais como, atividade antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante, entre outras (AUYEUNG & KO, 2010). Mais de 4.200 flavonóides são conhecidos, os quais dependendo de suas características biossintéticas e estruturas químicas podem ser agrupados nas seguintes classes (Figura 3): flavonóis, flavonas, catequinas, flavanonas, chalconas, antocianidinas e isoflavonas (SIMÕES *et al.*, 2007).

As chalconas, por sua vez, são os precursores imediatos na biossíntese de flavonóides, e sua estrutura difere dos outros membros da família, por apresentar uma cadeia aberta (ECHEVERRIA *et al.*, 2009).

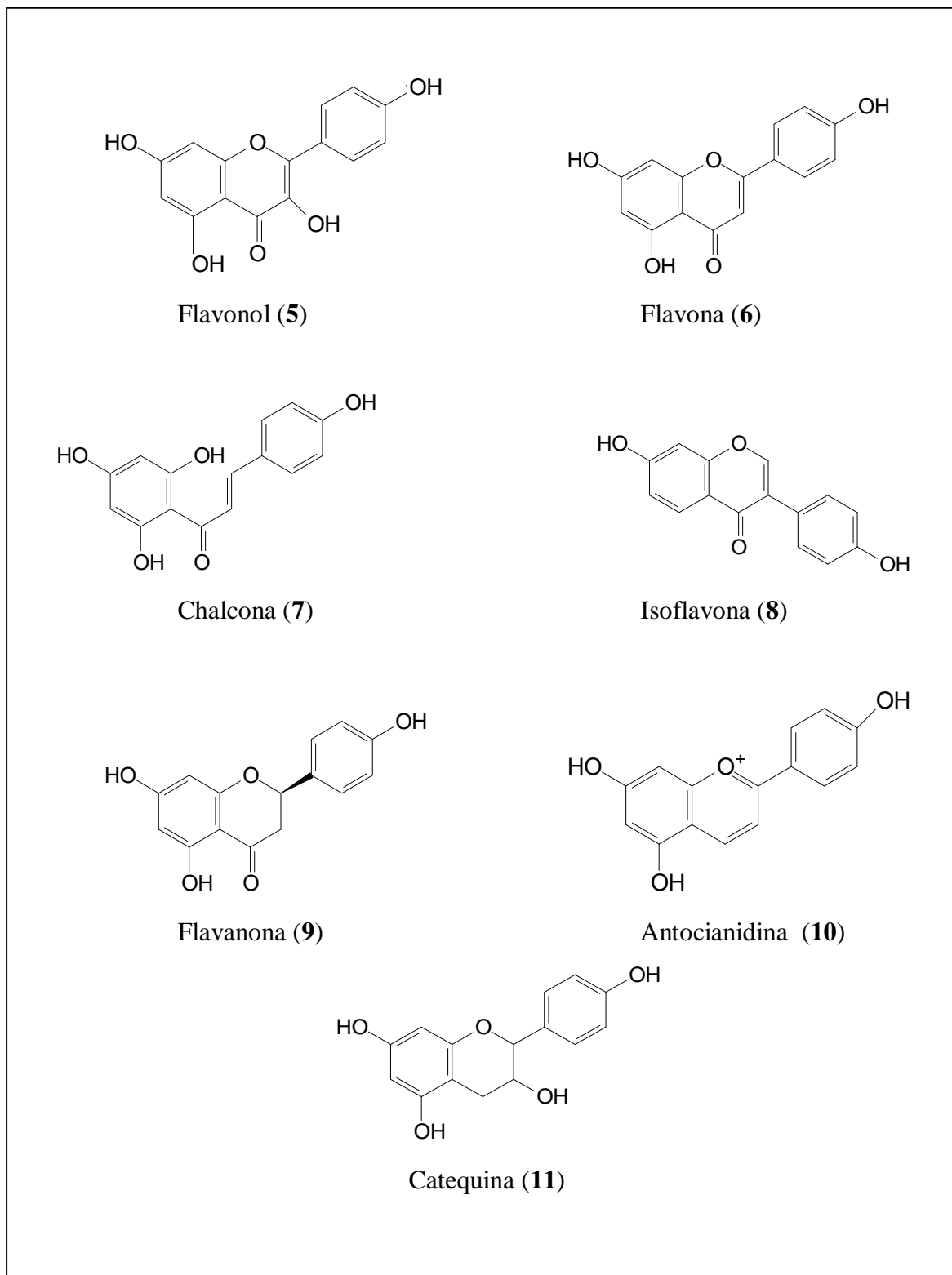


Figura 3. Exemplos de representantes das classes de flavonóides.

2.4. Chalconas

Chalconas, consideradas precursores imediatos da via de biossíntese de flavonóides, são largamente encontradas em plantas e possuem pigmentação amarela até vermelha (ANDERSEN & MARKHAM, 2006). Estes compostos têm um papel importante em sistemas ecológicos em função das cores que produzem nos vegetais, auxiliando assim na polinização como atraentes de insetos e pássaros (SIMÕES *et al.*, 2007). As chalconas naturais ocorrem principalmente na forma hidroxilada e vários estudos têm relatado suas propriedades biológicas (NAVARINI *et al.*, 2009).

Quimicamente as chalconas (**12**, Figura 4) podem ser definidas como cetonas α , β - insaturadas, onde se tem tanto a carbonila quanto a porção olefínica conjugadas e ligadas a grupamentos aromáticos, comumente designados como anel A, proveniente da cetona e anel B do aldeído (DHAR, 1981). O núcleo A das chalconas é numerado com números ordinários seguidos de uma linha (') e o núcleo B somente com números ordinários (SIMÕES *et al.*, 2007).

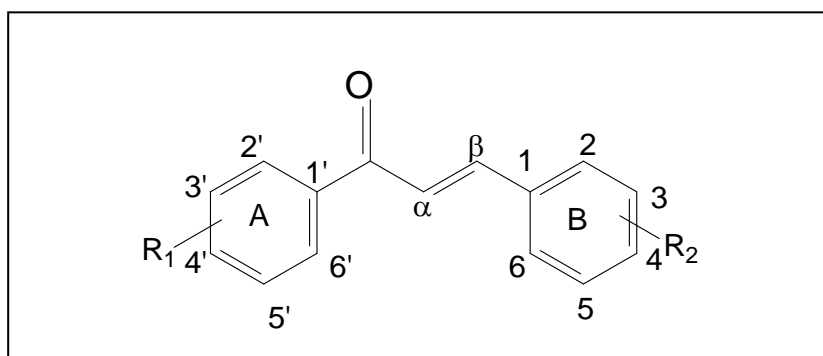


Figura 4. Núcleo fundamental das chalconas (**12**).

As chalconas são obtidas pela reação de condensação de Claisen-Schmidt entre uma cetona e um aldeído aromático em presença de catalisadores básicos. O nome da reação foi em homenagem aos químicos alemães J. G. Schmidt (que descobriu a reação em 1880) e Ludwig Claisen (que a desenvolveu entre 1881 e 1889).

A reação de condensação (Figura 5) começa pela abstração de um próton do carbono α da molécula de cetona para formar o íon enolato, o qual é estabilizado por ressonância. O íon enolato a seguir age como nucleófilo e ataca o carbono da carbonila do aldeído formando o íon alcóxido (intermediário tetraédrico). Posteriormente, o íon alcóxido remove um próton da molécula de água, formado uma hidroxicetona. Finalmente, a desidratação da hidroxicetona

conduz à formação do produto da reação, uma cetona α , β -insaturada (SOLOMONS & FRYHLE, 2009). O mecanismo reacional desta reação se apresenta na Figura 5.

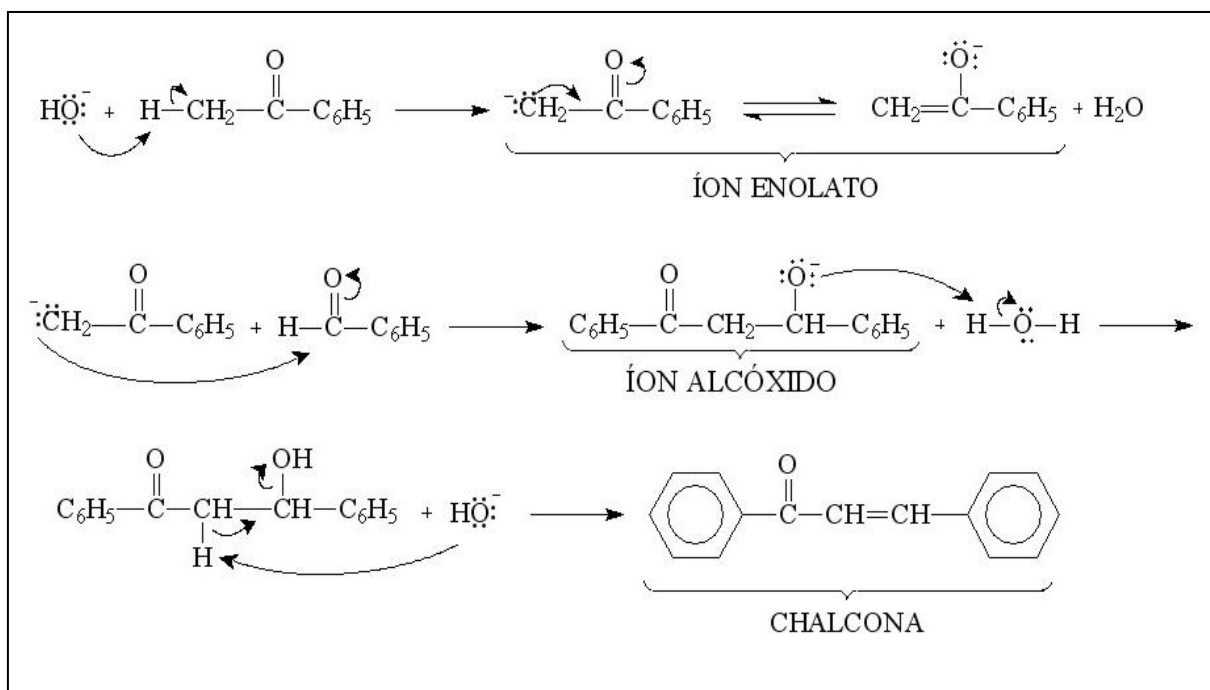


Figura 5. Mecanismo de condensação aldólica das chalconas (SOLOMONS & FRYHLE, 2009).

Devido ao grande interesse nesta classe de compostos, Ni e colaboradores (2004) publicaram uma revisão sobre os avanços na terapêutica de chalconas com o objetivo de sumarizar o desenvolvimento das pesquisas com estes compostos biologicamente ativos, incluindo algumas moléculas já patenteadas.

2.5. Câncer

O termo câncer é utilizado genericamente para representar um conjunto de mais de 100 doenças, incluindo tumores malignos de diferentes localizações. Importante causa de morte no Brasil, desde 2003, as neoplasias malignas constituem a segunda causa de morte na população, representando quase 17% dos óbitos notificados em 2007 no Sistema de Informações sobre Mortalidade (INCA, 2010).

Segundo recente relatório da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC)/OMS, o impacto global do câncer mais que dobrou em 30 anos. Em 2008, estimou

que ocorressem 12,4 milhões de casos novos e 7,6 milhões de óbitos por câncer no mundo. Destes, os mais incidentes foram o câncer de pulmão (1,52 milhões de casos novos), de mama (1,29 milhões), de cólon e de reto (1,15 milhões). No Brasil, as estimativas, para o ano de 2010 apontam para a ocorrência de 489.270 casos novos de câncer (INCA, 2010).

O termo neoplasia significa “crescimento novo”, e esse novo crescimento é um neoplasma. A palavra câncer é o termo comum utilizado para referir-se a todos os tumores malignos. Em geral a velocidade de crescimento dos tumores está relacionada com seu nível de diferenciação, de modo que os tumores malignos crescem, em sua maioria, mais rapidamente do que as lesões benignas e se espalham através das metástases (COTRAN; KUMAR & COLLINS, 2000).

As metástases, por sua vez, são implantes tumorais descontínuos em relação ao tumor primário, apresentando-se como um processo biológico dinâmico e complexo envolvendo a interação tumoral com células sadias e células tumorais (ENGERS & GABBERT, 2000). A capacidade de formar metástases distingue as neoplasias malignas das benignas, pois os tumores benignos não conduzem a metástase (ROBBINS, 1969). Dessa forma, a invasão dos cânceres permite a sua penetração nos vasos sanguíneos, linfáticos e cavidades corporais, proporcionando-lhes, assim, a oportunidade de disseminação (COTRAN; KUMAR & COLLINS, 2000).

Embora sejam observadas diferenças na duração do ciclo celular entre células de vários tipos, todas exibem um padrão semelhante durante o processo de divisão (Figura 6): (1) uma fase que precede a síntese de DNA (G_1); (2) uma fase de síntese de DNA (S); (3) um intervalo após o término da síntese de DNA (G_2); e (4) a fase mitótica (M) durante a qual a célula, que contém um duplo complemento de DNA, divide-se em duas células-filhas G_1 . Cada uma dessas células-filhas pode reentrar imediatamente no ciclo celular ou passar por uma fase não-proliferativa, designada como G_0 . As células G_0 de determinados tecidos especializados podem diferenciar-se em células funcionais, que não são mais capazes de sofrer divisão. Entretanto, problemas em relação ao ciclo celular podem levar a um crescimento desordenado das células originando processos tumorais (BRUNTON; LAZO & PARKER, 2006).

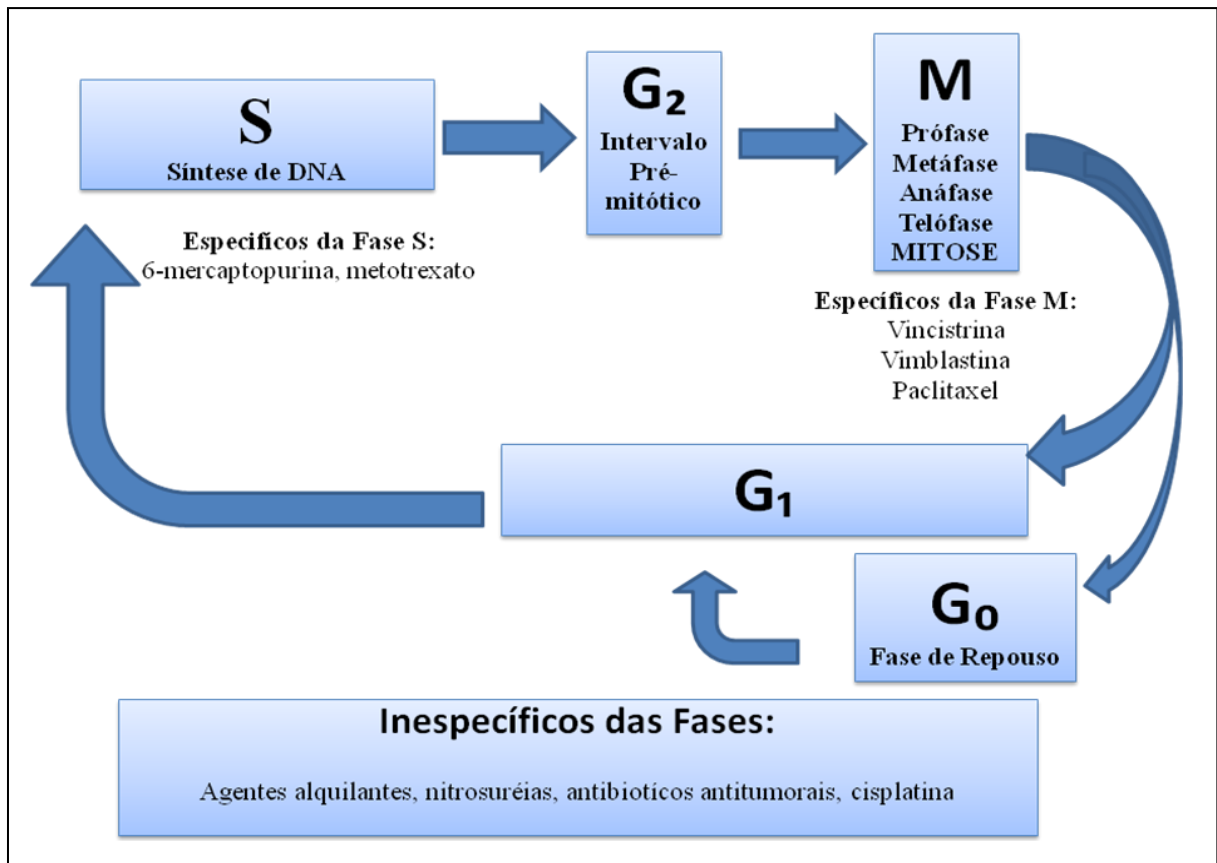


Figura 6. Relação entre a ação dos agentes antitumorais e o ciclo celular (Adaptada de BRUNTON; LAZO & PARKER, 2006).

Em relação a processos cancerígenos têm-se realizado vários estudos avaliando a sua incidência no organismo com a formação de espécies reativas de oxigênio tais como peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila. Dessa forma, existe uma importante correlação entre os níveis de glutathione em sua forma reduzida e os mecanismos enzimáticos de defesa. Esta observação tem promovido uma série de estudos clínicos sobre a interdependência entre o aumento dos níveis de glutathione no plasma sanguíneo e doenças cancerígenas em determinados órgãos vitais como rins e pulmões (SENTURKER & DIZDAROGLU, 1999; NAVARRO *et al.*, 1999; JÚNIOR *et al.*, 2001).

A glutathione, um tripeptídeo (g-L-glutamil-L-cisteinil-glicina), existe no organismo nas formas reduzidas (GSH) e oxidadas (GSSG). A glutathione atua direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular. Em particular, problemas na síntese e metabolismo da glutathione estão associados a algumas doenças, nas quais os níveis de glutathione e das enzimas que atuam no seu metabolismo podem ser bastante significativos no diagnóstico de alguns tipos de câncer,

bem como em outras doenças relacionadas ao estresse oxidativo (NAVARRO *et al.*, 1999; JÚNIOR *et al.*, 2001).

As membranas celulares e intracelulares, que possuem grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados, são um importante alvo para o ataque de radicais livres. Espécies radicalares provenientes do oxigênio podem estar envolvidas em processos patológicos, causando um estresse oxidativo dos fosfolípídeos, proteínas e ácido desoxirribonucléico (DNA) (SAYDAM *et al.*, 1997)

O DNA consiste de duas cadeias helicoidais que se enrolam ao redor do mesmo eixo formando uma dupla hélice, sendo que o esqueleto hidrofílico dos grupos alternantes desoxirribose e fosfato estão carregados negativamente, apresentando assim um caráter nucleofílico (LEHNIGER; NELSON & COX, 1995).

Dessa forma, o aumento nos níveis de bases de DNA lesadas devido ao dano oxidativo leva à formação de radicais livres que podem aumentar a quantidade de células malignas. A presença destes radicais tem sido correlacionada com um grande número de doenças, indicando que estas espécies não têm um papel etiológico na grande maioria dos estados patológicos, mas que participam diretamente dos mecanismos fisiopatológicos que determinam a continuidade e as complicações presentes nestes processos (OBERLEY, 2002; JÚNIOR *et al.*, 2001).

Compreender e controlar as doenças malignas requer conhecimentos científicos e experiências que vão desde o reconhecimento dos complexos mecanismos de regulação molecular intracelular às escolhas individuais do estilo de vida. Assim, a prevenção e o controle de câncer estão entre os mais importantes desafios científicos e de saúde pública (INCA, 2010).

2.5.1. Tipos de Tratamentos Disponíveis

Os tipos de tratamento mais usados contra o câncer incluem a cirurgia, a radiação e a quimioterapia. A quimioterapia é considerada o método ideal e mais efetivo (ROBBINS, 1969). A maior parte dos agentes antineoplásicos atua sobre o ciclo celular, impedindo a duplicação do DNA e acarretando a morte celular (FUCHS; WANNMACHER & FERREIRA, 2006). Atualmente, uma das atividades principais de muitos centros de pesquisa

contra o câncer é, justamente, a procura de medicamentos que possam destruir as células cancerosas (ROBBINS, 1969).

Tradicionalmente, os fármacos para o tratamento do câncer foram descobertos através de testes em animais, em larga escala, de substâncias químicas sintéticas e produtos naturais utilizados contra tumores de rápida proliferação. Os agentes descobertos nas primeiras duas décadas de quimioterapia do câncer (1950 e 1970) interagem, em sua maioria, com o DNA ou seus precursores, inibindo a síntese de novo material genético ou causando lesão irreparável no DNA. Nos últimos anos, a descoberta de novos agentes ocorreu a partir de produtos naturais mais convencionais, como o paclitaxel (Taxol®) e de agentes semi-sintéticos, como o etoposídeo, ambos direcionados contra o processo proliferativo (BRUNTON; LAZO & PARKER, 2006).

O diterpeno paclitaxel (**13**, Figura 7), foi isolado pela primeira vez no final dos anos 60 a partir das cascas de *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae). Esta substância foi descoberta pelo National Cancer Institute (NCI) e também está presente em outras espécies do gênero *Taxus*, como por exemplo, nas folhas de *Taxus baccata* L., porém em pequenas quantidades. A sua síntese total é muito cara e impraticável do ponto de vista industrial, por isso foram desenvolvidos estruturas análogas como o docetaxel (**14**, Figura7) através de vias semi-sintéticas (HOSTETTMANN; QUEIROZ & VIEIRA, 2003).

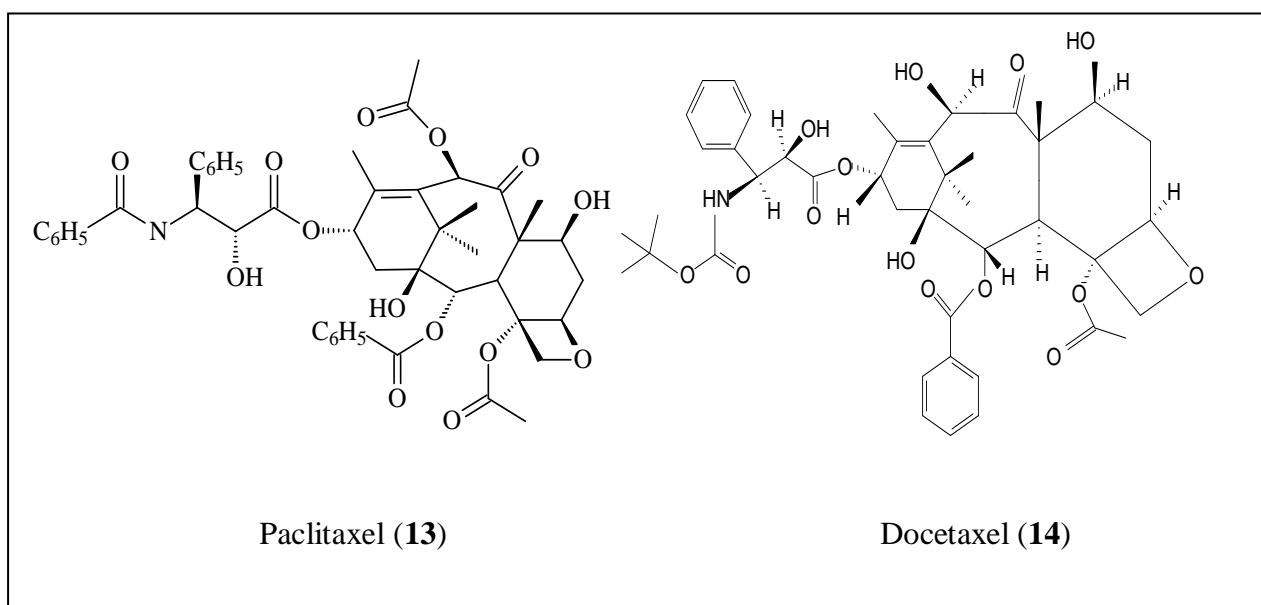


Figura 7. Paclitaxel (**13**) e docetaxel (**14**).

O câncer está intimamente relacionado ao ciclo celular (Figura 6, pág.9), sendo assim as principais classes de fármacos usados na quimioterapia atuam diretamente sobre as células e incluem: agentes alquilantes, que formam íons altamente ativos e causam danos à estrutura do DNA (ex: cisplatina e nitrosuréias); os antimetabólitos, que tem como base a capacidade de interromper a síntese de ácidos nucleicos (ex: 6-mercaptopurina e metotrexato); os antibióticos, que inibem a síntese de RNA/DNA - dependente e retardam ou inibem a mitose (ex: mitomicina, daunorrubicina e mitoxantrona); inibidores antimitóticos, que atuam como inibidores do fuso celular, causando parada na metáfase. Estes agentes são alcalóides isolados da *Catharanthus roseus* (vimblastina e vincristina) ou da planta *Podophyllum peltatum* (etoposídeo), que é um derivado semi-sintético (SILVA, 1998). O paclitaxel e o docetaxel semi-sintético também atuam como inibidores da mitose (BRUNTON; LAZO & PARKER, 2006).

Os alcalóides bisindólicos vimblastina e vincristina (Figura 8) foram descobertos no final dos anos 60 e ainda são considerados medicamentos indispensáveis para o tratamento da leucemia (HOSTETTMANN; QUEIROZ & VIEIRA, 2003).

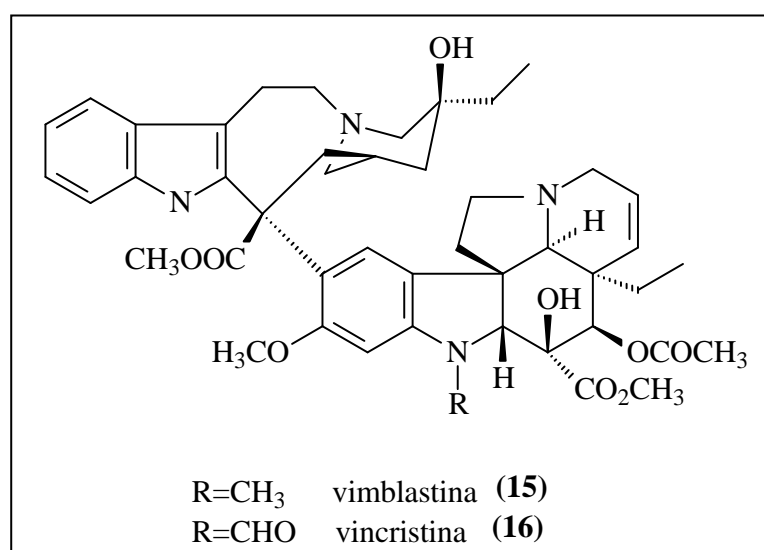


Figura 8. Vimblastina (15) e Vincristina (16).

2.5.2. Dificuldades na Terapia Anti-câncer

Apesar do grande número de agentes quimioterápicos disponíveis no mercado, a necessidade médica por novos medicamentos ainda se faz presente. As principais razões são a

falta de seletividade, que leva a toxicidade; o rápido crescimento metastático; heterogeneidade da doença, contendo cerca de cem tipos diferentes de cânceres e a resistência intrínseca ou adquirida à quimioterapia após poucos ciclos terapêuticos (MDR= multi-drug resistance) (COZZI, 2002).

Os tecidos tipicamente suscetíveis aos efeitos adversos dos medicamentos antineoplásicos são aqueles de altas taxas de multiplicação, como cabelos, mucosas, tecido hematopoiético e germinativo (FUCHS; WANNMACHER & FERREIRA, 2006). O fato dos antineoplásicos atuarem em células cancerosas e normais leva a uma série de efeitos adversos no organismo como náuseas, diarreia, anemias, leucopenia (diminuição dos glóbulos brancos), insuficiência renal, esterilidade, alopecia e flebite que dificultam a terapia. (MARDINI & RECORD, 2005).

Medicamentos antineoplásicos, para exercerem sua atividade, devem chegar até a célula, atravessar a membrana plasmática, muitas vezes serem convertidos a metabólito ativo dentro do citoplasma e atingir seu alvo, normalmente no núcleo celular. Células neoplásicas dispõem de uma série de mecanismos para bloqueio da ação de antineoplásicos, os quais podem determinar resistência do tumor à quimioterapia (FUCHS; WANNMACHER & FERREIRA, 2006).

Entre os mecanismos que explicam o desenvolvimento da resistência estão: aumento do potencial anti-apóptico das células antitumorais; incremento do mecanismo de reparo do DNA; e interferências no transporte de medicamentos por proteínas capazes de promover o efluxo de medicamento das células alvo. A glicoproteína P é a proteína mais importante, sendo responsável pela MDR, que é associado a uma baixa resposta medicamentosa (MARIE; MARZAC & LEGRAND, 2004).

O conhecimento dos mecanismos de resistência a antineoplásicos é uma das ferramentas essenciais no planejamento da terapia oncológica. Uso de combinações de fármacos com diferentes mecanismos de ação e, conseqüentemente, diferentes potenciais de resistência dificulta o surgimento de células não sensíveis à terapia, aumentando as chances de controle ou de cura da neoplasia (FUCHS; WANNMACHER & FERREIRA, 2006).

2.6. Chalconas e sua Relação com Antitumorais

Na literatura registra-se que algumas chalconas, flavonas e flavanonas sintéticas apresentaram atividade *in vitro* contra algumas células tumorais (CABRERA *et al.*, 2007).

Entretanto, as chalconas que previamente eram conhecidas por sua ação antioxidante, foram submetidas a investigações com o objetivo de avaliar a sua capacidade de modular o balanço entre a produção de espécies oxigênio-reativas e tióis intracelulares (como a GSH) (VINCENZO *et al.*, 2000).

Recentemente foi reportada a síntese de dez análogos de chalconas, sendo que dois compostos (**17** e **18**) (Figura 9) apresentaram significativa atividade citotóxica em linhagens de células tumorais de mama MDA-MB 231 e MCF-7 ADRr. Estas linhagens foram sensíveis ao efeito antiproliferativo dos análogos (**17** e **18**) em concentrações micro molares. Após o cálculo de IC_{50} o composto (**17**) foi considerado o mais ativo ($IC_{50}=1,2\mu M$ e $2,2\mu M$ para MDA-MB 231 e MCF-7 ADRr, respectivamente). Seguido em ordem decrescente pelo composto (**18**) ($IC_{50}=1,9\mu M$ e $2,8\mu M$ para MDA-MB 231 e MCF-7 ADRr, respectivamente) (VINCENZO *et al.*, 2000).

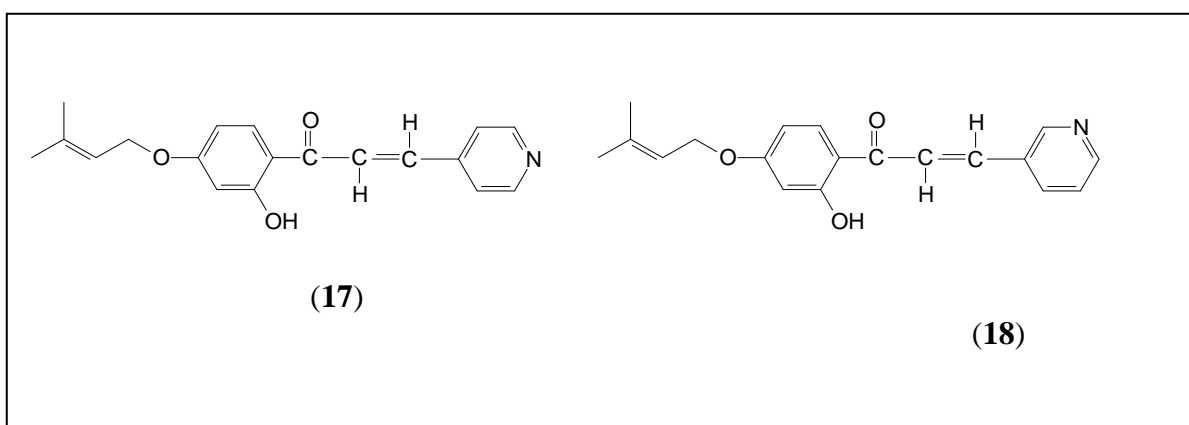


Figura 9. Estrutura química de análogos de chalconas que apresentaram atividade citotóxica contra o câncer de mama.

No estudo realizado *in vivo*, o composto (**19**) (Figura 10) apresentou atividade antitumoral frente às células neoplásicas de L1210 (leucemia), resistente a vimblastina, e melanoma B₁₆. Em relação à leucemia o composto (**19**) apresentou $IC_{50}= 1 \mu M$. Doses elevadas de vimblastina são consideradas tóxicas e moléculas análogas podem ser projetadas com o auxílio dos estudos de QSAR (EDWARDS; STEMERICK & SUNKARA, 1990).

Dessa forma, estudos mais sistemáticos da relação estrutura-atividade são de fundamental importância para que se possa entender e esclarecer melhor o efeito das propriedades eletrônicas e estruturais dos compostos na avaliação da atividade citotóxica (JHA *et al.*, 2007).

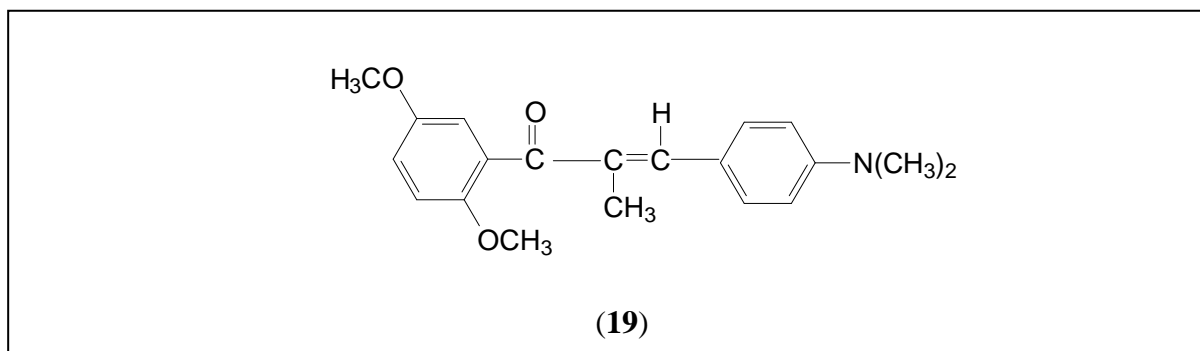


Figura 10. Estrutura química da chalcona com atividade antitumoral *in vivo*.

A síntese de uma série de chalconas substituídas com atividade citotóxica verificada *in vitro* frente às células K562 (leucemia) foi relatada recentemente. Desta série, foram obtidas sete chalconas com IC_{50} menor do que $1 \mu M$. Destas, o composto (20) (Figura 11) foi o mais ativo, apresentando valor de $IC_{50} = 0,03 \mu M$ e interrompendo o ciclo celular entre a fase G_2 e fase M (LAWRENCE *et al.*, 2001).

Em geral a atividade citotóxica é altamente dependente das substituições nos anéis aromáticos, sendo que as chalconas metoxiladas apresentam elevada citotoxicidade (DUCKI *et al.*, 2009). Estudos conduzidos por Reddy *et al.* (2008) e Xia *et al.* (2000) relatam a grande importância da presença do grupo metoxi como substituinte no anel, caracterizada pelo aumento significativo da atividade citotóxica destes compostos.

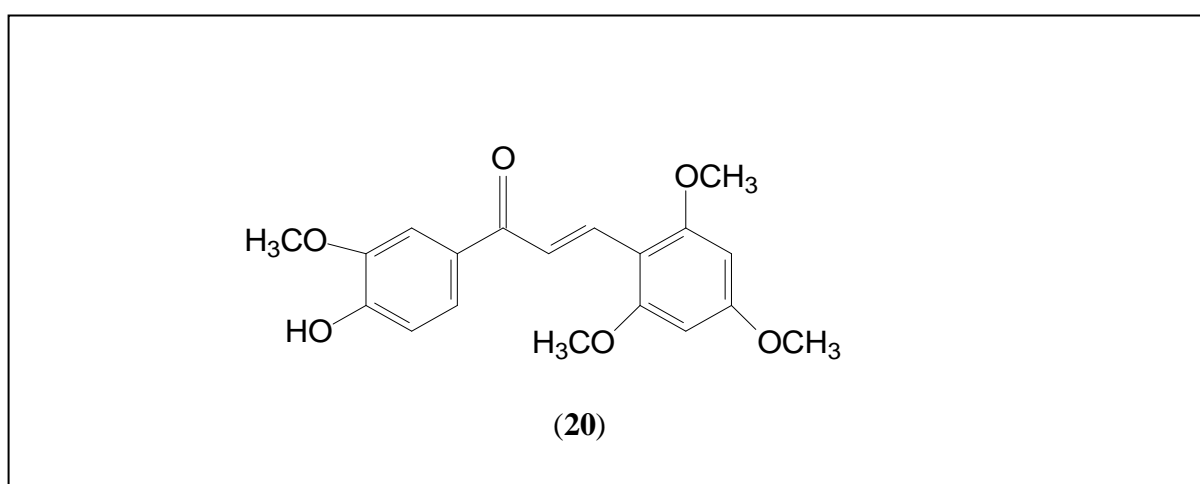


Figura 11. Estrutura química da chalcona substituída com atividade citotóxica frente às células K562 (leucemia).

De acordo com dados da literatura as chalconas podem agir através de diversos mecanismos tais como apoptose, interferências na fase mitótica do ciclo celular (NAM *et al.*, 2004), modulação da glicoproteína P e atividade redox, mas novos estudos ainda se fazem necessários para esclarecer melhor estes mecanismos (VINCENZO *et al.*, 2000; ECHEVERRIA *et al.*, 2004; YE *et al.*, 2005) pois a lipofilicidade dos anéis A e B também pode afetar a citotoxicidade através de substituintes polares que dificultam a passagem dos compostos pela membrana lipídica de células cancerígenas (WON *et al.*, 2005; JHA *et al.*, 2007).

Um grande número de chalconas tem apresentado atividade citotóxica e propriedades tumorais devido a sua reatividade com os grupos tióis intracelulares (GSH) (NAM *et al.*, 2004; JHA *et al.*, 2007).

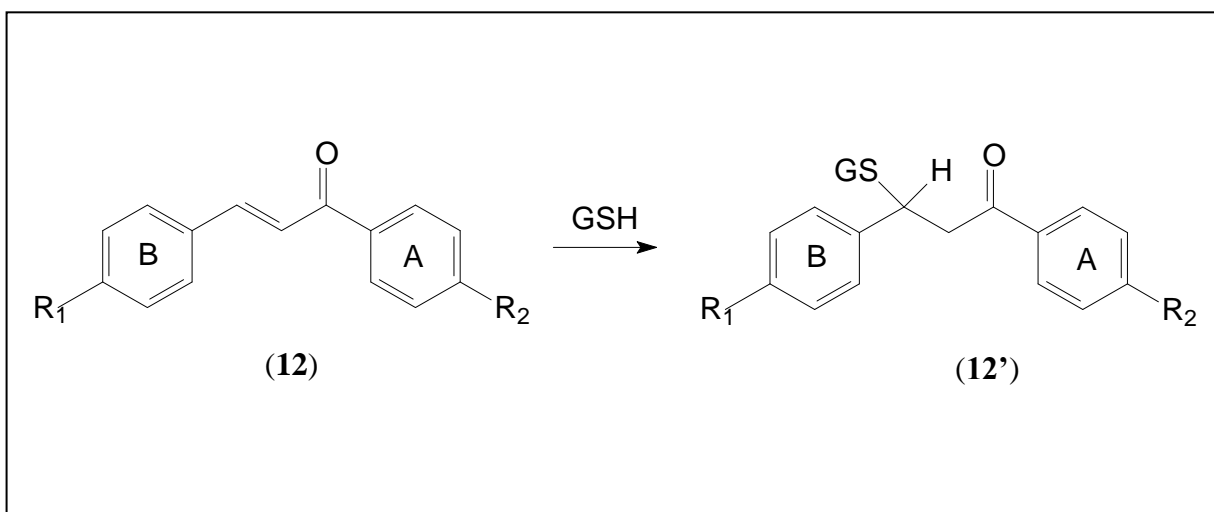


Figura 12. Reação do seqüestro da glutathiona (nucleófilo bio-orgânico) pela chalcona (12) (Adaptada de DIMMOCK *et al.*, 1998; NAM *et al.*, 2004).

A inibição do crescimento tumoral envolve a adição nucleofílica a cetonas α,β -insaturadas de reagentes nucleofílicos bio-orgânicos, como a glutathiona (GSH) através de uma adição conjugada ao carbono β do acceptor (Figura 12), que é chamada de adição de Michael (MATTOS & MARZORATI, 1999; DIMMOCK *et al.*, 1998; NAM *et al.*, 2004; SOLOMONS & FRYHLE, 2009; VIA *et al.*, 2009).

Esta reação demonstra que a presença da dupla ligação nas chalconas é essencial para a sua atividade antitumoral (XIA *et al.*, 2000).

2.7. Doenças Ósseas

A osteoporose é um problema de saúde pública crescente que acomete principalmente mulheres e homens idosos sendo definida como a redução da massa óssea a um nível suficiente para torná-lo frágil e vulnerável a fraturas. As causas mais comuns de osteoporose são a deficiência de estrógeno na pós-menopausa e a deterioração da homeostasia óssea relacionada à idade (BRUNTON; LAZO & PARKER, 2006; BOGLIOLO, 2006; RANG *et al.*, 2007), mas pode ocorrer também devido a outros fatores como excesso de tiroxina e administração de glicocorticóides por longo tempo (RANG *et al.*, 2007; YASUDA *et al.*, 2005).

Os agentes farmacológicos utilizados no tratamento da osteoporose atuam diminuindo a taxa de reabsorção óssea, retardando, assim, a taxa de perda óssea ou promovendo a formação óssea (BRUNTON; LAZO & PARKER, 2006), porém apresentam baixa eficácia e diversos efeitos adversos e dessa forma tem-se uma necessidade por medicamentos mais eficazes e menos tóxicos (YASUDA *et al.*, 2005).

O osso é continuamente remodelado e este processo de remodelagem óssea envolve principalmente a atividade de dois tipos celulares, que são os osteoblastos que secretam a nova matriz óssea e os osteoclastos que a reabsorvem (RANG *et al.*, 2007; LECAILLE *et al.*, 2008).

A artrite reumatóide (AR) é outro exemplo de doença óssea e se apresenta como uma doença inflamatória crônica, recidivante e sistêmica, de natureza auto-imune e mantida por mecanismos inflamatórios celulares que se caracterizam pela destruição progressiva da cartilagem articular, com diminuição gradual de proteoglicanos e colágeno tipo II (BOGLIOLO, 2006; YASUDA *et al.*, 2005; LECAILLE *et al.*, 2008). Acomete o tecido conjuntivo de vários órgãos, podendo resultar muitas vezes na destruição das articulações. Admite-se que cerca de 1% da população mundial sofra de AR, sendo mais frequente em mulheres do que em homens (BOGLIOLO, 2006).

2.8. Catepsinas como Alvo Terapêutico

As catepsinas (Figura 13) estão classificadas de acordo com suas características estruturais e catalíticas, sendo distribuídas entre as famílias das aspartil peptidases (catepsinas

D e E), serino peptidases (catepsinas A e G) e cisteíno peptidases (catepsinas B, C, F, H, K, L, O, S, V, W e X) (TURK *et al.*; 2000; VASILJEVA & TURK, 2008; REISER; ADAIR & REINHECKEL, 2010).

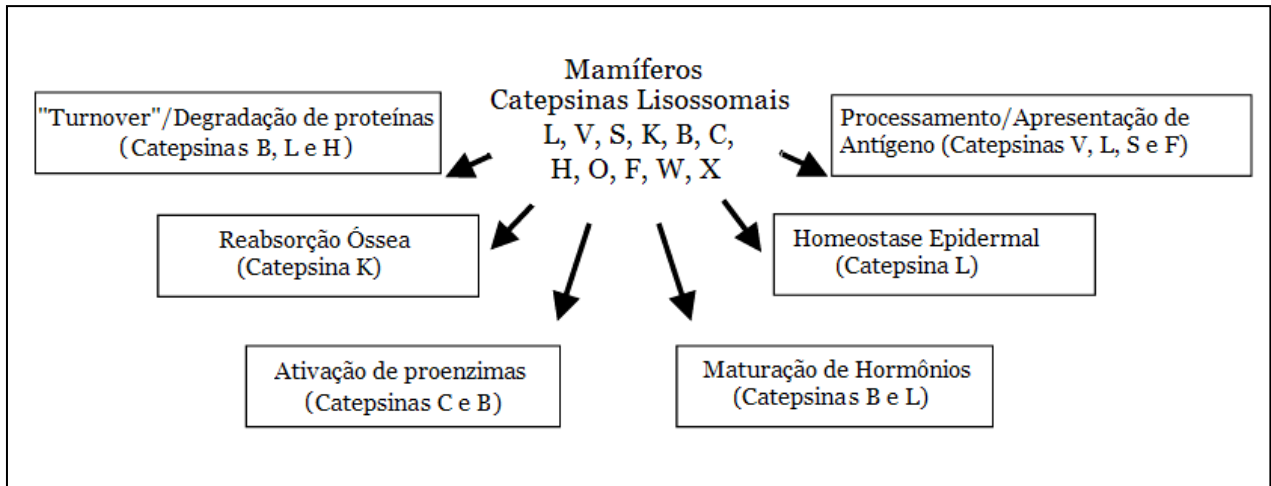


Figura 13. Papéis fisiológicos das cisteíno proteases humanas.

Cisteíno peptidases, catepsinas, são enzimas proteolíticas que residem em vesículas endolisossomais, podendo também ser encontradas em compartimentos extracelulares e eficientemente capazes de clivar uma grande variedade de substratos (WATSON & KREUZALER, 2009). Apesar de estas enzimas apresentarem estruturas topográficas totais semelhantes, cada catepsina possui características únicas que determinam sua especificidade (LECAILLE *et al.*, 2008). O alto potencial destrutivo das cisteíno peptidases lisossomais é regulado por inibidores protéicos endógenos e alterações do conteúdo enzimático ou dos inibidores podem resultar em diversas patologias que envolvem estados de remodelação tecidual (TURK *et al.*, 1997; KUESTER *et al.*, 2008). Assim, as catepsinas estão envolvidas em diversos processos fisiológicos e sua excessiva expressão pode desencadear várias doenças como osteoporose, artrite reumatóide, aterosclerose e câncer (VASILJEVA & TURK, 2008; REISER; ADAIR & REINHECKEL, 2010).

As catepsinas B e K, dois importantes membros das proteases lisossomais, são proteínas de 30 e 27 kDa, respectivamente, e estão envolvidas em diversas patologias tais como câncer e doenças ósseas (ZENG *et al.*, 2006). Apesar de pertencerem à mesma família das cisteíno peptidases, as catepsinas B e K possuem baixa similaridade (identidade de 24 % da seqüência de aminoácidos) ocasionando assim certa seletividade de seus inibidores (LECAILLE *et al.*, 2008).

Inibidores enzimáticos são substâncias capazes de reduzir a velocidade de reações enzimáticas. As reações bioquímicas catalisadas pelas enzimas ocorrem em geral pela associação da mesma ao seu substrato, formando um complexo chamado enzima-substrato (COPELAND, 2005).

Diversos compostos peptídicos têm sido descritos como inibidores de catepsinas, tais como as cistatinas e leupeptidinas, entretanto essas moléculas apresentam pobres propriedades farmacocinéticas (ZENG *et al.*, 2006). Inibidores irreversíveis não são considerados candidatos a fármacos viáveis para o tratamento das doenças crônicas, pois apesar da alta potência e seletividade, eles apresentam diversos efeitos adversos e se ligam de forma covalente a enzima (YASUDA *et al.*, 2005). Dessa forma, é crescente a busca por inibidores enzimáticos específicos, principalmente reversíveis e não-peptídicos, que potencialmente poderiam vir a ser usados no tratamento dessas doenças (TURK *et al.*, 2002; JEONG *et al.*, 2004; ZENG *et al.*, 2006).

2.8.1. Catepsina B e Processos Cancerígenos

A catepsina B tem sido alvo de constantes estudos que visam um melhor entendimento dos processos de remodelação tecidual, evolução tumoral e metástases (MIGNATTI & RIFKIN, 1993; VASILJEVA *et al.*, 2006). Esta catepsina se destaca entre os membros das cisteíno peptidases, podendo se apresentar tanto como uma endopeptidase como uma exopeptidase (MORT & BUTTLE, 1997; ZENG *et al.*, 2006; LECAILLE *et al.*, 2008). A elevação dos níveis dessa enzima tem sido relatada em diversos tipos cancerígenos e está particularmente bem documentada em carcinomas de colón, mama, pâncreas, próstata e cérebro (SLOANE *et al.*, 1986; TURK *et al.*, 2002; EIJÁN *et al.*, 2003; KUESTER *et al.*, 2008), entretanto além do lisossomo, a catepsina B também tem sido localizada na membrana plasmática de células tumorais (GUINEC *et al.*, 1992; MOIN *et al.*, 1998).

Estudos sobre a progressão do câncer correlacionados aos níveis de catepsina B, têm mostrado que essa enzima freqüentemente aparece elevada na maioria dos tumores malignos em estágios invasivos, quando comparada aos tecidos normais ou até mesmo a tumores benignos (IACOBUZIO-DONAHUE *et al.*, 1997; SZPADERSKA & FRANKFATER, 2001) e também parece estar envolvida em alguns processos inflamatórios (EIJÁN *et al.*, 2003).

A catepsina B é responsável pelo rompimento das células cancerosas e o conseqüente espalhamento do material tumoral na corrente sanguínea, levando a disseminação do câncer pelo organismo (LIM *et al.*, 2004). O aumento dos níveis dessa enzima está relacionado a um mau prognóstico em pacientes com câncer (VIGNESWARAN *et al.*, 2000; SEVENICH *et al.*, 2011). Sendo assim, a catepsina B é considerada um alvo importante no processo de intervenção do câncer e o desenvolvimento de inibidores específicos pode ser uma fonte promissora para possíveis novos medicamentos antineoplásicos utilizados na terapia oncológica (TURK *et al.*, 2002; VASILJEVA *et al.*, 2006; LIM *et al.*, 2004).

2.8.2. Catepsina K e Doenças Ósseas

A catepsina K é uma protease lisossomal predominantemente secretada por macrófagos ativos e osteoclastos, implicando na reabsorção óssea e sendo um alvo terapêutico atrativo para o tratamento de osteoporoses e artrite reumatóide (CHAPPARD *et al.*, 2010; BARASCUK *et al.*, 2010; MA *et al.*, 2007; ZHAO *et al.*, 2009). Esta enzima atua na degradação do colágeno tipo I, que é o componente predominante da matriz óssea extracelular (cerca de 90%) (YASUDA *et al.*, 2005; ZENG *et al.*, 2006; LECAILLE *et al.*, 2008; ZHAO *et al.*, 2009). Em contraste com outras proteases, a catepsina K é capaz de clivar o colágeno em vários pontos dando origem assim a pequenos peptídeos (LECAILLE *et al.*, 2008).

Estudos recentes têm demonstrado que inibidores inespecíficos de cisteíno proteases, que também se apresentam como ativos para a catepsina K reduziram significativamente a reabsorção óssea em modelos *in vitro* e *in vivo* (JEONG *et al.*, 2004; ZENG *et al.*, 2006). Tendo em vista a necessidade de investigação de novos inibidores potentes e seletivos para as catepsinas, Patil & Colaboradores (2002) realizaram um screening de extratos de produtos naturais para avaliar a presença de possíveis inibidores da catepsina K e relataram o isolamento de três flavonóides da planta *Artocarpus altilis* (Moraceae), dentre eles uma dihidrochalcona dimérica (**21**, Figura 14) que se apresentou como potente inibidor da catepsina K com IC₅₀ de 98 nM (PATIL *et al.*, 2002).

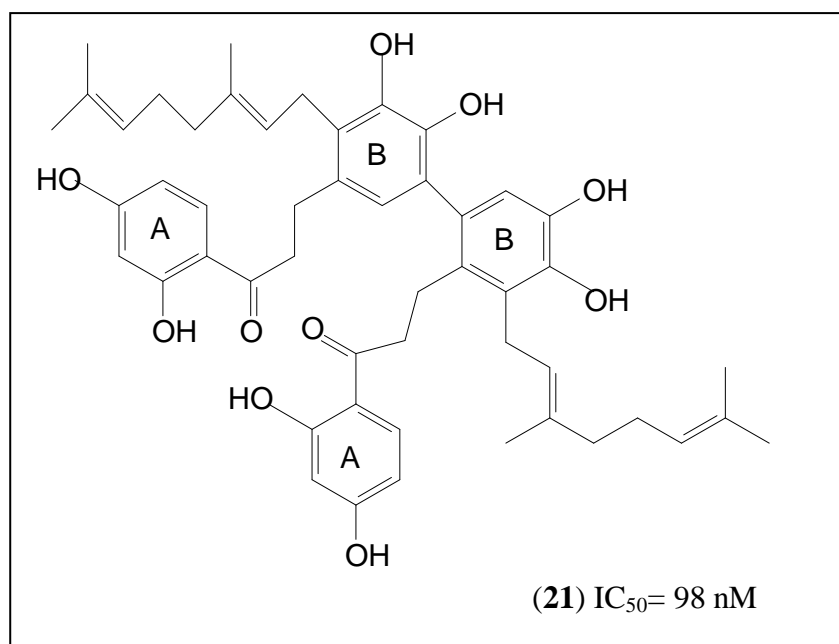


Figura 14: Dihidrochalcona dimérica (21) da *Artocarpus altilis* inibidor da catepsina K.

Dessa forma, o desenvolvimento de inibidores específicos desta enzima pode levar a novas fontes de tratamento para doenças que envolvam o fenômeno da reabsorção óssea excessiva (ZENG *et al.*, 2006).

O importante papel desempenhado pela catepsina K na reabsorção óssea faz dessa enzima um alvo interessante para as indústrias farmacêuticas. Recentemente a empresa Merck divulgou estudos clínicos de fase III com um inibidor específico da catepsina K denominado odanacatibe (22, Figura 15). Este pode ser administrado de forma oral, possui $IC_{50} = 0,20 \text{ nM}$ e encontra-se em desenvolvimento para o tratamento da osteoporose em mulheres com pós-menopausa (STOCH *et al.*, 2009; ISABEL *et al.*, 2010).

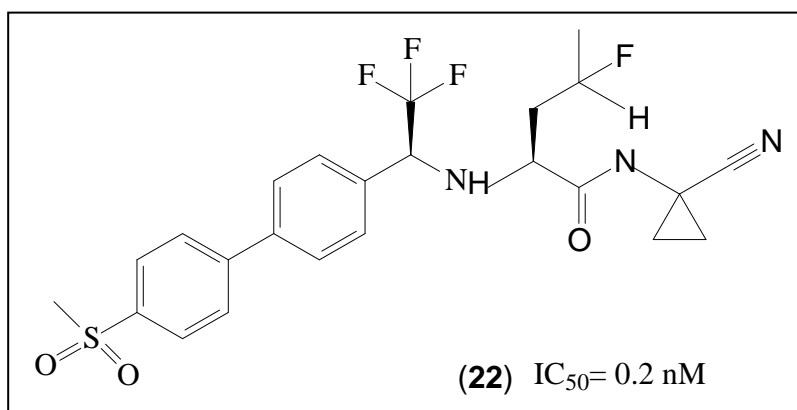


Figura 15: Odanacatibe (22).

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1. Materiais e Métodos

3.1.1. Reagentes e Soluções

Utilizados na síntese dos compostos derivados de chalconas:

- Acetofenona 99% (Fluka ®)
- HCl 37% (Vetec ®)
- 2,4-dimetoxibenzaldeído 98% (Sigma ®)
- 3,4-dimetoxibenzaldeído 99% (Sigma ®)
- H₂SO₄ concentrado (Vetec ®)
- KOH 85% (Vetec ®)
- NaOH 15% (Vetec ®)
- Na₂SO₄ anidro (Vetec ®)
- *p*-clorobenzaldeído 97% (Fluka®)
- *p*-fluorbenzaldeído 98% (Fluka ®)
- *p*-hidroxibenzaldeído 99% (Acros Organics ®)
- *p*-metoxibenzaldeído 99% (Acros Organics ®)
- *p*-nitrobenzaldeído 99% (Acros Organics ®)
- *p*-nitroacetofenona 99% (Sigma ®)
- Piperonaldeído 99% (Fluka ®)

3.2. Solventes

Foram utilizados solventes comerciais Cromoline®, Vetec®, Labsynth® e outros destilados no Departamento de Química da UFSCar para realização das reações.

Os solventes deuterados acetona e clorofórmio usados para obtenção dos espectros de RMN foram obtidos da Merck e Aldrich.

3.3. Cromatografia em camada delgada (CCD)

Utilizada para monitoração das reações:

- Cromatoplaça de sílica gel 60 HF254 em alumínio (Merck ®).

3.4. Reveladores

- Câmara de radiação na região do UV (254 e 360nm)
- Vanilina em ácido sulfúrico (Fluka ®)

3.5. Equipamentos

3.5.1. Cromatógrafo Gasoso

A análise por CG foi realizada no equipamento VARIAN 3900, utilizando-se a coluna FactorFour VF-1 MS (15 m x 0,25 mm), espessura do filme de 0,25 μm e diâmetro interno de 0,25 mm. A temperatura do injetor foi mantida a 250°C e a do detector (ionização em chama) a 300°C. O volume de injeção foi de 0,5 μL da amostra solubilizada em metanol grau HPLC. O fluxo de nitrogênio usado como gás de arraste foi de 1 mL/min e a relação de splitter foi de 50. O forno foi mantido em 100°C durante 2 minutos e a seguir foi aquecido a uma taxa de 20°C/min até 350°C e mantido nesta temperatura durante 5 minutos.

3.5.2. Espectrômetro de Infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram registrados num equipamento MOBEM modelo M102 com transformada de Fourier e calibração interna e no Spectrum 100 da Perkin Elmer. As amostras foram incorporadas em pastilhas de KBr e as absorções estão expressas em número de ondas (cm^{-1}).

3.5.3. Espectrômetro de Massas acoplado ao Cromatógrafo Gasoso (CG-EM)

Os espectros de massa foram obtidos num equipamento CGEM-QP 2000 da Shimadzu (do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da COPPE/UFRJ), no modo scann e com temperatura da fonte de íons e da interface em 250°C. Em relação à técnica de injeção foi usada introdução direta de amostras no espectrômetro de massas. Para amostras com grupo nitro na composição foi utilizada programação do DI de 50-200 °C a 10°C/min, de 200-350°C a 20°C/min e permaneceu a 350°C por 5 min. Para amostras sem o grupo nitro na composição foi utilizada programação do DI de 50-200°C a 5°C/min, de 200-350°C a 40°C/min, permanece a 350°C por 5 min. Os fragmentos foram expressos pela razão entre unidades de massa e carga (m/z) e a abundância relativa dos picos em porcentagem (%).

3.5.4. Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H foram obtidos em aparelhos BRUKER modelo DRX 400 MHz de 9,4 Tesla (pertencente à UFSCar) e modelo AV II 500 MHz de 11,75 Tesla (pertencente à UFG). Os deslocamentos químicos (δ) estão expressos em parte por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz) em relação a um padrão interno de tetrametilsilano (TMS).

3.5.5. Espectrofluorímetro

Leitor de placa de ELISA Molecular Devices Corporation - Spectra MAX GEMINI-XS.

3.5.6. Aparelho de Ponto de Fusão

Micro Química Ind. e Com. Ltda. Modelo MQAPF-301.

3.6. Síntese dos Derivados de Chalconas

3.6.1. Síntese da chalcona (*E*)-3-(4-hidroxifenil)-1-(4-nitrofenil)-2-propen-1-ona (23)

Foram utilizados *p*-nitroacetofenona (0,330 g/ 2,0 mmol) e *p*-hidroxibenzaldeído (0,244 g/ 2,0 mmol) dissolvidos em metanol (15 mL) e quantidade catalítica de H₂SO₄ concentrado. A reação foi mantida sob refluxo a 64°C por 24 horas sendo acompanhada por CCD. Após o término da reação neutralizou-se com NaOH 15% até pH neutro. A fase orgânica foi extraída com AcOEt, seca com Na₂SO₄ anidro e evaporada (SEO *et al.*, 2005). O produto formado foi recristalizado em metanol. Características físico-química: p.f.: 201-204°C (lit. p. f.: 204-205°C segundo GUSAK & KOSLOV, 2003).

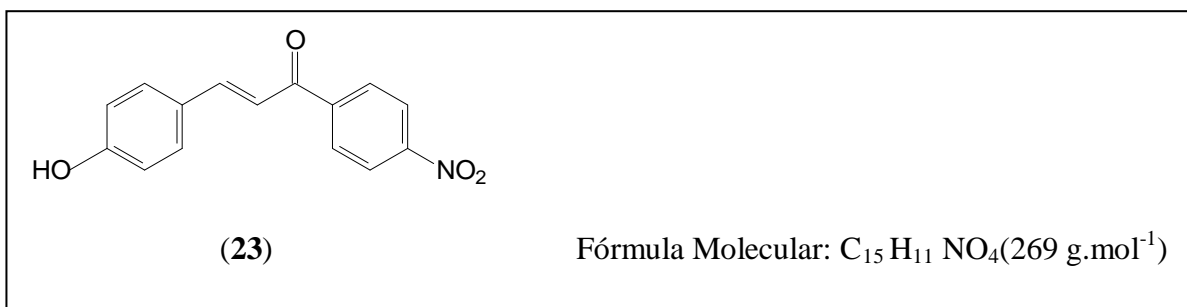


Figura 16. Estrutura química da chalcona (*E*)-3-(4-hidroxifenil)-1-(4-nitrofenil)-2-propen-1-ona (23).

3.6.2. Síntese da chalcona (*E*)-3-(4-hidroxifenil)-1-fenil-2-propen-1-ona (24)

Foram utilizados acetofenona (0,233 mL/ 2,0 mmol) e *p*-hidroxibenzaldeído (0,244 g/ 2,0 mmol) dissolvidos em metanol (15 mL) e quantidade catalítica de H₂SO₄ concentrado. A reação foi mantida sob refluxo a 64°C por 24 horas sendo acompanhada por CCD. Após o término da reação neutralizou-se com NaOH 15% até pH neutro. A fase orgânica foi extraída com AcOEt, seca com Na₂SO₄ anidro e evaporada (SEO *et al.*, 2005). O produto formado foi recristalizado em metanol. Características físico-químicas: p.f.: 185-187 °C (lit. p. f.: 187-188 °C segundo SEO *et al.*, 2005).

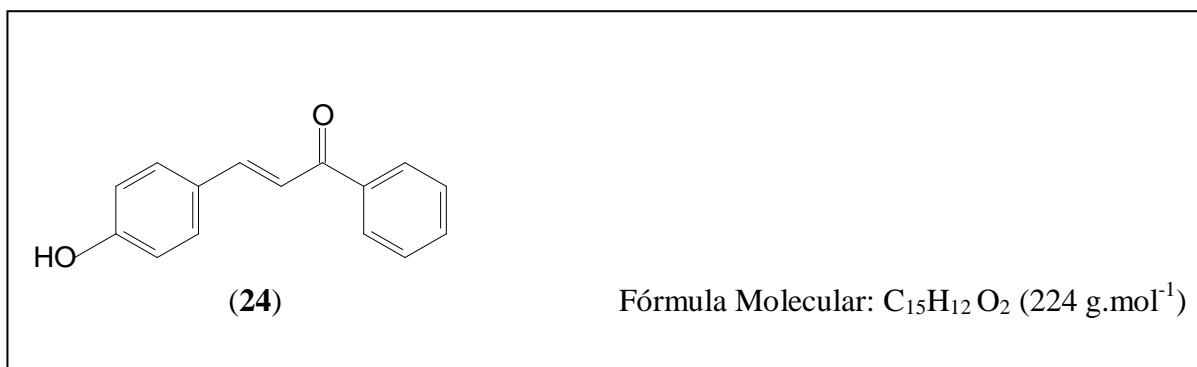


Figura 17. Estrutura química da chalcona (*E*)-3-(4-hidroxifenil)-1-fenil-2-propen-1-ona (24).

3.6.3. Síntese da chalcona (*E*)-1,3-bis(4-nitrofenil)-2-propen-1-ona (25)

Foram utilizados *p*-nitroacetofenona (0,330 g/ 2,0 mmol) e *p*-nitrobenzaldeído (0,302 g/ 2,0 mmol) dissolvidos em 15 mL de metanol na presença de uma solução de KOH 20%. A reação foi mantida em banho de gelo sendo acompanhada por CCD e apresentou um tempo reacional de 3 horas. Observou-se a formação do precipitado (amarelo) que foi filtrado e recristalizado em metanol. Características físico-químicas: p.f.: 161-165 °C (lit. p. f.: 164-166°C segundo WEI *et al.*, 2005).

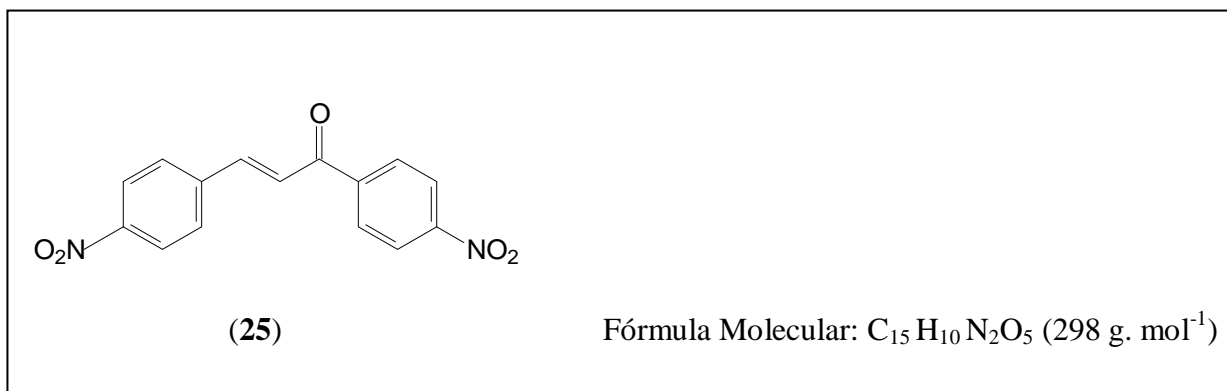


Figura 18. Estrutura química da chalcona (*E*)-1,3-bis (4-nitrofenil)-2-propen-1-ona (25).

3.6.4. Síntese da chalcona (*E*)-3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-fenil-2-propen-1-ona (26)

Foram utilizados acetofenona (0,233 mL/ 2,0 mmol) e piperonaldeído (0,300 g/ 2,0 mmol) dissolvidos em 15 mL de metanol na presença de uma solução de KOH 20%. A reação

foi mantida sob agitação em temperatura ambiente, sendo acompanhada por CCD e apresentou um tempo reacional de 3 horas. Observou-se a formação do precipitado (amarelo claro) que foi filtrado e recristalizado em metanol. Características físico-químicas: p.f.:116-117 °C (lit. p.f.: 117 °C segundo LI *et al.*,2002).

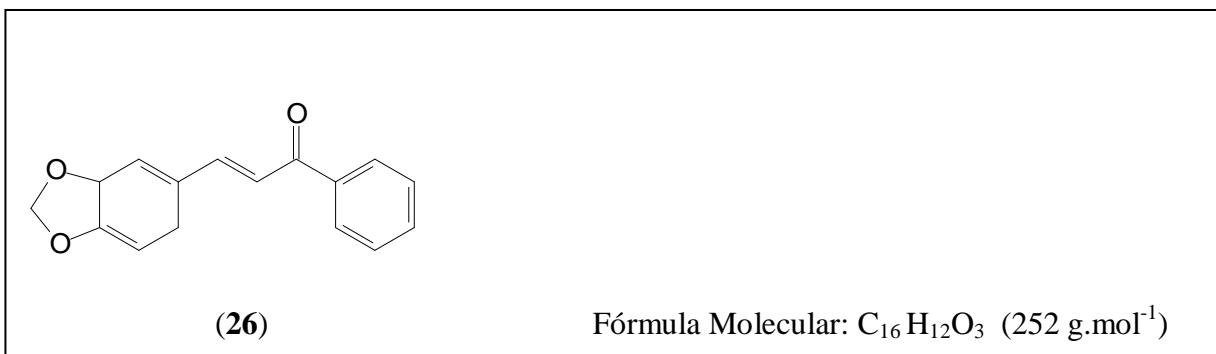


Figura 19. Estrutura química da chalcona (*E*)-3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-fenil-2-propen-1-ona (26).

3.6.5. Síntese da chalcona (*E*)-3-(4-clorofenil)-1-(4-nitrofenil)-2-propen-1-ona (27)

Foram utilizados *p*-nitroacetofenona (0,330 g/ 2,0 mmol) e *p*-clorobenzaldeído (0,281 g/ 2,0 mmol) dissolvidos em 15 mL de metanol na presença de uma solução de KOH 20%. A reação foi mantida sob agitação em temperatura ambiente, sendo acompanhada por CCD e apresentou um tempo reacional de 3 horas. Observou-se a formação do precipitado (amarelo claro) que foi filtrado e recristalizado em metanol. Características físico-químicas: p.f.: 163-165 °C (lit. p. f. : 162-163 °C segundo KOZLOV *et al.*,1976).

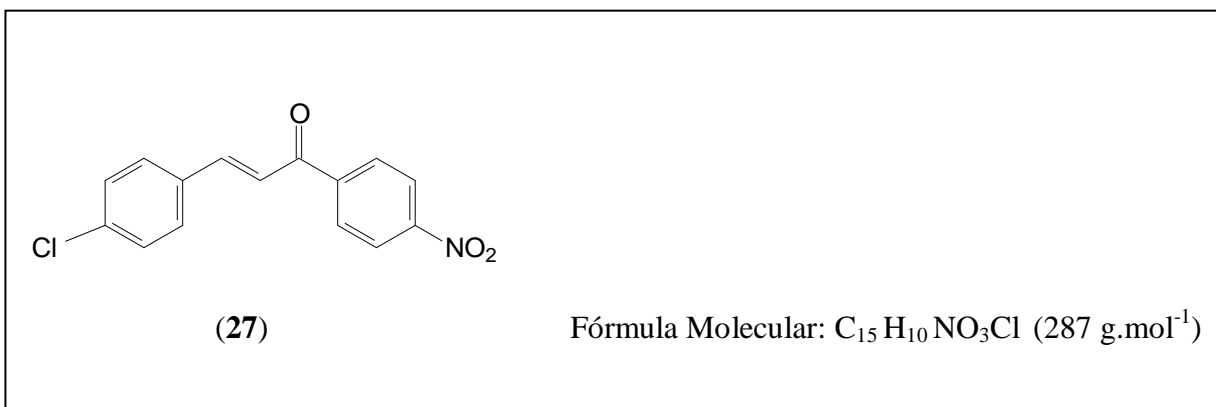


Figura 20. Estrutura química da chalcona (*E*)-3-(4-clorofenil)-1-(4-nitrofenil)-2-propen-1-ona (27).

3.6.6. Síntese da chalcona (*E*)-3-(4-fluorfenil)-1-fenil-2-propen-1-ona (28)

Foram utilizados acetofenona (0,233 mL/ 2,0 mmol) e *p*-fluorbenzaldeído (0,214 mL/ 2,0 mmol) dissolvidos em 15 mL de metanol na presença de uma solução de KOH 20%. A reação foi mantida sob agitação em temperatura ambiente, sendo acompanhada por CCD e apresentou um tempo reacional de 4 horas. Observou-se a formação do precipitado (amarelo) que foi filtrado e recristalizado em metanol. Características físico-químicas: p.f.: 85-88 °C (lit. p. f.: 85-87 °C segundo SHABAROV *et al.*, 1965).

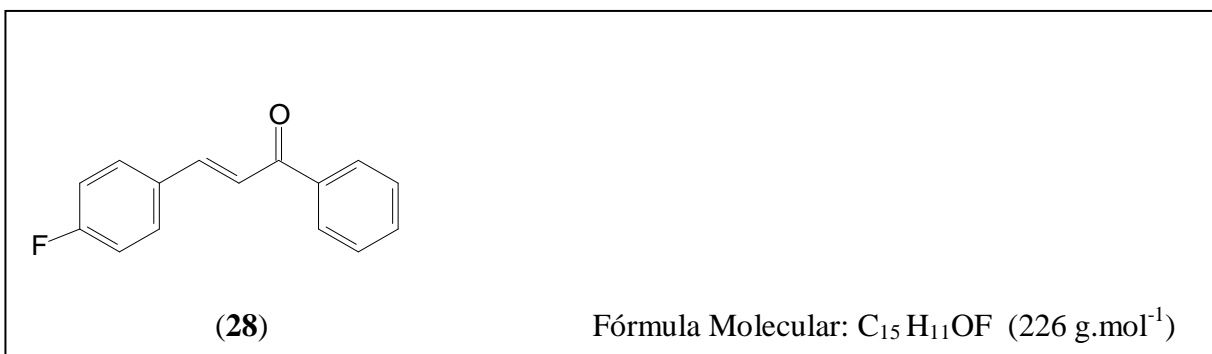


Figura 21. Estrutura química da chalcona (*E*)-3-(4-fluorfenil)-1-fenil-2-propen-1-ona (28).

3.6.7. Síntese da chalcona (*E*)-3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-(4-nitrofenil)-2-propen-1-ona (29)

Foram utilizados *p*-nitroacetofenona (0,330 g/ 2,0 mmol) e piperonaldeído (0,300 g/ 2,0 mmol) dissolvidos em 15 mL de metanol na presença de uma solução de KOH 20%. A reação foi mantida sob agitação em temperatura ambiente sendo acompanhada por CCD e apresentou um tempo reacional de 1 hora. Observou-se a formação do precipitado (amarelo claro) que foi filtrado e recristalizado em metanol. Características físico-químicas: p. f.: 206-210 °C (lit. p. f.: 206 °C segundo SAINI *et al.*, 2007)

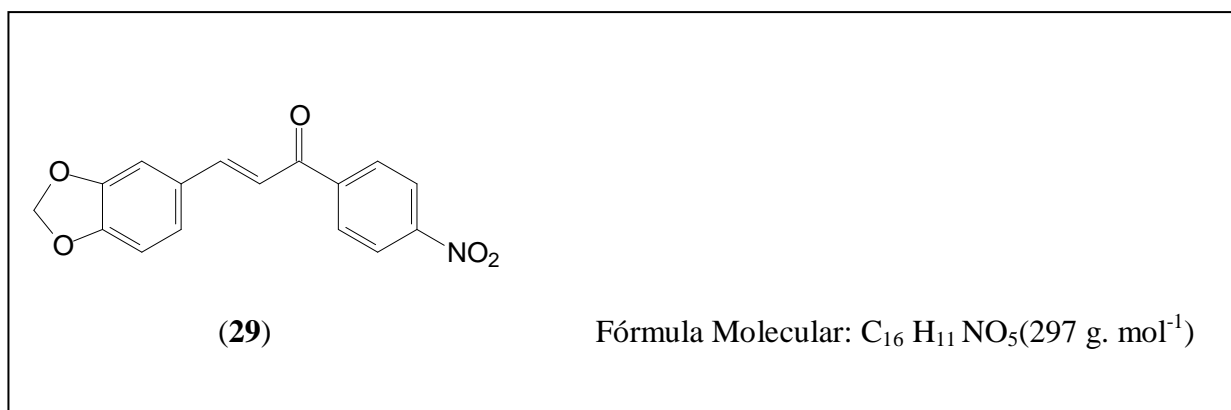


Figura 22. Estrutura química da chalcona (*E*)-3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-(4-nitrofenil)-2-propen-1-ona (29).

3.6.8. Síntese da chalcona (*E*)-3-(2,4-dimetoxifenil)-1-(4-nitrofenil)-2-propen-1-ona (30)

Foram utilizados *p*-nitroacetofenona (0,330 g/ 2,0 mmol) e 2,4-dimetóxiacetofenona (0,332 g/ 2,0 mmol) dissolvidos em 15 mL de metanol na presença de uma solução de KOH 20 %. A reação foi mantida sob agitação em temperatura ambiente, sendo acompanhada por CCD e apresentou um tempo reacional de 1 hora. Observou-se a formação do precipitado (amarelo) que foi filtrado e recristalizado em metanol. Características físico-químicas: p. f.: 177-181 °C.

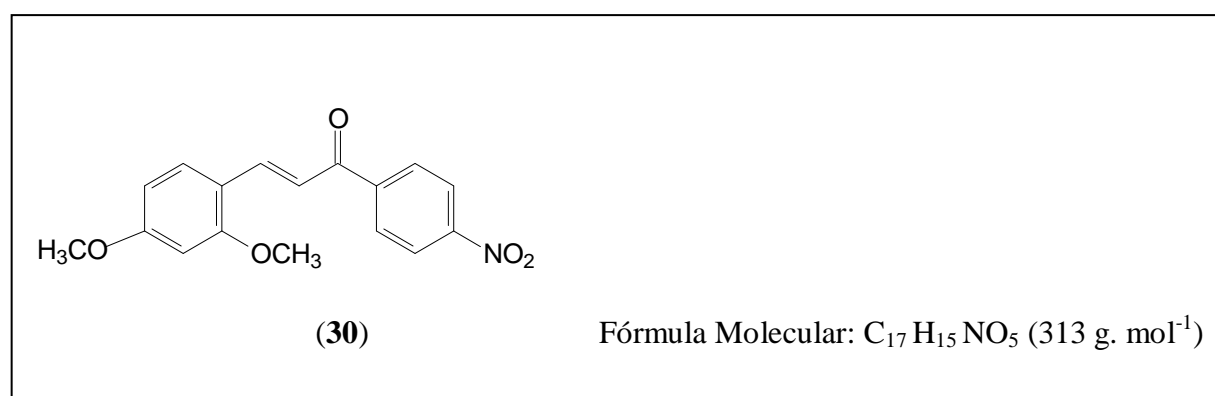


Figura 23. Estrutura química da chalcona (*E*)-3-(2,4-dimetoxifenil)-1-(4-nitrofenil)-2-propen-1-ona (30).

3.6.9. Síntese da chalcona (*E*)-3-(3,4-dimetoxifenil)-1-(4-nitrofenil)-2-propen-1-ona (31)

Foram utilizados *p*-nitroacetofenona (0,330 g/ 2,0 mmol) e 3,4-dimetóxiacetofenona (0,332 g/ 2,0 mmol) dissolvidos em 15 mL de metanol na presença de uma solução de KOH

20 %. A reação foi mantida sob agitação em temperatura ambiente, sendo acompanhada por CCD e apresentou um tempo reacional de 3 horas. Observou-se a formação do precipitado (amarelo) que foi filtrado e recristalizado em metanol. Características físico-químicas: p. f.: 181-183 °C.

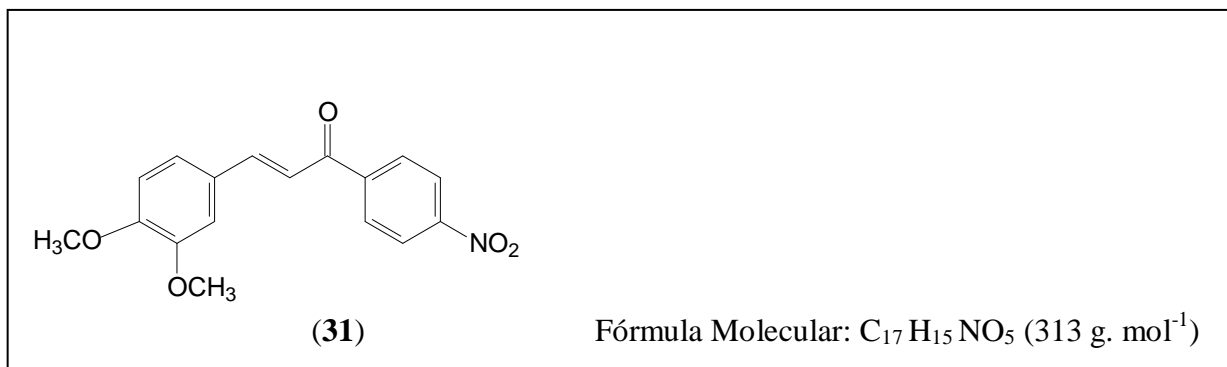


Figura 24. Estrutura química da chalcona (*E*)-3-(3,4-dimetoxifenil)-1-(4-nitrofenil)-2-propen-1-ona (31).

3.6.10. Síntese da chalcona (*E*)-3-(4-fluorfenil)-1-(4-nitrofenil)-2-propen-1-ona (32)

Foram utilizados *p*-nitroacetofenona (0,330 g/ 2,0 mmol) e *p*-fluorbenzaldeído (0,214 mL/ 2,0 mmol) dissolvidos em 15 mL de metanol na presença de uma solução de KOH 20%. A reação foi mantida sob agitação em temperatura ambiente, sendo acompanhada por CCD e apresentou um tempo reacional de 3 horas. Observou-se a formação do precipitado (amarelo) que foi filtrado e recristalizado em metanol. Características físico-químicas: p. f.: 203-206 °C.

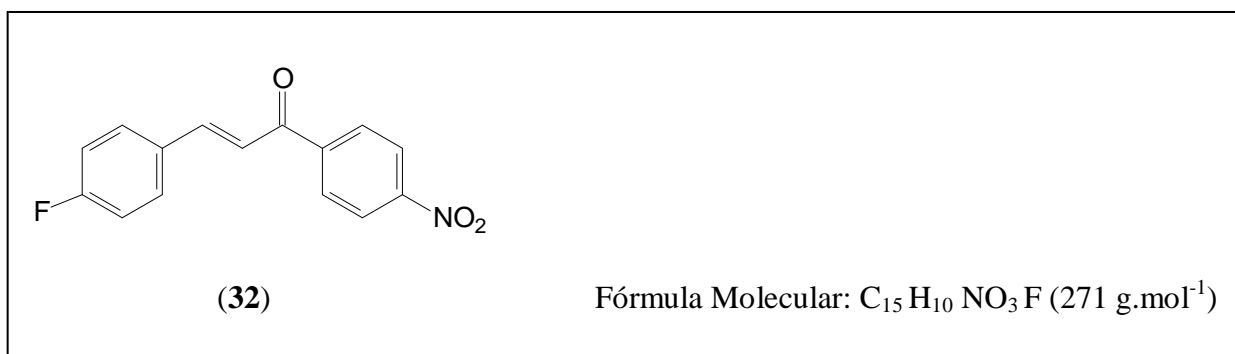


Figura 25. Estrutura química da chalcona (*E*)-3-(4-fluorfenil)-1-(4-nitrofenil)-2-propen-1-ona (32).

3.6.11. Síntese da chalcona (*E*)-3-(4-metoxifenil)-1-(4-nitrofenil)-2-propen-1-ona (33)

Foram utilizados *p*-nitroacetofenona (0,330 g/ 2,0 mmol) e *p*-metoxibenzaldeído (0,243 mL/ 2,0 mmol) dissolvidos em 15 mL de metanol na presença de uma solução de KOH 20 %. A reação foi mantida sob agitação em temperatura ambiente, sendo acompanhada por CCD e apresentou um tempo reacional de 6 horas. Observou-se a formação do precipitado (amarelo) que foi filtrado e recristalizado em metanol. Características físico-químicas: 175-177 °C (lit. p. f.: 175-177 °C segundo FALCÃO, 1968).

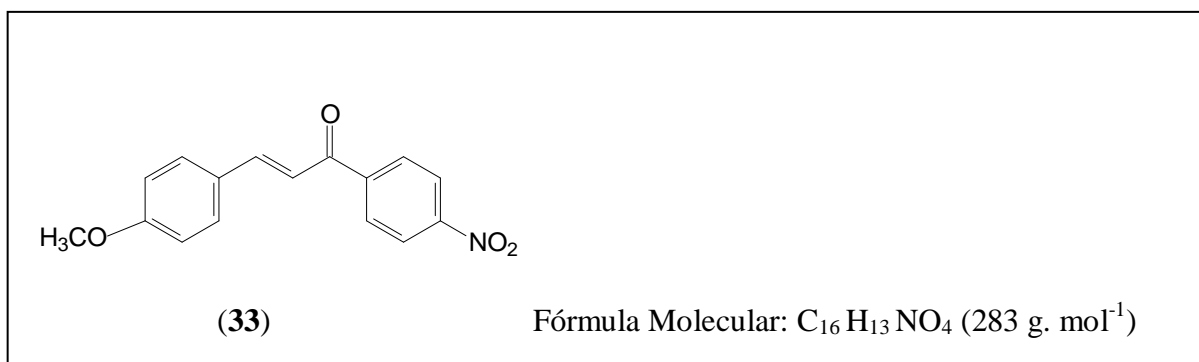


Figura 26. Estrutura química da chalcona (*E*)-3-(4-metoxifenil)-1-(4-nitrofenil)-2-propen-1-ona (33).

3.6.12. Síntese da chalcona (*E*)-3-(3,4-dimetoxifenil)-1-fenil-2-propen-1-ona (34)

Foram utilizados acetofenona (0,233 mL/ 2,0 mmol) e 3,4-dimetoxibenzaldeído (0,332 g / 2,0 mmol) dissolvidos em 15 mL de metanol na presença de uma solução de KOH 20%. A reação foi mantida sob agitação em temperatura ambiente, sendo acompanhada por CCD e apresentou um tempo reacional de 12 horas. Observou-se a formação do precipitado (amarelo) que foi filtrado e recristalizado em metanol. Características físico-químicas: p. f.: 83-84 °C (lit. p. f.: 83-84 °C segundo SILVA *et al.*, 2010).

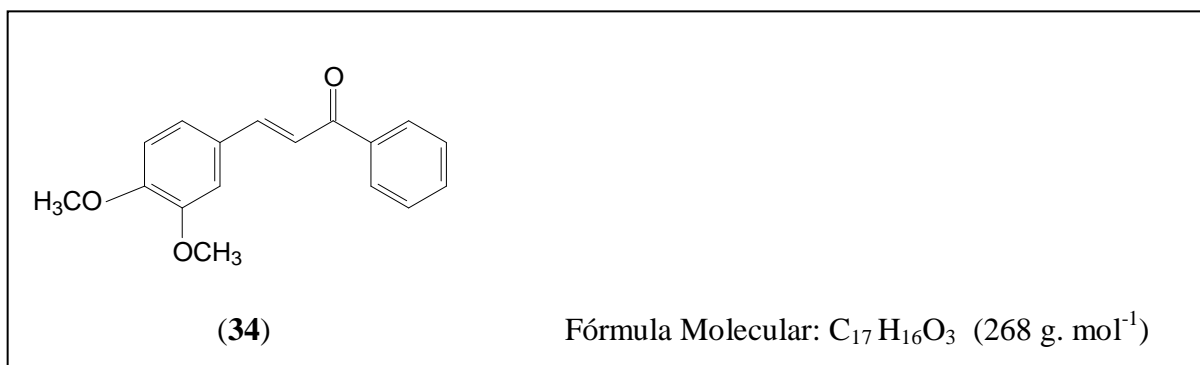


Figura 27. Estrutura química da chalcona (*E*)-3-(3,4-dimetoxifenil)-1-fenil-2-propen-1-ona (34).

3.6.13. Síntese da chalcona (*E*)-3-(4-clorofenil)-1-fenil-2-propen-1-ona (35)

Foram utilizados acetofenona (0,233 mL/ 2,0 mmol) e *p*-clorobenzaldeído (0,281 g/ 2,0 mmol) dissolvidos em 15 mL de metanol na presença de uma solução de KOH 20%. A reação foi mantida sob agitação em temperatura ambiente, sendo acompanhada por CCD e apresentou um tempo reacional de 4 horas. Observou-se a formação do precipitado (amarelo claro) que foi filtrado e recristalizado em metanol. Característica físico-química: p. f.: 94-96 °C (lit. p. f.: 97 °C segundo BONSIGNORE *et al.*, 1976).

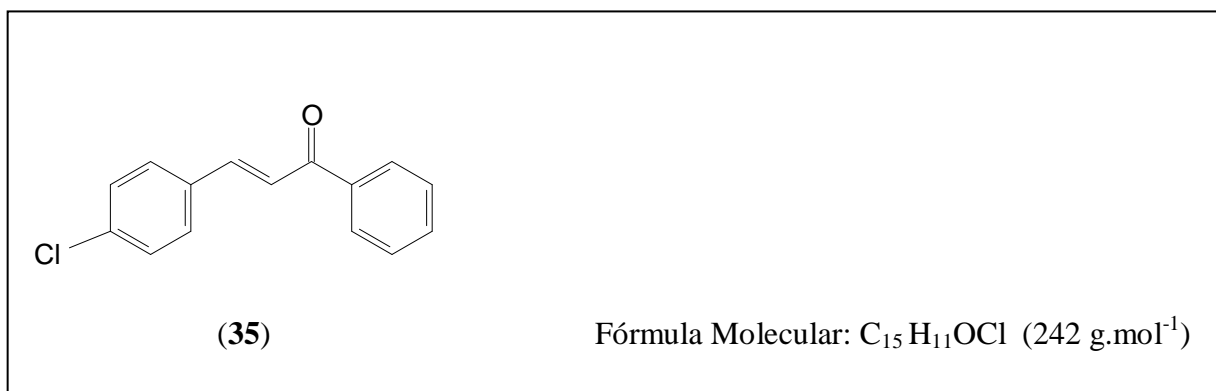


Figura 28. Estrutura química da chalcona (*E*)-3-(4-clorofenil)-1-fenil-2-propen-1-ona (35).

3.6.14. Síntese da chalcona (*E*)-3-(4-metoxifenil)-1-fenil-2-propen-1-ona (36)

Foram utilizados (0,233 mL/ 2,0 mmol) acetofenona e (0,486 mL/ 4,0 mmol) *p*-metoxibenzaldeído dissolvidos em 15 mL de metanol na presença de uma solução de KOH 10%. A reação foi mantida em refluxo a 64°C, acompanhada por CCD e apresentou um

tempo reacional de 10 horas. Após o término da reação, procedeu-se a extração. Extraiu-se com três porções de 15 mL de água e 10 mL de diclorometano. Acrescentou HCl até pH neutro. Em seguida o produto formado foi filtrado e recristalizado em metanol. Características físico-químicas: p. f.: 116-118°C (lit. p.f.: 114-116°C segundo IWATA *et al.*, 1995).

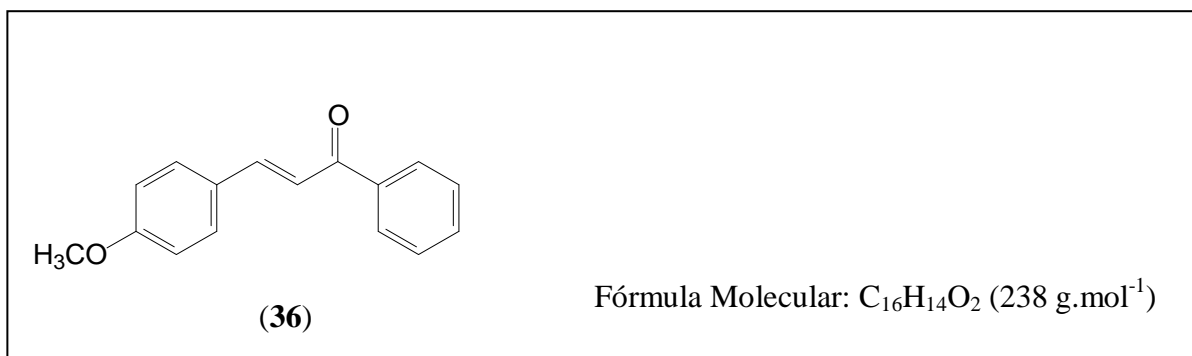


Figura 29. Estrutura química da chalcona (*E*)-3-(4-metoxifenil)-1-fenil-2-propen-1-ona (36).

3.6.15. Síntese da chalcona (*E*)-3-(4-nitrofenil)-1-fenil-2-propen-1-ona (37)

Foram utilizados (0,233 mL/ 2,0 mmol) acetofenona e *p*-nitrobenzaldeído (0,302 g/ 2,0 mmol) dissolvidos em 15 mL de metanol na presença de uma solução de KOH 10%. A reação foi mantida sob agitação em temperatura ambiente, sendo acompanhada por CCD e apresentou um tempo reacional de 4 horas. Observou-se a formação do precipitado (amarelo) que foi filtrado e recristalizado em metanol. Características físico-químicas: p. f. :161-164°C (lit. p. f.: 163-164 °C segundo BRAUN *et al.*, 2006).

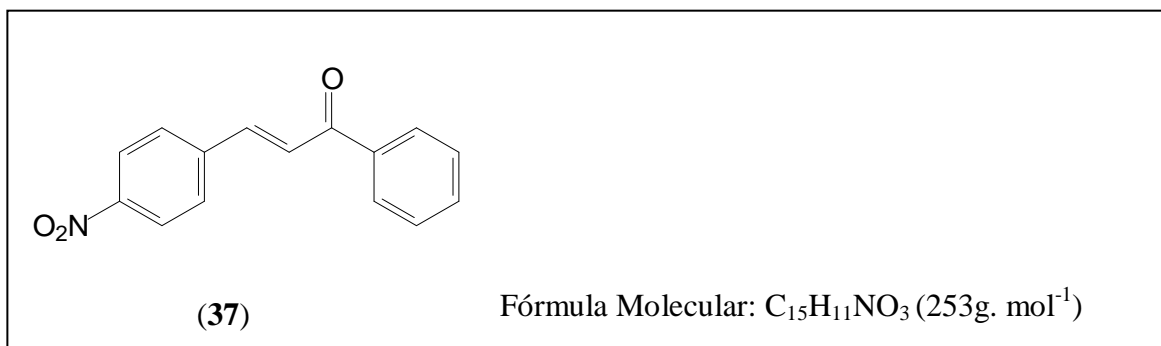


Figura 30. Estrutura química da chalcona (*E*)-3-(4-nitrofenil)-1-fenil-2-propen-1-ona (37).

3.7. Metodologia dos Ensaios Biológicos

3.7.1. Estudo da Atividade Citotóxica *in vitro*

As análises da citotoxicidade foram realizadas no Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará, sob responsabilidade da doutoranda Kristiana Cerqueira Mousinho, através do método de MTT, o qual vem sendo utilizado no programa de *screening* do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (SKEHAN *et al.*, 1990). É um método rápido, sensível e barato. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE & TAN, 1993).

Foi descrito primeiramente por Mosman em 1983, tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. Ou seja, a solução amarela de MTT é reduzida pela atividade mitocondrial nas células metabolicamente ativas em um cristal roxo.

As linhagens utilizadas, MDA-MB-435 (melanoma), HCT-8 (cólon humano), SF-295 (sistema nervoso central) e HL-60 (leucemia), foram cedidas pelo NCI, tendo sido cultivadas em frascos plásticos para cultura, utilizando o meio RPMI 1640 suplementado com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos (penicilina/estreptomicina). As células foram incubadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5 % de CO₂ e 95 % de umidade, seguido da observação do crescimento celular com ajuda do microscópio de inversão a cada 24 horas, quando necessário as células foram repicadas em meio de cultura novo, em uma concentração de 1 x 10⁵ céls/ 100 µL.

As substâncias foram dissolvidas em DMSO puro e estéril na concentração de 5 µg/mL (dose única) e adicionadas em placas de 96 poços (100 µL/poço). O quimioterápico doxorrubicina foi usado como controle positivo. Após um período de incubação de 72 horas, as placas foram retiradas e centrifugadas a 1500 rpm/ 15 minutos. O sobrenadante foi aspirado e foi adicionado 200 µL da solução de MTT 10 % em RPMI 1640, sendo a placa colocada em estufa a 5 % de CO₂ por 3 horas. Em seguida, as placas foram novamente centrifugadas a 3000 rpm/10 minutos, tendo o sobrenadante aspirado e o precipitado ressuspenso em 150

μL de DMSO e agitado por cerca de 10 minutos até completa dissolução dos cristais de formazan. A absorbância foi lida em um espectrofotômetro de placas a um comprimento de onda de 550 nm.

A determinação da concentração capaz de inibir 50 % do crescimento celular (IC_{50}) das amostras selecionadas no *screening* inicial foi realizada pelo método do MTT em concentrações que variam de 0,078-5 $\mu\text{g/mL}$. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços nas seguintes concentrações (células/mL):

- MDA-MB-435, SF-295: 1×10^5 ;
- HCT-8: 7×10^4 ;
- HL-60: 3×10^5 ;

Os resultados foram analisados segundo suas médias e respectivos desvios-padrão no programa *GraphPad Prism*. Cada amostra foi analisada a partir de dois experimentos realizados em duplicata.

Para citotoxicidade *in vitro* em eritrócitos de camundongos, foram coletados 5 mL de sangue de animais sadios em tubos contendo heparina. O sangue foi lavado com solução salina e os eritrócitos foram isolados por gradiente de densidade após centrifugação a 1500 rpm por 5 min. O pellet foi diluído a 2 % em solução salina e plaqueados 100 μL / poço após ter sido aplicada a amostra em diluição seriada, DMSO e Triton X-100 0,5 %. Após um período de incubação de 1 hora sob agitação constante a temperatura ambiente, a placa foi centrifugada a 1500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outra placa e lida no espectrofotômetro a um comprimento de onda de 450 nm.

3.7.2. Inibição Enzimática das Catepsinas B e K

As análises de inibição enzimática das catepsinas foram realizadas no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Genética e Bioquímica, na Universidade Federal de São Carlos. A catepsina B utilizada neste ensaio foi obtida comercialmente através da empresa Sigma. A catepsina K é uma enzima não comercial, pertence ao Laboratório de Produtos Naturais do DQ-UFSCar, e foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Dieter Bromme da University of British Columbia, Vancouver, Canadá.

Inicialmente foi realizada uma triagem bioquímica inicial para identificação das moléculas capazes de inibir as catepsinas estudadas. Os compostos foram dissolvidos em

DMSO e avaliados em triplicata, na dose única padrão de 125 μM . Nos ensaios utilizou-se um tampão acetato de sódio 100 mM, com 5 mM de EDTA e pH de 5,5. As enzimas foram usadas na concentração estimada de 3 mM, sendo estas pré-ativadas com DTE (5,0 mM) durante 5 minutos, a 27°C e em seguida adicionado 5 μL da solução a ser testada (substância pura) deixando-se a placa em pré-incubação por 5 minutos. Posteriormente foram adicionados 10 μM do substrato fluorogênico Z-FRMCA (Sigma), realizando-se a leitura em tempo real.

Foram utilizadas placas de ELISA de 96 poços com volume de 200 μL / poço, coloração preta e fundo plano, mantida em compartimento termostaticado a 27°C, sendo a fluorescência detectada em espectrofluorímetro com fenda de excitação ajustada para $\lambda_{\text{ex}}=380$ nm e emissão $\lambda_{\text{em}}=460$ nm. A ação enzimática foi determinada pelo aumento da fluorescência devido à hidrólise do substrato fluorogênico Z-FRMCA. A leitura foi convertida em μmols de substrato hidrolisado por minuto a partir das curvas de fluorescência das soluções de substrato antes e depois da hidrólise total. Os parâmetros cinéticos foram calculados utilizando o programa Origin.

Depois de realizada a triagem inicial, os compostos que apresentaram inibição significativa (superior a 80%) frente às catepsinas B e K foram selecionados e posteriormente encaminhados para a determinação dos valores de IC_{50} .

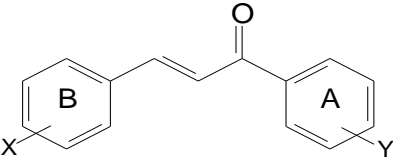
O valor de IC_{50} é definido pela concentração do inibidor responsável por provocar uma queda de 50% na atividade da enzima. Para calcular os valores de IC_{50} foram utilizados os dados de inibição de cada composto quando testados em uma única concentração (125 μM). Dessa forma, o potencial de inibição foi determinado utilizando dez diferentes concentrações do inibidor e construindo uma curva de concentração x resposta. Os valores de IC_{50} obtidos foram determinados pelo método de regressão não-linear. As condições experimentais foram as mesmas para ambas as catepsinas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Síntese dos Derivados de Chalconas

Os derivados das chalconas (**25-37**) apresentados neste trabalho foram sintetizados usando a reação de condensação de Claisen-Schmidt e os compostos (**23** e **24**) foram sintetizados através da catálise ácida. Para todas as moléculas obtidas foram realizadas análises de IV, RMN de ^1H e massas. Os resultados dos rendimentos e o tempo reacional de cada composto estão listados na Tabela 1.

Tabela 1.0. Estrutura, tempo reacional e rendimento dos derivados de chalconas (**23-37**).



Nº	X	Y	Tempo (horas)	Rendimento (%)
23	4-OH	4-NO ₂	24	45
24	4-OH	H	24	32
25	4-NO ₂	4-NO ₂	3	87
26	O-CH ₂ -O	H	3	48
27	4-Cl	4-NO ₂	3	54
28	4-F	H	4	42
29	O-CH ₂ -O	4-NO ₂	1	75
30	2,4-OCH ₃	4-NO ₂	1	46
31	3,4-OCH ₃	4-NO ₂	3	75
32	4-F	4-NO ₂	3	65
33	4-OCH ₃	4-NO ₂	6	68
34	3,4-OCH ₃	H	12	63
35	4-Cl	H	4	42
36	4-OCH ₃	H	10	48
37	4-NO ₂	H	4	78

As condições de reação para a síntese das chalconas foram modificadas com o intuito de facilitar a obtenção dos compostos, já que alguns grupamentos têm a propriedade de doar

ou retirar elétrons, o que pode facilitar ou desfavorecer as reações. A presença da hidroxila ácida no aldeído dificulta a obtenção das chalconas **23** e **24** através da catálise básica nas reações de Claisen-Schmidt, pois estes aldeídos quando colocados em meio alcalino sofrem uma reação conhecida como reação de Cannizzaro. Dessa forma para obtenção das chalconas hidroxiladas optou-se pela catálise ácida em quantidade catalítica de ácido sulfúrico e também foram necessárias condições mais enérgicas, sendo submetidas a refluxo e maior tempo reacional.

As reações em média possuem rendimentos satisfatórios, com exceção dos compostos **23**, **24**, **26**, **28**, **30**, **35** e **36** que apresentaram rendimento abaixo de 50 %. O tempo reacional foi bem diversificado principalmente quando comparada as sínteses em temperatura ambiente e refluxo. O grupo nitro retira elétrons do anel aromático proporcionando aumento da eletropositividade da carbonila do aldeído (**25** e **37**), resultando assim em um maior rendimento.

Todos os derivados foram purificados através da recristalização em metanol. A pureza dos compostos sintetizados foi avaliada através da cromatografia em camada delgada, espectroscopia de IV e RMN ¹H.

Em geral os compostos da série apresentam espectros (Anexo) com perfis semelhantes. Em relação aos espectros no IV pode-se verificar a presença de grupos funcionais característicos (Quadro 1), como absorções de estiramento C=C (C, sp²) de anel aromático ocorrendo aproximadamente em 1.600 cm⁻¹. Nota-se que a conjugação de uma ligação C=C a um grupo carbonila diminui as frequências de absorção, apresentando um estiramento C=O abaixo de 1.710 cm⁻¹. Os compostos que apresentam o grupo nitro possuem estiramento forte de 1.550-1.490 cm⁻¹ e também de 1.355-1.315 cm⁻¹. Os compostos **23** e **24** (ver Anexo, Figura 31 e 34, pág. 58 e 61, respectivamente) se destacam pela presença do grupamento hidroxila que se apresenta como uma banda de estiramento largo e intenso centrada em 3.200 cm⁻¹. A determinação da presença de um halogênio, aqui representado pelo estiramento C-Cl e C-F, ocorre em frequências muito baixas, na extrema direita do espectro, em que uma variedade de outras bandas também aparecem, e por esta razão torna-se difícil determinar a presença dos mesmos (SILVERSTEIN; BASSLER & MORRIL, 1994; PAVIA *et al.*, 2010), sendo necessário a espectroscopia de massas que fornece informações mais confiáveis para esta classe de compostos (**27**, **28**, **32** e **35**). Através do CG-EM é possível identificar quando o cloro está presente pelo pico M + 2, referente ao isótopo ³⁷Cl.

Quadro 1.0. Dados de infravermelho dos compostos derivados de chalconas (23-37).

Principais absorções no IV (cm ⁻¹)															
Tipo de Vibrações	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
ν C=C (C, sp ²)	1.562	1.573	1.600	1.589	1.606	1.602	1.579	1.604	1.575	1.585	1.604	1.585	1.602	1.598	1.596
ν O-H	3.259	3.234	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ν NO ₂	1.517/ 1.340	—	1.517/ 1.348	—	1.519/ 1.332	—	1.523/ 1.342	1.521/ 1.340	1.525/ 1.346	1.510/ 1.334	1.512/ 1.338	—	—	—	1.514/ 1.336
ν C=O	1.647	1.649	1.685	1.658	1.664	1.660	1.654	1.656	1.660	1.666	1.656	1.654	1.660	1.656	1.658
ν C-O-C	—	—	—	1.253	—	—	1.251	—	—	—	—	—	—	—	—
ν C-O	—	—	—	—	—	—	—	1.216	1.271	—	1.257	1.257	—	1.263	—
ν C-F	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ν C-Cl	—	—	—	—	785- 540 #	1.400- 1.000 #	—	—	—	1.400- 1.000 #	—	—	785- 540 #	—	—

Estiramento mascarado por outras bandas na mesma região.

A análise dos espectros de RMN ^1H (Anexo) da série de derivados de chalconas sintetizadas permite verificar a presença de sinais localizados em uma região própria de 6,5-8,0 ppm referente aos hidrogênios ligados aos anéis aromáticos. Os hidrogênios olefínicos *trans* (H_α e H_β) também aparecem nesta mesma região, sendo caracterizados pela constante de acoplamento situada na faixa de 15-16,00 Hz conferindo ao grupo funcional alceno uma geometria *E*, indicando assim a pureza geométrica dos compostos (SILVERSTEIN; BASSLER & MORRIL, 1994; PAVIA *et al.*, 2010).

Vale ressaltar que os maiores deslocamentos químicos foram encontrados nos hidrogênios de anéis quando grupos que retiram elétrons como o nitro estão ligados ao anel (compostos **23**, **25**, **27**, **29**, **30**, **31**, **32**, **33** e **37**) promovendo assim um efeito de desblindagem. De modo oposto, grupos que doam elétrons, como a metoxila (compostos **30**, **31**, **33**, **34** e **36**) aumentam a blindagem desses hidrogênios.

Também se tem efeito de desblindagem devido à eletronegatividade dos átomos de halogênio, tais como cloro e flúor. A grandeza do deslocamento aumenta com a eletronegatividade do halogênio, e o maior deslocamento foi encontrado em compostos que contém flúor (**28** e **32**). Houve também acoplamento forte entre o flúor e hidrogênios de carbonos adjacentes. Outros halogênios (I, Cl e Br) não apresentam acoplamento (SILVERSTEIN; BASSLER & MORRIL, 1994; PAVIA *et al.*, 2010).

Os compostos **23**, **25**, **27**, **29**, **30**, **31**, **32** e **33** (Quadro 2) caracterizam-se pela presença do grupamento *p*-nitrobenzoíla (Figura 31). Os hidrogênios aromáticos presentes pertencem ao sistema AA'XX' de acoplamento de spin, integrados para dois hidrogênios cada com constante de acoplamento entre 8,00-9,00 Hz. Este anel benzênico *p*-dissubstituído da molécula tem um plano de simetria que deixa quimicamente equivalentes e magneticamente diferentes os hidrogênios em lados opostos do anel (H_A e H_A' ; H_X e H_X') (SILVERSTEIN; BASSLER & MORRIL, 1994; PAVIA *et al.*, 2010).

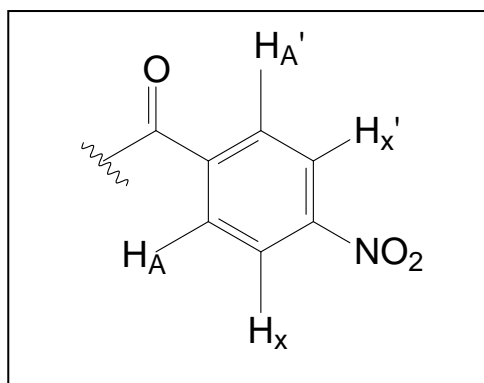
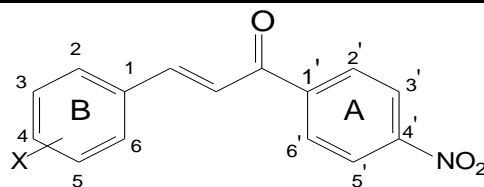


Figura 31. Grupamento *p*-nitrobenzoíla.

Quadro 2.0. Dados de RMN ¹H dos compostos derivados de chalcona que apresentam o grupo *p*-nitrobenzoíla.



Compostos	H2	H3	H4	H5	H6	H β	H α	H2'/H6'	H3'/H5'
23	7,74 (d) <i>J</i> = 8,0	6,94 (d) <i>J</i> = 8,0	—	6,94 (d) <i>J</i> = 8,0	7,74 (d) <i>J</i> = 8,0	7,82 (d) <i>J</i> = 16,0	7,70 (d) <i>J</i> = 16,0	8,33 (d) <i>J</i> = 8,0	8,39 (d) <i>J</i> = 8,0
25	7,83 (d) <i>J</i> = 8,8	8,19 (d) <i>J</i> = 8,8	—	8,19 (d) <i>J</i> = 8,8	7,83 (d) <i>J</i> = 8,8	7,90 (d) <i>J</i> = 15,6	7,62 (d) <i>J</i> = 15,6	8,32 (d) <i>J</i> = 8,8	8,40 (d) <i>J</i> = 9,2
27	7,60 (d) <i>J</i> =8,4	7,43 (d) <i>J</i> = 8,8	—	7,43 (d) <i>J</i> = 8,8	7,60 (d) <i>J</i> = 8,4	7,81 (d) <i>J</i> = 15,6	7,46 (d) <i>J</i> = 15,6	8,14 (d) <i>J</i> = 8,0	8,36 (d) <i>J</i> = 8,0
29	7,18 (d) <i>J</i> = 2,0	6,06 (s) O-CH ₂ -O	6,06 (s) O-CH ₂ -O	6,88 (d) <i>J</i> = 8,0	7,16 (dd) <i>J</i> =8,4; 1,6	7,80 (d) <i>J</i> = 15,6	7,33 (d) <i>J</i> = 15,6	8,14 (d) <i>J</i> = 8,0	8,36 (d) <i>J</i> = 8,0
30	7,57 (d) <i>J</i> = 8,5	6,56 (dd) <i>J</i> = 9,0; 2,5	3,91 (s) H ₃ CO	6,48 (d) <i>J</i> =2,5	3,86 (s) H ₃ CO	8,07 (d) <i>J</i> = 15,0	7,49 (d) <i>J</i> =15,0	8,11 (d) <i>J</i> =9,0	8,33 (d) <i>J</i> =8,5
31	7,26 (dd) <i>J</i> = 9,0; 2,0	6,92 (d) <i>J</i> =8,0	3,94 (s) H ₃ CO	3,95 (s) H ₃ CO	7,15 (d) <i>J</i> = 2,0	7,80 (d) <i>J</i> =15,0	7,33 (d) <i>J</i> =15,0	8,13 (d) <i>J</i> =9,0	8,36 (d) <i>J</i> =8,5
32	7,68 (dd) <i>J</i> =5	7,16 (dd) <i>J</i> = 10	—	7,16 (dd) <i>J</i> =10	7,68 (dd) <i>J</i> =5	7,84 (d) <i>J</i> = 15,5	7,43 (d) <i>J</i> =16,0	8,15 (d) <i>J</i> = 9,5	8,37 (d) <i>J</i> = 9,0
33	7,63 (d) <i>J</i> = 8,5	6,97 (d) <i>J</i> = 9,0	3,88 (s) H ₃ CO	6,97 (d) <i>J</i> = 9,0	7,63 (d) <i>J</i> = 8,5	7,84 (d) <i>J</i> =15,5	7,37 (d) <i>J</i> =15,5	8,14 (d) <i>J</i> = 9,0	8,36 (d) <i>J</i> = 9,0

J= Hz

Os compostos **24**, **26**, **28**, **34**, **35**, **36** e **37** (Quadro 3) caracterizam-se pela presença do grupamento benzoíla (Figura 32). Os hidrogênios aromáticos pertencem ao sistema AA'BB'C de acoplamento de spin, e os deslocamentos químicos estão presentes entre 7,00-8,00 ppm.

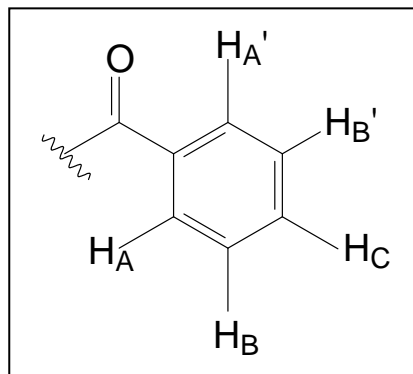
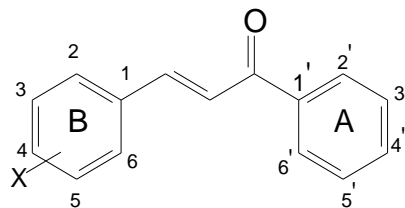


Figura 32. Grupamento benzoíla.

Verifica-se que todos os prótons do anel aromático da acetofenona estão desblindados, mas é possível notar um efeito de desblindagem adicional nos prótons em *orto*, devido à presença do grupo carbonila (SILVERSTEIN; BASSLER & MORRIL, 1994; PAVIA *et al.*, 2010).

Quadro 3.0. Dados de RMN ^1H dos compostos derivados de chalcona que apresentam o grupo benzoíla.



Composto	H2	H3	H4	H5	H6	H β	H α	H2'/H6'	H3'/H5'	H4'
24	7,72 #	6,94 (d) $J=8,4$	—	6,94 (d) $J=8,4$	7,72 #	7,78 (d) $J= 15,6$	7,71 (d) $J=15,6$	8,13-8,11 (m)	7,53-7,57 (m)	7,61-7,66 (m)
26	7,19 (d) $J=1,6$	6,03 (s) O-CH ₂ -O	6,03 (s) O-CH ₂ -O	6,86 (d) $J= 8,0$	7,16 (dd) $J=8,0; 2,0$	7,76 (d) $J= 16,0$	7,39 (d) $J= 16,0$	7,99-8,01 (m)	7,48-7,52 (m)	7,56-7,60 (m)
28	7,66 (dd) $J= 5$	7,14 (dd) $J= 10$	—	7,14 (dd) $J=10$	7,66 (dd) $J= 5$	7,79 (d) $J= 15,0$	7,48 (d) $J= 15,0$	8,0-8,03 (m)	7,50-7,53 (m)	7,58-7,61 (m)
34	7,25 (dd) $J=9,0; 2,5$	6,91 (d) $J=8,5$	3,95 (s) H ₃ CO	3,93 (s) H ₃ CO	7,16 (d) $J= 1,5$	7,77 (d) $J= 15,0$	7,39 (d) $J= 15,0$	8,0-8,02 (m)	7,49-7,52 (m)	7,56-7,60 (m)
35	7,59#	7,40 (d) $J= 8,0$	—	7,40 (d) $J=8,0$	7,59 #	7,78 (d) $J= 15,5$	7,52 (d) $J= 15,5$	8,03-8,01 (m)	7,49-7,52 (m)	7,61 #
36	7,61 (d) $J=8,5$	6,95 (d) $J= 9,0$	3,85 (s) H ₃ CO	6,95 (d) $J= 9,0$	7,61 (d) $J= 8,5$	7,81(d) $J= 16,0$	7,43 (d) $J= 15,0$	8,0-8,02 (m)	7,48-7,51 (m)	7,55-7,59 (m)
37	7,78 #	8,30 (d) $J= 8,0$	—	8,30 (d) $J= 8,0$	7,78 #	7,85 (d) $J= 16$	7,67 (d) $J= 16$	8,03-8,06 (m)	7,52-7,56 (m)	7,61-7,65 (m)

$J= \text{Hz}$

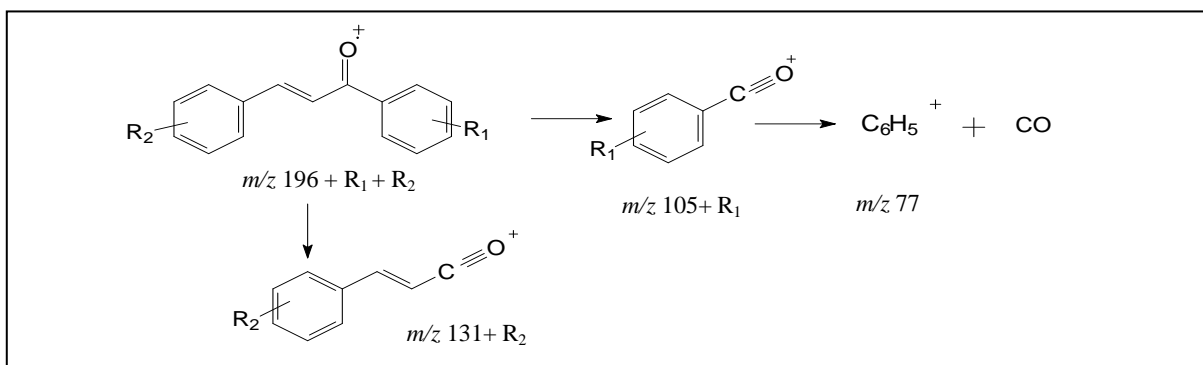
Sobreposição de sinais

Os experimentos de espectrometria de massas (ver espectros em Anexo) confirmam a presença a respectivas massas dos compostos derivados de chalcona através dos íons moleculares e pico base, como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2.0. Dados de CG-EM dos compostos derivados de chalconas (23-37).

Amostras	M ⁺	Pico Base
23	<i>m/z</i> 269	269
24	<i>m/z</i> 224	77
25	<i>m/z</i> 297	281
26	<i>m/z</i> 252	252
27	<i>m/z</i> 287	252
28	<i>m/z</i> 226	77
29	<i>m/z</i> 297	297
30	<i>m/z</i> 313	282
31	<i>m/z</i> 313	313
32	<i>m/z</i> 271	271
33	<i>m/z</i> 283	283
34	<i>m/z</i> 268	77
35	<i>m/z</i> 242	77
36	<i>m/z</i> 238	238
37	<i>m/z</i> 253	77

De modo ilustrativo, no esquema abaixo (Esquema 1) segue uma proposta de fragmentação geral do núcleo fundamental das chalconas.



Esquema 1. Proposta de fragmentação do núcleo fundamental das chalconas.

4.2. Atividades Biológicas

4.2.1. Avaliação da Atividade Citotóxica *in vitro*

Os compostos (**23-37**) foram testados na concentração única de 5 µg/mL, através do método de MTT nas linhagens MDA-MB-435 (melanoma), HCT-8 (côlon) e SF-295 (sistema nervoso central). Os resultados das atividades citotóxicas estão expressos na Tabela 3, com seus respectivos desvios-padrão.

Tabela 3.0. Porcentagem de inibição das amostras (**23-37**) através do ensaio do MTT.

Linhagem celular (média e desvio padrão)			
Amostras	MDA-MB-435	HCT-8	SF-295
23	21,55% (+/- 0,66)	33,33% (+/- 5,34)	26,19% (+/- 5,34)
24	52,57% (+/- 2,30)	53,99% (+/- 0,93)	33,76% (+/- 6,32)
25	14,36% (+/- 3,34)	33,28% (+/- 1,28)	16,34% (+/- 11,12)
26	49,74% (+/- 17,57)	48,90% (+/- 5,70)	48,37% (+/- 3,46)
27	19,93% (+/- 19,08)	27,29% (+/- 8,62)	19,77% (+/- 3,14)
28	88,59% (+/-13,38)	72,54% (+/- 31,85)	35,65% (+/-5,95)
29	6,69% (+/- 0,80)	2,61% (+/- 2,69)	21,60% (+/- 2,20)
30	13,99% (+/- 0,98)	20,28% (+/- 9,41)	4,47% (+/- 6,96)
31	24,11% (+/- 4,93)	7,55% (+/- 0,14)	25,12% (+/- 10,41)
32	25,17% (+/- 5,38)	39,78% (+/- 2,92)	23,35% (+/- 9,32)
33	31,52% (+/- 6,75)	33,03% (+/- 4,49)	12,72% (+/- 18,36)
34	96,66% (+/-3,12)	50,52% (+/- 3,42)	88,06% (+/- 5,78)
35	96,34% (+/- 5,44)	93,35% (+/- 1,14)	90,28% (+/- 2,77)
36	96,74% (+/- 0,95)	85,52% (+/- 2,17)	93,14% (+/- 3,02)
37	89,20% (+/-0,10)	98,23% (+/- 0,12)	76,56% (+/- 9,93)

São considerados relevantes valores de potencial de inibição do crescimento tumoral maiores que 90 %, sendo selecionadas para avaliações subseqüentes somente as moléculas que apresentaram valores de inibição em ≥ 75 % em pelo menos duas linhagens testadas.

Dessa forma, dos quinze compostos testados, somente quatro amostras (**34**, **35**, **36** e **37**) apresentaram potencial citotóxico relevante, sendo encaminhadas para a determinação da IC₅₀ e teste de atividade hemolítica.

Supondo que o mecanismo de ação dos compostos derivados de chalcona envolva o seqüestro de nucleófilos bio-orgânicos (como a GSH) através de uma adição conjugada ao carbono β do aceptor, interferindo assim na fase mitótica do ciclo celular via adições de Michael (Figura 12), tem-se uma maior atividade citotóxica destes compostos (DIMMOCK *et al.*, 1998; NAM *et al.*, 2004; BARREIRO & FRAGA, 2008; VIA *et al.*, 2009).

O composto **37** foi estudado por Mousinho, sendo avaliado na dose de 4 μM. Estudos avançados demonstraram que o mecanismo de ação é através da morte celular por apoptose, interrompendo o ciclo celular na fase G2/M. Também foram realizados ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade, os quais apresentaram resultados negativos (MOUSINHO, 2010).

De forma geral as substâncias **37** e **35** que apresentam grupos retiradores de elétrons na posição 4 do anel B, grupo nitro e Cl, respectivamente, possuem elevado potencial de inibição. O que não pode ser observado no composto **28**, que apesar do flúor estar presente na mesma posição e possuir elevada eletronegatividade, o composto apresentou baixa atividade citotóxica.

Os compostos **23**, **25**, **27**, **29**, **30**, **31**, **32** e **33** que se caracterizam pela presença do grupamento nitro na posição 4' do anel A apresentaram baixo potencial de inibição para as linhagens testadas. Possivelmente este grupamento altera a interação das moléculas com os nucleófilos bio-orgânicos.

Diante dos resultados apresentados, é possível observar que não existe um padrão de citotoxicidade para os compostos avaliados, e isto ressalta a necessidade de estudos subseqüentes de mecanismo de ação, assim como a realização de modificações estruturais. A falta de um maior número de estruturas também reforça a importância destes estudos para maiores conclusões, mas alguns componentes desta classe se apresentam como promissores na avaliação da atividade citotóxica.

Os resultados dos testes de IC₅₀ das amostras avaliadas (**34**, **35**, **36** e **37**) estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4.0. Valores de IC₅₀ e intervalo de confiança de 95% em µg/mL das amostras testadas.

Linhagem celular				
Amostras	HL-60	MDA-MB-435	SF-295	HCT-8
34	2,406 (2,093-2,767)	3,282 (2,651-4,062)	4,107 (3,323-5,076)	0,557 (0,244-1,267)
35	0,5087 (0,2425- 1,067)	2,623 (2,183-3,152)	1,975 (1,001-3,900)	2,513 (1,426-4,427)
36	0,7060 (0,59-0,84)	1,625 (1,14-2,23)	1,545 (1,28-1,85)	0,2821 (0,13-0,59)
37	0,4849 (0,06-3,8)	0,4585 (0,34-0,60)	0,3070 (0,20-0,47)	0,840 (0,6-1,19)

Foram consideradas potencialmente ativas, as substâncias que apresentaram IC₅₀ menor que 4 µg/mL. A amostra **37** apresentou elevado potencial citotóxico, com IC₅₀ menor que 1 µg/mL, não apresentando seletividade entre as linhagens testadas.

No teste de atividade hemolítica tanto o composto **37** quanto os compostos **34**, **35** e **36** não causaram danos diretos à membrana celular nas concentrações testadas de 50 µg/mL. A ausência de hemólise sugere que a ação citotóxica não ocorre pelo rompimento da membrana celular.

4.2.2. Avaliação da Inibição Enzimática

Os compostos derivados de chalconas (**23-37**) foram submetidos a ensaios de inibição enzimática das catepsinas B e K. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 5 com seus respectivos desvios-padrão.

Tabela 5.0. Porcentagem de inibição das B e K pelos derivados de chalconas (**23-37**).

% de inibição a 125 μ M (média e desvio padrão)		
Amostras	Cat B	Cat K
23	63,63% (+/- 4,72)	10,52% (+/- 0,64)
24	59,24% (+/- 2,30)	50,65% (+/- 4,55)
25	63,05% (+/- 3,41)	75,69% (+/- 2,13)
26	29,60% (+/- 0,49)	95,68% (+/- 1,17)
27	0,0 % (+/- 4,46)	63,50% (+/- 7,66)
28	0,0% (+/- 3,94)	82,55% (+/- 8,07)
29	15,62% (+/- 1,05)	13,38% (+/- 21,80)
30	0,0% (+/- 4,68)	63,18% (+/- 6,24)
31	0,0% (+/- 5,61)	58,30% (+/- 7,77)
32	0,0% (+/- 7,95)	77,69% (+/- 0,53)
33	0,0% (+/- 2,03)	75,58% (+/- 1,07)
34	0,0% (+/- 2,34)	58,73% (+/- 14,05)
35	0,0% (+/- 4,31)	86,74% (+/- 1,65)
36	0,02% (+/- 1,84)	89,14% (+/- 0,23)
37	0,0% (+/- 6,50)	52,02% (+/- 3,58)

São considerados relevantes os potenciais de inibição das catepsinas superiores a 80 %, sendo encaminhados para avaliações subsequentes.

Avaliando a inibição da catepsina B nenhuma das amostras testadas inibiu de forma significativa, demonstrando que esta classe não se apresenta como promissora na busca de inibidores para esta enzima. Entretanto, os melhores resultados foram obtidos frente à catepsina K, onde os compostos **26**, **28**, **35** e **36** se destacaram com inibição superior a 80 %,

sendo encaminhados para determinação de IC₅₀. Dessa forma, observa-se que esta classe de compostos apresentou seletividade frente às catepsinas B e K.

A ausência de substituinte na posição 4' do anel A (**26**) aumentou de forma considerável a atividade da catepsina K (95,68 %) quando comparada com composto **29** que possui o grupamento nitro na mesma posição e foi praticamente inativo (13,38 %). O mesmo comportamento também pode ser observado quando avaliamos os compostos **27** (63,50 %) e **35** (86,74 %), os quais se diferem somente pela presença do grupamento nitro na posição 4' do anel A.

As chalconas polimetoxiladas **30**, **31** e **34** apresentaram baixa atividade frente à enzima catepsina K, mesmo estando presentes em diferentes posições no anel B. Assim, de acordo com os resultados obtidos para a catepsina K, pôde-se concluir que a diferentes substituintes na cadeia lateral é fundamental para a atividade.

Avaliando a inibição da catepsina B (Tabela 5) pelos compostos sintetizados pôde-se perceber que não existe nenhuma correlação com os resultados citotóxicos (Tabela 3) anteriormente apresentados pelas substâncias **34**, **35**, **36** e **37**. Apesar de ambos os ensaios biológicos estarem relacionados com a busca de agentes antitumorais, percebe-se que estes atuam por diferentes mecanismos de ação, apresentando dessa forma resultados bastante distintos.

Diante do levantamento bibliográfico realizado poucos relatos de ensaios de chalconas em catepsinas são descritos, sendo que possíveis otimizações podem ser realizadas na busca de compostos mais ativos.

5. CONCLUSÕES

- A presente pesquisa permitiu a síntese de quinze compostos derivados de chalconas, sendo que as reações resultaram em compostos com rendimentos entre 32 % a 87 % e tempo de reação variado.

- As chalconas estudadas mostraram-se bastante promissoras quanto às atividades citotóxicas *in vitro* em especial os compostos **34**, **35**, **36** e **37** que apresentaram inibição superior a 75 % em pelo menos duas linhagens tumorais testadas.

- O composto **37** possui elevado potencial citotóxico com IC₅₀ menor que 1 µg/mL, não apresentando seletividade entre as linhagens.

- Na avaliação da atividade hemolítica verificou-se que os compostos **34**, **35**, **36** e **37** não causaram danos diretos à membrana celular nas concentrações testadas de 50 µg/mL, sugerindo assim que a ação citotóxica não ocorre pelo rompimento desta estrutura.

- O composto **28** apesar de ter a presença do flúor, um átomo bastante eletronegativo, na posição 4 do anel B apresentou baixa citotoxicidade nas linhagens testadas.

- Nos testes de citotoxicidade os compostos **23**, **25**, **27**, **29**, **30**, **31**, **32** e **33** apresentaram reduzida atividade. Foi observado que a presença de um grupamento nitro na posição 4' do anel A, pode ser fundamental para a redução da atividade citotóxica.

- A classe de compostos derivados de chalconas apresentou seletividade frente às enzimas (cat B e cat K) avaliadas.

- Na avaliação da inibição enzimática, os melhores resultados foram obtidos frente à catepsina K, onde os compostos **26**, **28**, **35** e **36** se destacaram com inibição superior a 80 %.

- As chalconas polimetoxiladas **30**, **31** e **34** apresentaram baixa atividade frente à enzima catepsina K, mesmo estando presentes em diferentes posições no anel B.

- Avaliando a inibição da catepsina B pelos compostos sintetizados observa-se que não existe correlação com os resultados citotóxicos. Apesar de ambos os ensaios biológicos estarem correlacionados com a busca de agentes antitumorais, estes atuam por diferentes mecanismos de ação apresentando resultados bastante distintos.

- Desta forma, este estudo demonstra que as chalconas apresentam características promissoras para serem candidatas a protótipos de fármacos, podendo ser submetidas a modificações estruturais e estudos subseqüentes de mecanismo de ação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. “Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications”. 1. ed. New York: Taylor & Francis Group, 2006.

AUYEUNG, K. K. W.; KO, J. K. S. “Novel Herbal Flavonoids Promote Apoptosis but Differentially Induce Cell Cycle Arrest in Human Colon Cancer Cell”. *Invest. New Drugs*. **28**, 1-13, 2010.

BARREIRO, E. J. “A importância da Síntese de Fármacos na Produção de Medicamentos”. *Quím. Nova*. **14**, 179-188, 1991.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. “Química Medicinal As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos”. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

BARASCUK, N.; SKJOT-ARKIL, H.; REGISTER, T. C.; LARSEN, L.; BYRJALSEN, I.; CHRISTIANSEN, C.; KARSDAL, M. A. “Human macrophage foam cells degrade atherosclerotic plaques through cathepsin K mediated processes”. *BMC Cardiovascular Disorders*. **10**, 1-9, 2010.

BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S. “Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction”. *Arch. Biochem. Biophys.* **303**, 474-482, 1993.

BOGLIOLO, L. “Patologia”. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

BONSIGNORE, L.; CABIDDU, S.; MACCIONI, A.; MARONGIU, E. “Synthesis and separation of geometrical isomers of arylacrylonaphthones”. *Gazzetta Chimica Italiana*. **106**, 617-24, 1976.

BRAUN, R. U.; ANSORGE, M.; MUELLER, T. J. J. “Coupling-isomerization synthesis of chalcones”. *Chem. Eur. Jour.* **35**, 9081-9094, 2006.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. “Goodman & Gilman As Bases Farmacológicas da Terapêutica”. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006.

CABRERA, M.; SIMOENS, M.; FALCHI, G.; LAVAGGI, M. L.; PIRO, O. E.; CASTELLANO, E. E.; VIDAL, A.; AZQUETA, A.; MONGE, A.; 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”. *Bioorg. Med. Chem.* **15**, 3356-3367, 2007.

CHAPPARD, D.; LIBOUBAN, H.; MINDEHOLM, L.; BASLE, M. F.; LEGRAND, E.; AUDRAN, M. “The Cathepsin K Inhibitor AAE581 Induces Morphological Changes in Osteoclasts of Treated Patients” *Microscopy Res. Techn.* **73**, 726-732, 2010.

CHIARADIA, L. D. “Obtenção de Chalconas Sintéticas com Potencial Atividade Biológica”. 2006. Dissertação (Mestrado em Química) – Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

COPELAND, R. A. “Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery: A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists”. New Jersey: Wiley & Sons, 2005.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. “Patologia Estrutural e Funcional”. 6. ed. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN S.A, 2000.

COZZI, P. “The Discovery of a New Potential Anticancer Drug: A Case History”. *IL Farmaco*. **58**, 213-220, 2003.

DHAR, D.N. “The Chemistry of Chalcones and Related Compounds”. New York: Wiley-Interscience, 1981.

DIAS, R. L. A.; CORRÊA, A. G. “Aplicações da Química Combinatória no Desenvolvimento de Fármacos”. *Quím. Nova*. **24**, 236-242, 2001.

DIMMOCK, J. R.; KANDEPU, N. M.; HETHERINGTON, M.; QUAIL, J. W.; PUGAZHENTHI, U.; SUDOM, A. M.; CHAMANKHAH, M.; ROSE, P.; PASS, E.; ALLEN, T. M.; HALLERAN, S.; SZYDLOWSKI, J.; MUTUS, B.; TANNOUS, M.; MANAVATHU, E. K.; MYERS, T. G.; CLERCQ, E. D.; BALZARINI, J. “Citotoxic Activities of Mannich bases of Chalcones and Related Compounds”. *J. Med. Chem.* **41**, 1014-1026, 1998.

DUCKI, S.; RENNISON, D.; WOO, M.; KENDALL, A.; CHABERT, J. F. D.; MCGOWN, A. T.; LAWRENCE, N. J. “Combretastatin-like Chalcones as Inhibitors of Microtubule Polymerization. Part 1: Synthesis and Biological Evaluation of Antivascular Activity”. *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 7698-7710, 2009.

ECHEVERRIA, C.; SANTIBAÑEZ, J. F.; TAUDA, O. D.; ESCOBAR, C. A.; TAGLE, R. R. “Structural Antitumoral Activity Relationships of Synthetic Chalcones”. *Int. J. Mol. Sci.* **10**, 221-231, 2009.

EDWARDS, M. L.; STEMERICK, D. M.; SUNKARA, P. S. “Chalcones: A New Class of Antimitotic Agents”. *J. Med. Chem.* **33**, 1948-1954, 1990.

EIJÁN, A. M.; SANDES, E. O.; RIVEROS, M. D.; THOMPSON, S.; PASIK, L.; MALLAGRINO, H.; CELESTE, F.; CASABE, A. R. “High Expression of Cathepsin B in Transitional Bladder Carcinoma Correlates with Tumor Invasion”. *Cancer*. **98**, 262-268, 2003.

ENGERS, R.; GABBERT, H. E. “Mechanisms of Tumor Metastasis: Cell Biological Aspects and Clinical Implications”. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **126**, 682-692, 2000.

FALCÃO, F. L. “Synthesis of nonnatural chalcones”. *Boletim da Escola de Farmacia, Universidade de Coimbra. Ed.Científica*. **28**, 49-52, 1968.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. "Farmacologia Clínica: Fundamentos da Terapêutica Racional". 3. ed. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN S.A, 2006.

GUINEC, N.; DALET-FUMERON, V. & PAGANO, M. "Quantitative study of the binding of cysteine proteinases to basement membranes". *FEBS Lett.* **24**, 305-308, 1992.

GUSAK, K. N.; KOZLOV, N. G. "Synthesis of 4,7-Phenanthroline Derivatives by Condensation of Arylmethylene(6-quinoly)amines with Hydroxy- and Nitro-substituted Acetophenone". *Russian J. Gen. Chem.* **73**, 964-967, 2003.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. "Série de Textos da Escola de Verão em Química: Princípios Ativos de Plantas Superiores". v. 4. São Carlos: EdUFSCar, 2003.

IACOBUZIO-DONAHUE, C. A., SHUJA, S., CAI, J., PENG, P. & MURNAME, M. J. "Elevations in cathepsin B protein content and enzyme activity occur independently of glycosylation during colorectal tumor progression". *J. Biol. Chem.* **272**, 29290-29199, 1997.

INCA – Ministério da Saúde. Câncer. Disponível em:

<http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=2 2010>.

Acesso em: 25 de maio de 2010.

ISABEL, E.; BATEMAN, K. P.; CHAURET, N.; CROMLISH, W.; DESMARAIS, S.; DUONG, L. T.; FALGUEYRET, J.P.; GAUTHIER, J. Y.; LAMONTAGNE, S.; LAU, C. K.; LÉGER, S.; LERICHE, T.; LÉVESQUE, J. F.; LI, C. S.; MASSÉ, F.; MCKAY, D. J.; MELLON, C.; NICOLL-GRIFFITH, D. A.; OBALLA, R. M.; PERCICAL, M. D.; RIENDEAU, D.; ROBICHAUD, J.; RODAN, G. A.; RODAN, S. B.; SETO, C.; THÉRIEN, M.; TRUONG, V. L.; WESOLOWSKI, G.; YOUNG, R. N.; ZAMBONI, R.; BLACK, W. C. "The discovery of MK-0674, an orally bioavailable cathepsin K inhibitor". *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20**, 887-892, 2010.

IWATA, S.; NISHINO, T.; NAGATA, N.; SATOMI, Y.; NISHINO, H.; SHIBATA, S. "Antitumorigenic activities of chalcones. I. Inhibitory effects of chalcones derivatives on ³²Pi-incorporation into phospholipids of HeLa cells promoted by 12-Otetradecanoyl-phorbol 13-acetate (TPA)". *Biol. Pharm. Bull.* **18**, 121710-1713, 1995.

JEONG, J. C.; YOON, C. H.; JEONG, C. W.; LEE, Y. C.; CHANG, Y. C.; KIM, C. H. "Inhibitory Activity of Drynariae rhizoma Extracts on Cathepsin Having Bone Resorption Activity". *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **26**, 373-385, 2004

JHA, A.; MUKHERJEE, C.; ROLLE, A. J.; CLERCQ, E. D.; BALZARINI, J.; STABLES, J. P. "Cytostatic Activity of Novel 4'-aminochalcone-based Imides". *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 4545-4550, 2007.

JÚNIOR, L. R.; HOEHR, N.F.; VELLASCO, A.P.; KUBOTA, L. T. "Sistema Antioxidante Envolvendo o Ciclo Metabólico da Glutathiona Associado a Métodos Eletroanalíticos na Avaliação do Estresse Oxidativo". *Quím. Nova.* **24**, 112-119, 2001.

KUESTER, D.; LIPPERTB, H.; ROESSNERA, A.; KRUEGER, S. "The cathepsin family and their role in colorectal cancer". *Pathol. Res. Pract.* **204**, 491-500, 2008.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H.; “Química Farmacêutica”. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN S.A, 1988.

KOZLOV, N. S.; AAPITSKAYA, A. F.; KISELEV, B. I.; KOZLOVA, T. E. “Study of the reactions of Mannich bases with benzylideneaniline derivatives under acid catalysis conditions”. *Katalit. Sintez Organ. Soedinenii*. 8-12, 1976.

LAWRENCE, N. J.; RENNISON, D.; MCGOWN, A. T.; DUCKI, S.; GUL, A. A.; HADFIELD, J. A.; KHAN, N. “Linked Parallel Synthesis and MTT Bioassay Screening of Substituted Chalcones”. *J. Comb. Chem.* **3**, 421-426, 2001.

LECAILLE, F.; BROMME, D.; LALMANACH, G. “Biochemical properties and regulation of cathepsin K activity”. *Biochimie*. **90**, 208-226, 2008.

LEHNIGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M.; “Princípios da Bioquímica”. 2. ed. São Paulo: SARVIER, 1995.

LI, J. T.; YANG, W. Z.; WANG, S. X.; LI, S. H.; LI, T. S. “Improved synthesis of chalcones under ultrasond irradiation”. *Ultrasonics Sonochemistry*. **9**, 237-239, 2002

LIM, I.; MEROUEH, S.O.; LEE, M.; HEEG, M.J.; MOBASHERY, S. “Strategy in Inhibition of Cathepsin B, A Target in Tumor Invasion and Metastasis”. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 10271-10277, 2004.

MA, S.; LAKSHMI, S.; KESAVAN, D.; GAO, J. “Molecular Dynamics Simulations of the Catalytic Pathway of a Cysteine Protease: A Combined QM/MM Study of Human Cathepsin K”. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 13633-1364, 2007.

MACHADO, A. L.; LIMA, L. M.; ARAÚJO-JR, J. X.; FRAGA, C. A. M.; KOATZ, V. L.G.; BARREIRO, E. J. “Design, Synthesis and Anti-inflammatory Activity of Novel Phtalimide Derivatives, Structurally Related to Thalidomide”. *Bioorg. Med. Chem.* **15**, 1169-1172, 2005.

MARDINI, H.; RECORD, C. “Detection Assesment and Monitoring of Hepatic Fibrosis: Biochemistry or Biopsy?”. *Ann. Clin. Biochem.* **42**, 441-447, 2005.

MARIE, J. P.; MARZAC, C.; LEGRAND, O. “Mécanismes de Résistance Aux Agents Cytostatiques”. *EMC-Hematol.* **1**, 59-68, 2004.

MATTOS, M.C.; MARZORATI, L. “O Aspectos Mecanísticos da Adição de Michael”. *Quím. Nova.* **22**, 710-714, 1999.

MENEGATTI, R.; MANSSOUR, C. A.; BARREIRO, E. J. “A importância da Síntese de Fármacos”. *Quím. Nova na Escola.* **3**, 6-22, 2001.

MIGNATTI, P. & RIFKIN, D. B. “Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion”. *Physiol. Reviews.* **73**, 161-195, 1993.

MOIN, K.; CAO, L. DAY, N. A.; KOBLISKI, J. E. & SLOANE, B F. “Tumor cell membrane cathepsin B”. *Biol. Chem.* **379**, 1093-1099, 1998.

MORT, J. S.; BUTTLE, D. J. "MOLECULES IN FOCUS: Cathepsin B" *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **29**, 715-720, 1997.

MOSMANN, T. "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays". *J. Immunol. Methods.* **65**, 55-63, 1983.

MOTTA, L. F. "Estudo Teórico das Relações Estrutura-Atividade Biológica de uma Série de Derivados de Chalconas (1,3-difenil-2-propen-1-ona) como Agentes Anti-*Plasmodium falciparum* (Agentes Antimaláricos)". 2004. Dissertação (Mestrado em Química) - Curso de Pós-Graduação em Química. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2004.

MOUSINHO, K. C. "ESTUDO DO POTENCIAL ANTICÂNCER DE UM DERIVADO DE CHALCONA, 1-(2-Nitrofenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona, *IN VITRO* E *IN VIVO*". 2010. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Curso de Pós Graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2010.

NAM, N. H.; HONG, D. H.; YOU, Y. J.; Kim, Y.; BANG, S. C.; Kim, H. M.; AHN, B. Z.; "Synthesis and Cytotoxicity of 2,5 Dihydroxychalcones and Related Compounds". *Arch. Pharm. Res.* **27**, 581-588, 2004.

NAVARINI, A. L. F.; CHIARADIA, L. D.; MASCARELLO, A.; FRITZEN, M.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. "Hidroxychalcones Induce Apoptosis in B16-F10 Melanoma Cells Via GSH and ATP Depletion". *E. J. Med. Chem.* **44**, 1630-1637, 2009.

NAVARRO, J.; OBRADOR, E.; CARRETERO, J.; PETSCHEN, I.; AVINÓ, J. PEREZ, P.; ESTRELA, J. M. "Changes in Glutathione Status and The Antioxidant System in Blood and in Cancer Cells Associate with Tumour Growth in Vivo". *Free Radical Biol. Med.* **26**, 410-418, 1999.

NI, L.; MENG, Q. M.; SIKORSKI, J. A. "Recent Advances in Therapeutic Chalcones". *Expert. Opin. Ther. Patents.* **14**, 1669-1691, 2004.

OBERLEY, T. D. "Oxidative Damage and Cancer". *A. J. Pathol.* **2**, 403-408, 2002.

PATIL, A. D.; FREYER, A. J.; KILLMER, L.; OFFEN, P.; TAYLOR, P. B.; VOTTA, B. J.; JOHNSON, R. K. "A New Dimeric Dihydrochalcone and a New Prenylated Flavone from the Bud Covers of *Artocarpus altilis*: Potent Inhibitors of Cathepsin K". *J. Nat. Prod.* **65**, 624-627, 2002.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. "Introdução à Espectroscopia". 4. ed. São Paulo: CENGAGE Learning, 2010.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. "Rang & Dale Farmacologia". 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

REDDY, M. V. B.; SU, C. R.; CHIOU, W. F.; LIU, Y. N.; CHEN, R. Y. H.; BASTOW, K. F.; LEE, K. H.; WU, T. S. "Design, Synthesis and Biological Evaluation of Mannich Bases of Heterocyclic Chalcone Analogs as Cytotoxic Agents". *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 7358-7370, 2008.

REISER, J.; ADAIR, B.; REINHECKEL, T. "Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease". *J. Clin. Invest.* **10**, 3421-3431, 2010.

ROBBINS, S. L. "Patologia". 2. ed. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN S.A, 1969.

SAINI, R. K.; KUMARI, N; JOSHI, Y. C.; JOSHI, P.; SHEKHAWA, S. S. "Solvent free microwave assisted synthesis of chalcones and their antifungal activities". *Asian J. Chem.* **6**, 4483-4486, 2007.

SAYDAM, N.; KIRB, A.; DEMIR, O.; HAZAN, E.; OTO, O.; SAYDAM, O.; GUNER, G. "Determination of Glutathione, Glutathione Reductase, Glutathione Peroxidase and Glutathione S-Transferase Levels in Human Lung Cancer Tissues". *Cancer Lett.* **119**, 13-19, 1997.

SENTURKER, S.; DIZDAROGLU, M. "The Effect of Experimental Conditions on The Levels of Oxidatively Modified Bases in DNA as Measured by Gas Chromatography-Mass Spectrometry: How Many Modified Bases are Involved? Purification or Not?" *Free Radical Biol. Med.* **27**, 370-380, 1999.

SEO, W. D.; KIM, J. H.; KANG, J. E.; RYU, H. W.; LONG, M. J. C.; LEE, H. S.; YANGA, M. S.; PARKA, K. H. "Sulfonamide chalcone as a new class of α -glucosidase inhibitors". *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15**, 5514-5516, 2005.

SEVENICH, L.; WERNER, F.; GAJDA, M.; SCHURIGT, U.; SIEBER, C.; MULLER, S.; M FOLLO, M.; PETERS, C.; REINHECKEL, T. "Transgenic expression of human cathepsin B promotes progression and metastasis of polyoma-middle-T-induced breast cancer in mice". *Oncogene* **30**, 54-64, 2011.

SHABAROV, YU. S.; POTAPOV, V. K.; KOLOSKOVA, N. M.; PODTEREBKOVA, A. A.; SVIRINA, V. S.; LEVINA, R. YA. M. V. "Cyclopropanes and cyclobutanes. XLI. Stereoisomeric 1-fluorophenyl-2-phenylcyclopropanes". *Zhurnal Obshchei Khimii.* **2**, 243-245, 1965.

SILVA, PENILDON. "Farmacologia". 5. ed. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN S.A, 1998.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G, C.; MORRIL, T. C. "Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos". 5. ed. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN S. A, 1994.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. "Farmacognosia: da Planta ao Medicamento". 6. ed. Florianópolis: UFRGS, 2007.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; McMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J.T.; BODESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M.R. "New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-drug Screening". *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 1107-1112, 1990.

SLOANE, B. F., ROZHIN, J., JOHNSON, K., TAYLOR, H., CRISSMAN, J. D., & HONN, K. V. "Cathepsin B: association with plasma membrane in metastatic tumours". *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**, 2483-2487, 1986.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B.; "Química Orgânica". 9. ed. v. 2. Rio de Janeiro: LTC, 2009.

STOCH, S.A.; ZAJIC, S.; STONE, J.; MILLER, D. L.; DYCK, K. V.; GUTIERREZ, M. J.; DECKER, M.; LIU, L.; LIU, Q.; SCOTT, B.B; PANEBIANCO, D.; JIN, B.; LT DUONG, L.T.; GOTTESDIERNER, K.; WAGNER, J.A. "Effect of the Cathepsin K Inhibitor Odanacatib on Bone Resorption Biomarkers in Healthy Postmenopausal Women: Two Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Phase I Studies". *Clin. Pharmacol. Therap.* **86**, 175-182, 2009.

SZPADERSKA, A. M.; FRANKFATER, A. "An Intracellular Form of Cathepsin B Contributes to Invasiveness in Cancer". *Cancer Res.* **61**, 3493-3500, 2001.

THOMAS, G. "Química Medicinal: Uma Introdução". 1. ed. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN S.A, 2003.

TURK, B.; TURK, V.; TURK, D. "Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors". *Biol. Chem.* **378**, 141-150, 1997.

TURK, B.; TURK, D.; TURK, V. "Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers". *Biochem. Biophys. Acta.* **1477**, 98-111, 2000.

VASILJEVA, O.; TURK, B. "Dual contrasting roles of cysteine cathepsins in cancer progression: Apoptosis versus tumour invasion". *Biochimie*, **90**, 380-386, 2008.

VASILJEVA, O.; PAPAZOGLU, A.; KRUGER, A.; BRODOEFEL, H.; KOROVIN, M. ; DEUSSING, J.; AUGUSTIN, N.; NIELSEN, B. S.; ALMHOLT, K.; BOGYO, M.; PETERS, C.; REINHECKEL, T. "Tumor Cell-Derived and Macrophage-Derived Cathepsin B Promotes Progression and Lung Metastasis of Mammary Cancer". *Cancer Res.* **66**, 5242-5250, 2006.

VIA, L. D.; GIA, O.; CHIARELOTTO, G.; FERLIN, M.G. "DNA-Targeting Pyrroloquinoline-linked Butanone and Chalcones: Synthesis and Biological Evaluation". *E. J. Med. Chem.* **44**, 2854-2861, 2009.

VIEGAS, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. "Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna". *Quím. Nova.* **29**, 326-337, 2006.

VIGNESWARAN, N.; ZHAO, W.; DASSANAYAKE, A.; MULLER, S.; DONALD M. MILLER, D. M.; ZACHARIAS, W. "Variable Expression of Cathepsin B and D Correlates With Highly Invasive and Metastatic Phenotype of Oral Cancer". *Hum. Pathol.* **31**, 931-937, 2000.

- VINCENZO, R. D.; FERLINI, C.; DISTEFANO, M.; GAGGINI, C.; RIVA, A.; BOMBARDELLI, E.; MORAZZZONI, P.; VALENTI, P.; BELLUTI, F.; RANELLETTI, F. O.; MANCUSO, S.; SCAMBIA, G. "In Vitro Evaluation of Newly Developed Chalcone Analogues in Human Cancer Cells". *Cancer Chemother. Pharmacol.* **46**, 305-312, 2000.
- XIA, Y.; YANG, Z. Y.; XIA, P.; BASTOW, K. F.; NAKANISHI, Y.; LEE, K. H. "Antitumor Agents. Part 202: Novel 2'- Amino Chalcones: Design, Synthesis and Biological Evaluation". *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **10**, 699-701, 2000.
- ZENG, G. Z.; PAN, X. L.; TAN, N. H.; XIONG, J.; ZHANG, Y. M. "Natural biflavones as novel inhibitors of cathepsin B and K". *E. J. Med. Chem.* **41**, 1247-1252, 2006.
- ZHAO, Q.; JIA, Y.; XIAO, Y. "Cathepsin K: A therapeutic target for bone diseases". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **380**, 721-723, 2009.
- WATSON, C. J.; KREUZALER, P. A.; "The Role of Cathepsins in Involution and Breast Cancer". *J. Mam. Gland. Biol. Neoplasia.* **14**, 171-179, 2009.
- WEI, W.; QUNRONG, W.; LIQUIN, D.; AIQING, Z.; DUOYAN, W.; KEY, H. "Synthesis of dinitrochalcones by using ultrasonic irradiation in the presence of potassium carbonate." *Ultrasonics Sonochem.* **6**, 411-414, 2005.
- WON, S. J.; LIU, C. T.; TSAO, L.T.; WENG, J. R.; KO, H. H.; WANG, J. P.; Lin, C. N. "Synthetic Chalcones as Potential Anti-inflammatory and Cancer Chemopreventive Agents". *E. J. Med. Chem.* **40**, 03-112, 2005.
- YASUDA, Y.; KALETAB, J.; BROMME, D. "The role of cathepsins in osteoporosis and arthritis: Rationale for the design of new therapeutics". *Adv. Drug Delivery Reviews.* **57**, 973-993, 2005.
- YE, C. L.; LIU, J. W.; WEI, D. Z.; LU, Y. H.; QIAN, F. "In Vivo Antitumor Activity by 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone in a Solid Human Carcinoma Xenograft Model". *Cancer Chemother. Pharmacol.* **55**, 447-452, 2005.

7. ANEXO

Espectros de RMN de ^1H (400 e 500 MHz), absorção no IV (KBr) e CG-EM dos compostos derivados de chalconas.

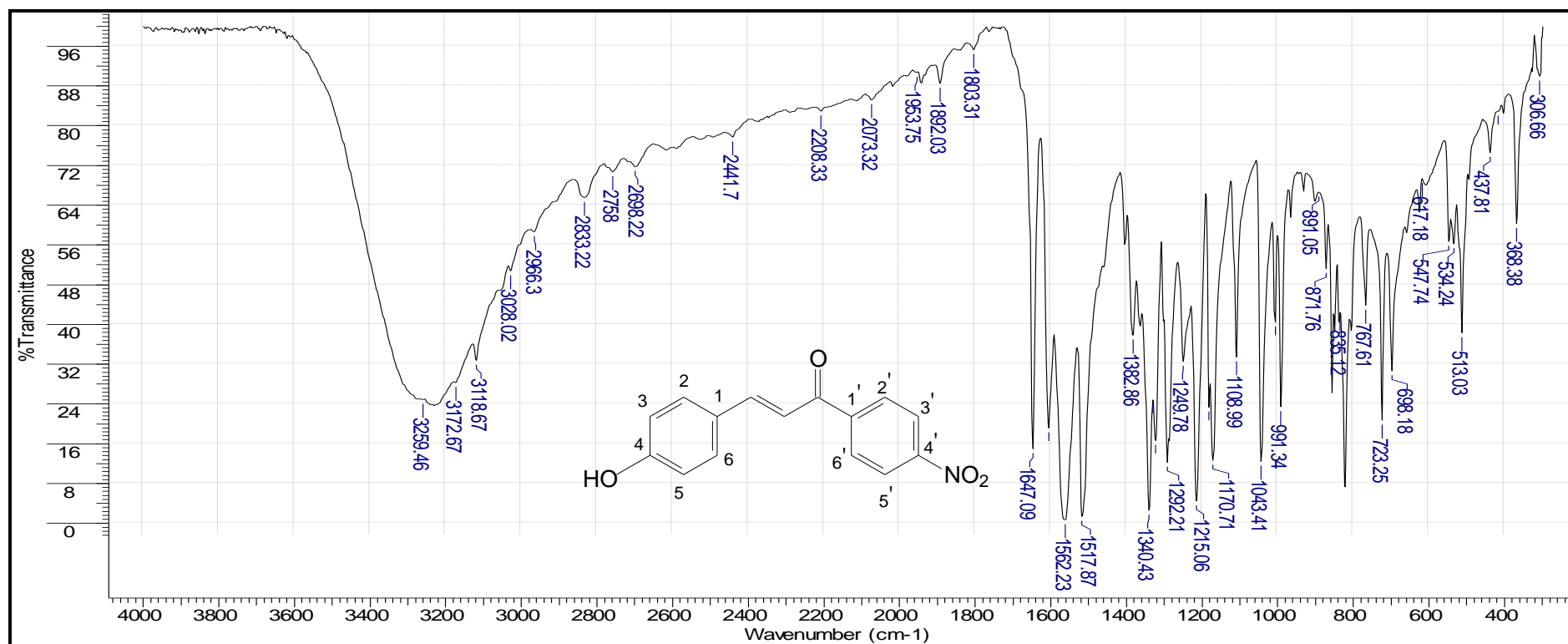


Figura 33. Espectro no IV (KBr) do composto (23).

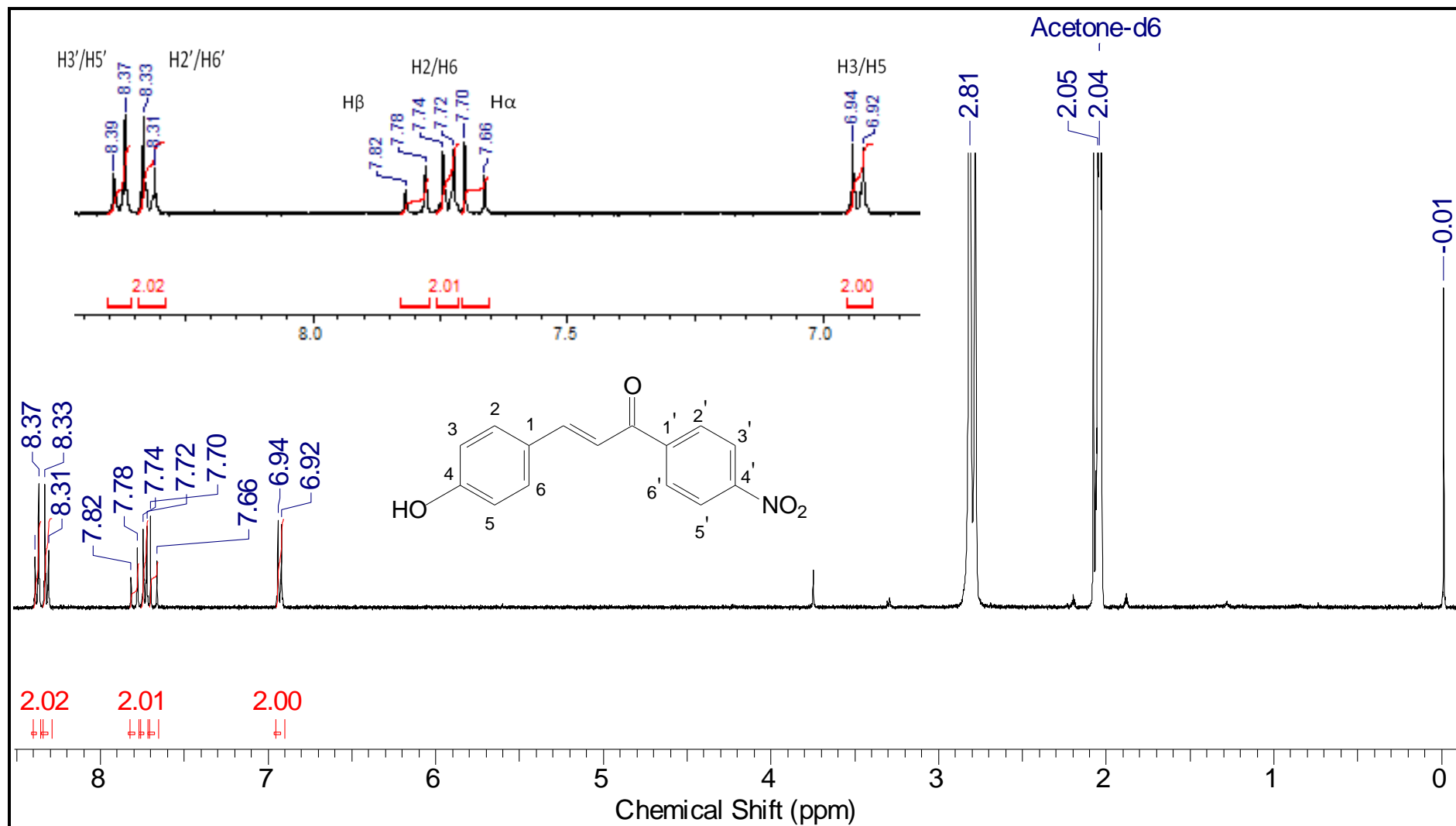


Figura 34. Espectro de RMN ^1H (400 MHz) do composto (23).

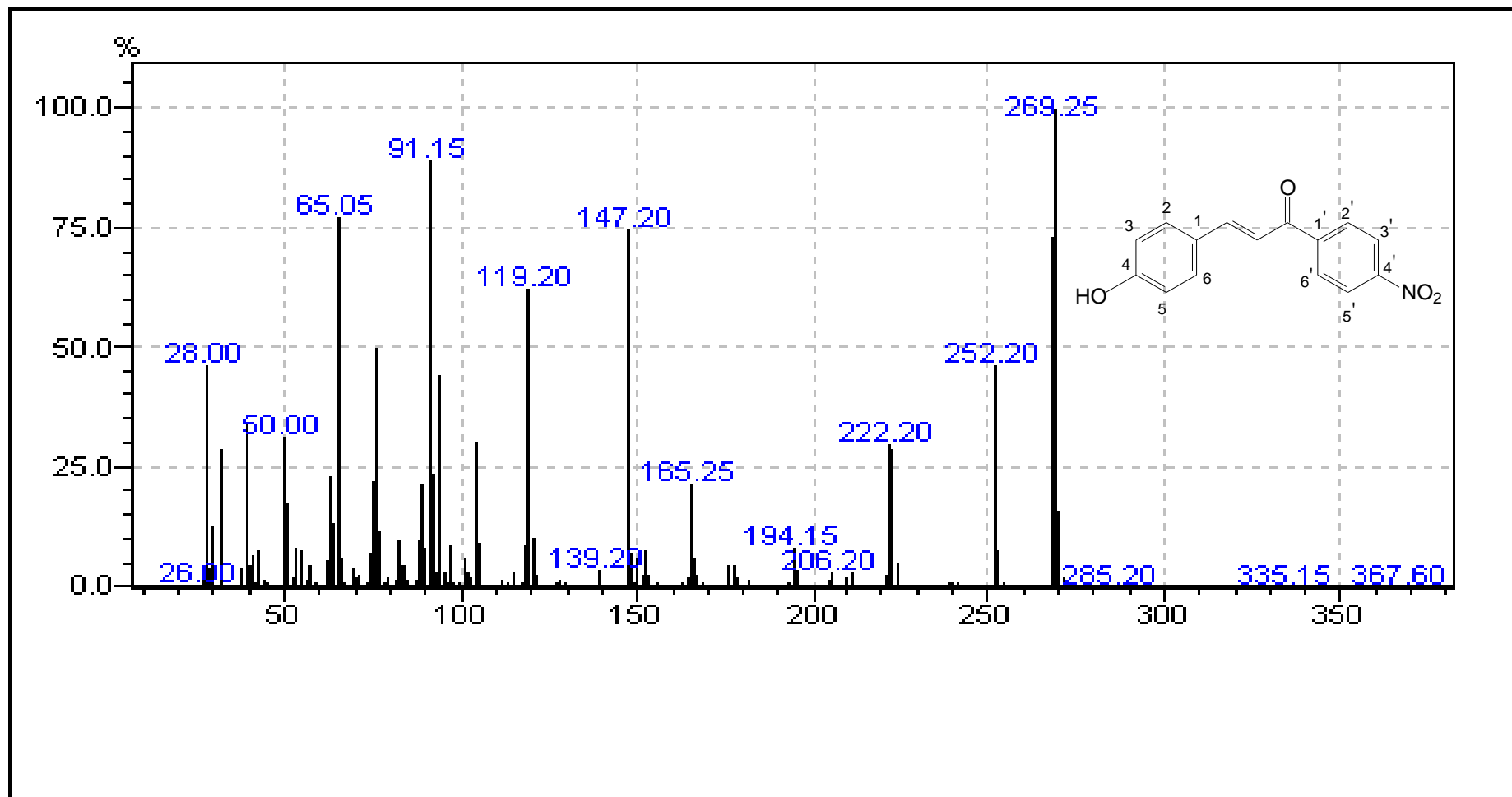


Figura 35. Espectro de massas do composto (23) obtido por CG-EM.

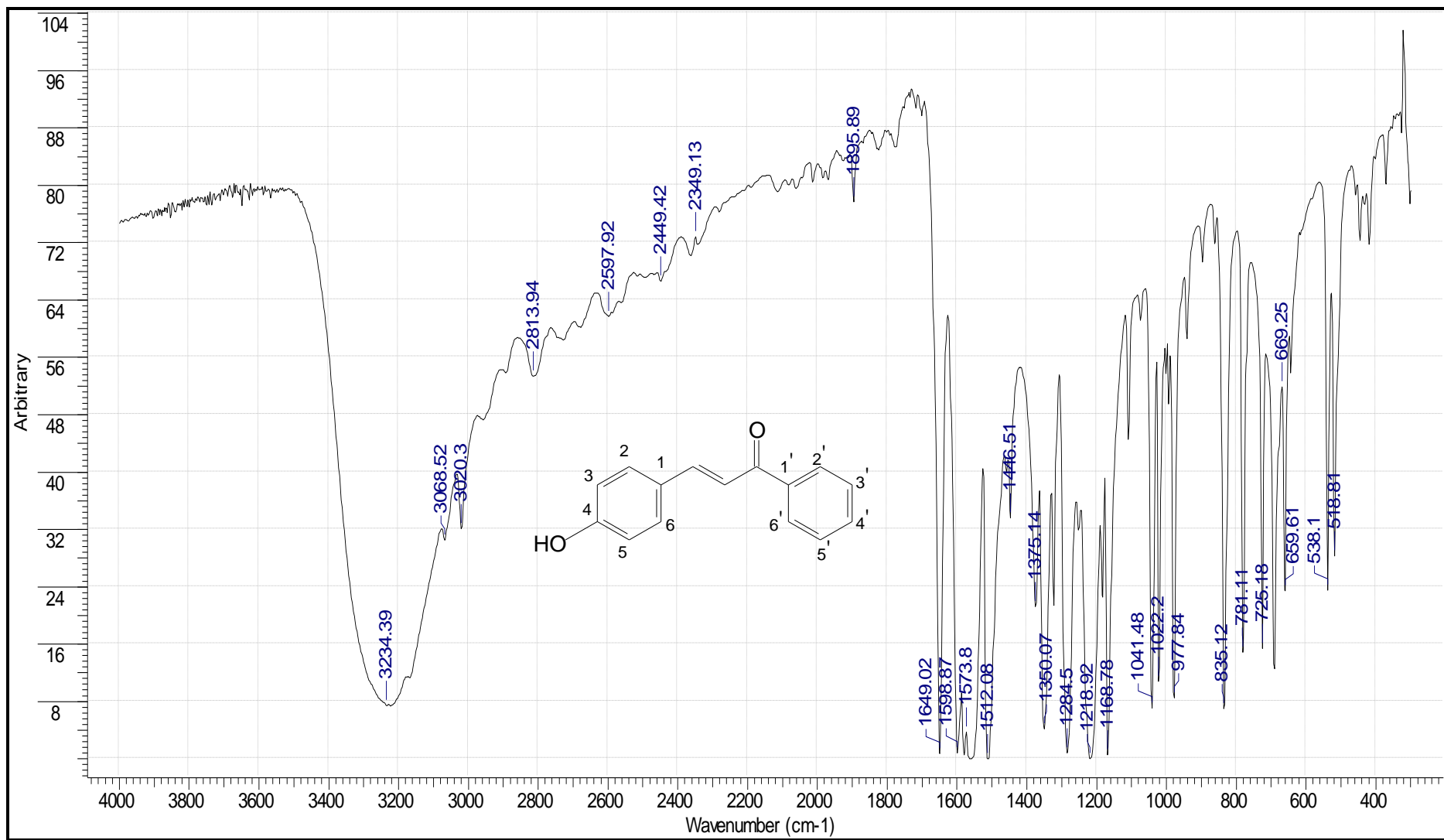


Figura 36. Espectro no IV (KBr) do composto (24).

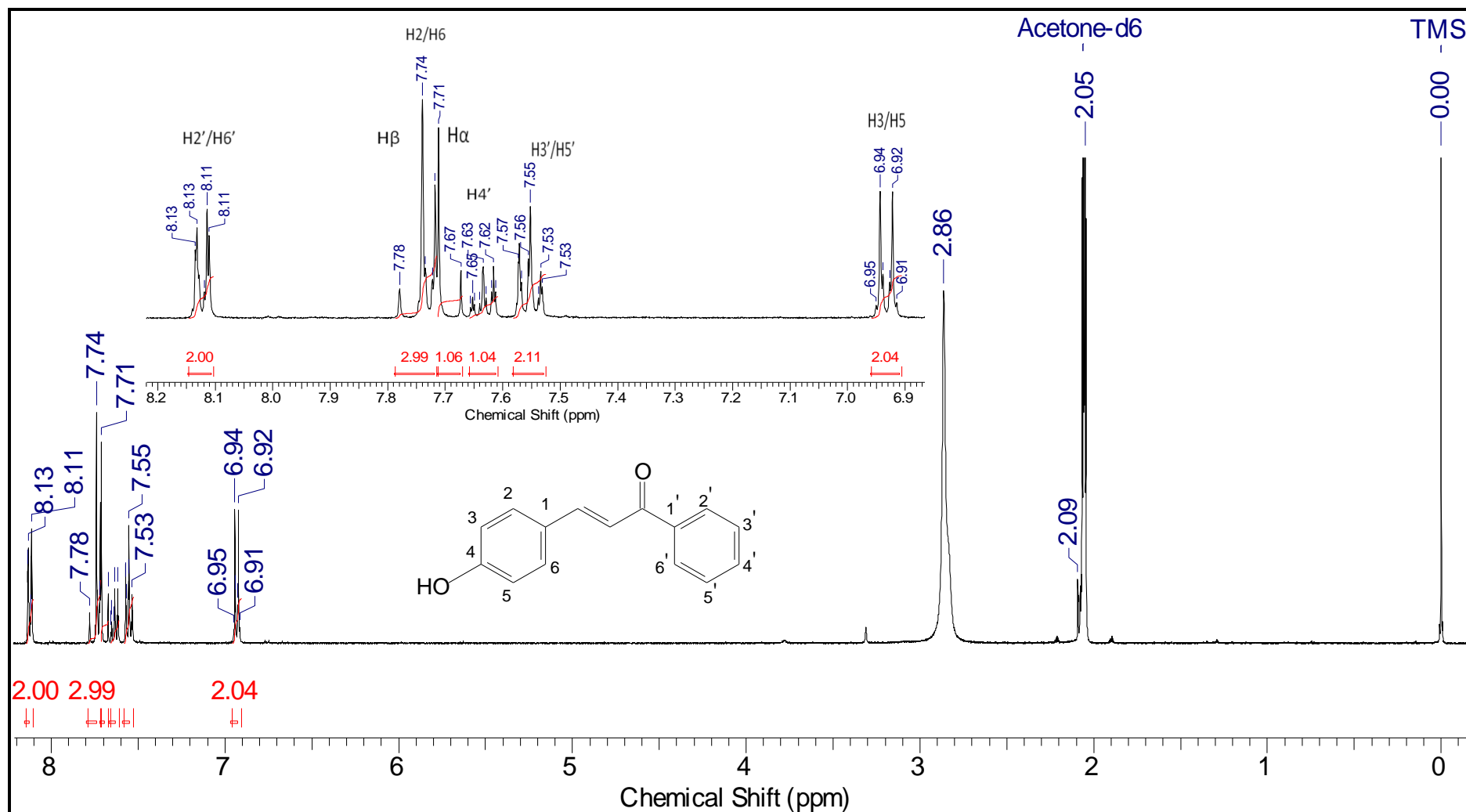


Figura 37. Espectro de RMN ¹H (400 MHz) do composto (24).

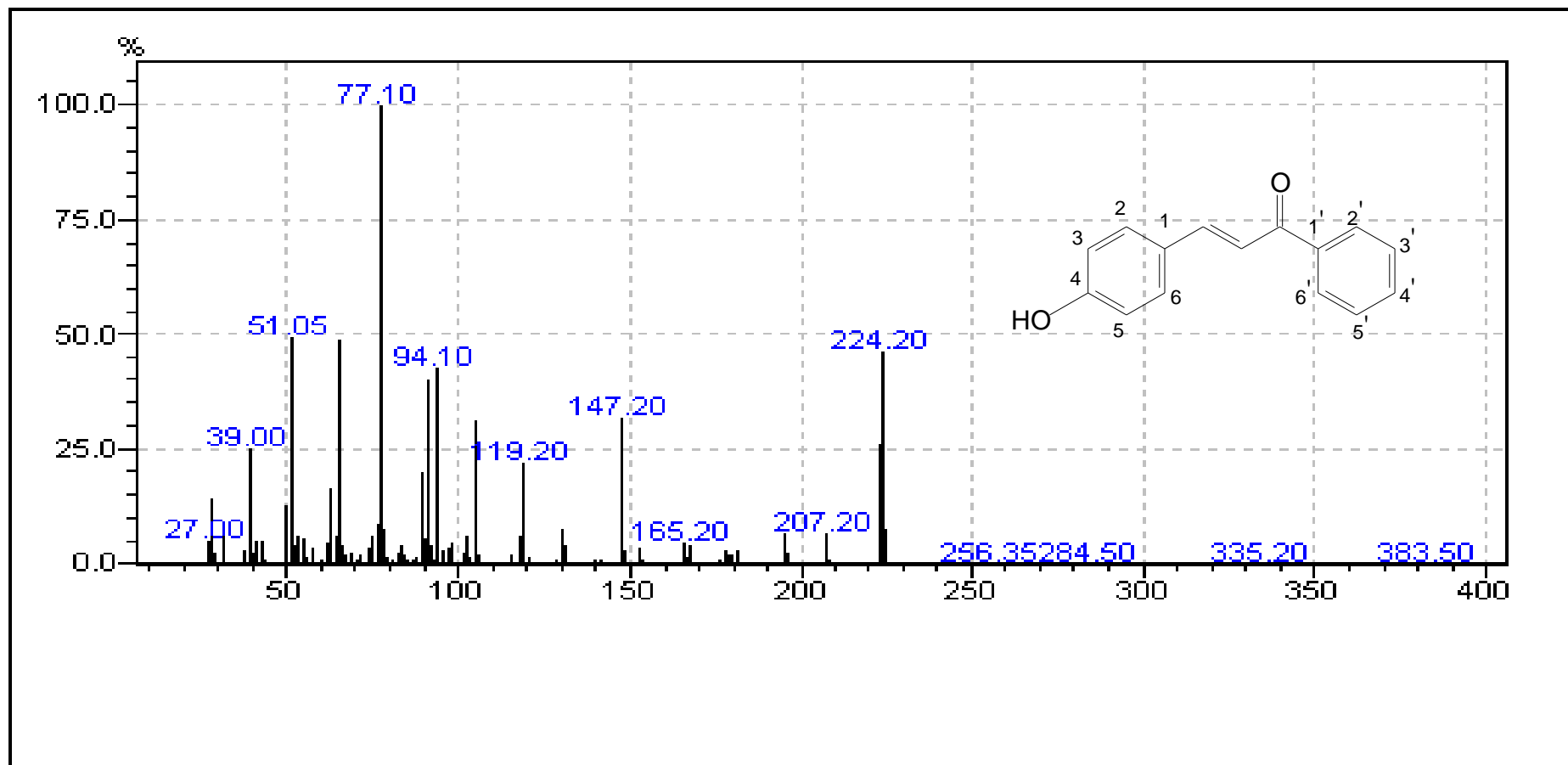


Figura 38. Espectro de massas do composto (24) obtido por CG-EM.

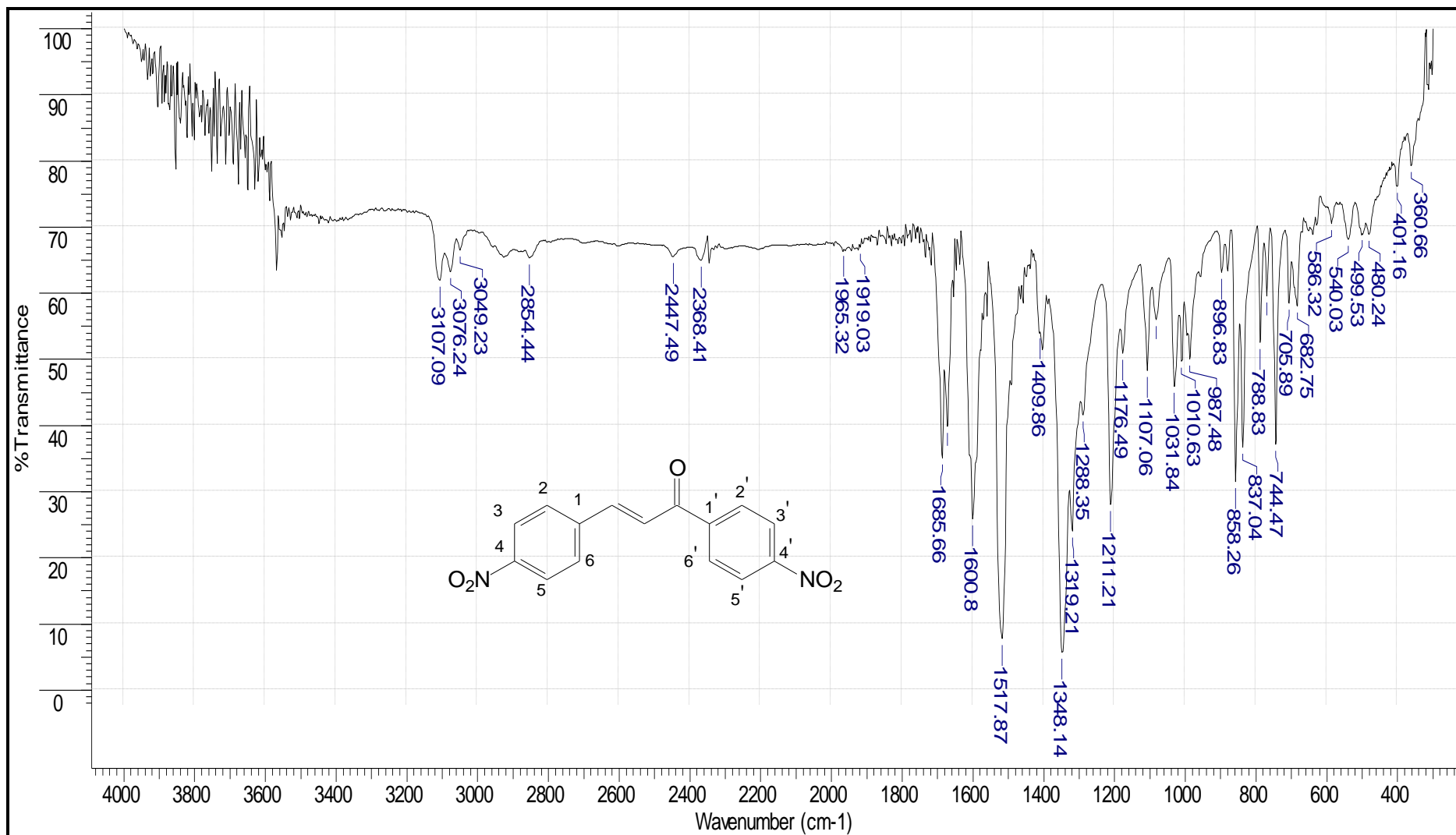


Figura 39. Espectro no IV (KBr) do composto (25).

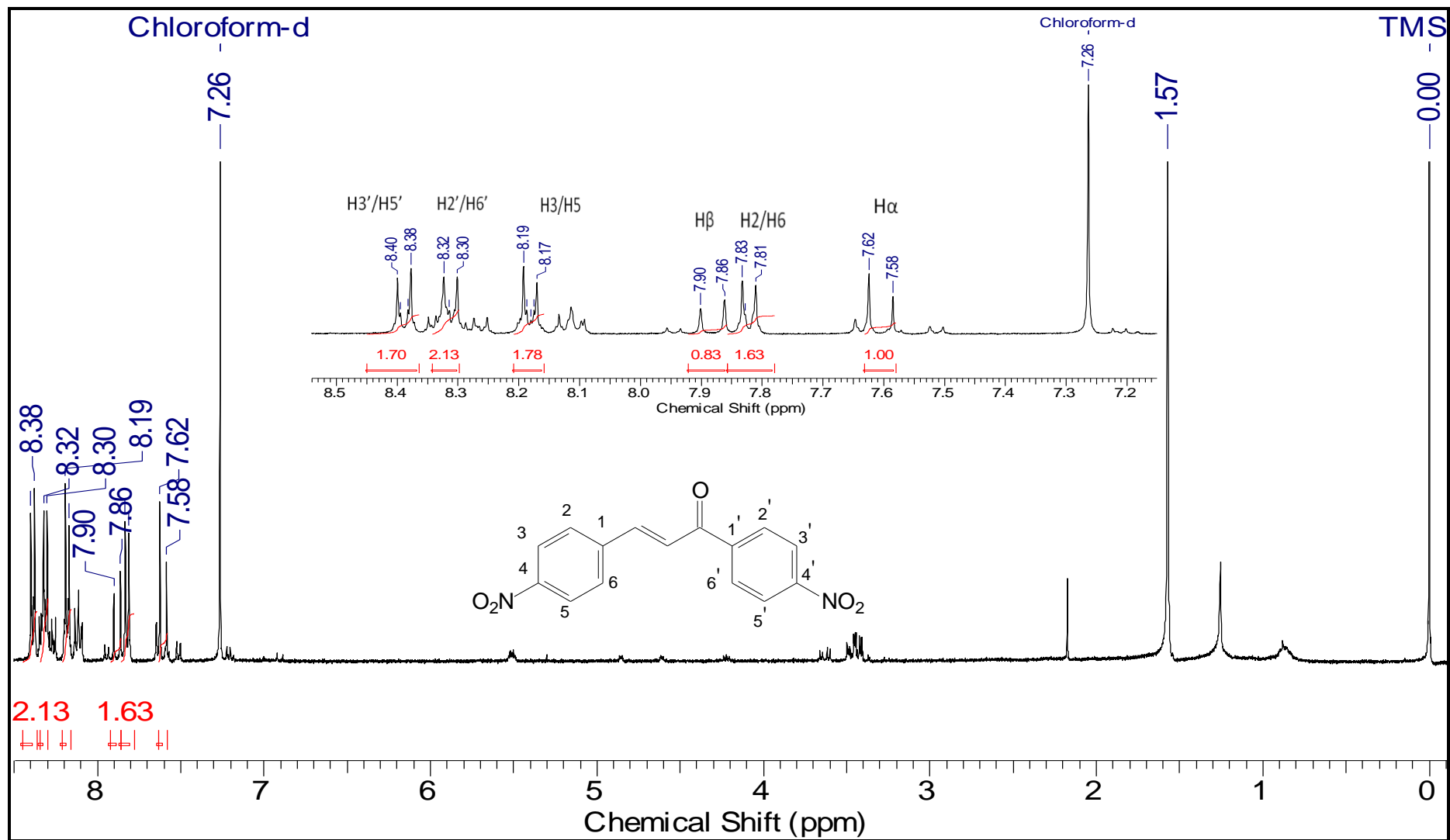


Figura 40. Espectro de RMN ^1H (400 MHz) do composto (25).

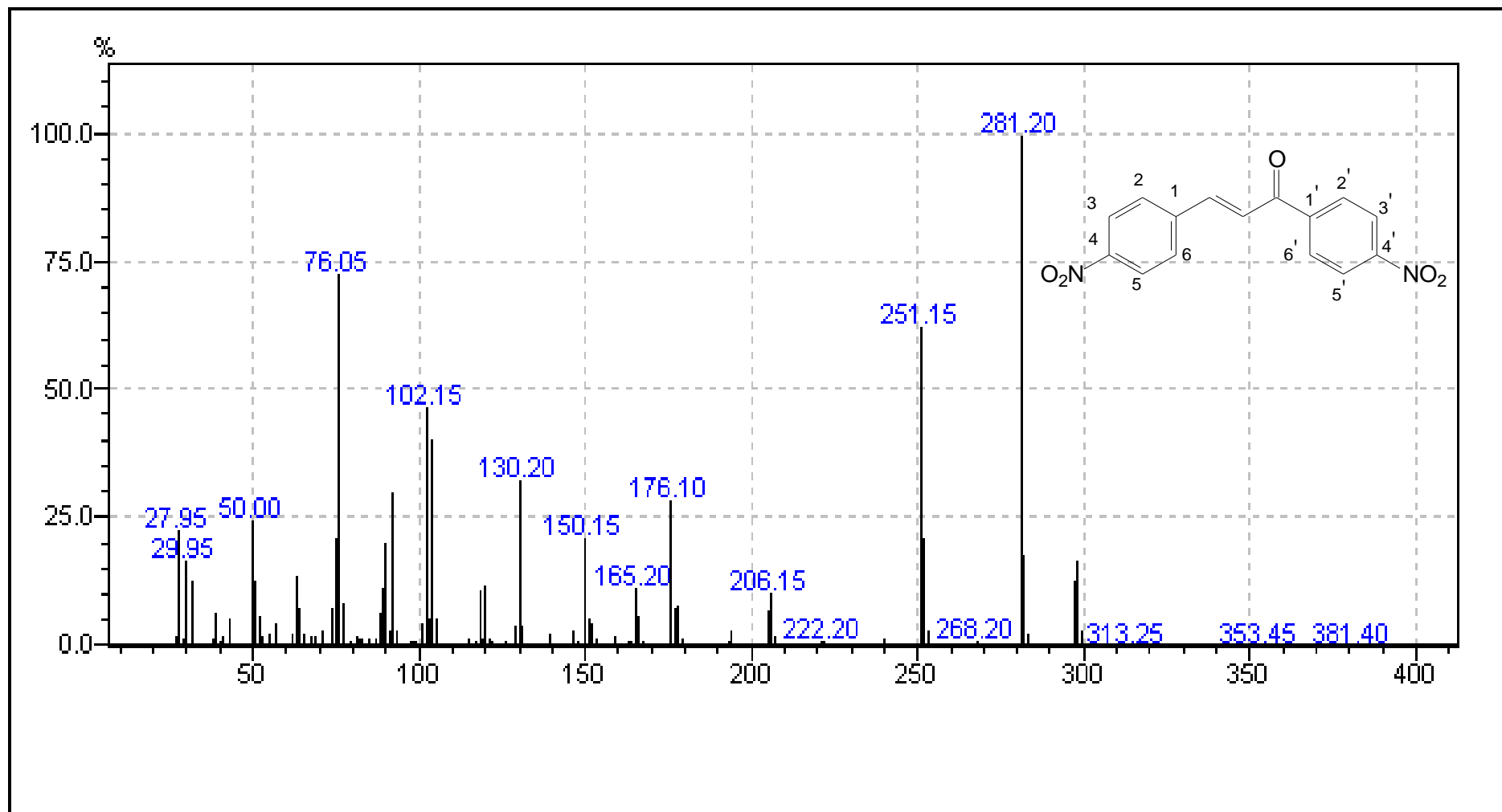


Figura 41. Espectro de massas do composto (25) obtido por CG-EM.

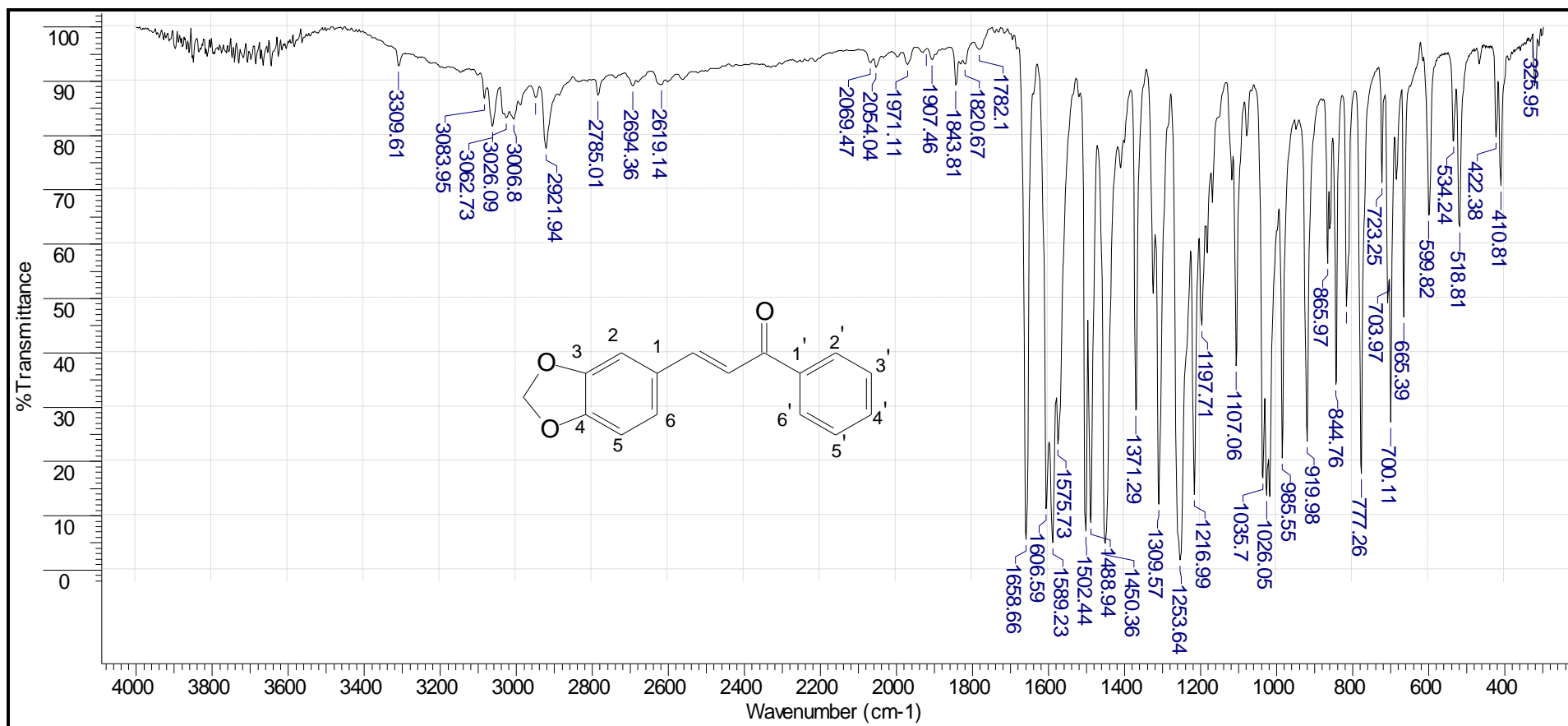


Figura 42. Espectro no IV (KBr) do composto (26).

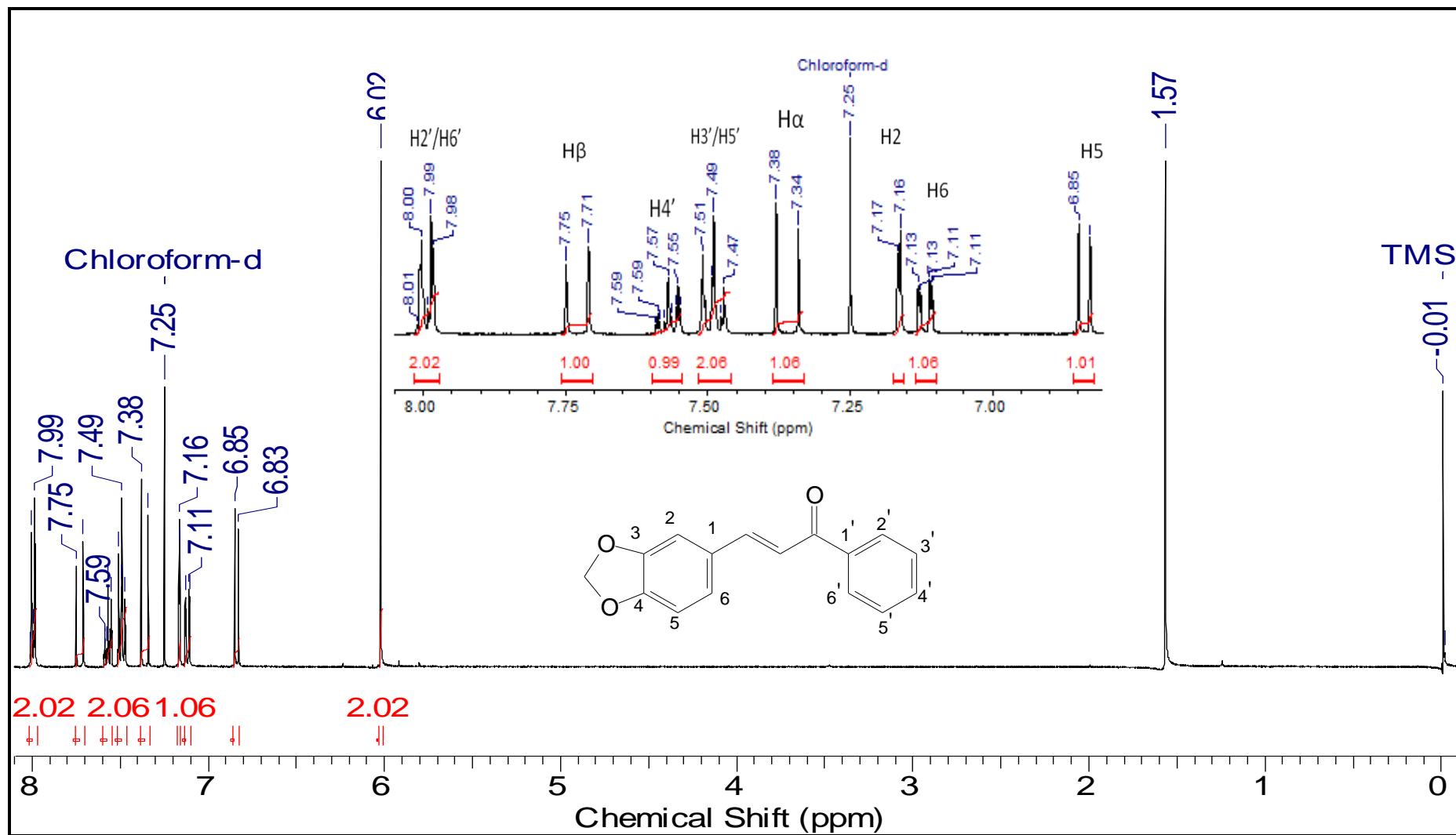


Figura 43. Espectro de RMN ^1H (400 MHz) do composto (26).

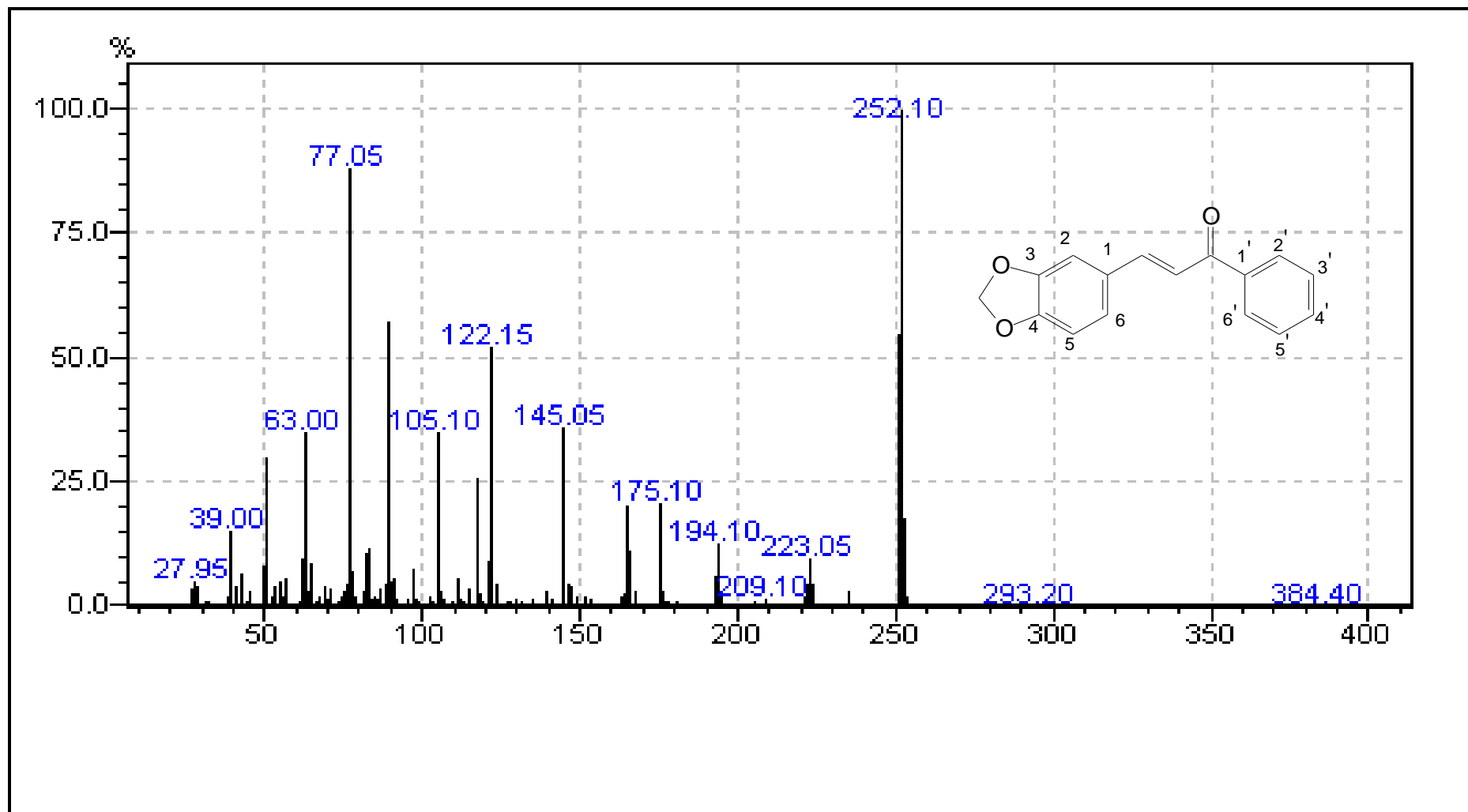


Figura 44. Espectro de massas do composto (26) obtido por CG-EM.

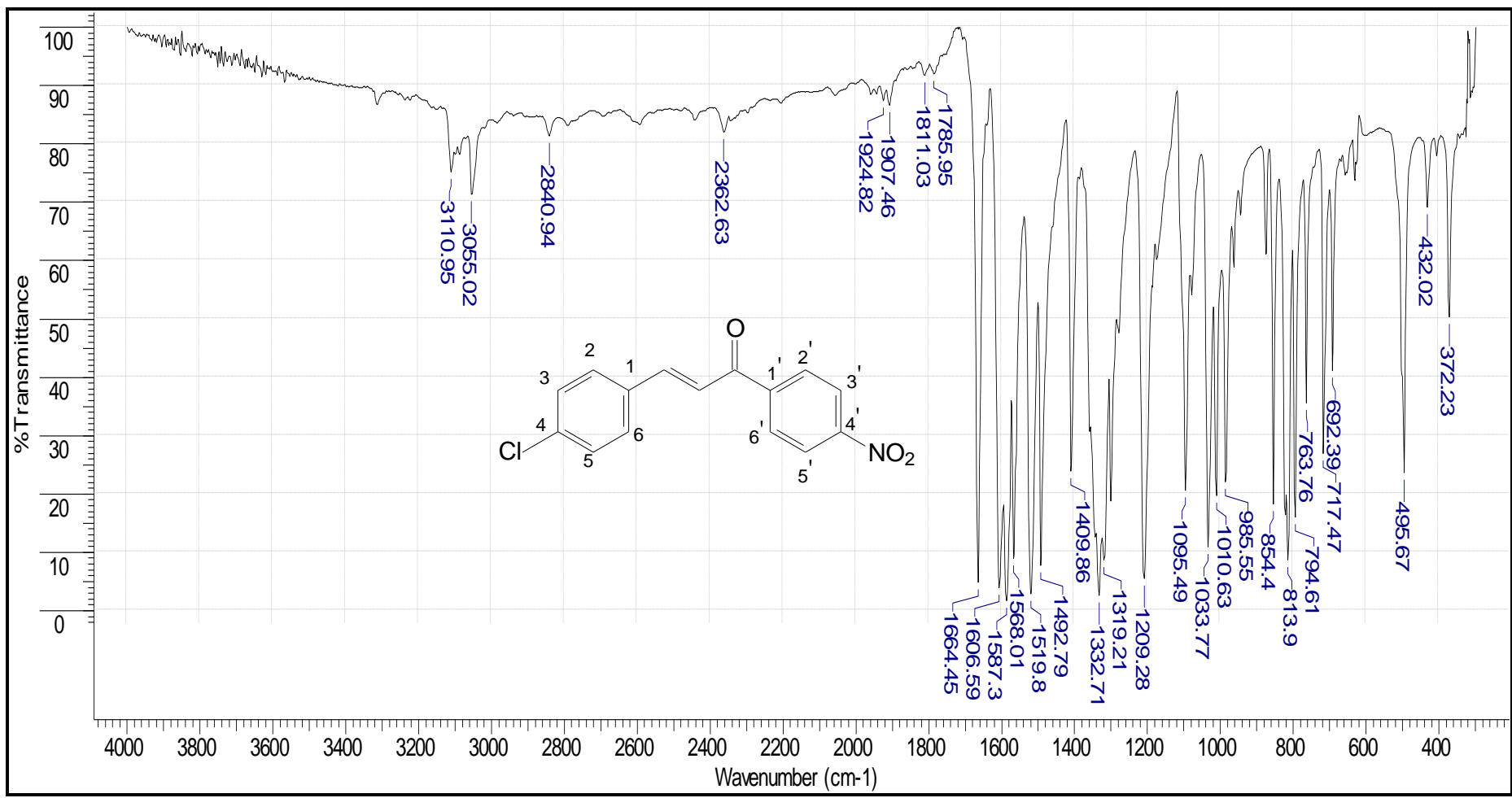


Figura 45. Espectro no IV (KBr) do composto (27).

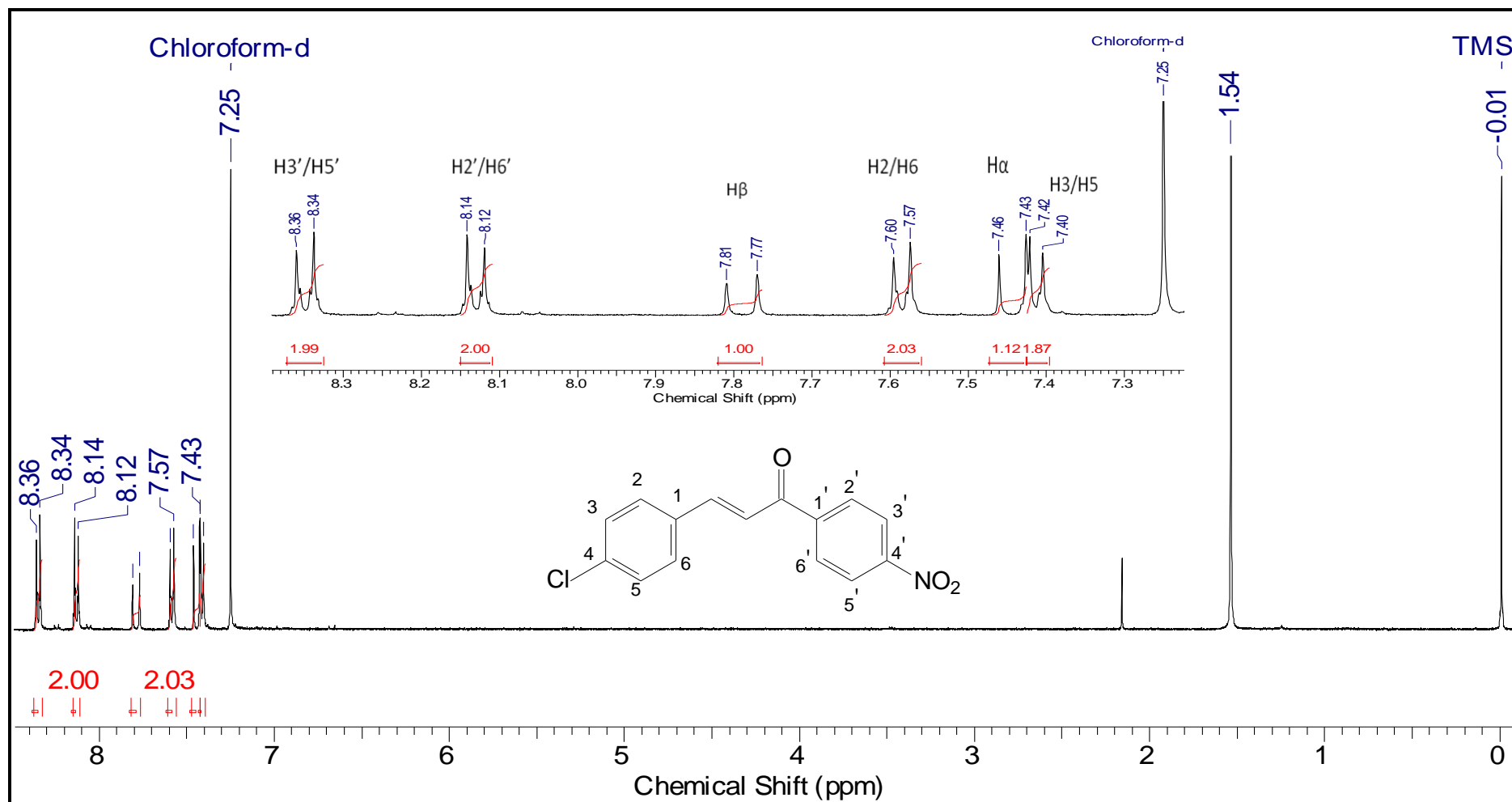


Figura 46. Espectro de RMN ¹H (400 MHz) do composto (27).

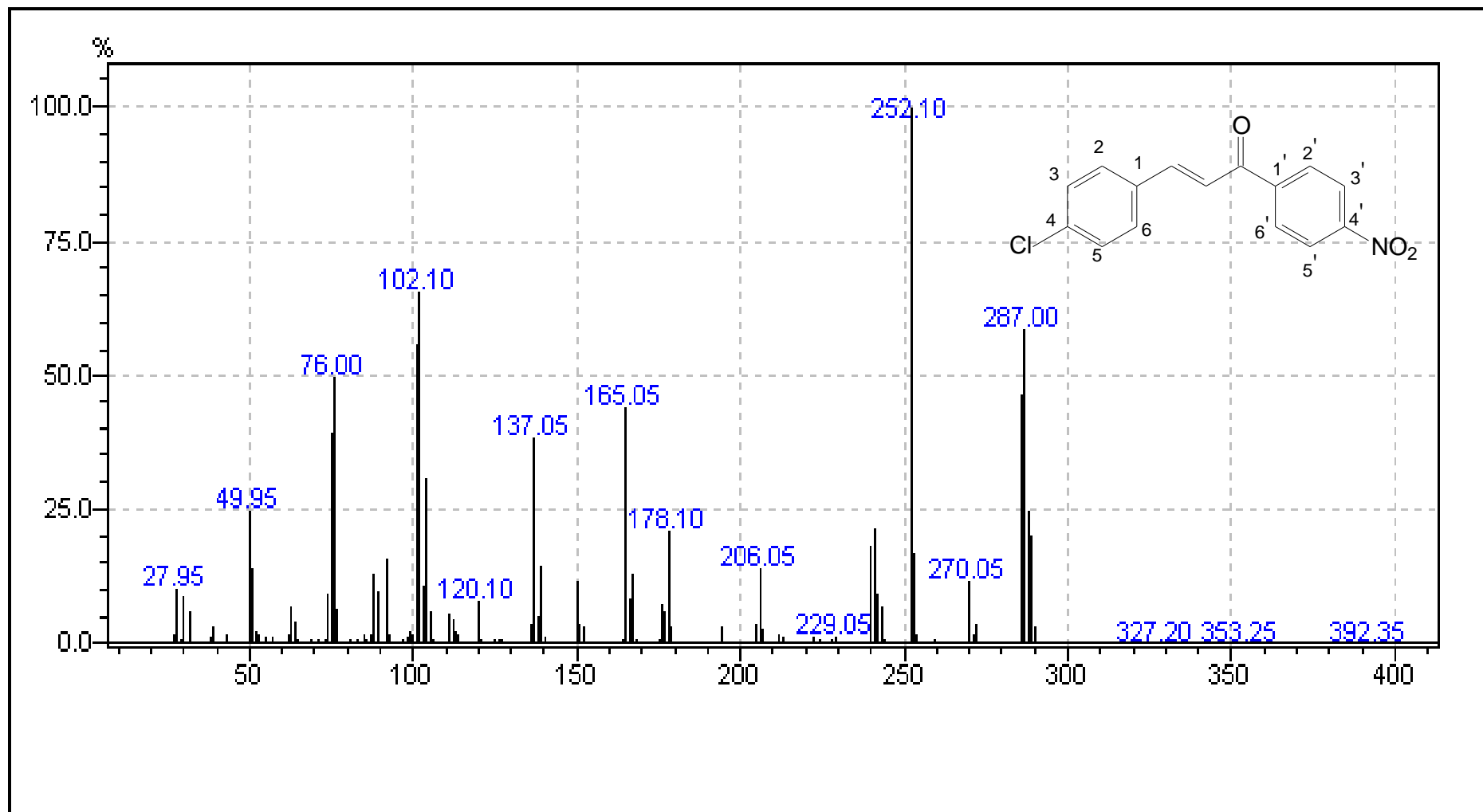


Figura 47. Espectro de massas do composto (27) obtido por CG-EM.

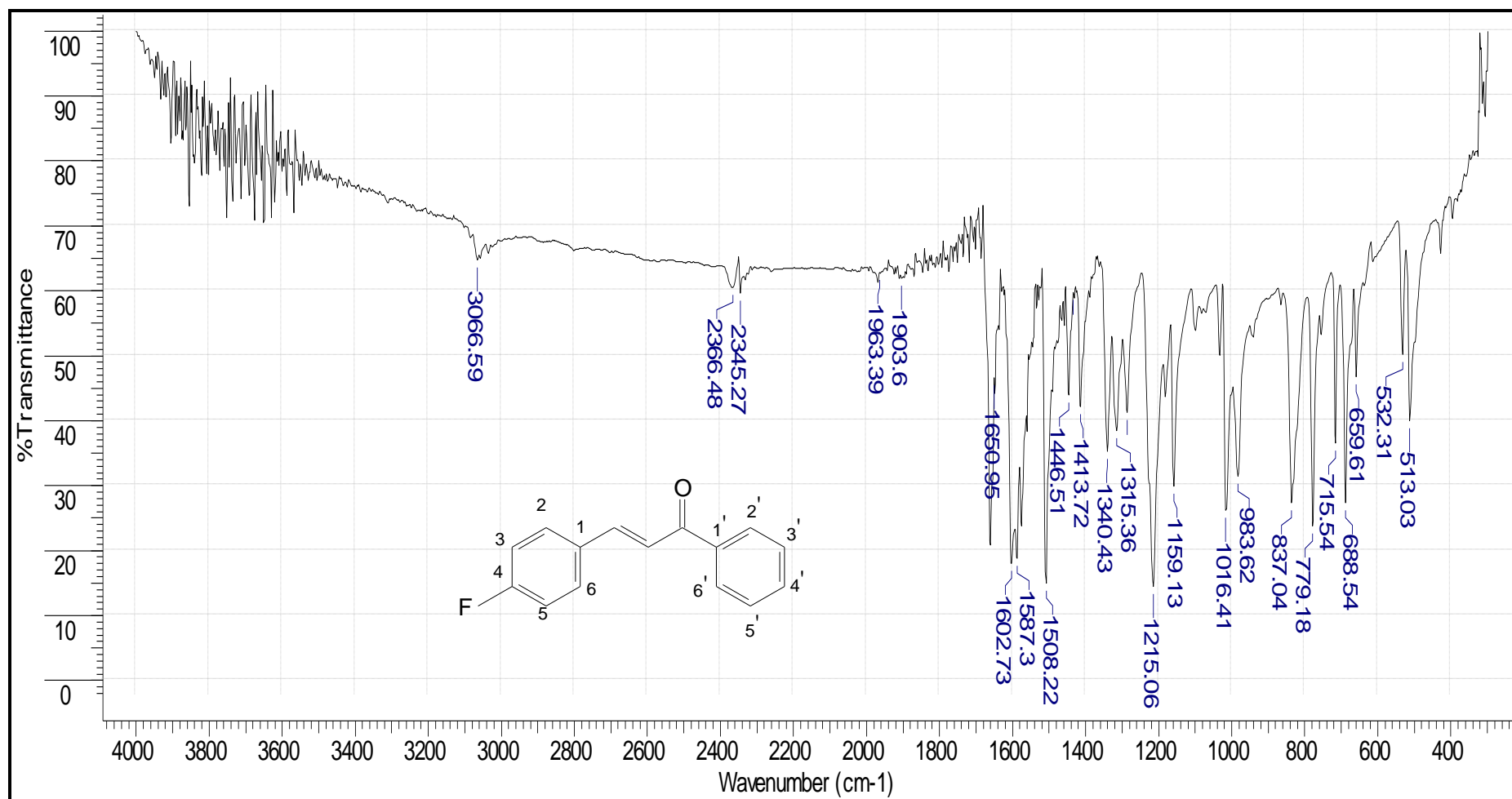


Figura 48. Espectro no IV (KBr) do composto (**28**).

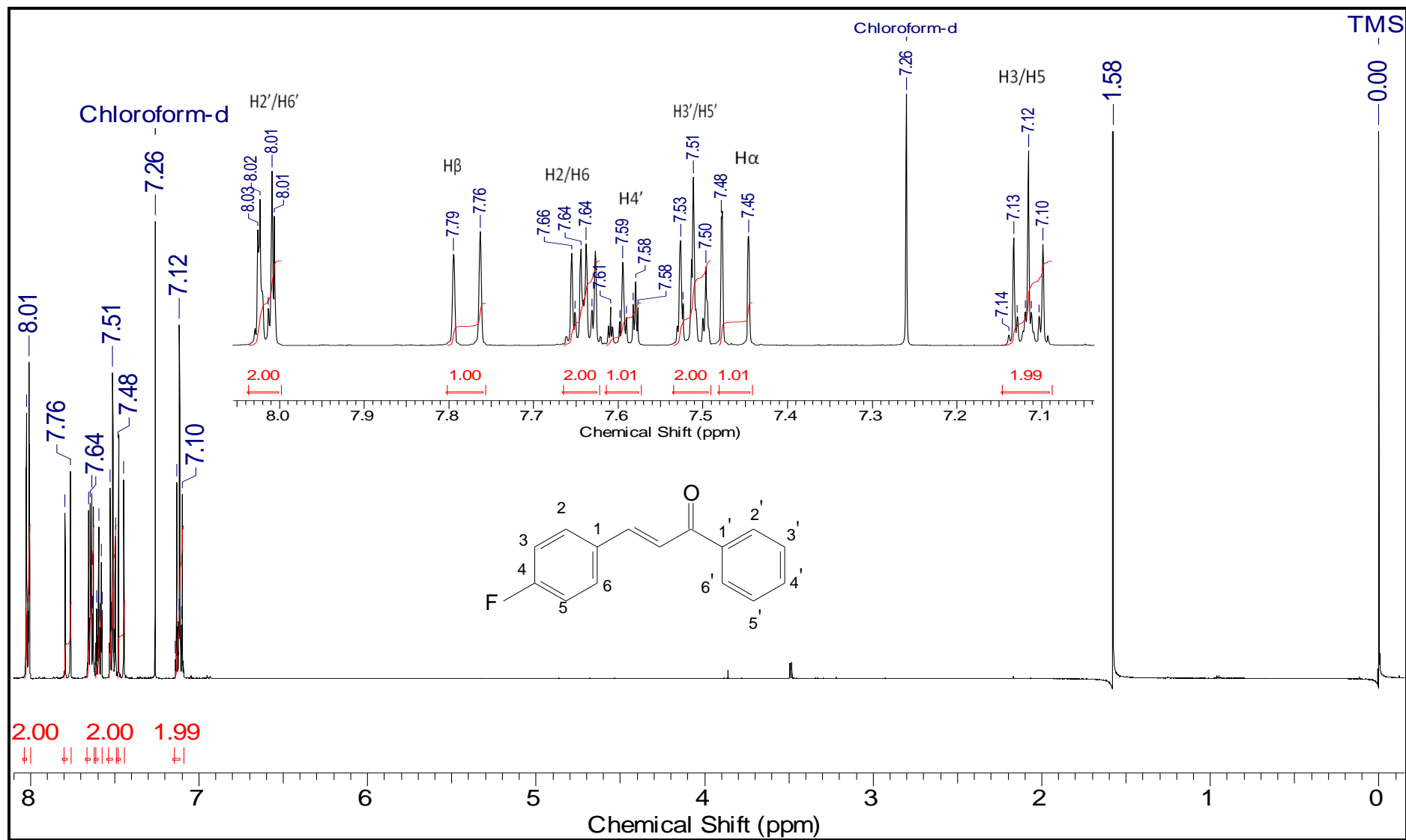


Figura 49. Espectro de RMN ^1H (500 MHz) do composto (28).

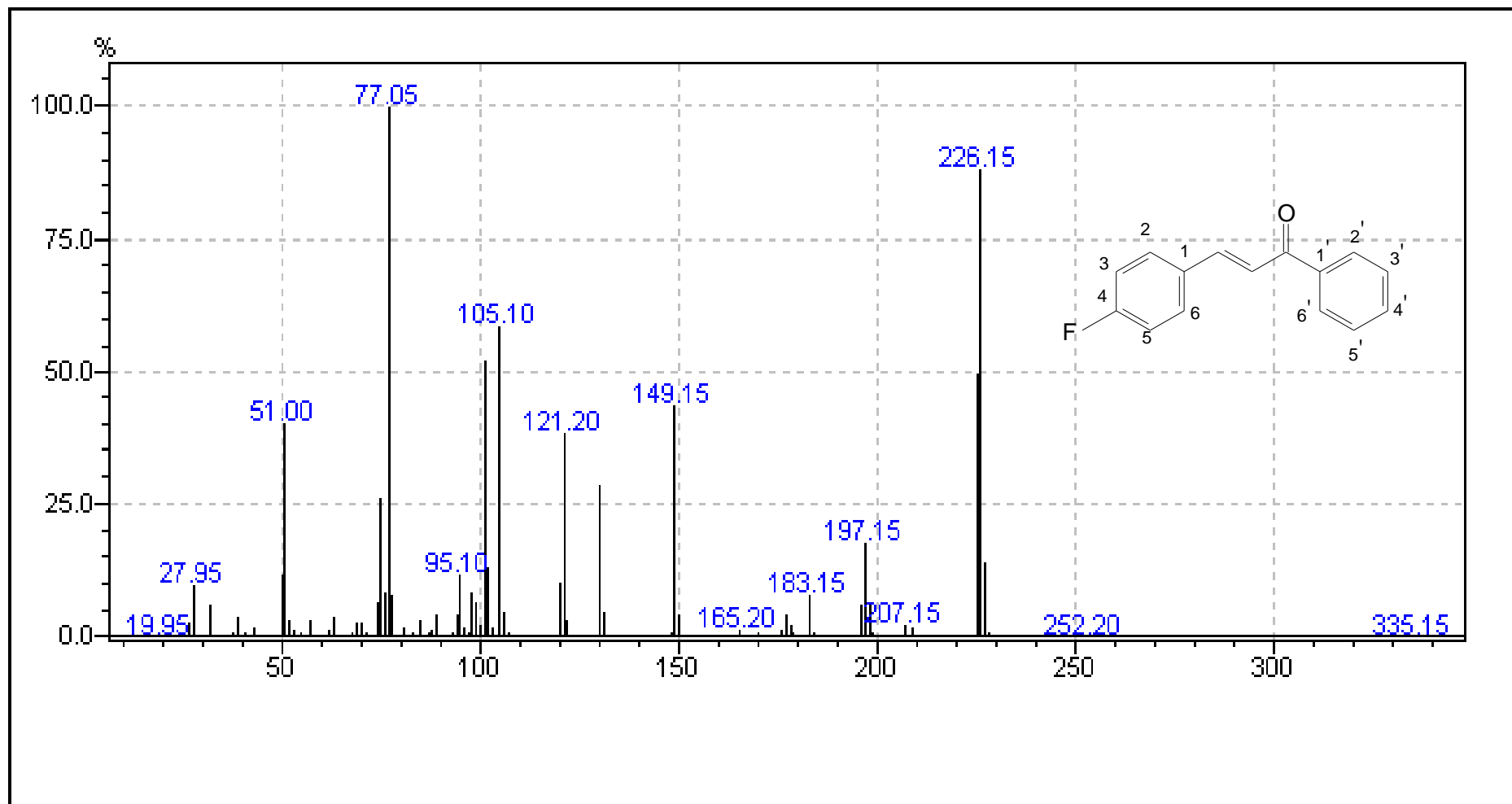


Figura 50. Espectro de massas do composto (28) obtido por CG-EM.

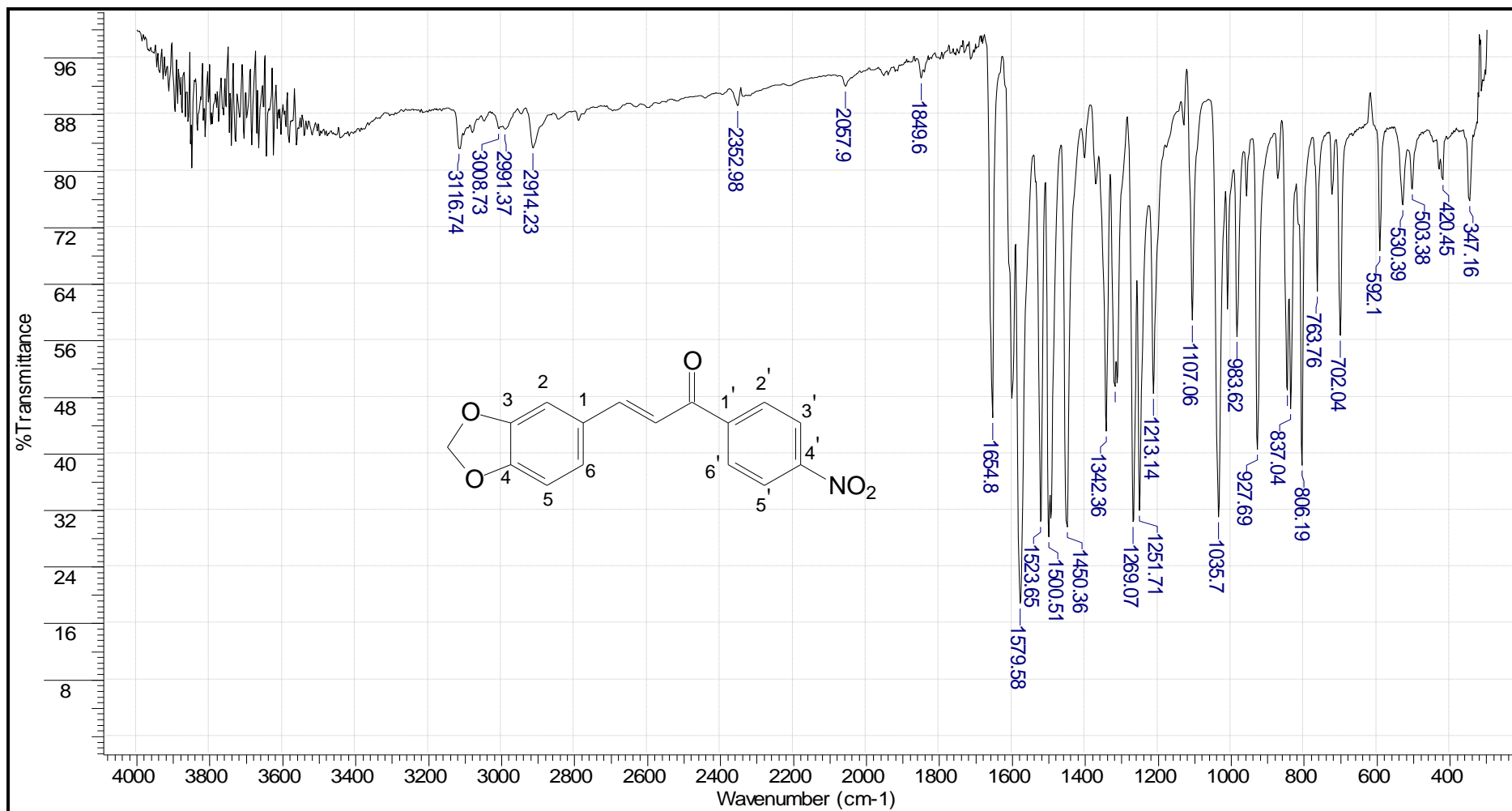


Figura 51. Espectro no IV (KBr) do composto (29).

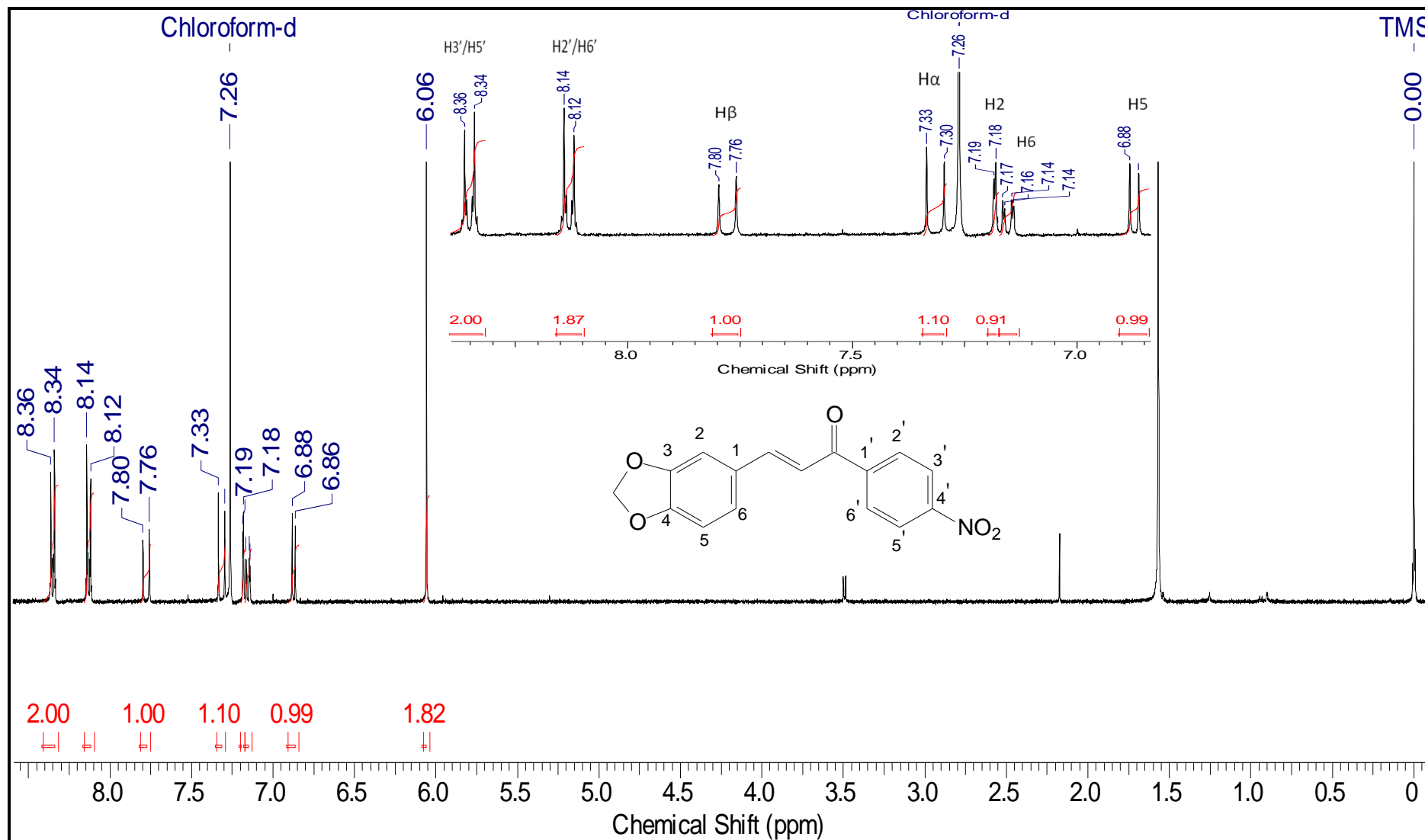


Figura 52. Espectro de RMN ^1H (400 MHz) do composto **(29)**.

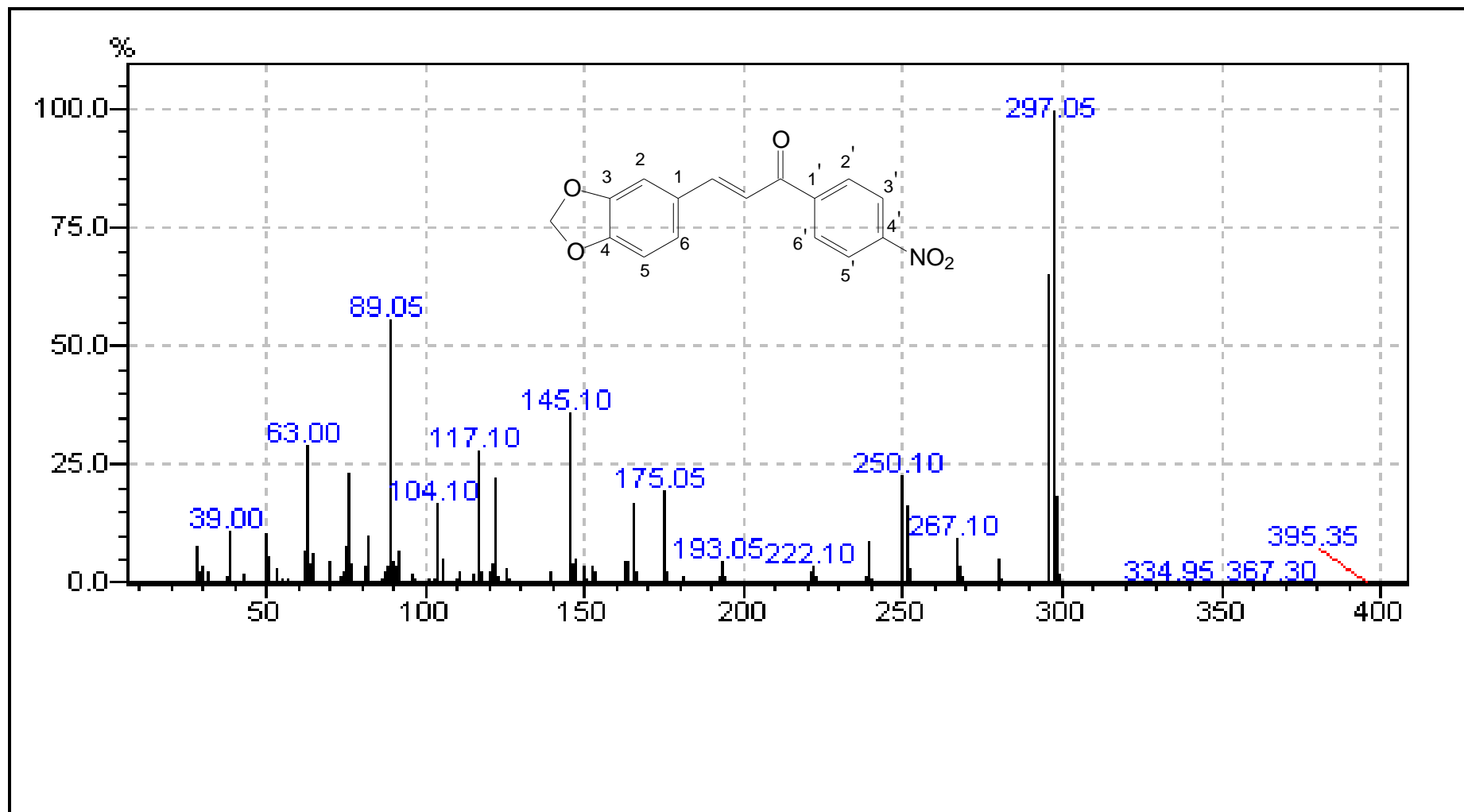


Figura 53. Espectro de massas do composto (29) obtido por CG-EM.

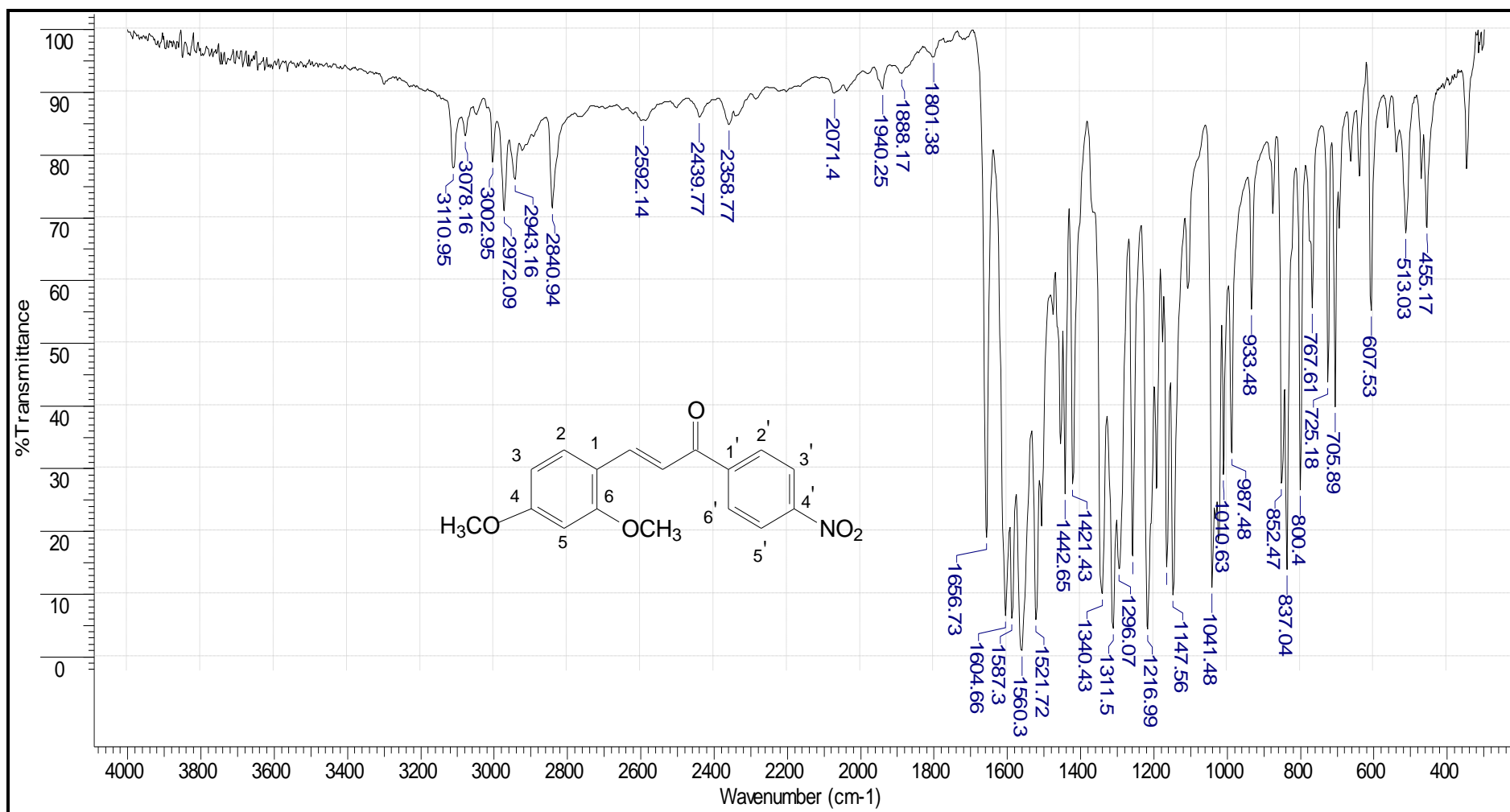


Figura 54. Espectro no IV (KBr) do composto (30).

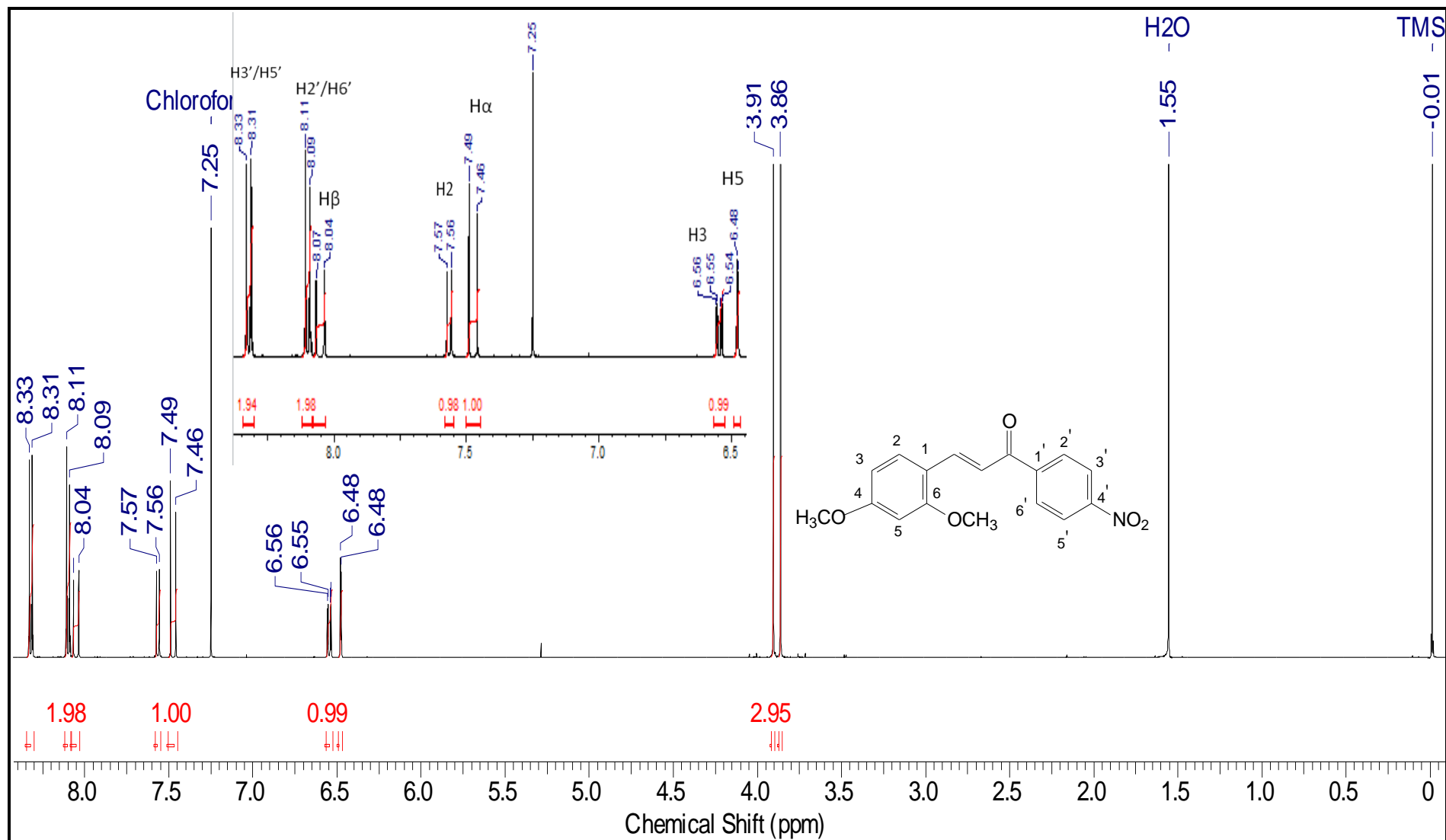


Figura 55. Espectro de RMN ^1H (500 MHz) do composto (30).

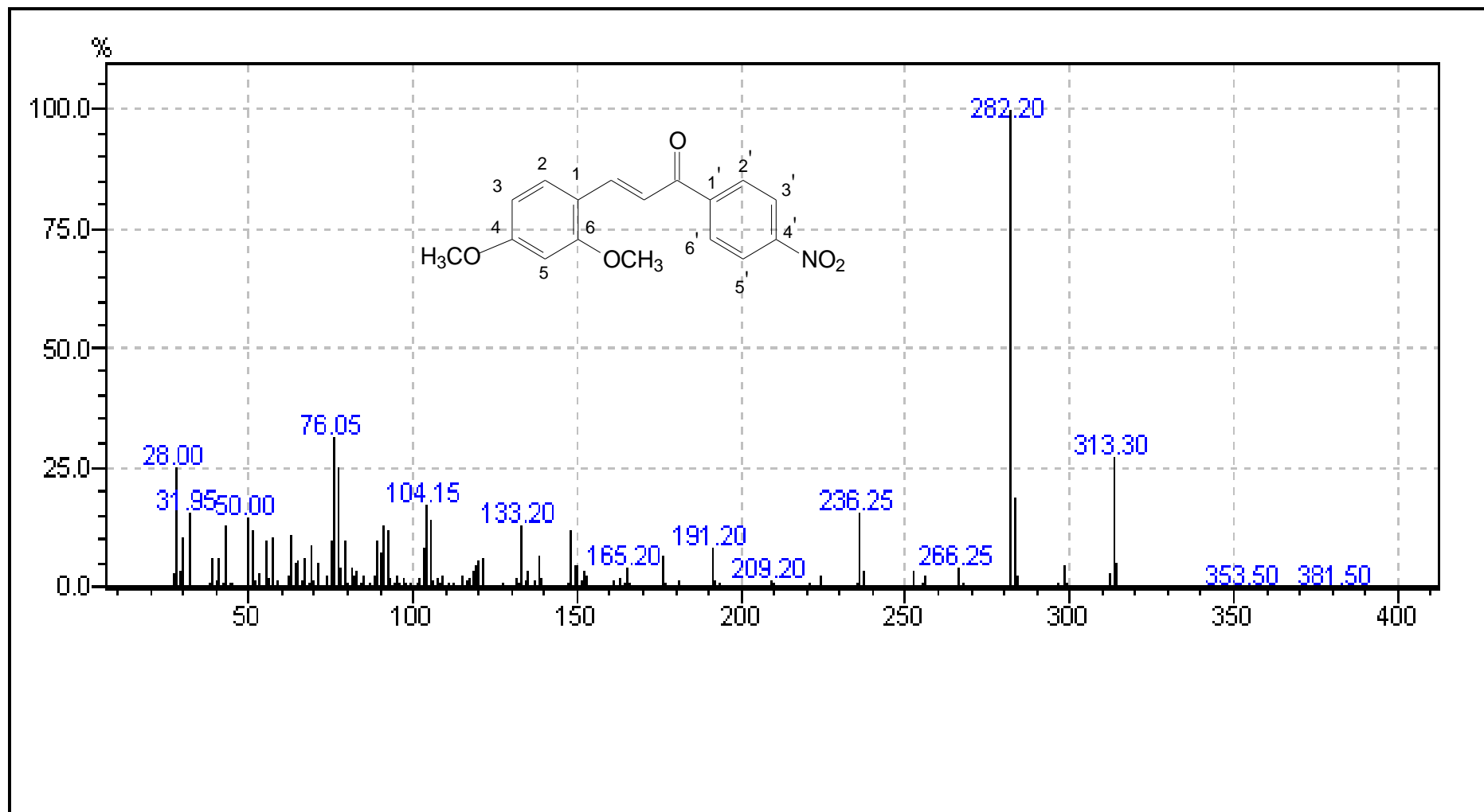


Figura 56. Espectro de massas do composto (30) obtido por CG-EM.

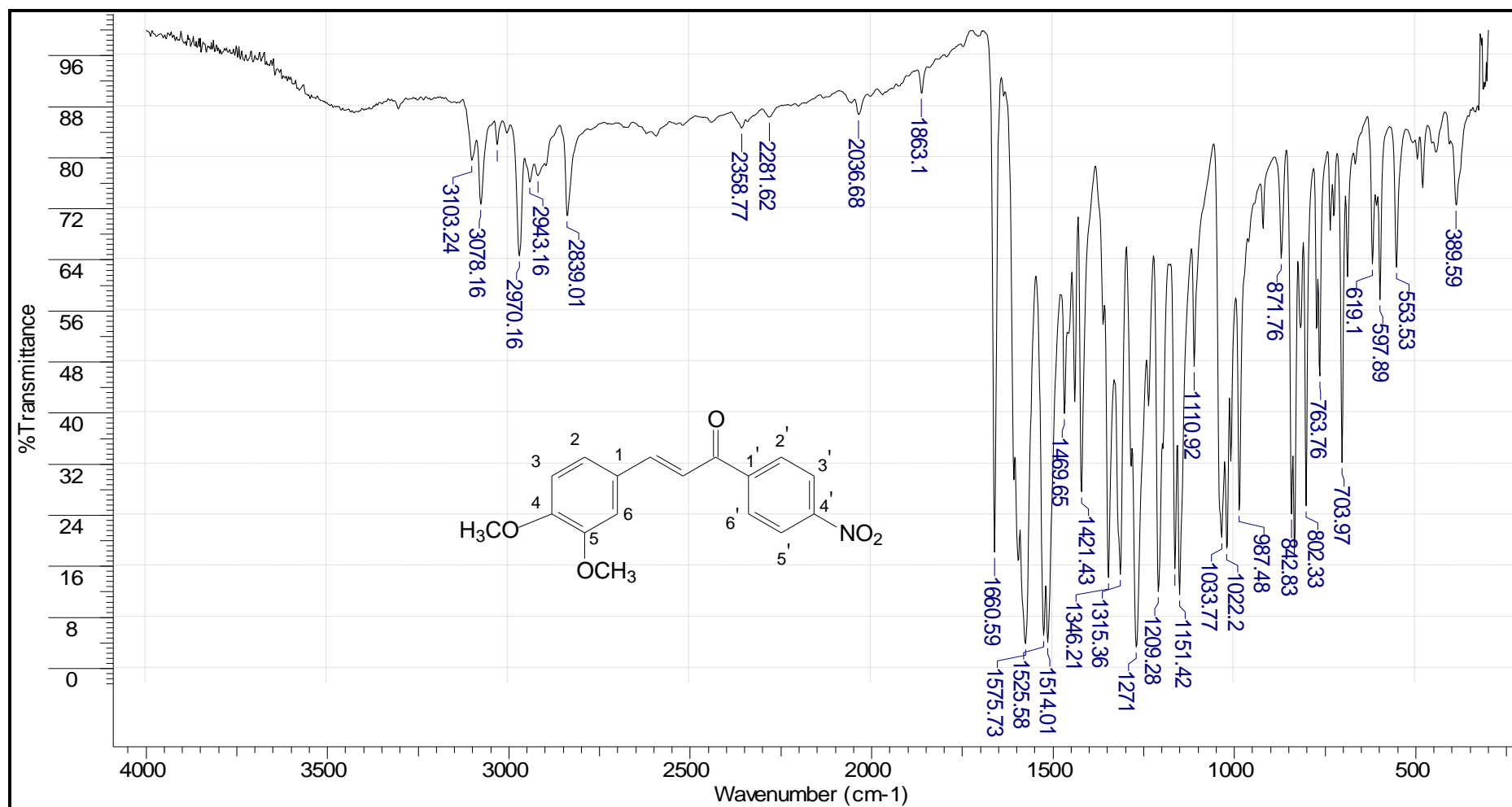


Figura 57. Espectro no IV (KBr) do composto (31).

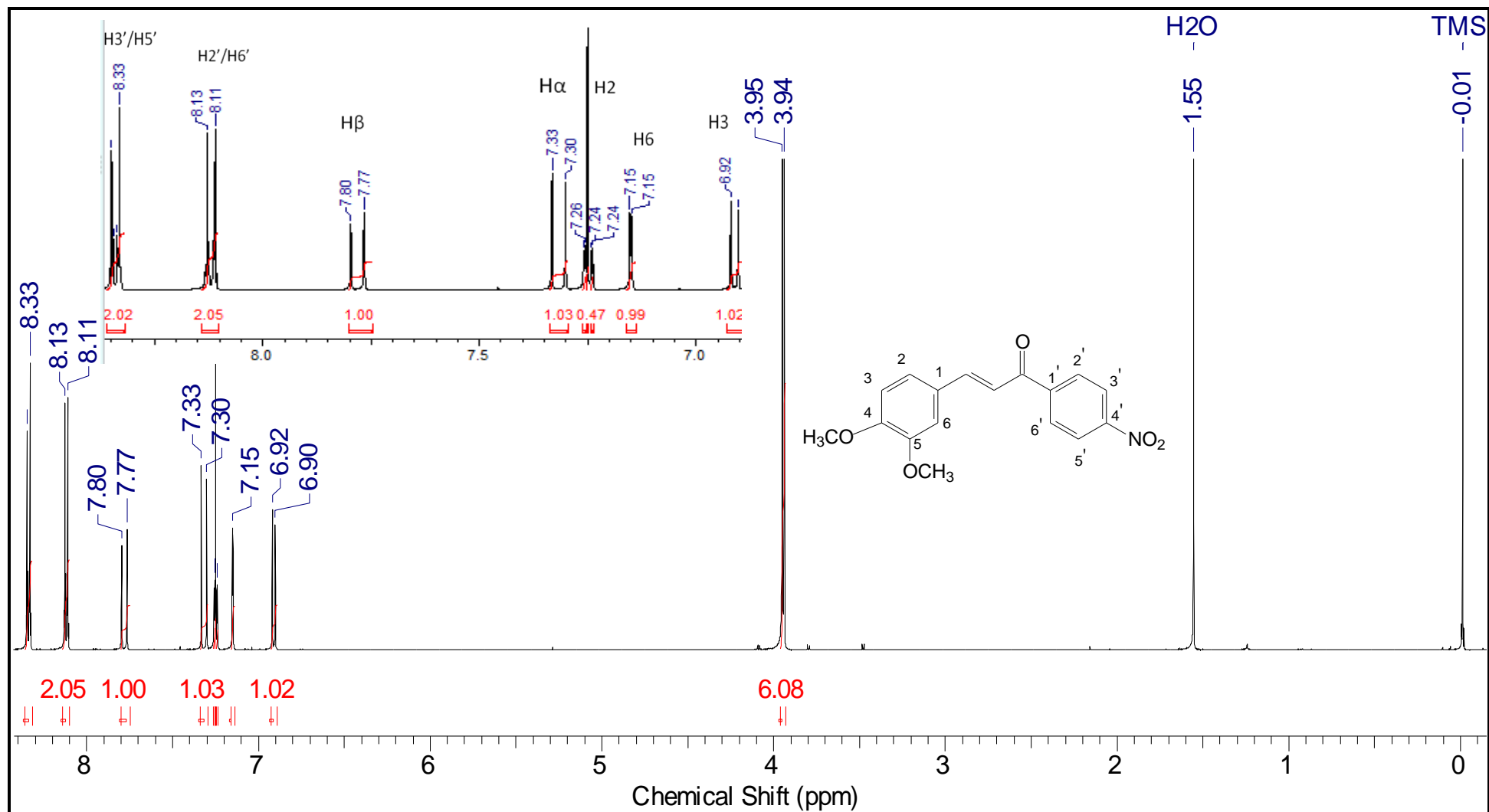


Figura 58. Espectro de RMN ^1H (500 MHz) do composto (31).

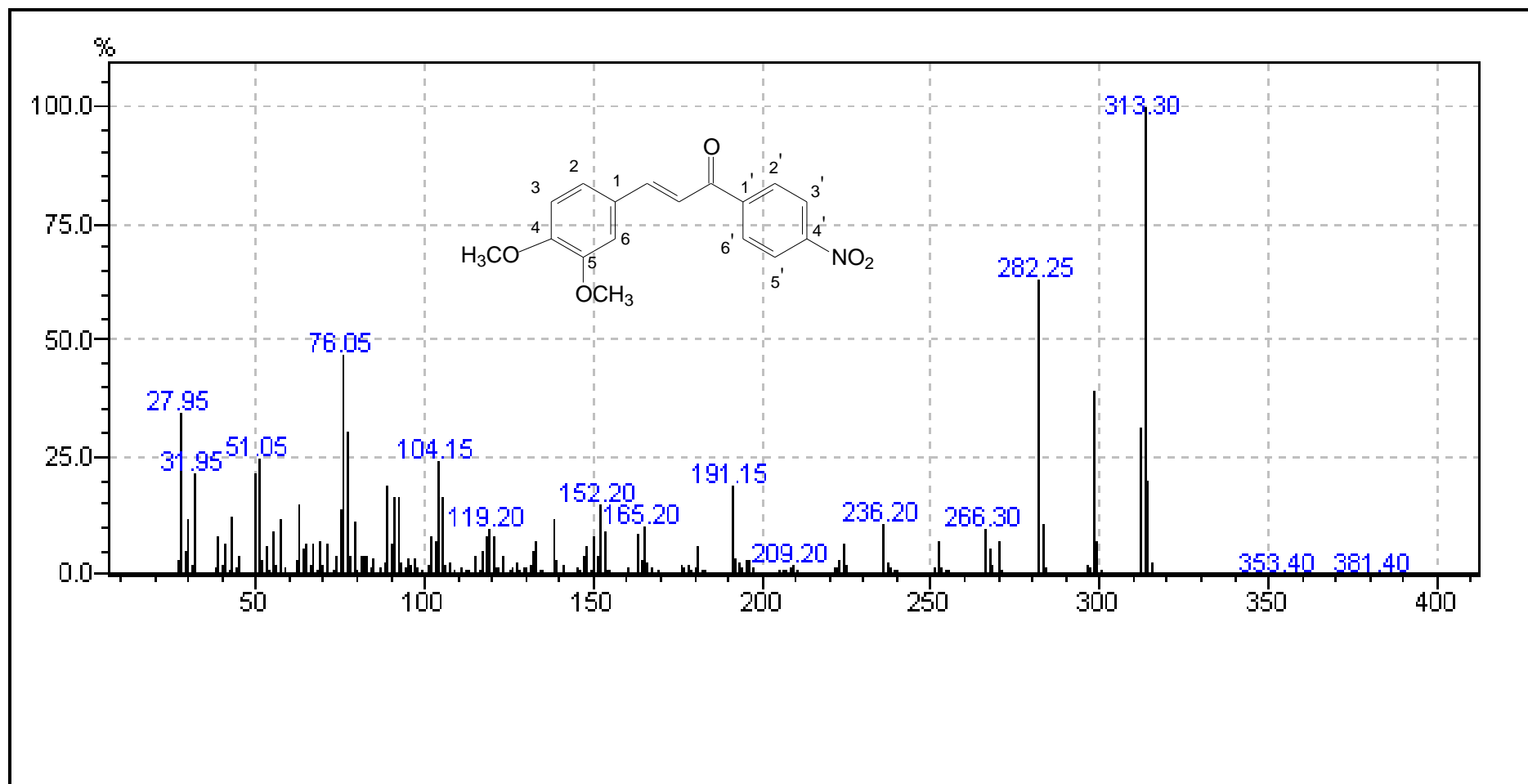


Figura 59. Espectro de massas do composto (31) obtido por CG-EM.

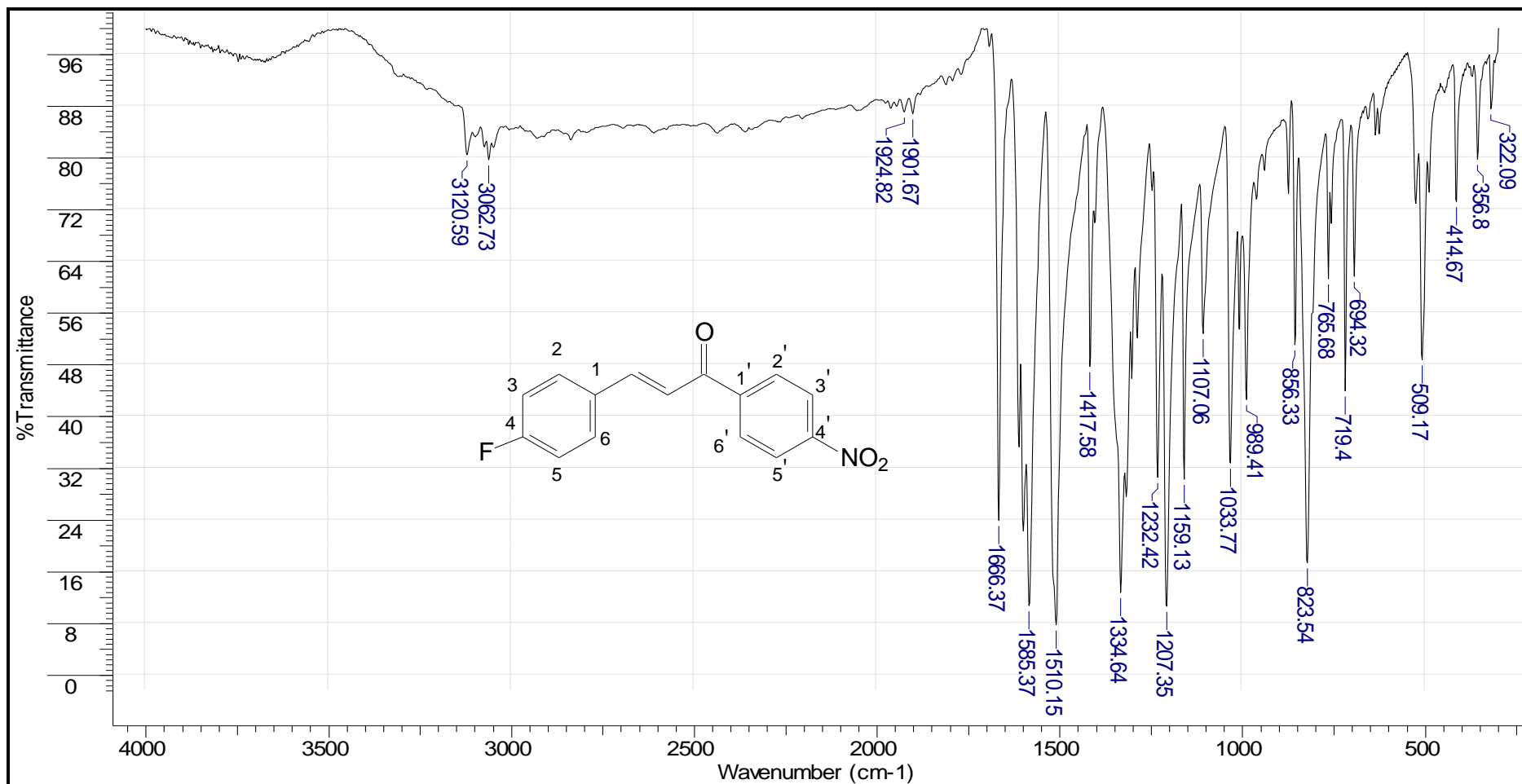


Figura 60. Espectro no IV (KBr) do composto (32).

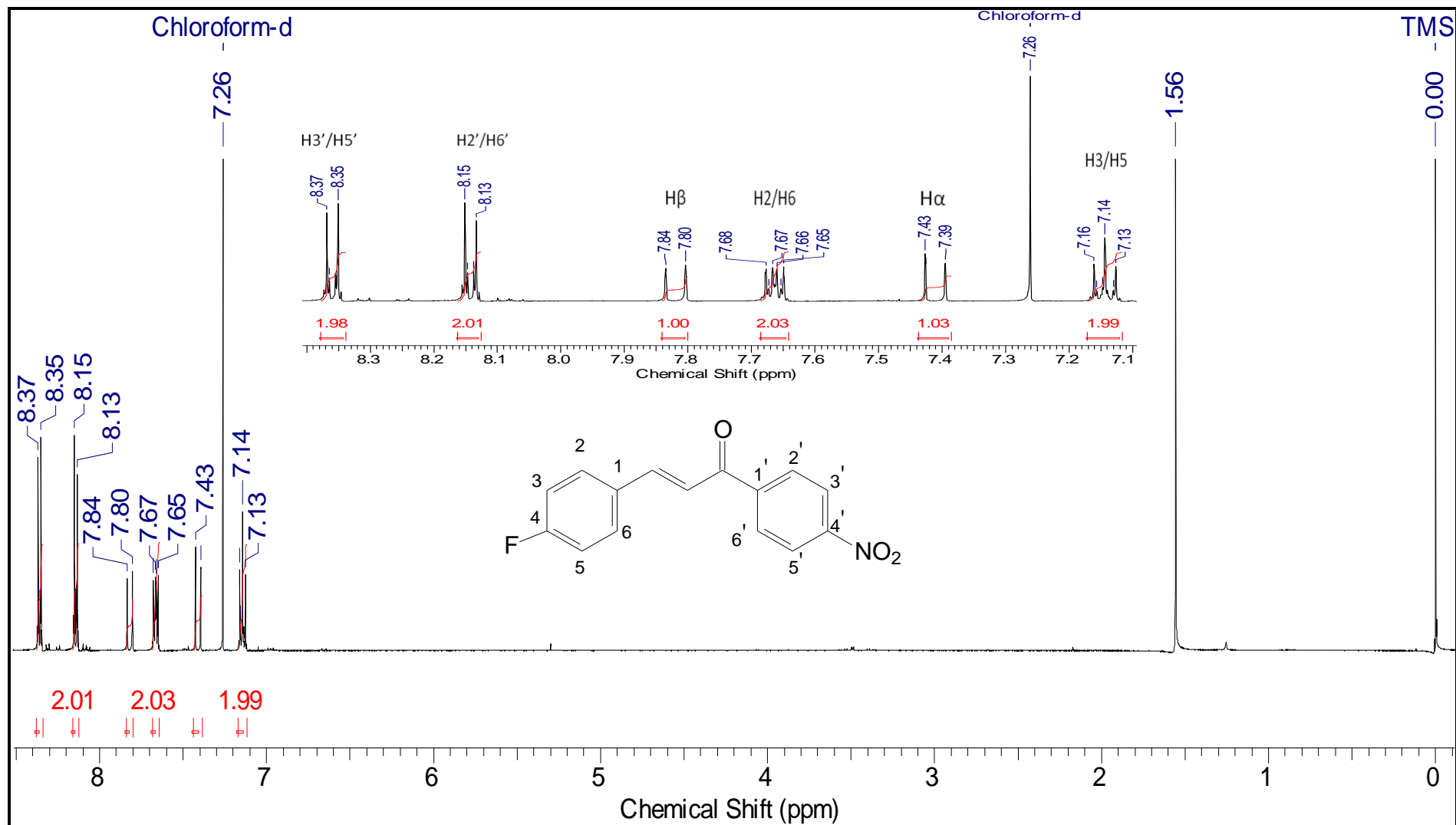


Figura 61. Espectro de RMN ^1H (500 MHz) do composto (32).

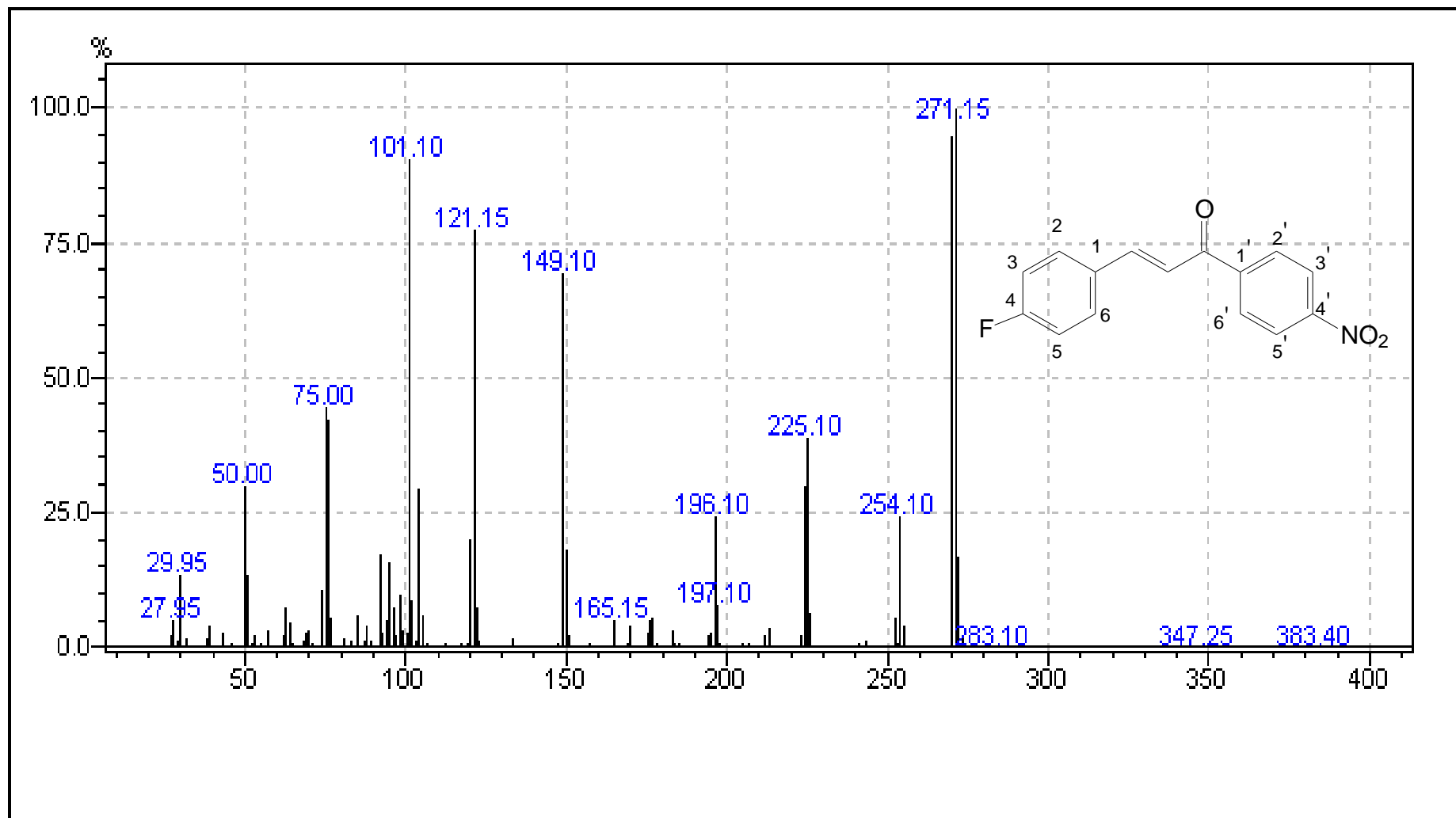


Figura 62. Espectro de massas do composto (32) obtido por CG-EM.

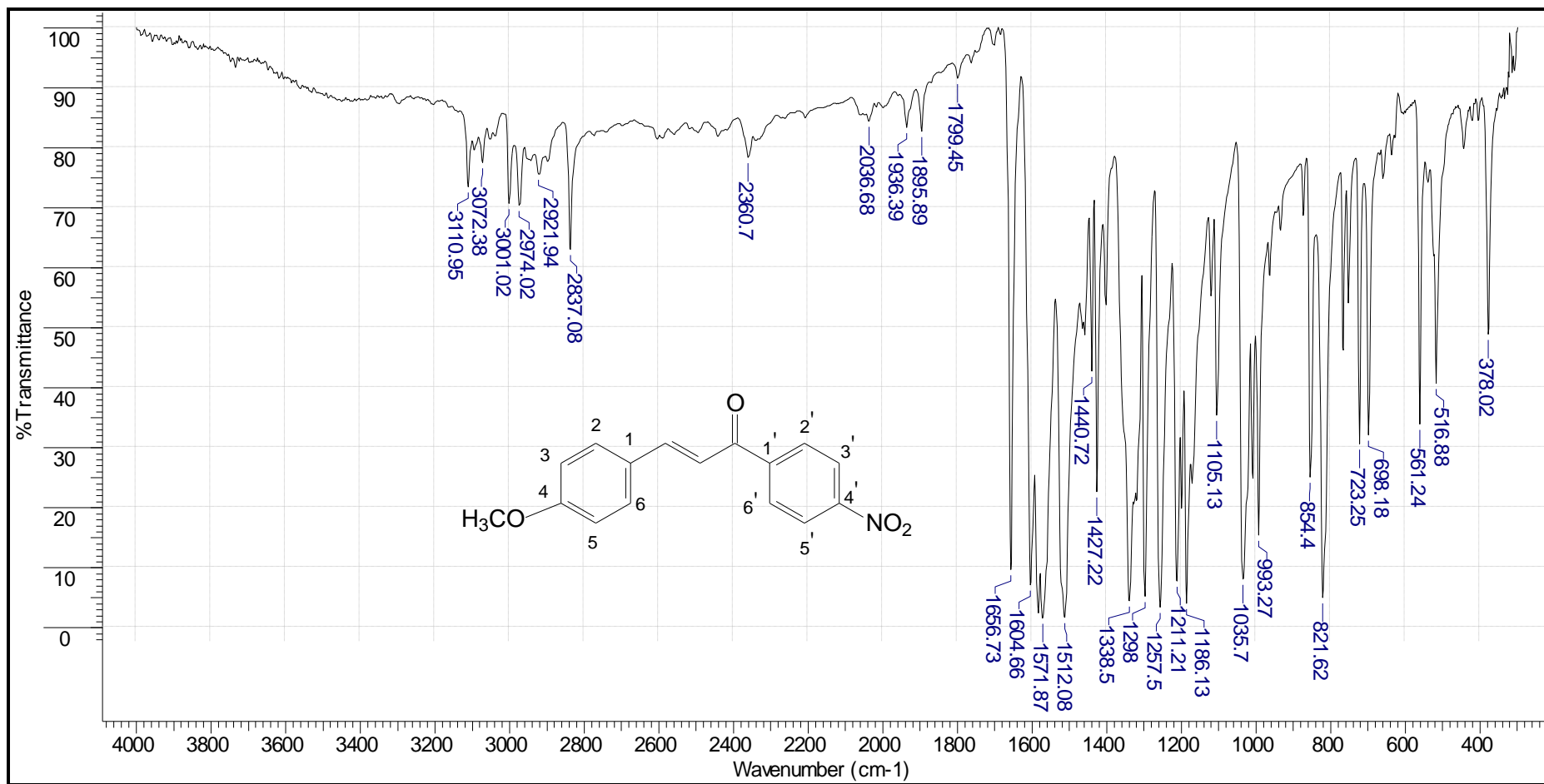


Figura 63. Espectro no IV (KBr) do composto (33).

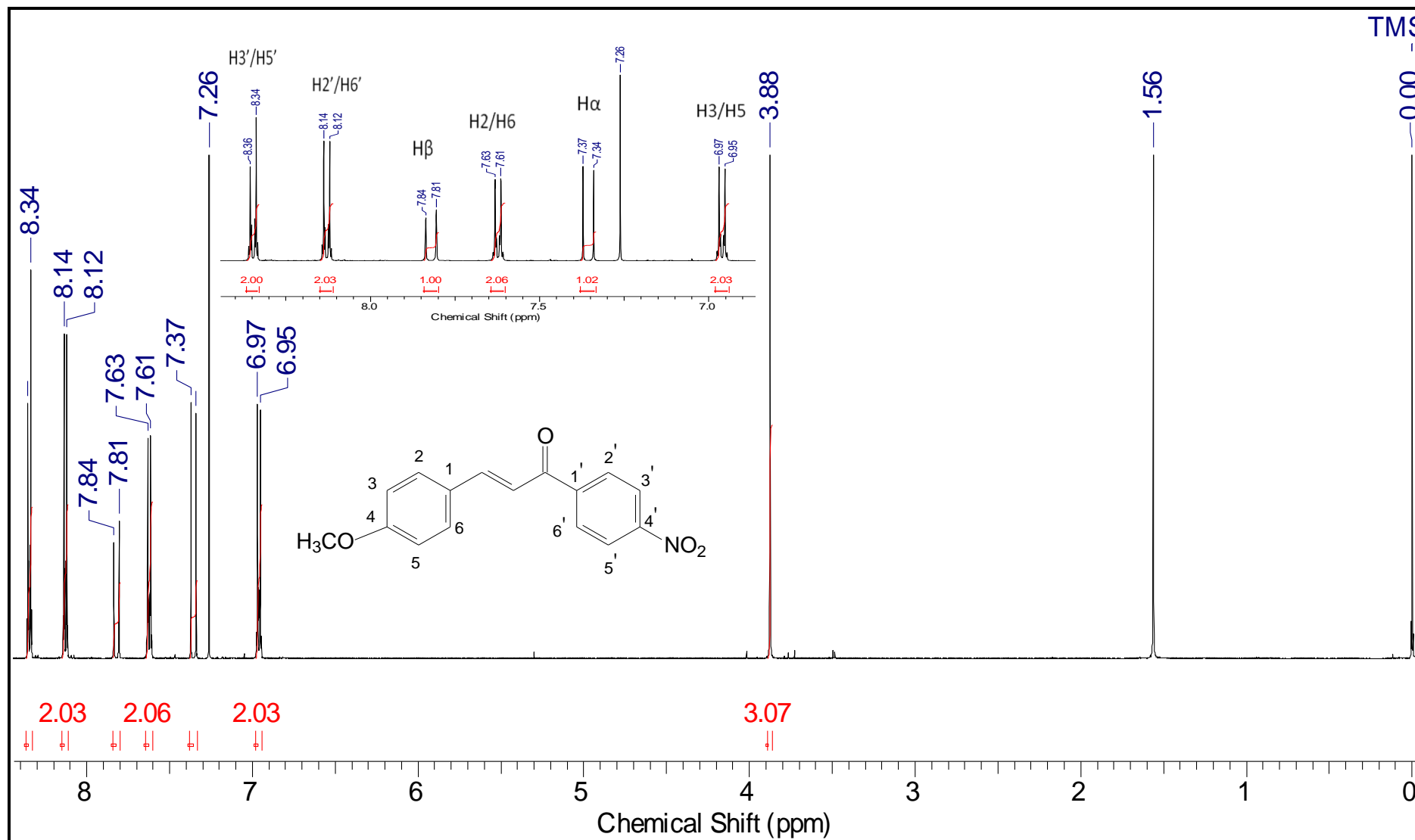


Figura 64. Espectro de RMN ^1H (500 MHz) do composto (33).

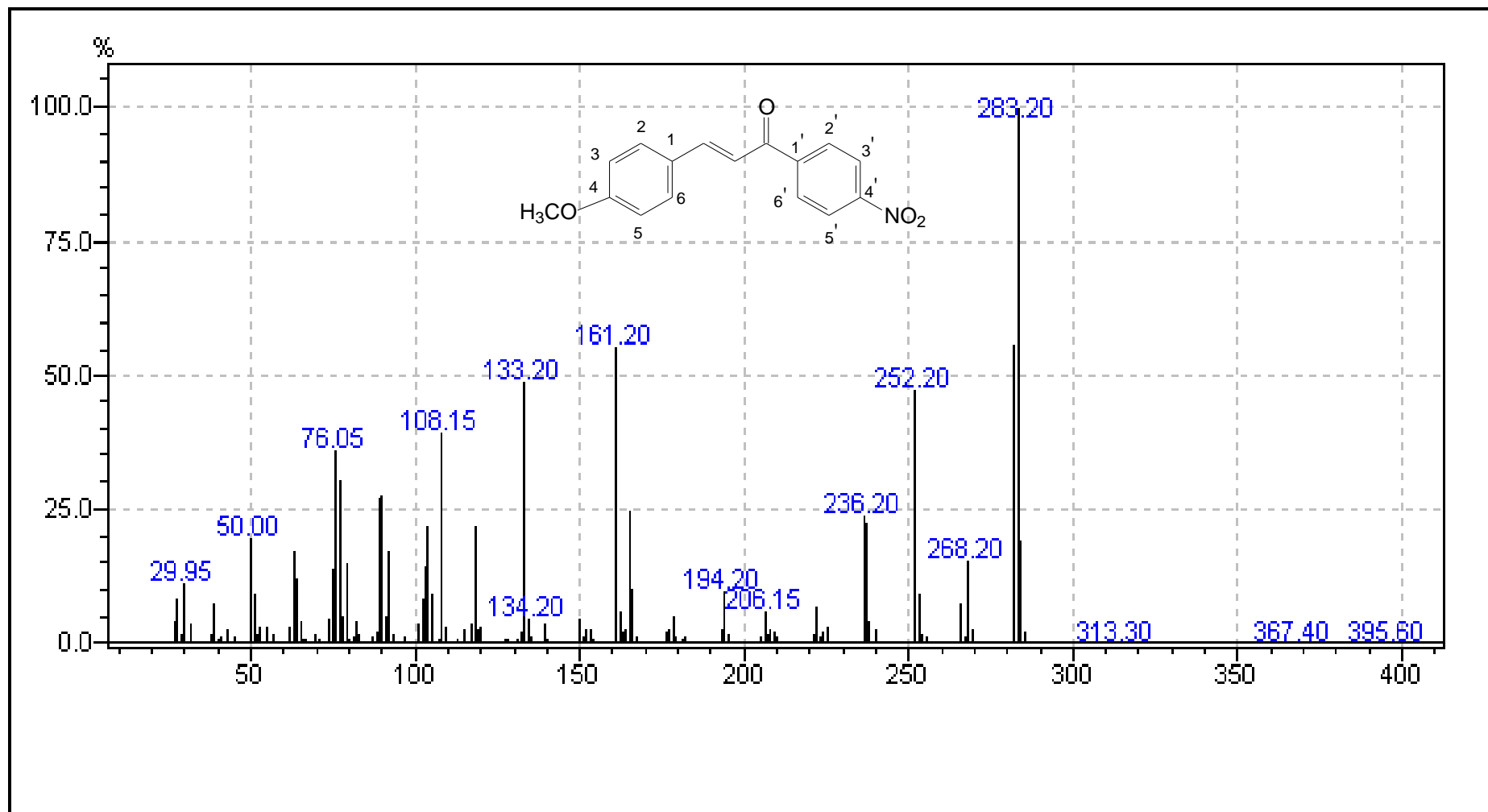


Figura 65. Espectro de massas do composto (33) obtido por CG-EM.

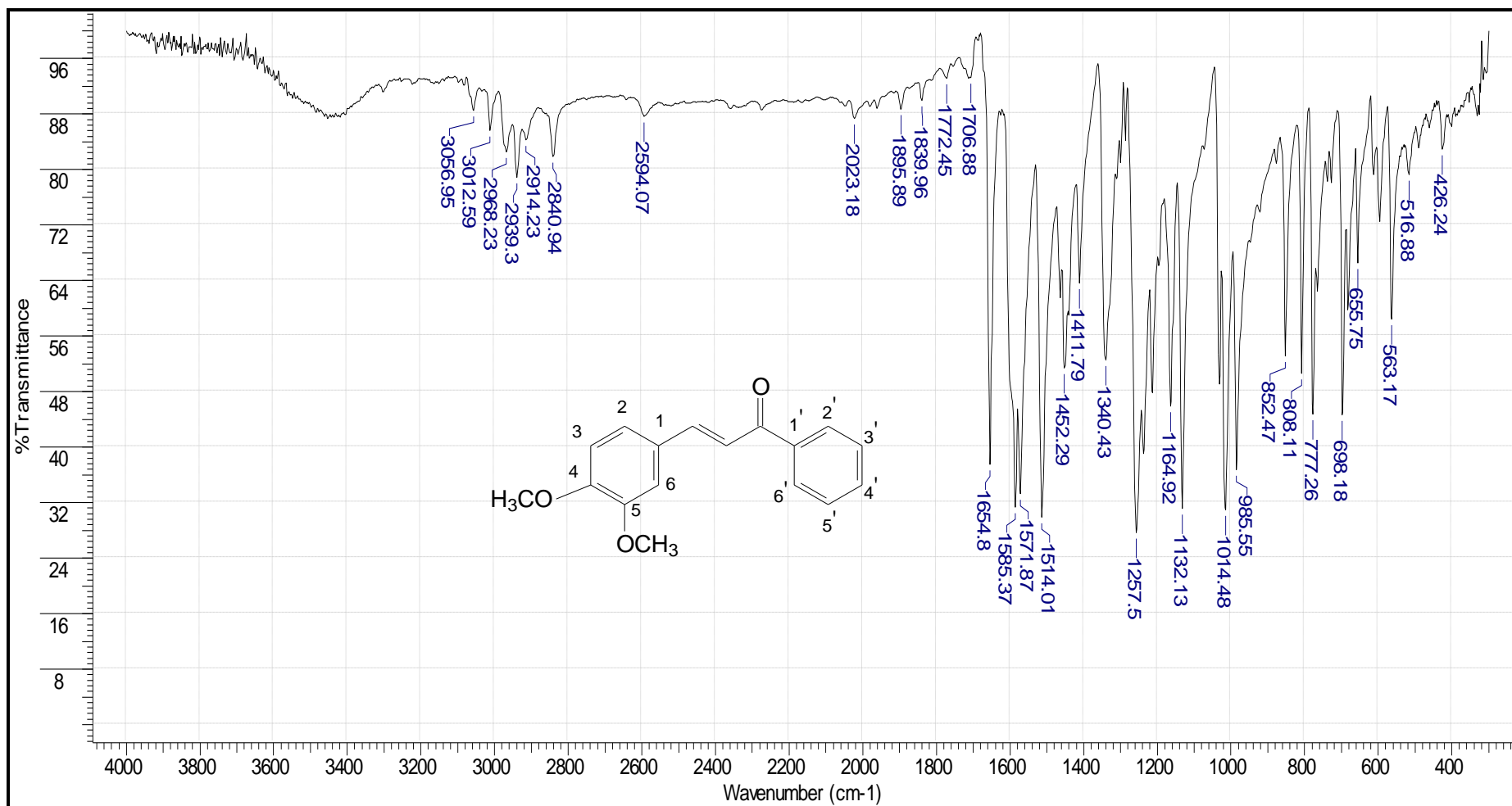


Figura 66. Espectro no IV (KBr) do composto (34).

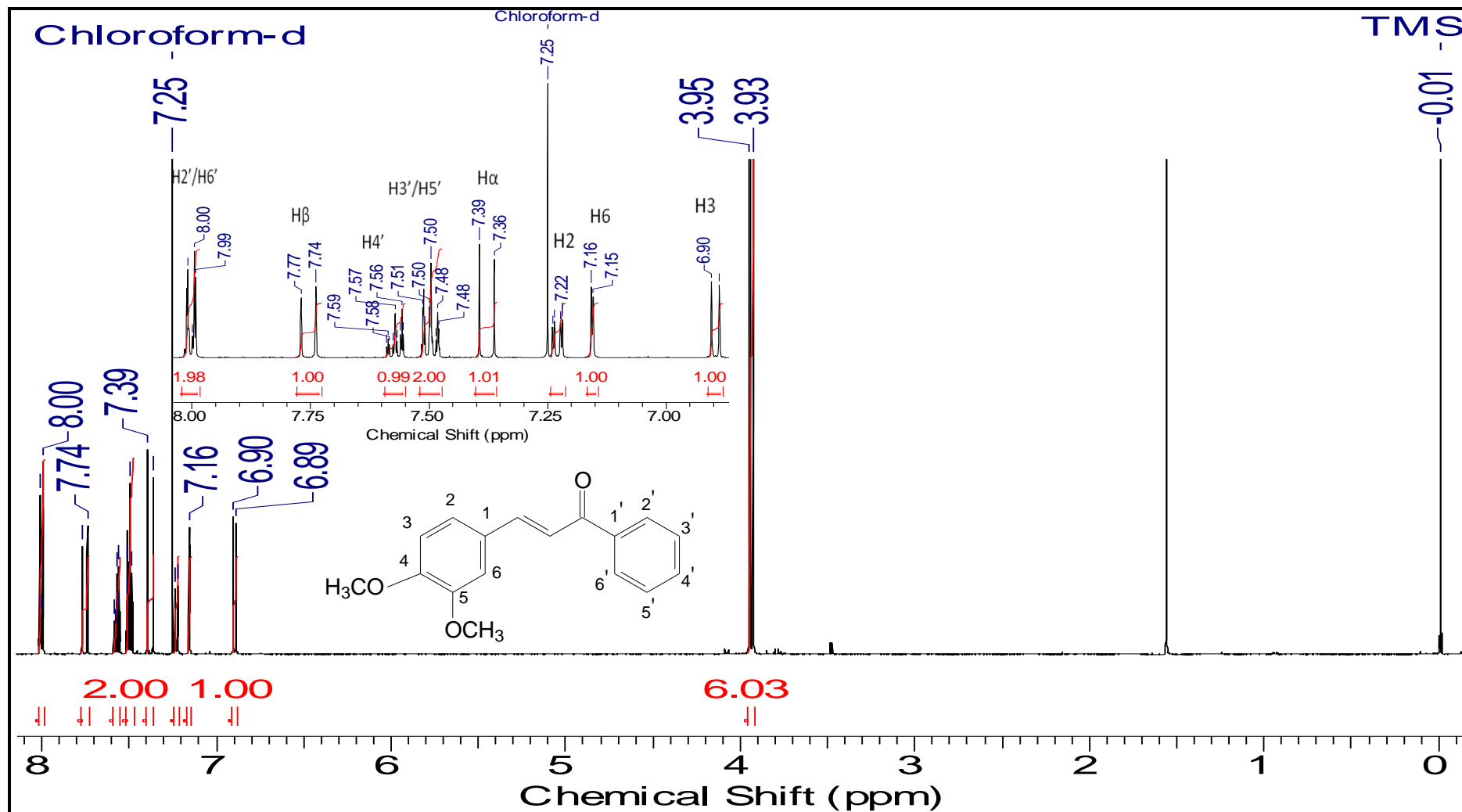


Figura 67. Espectro de RMN ¹H (500 MHz) do composto (34).

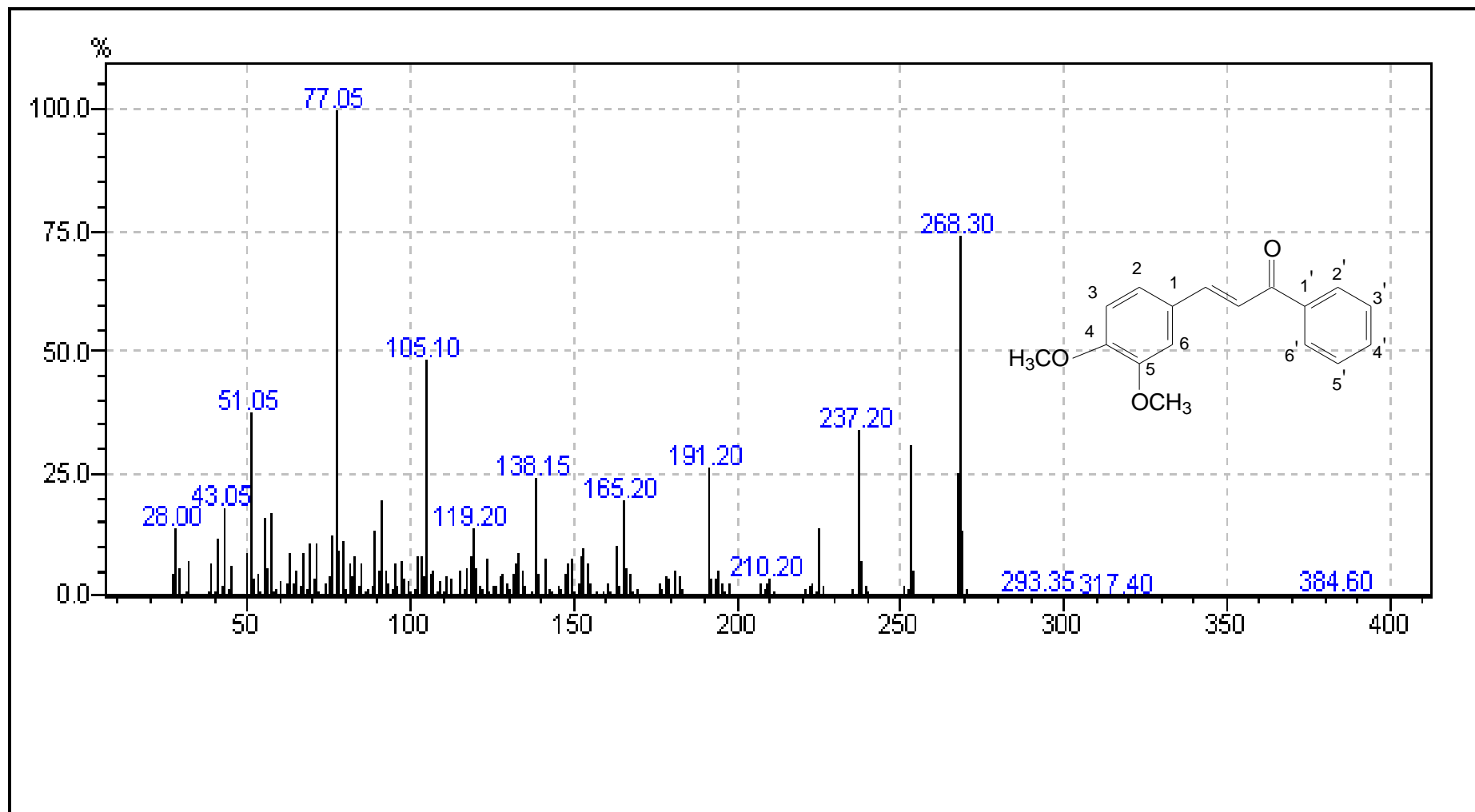


Figura 68. Espectro de massas do composto (34) obtido por CG-EM.

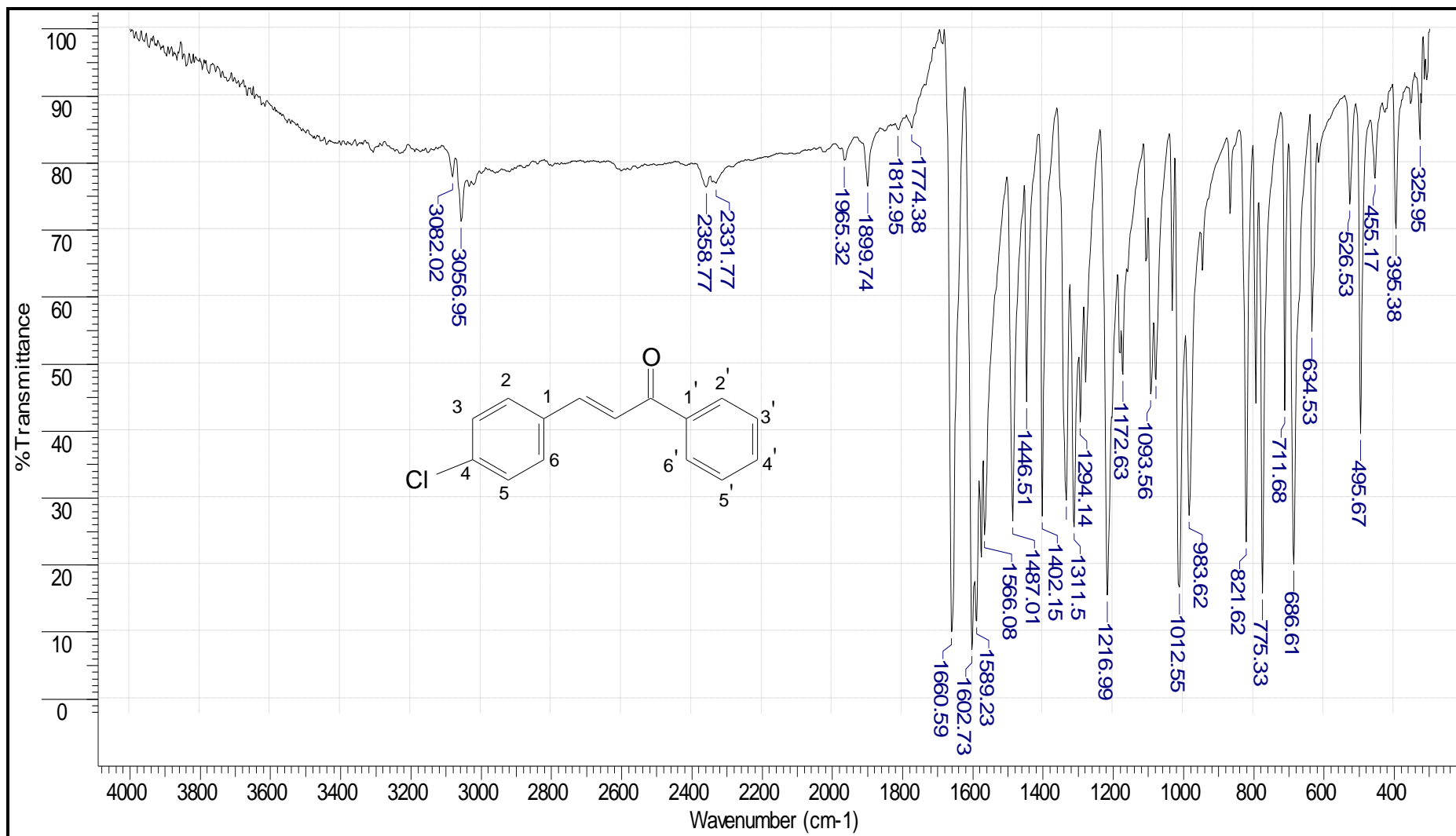


Figura 69. Espectro no IV (KBr) do composto (35).

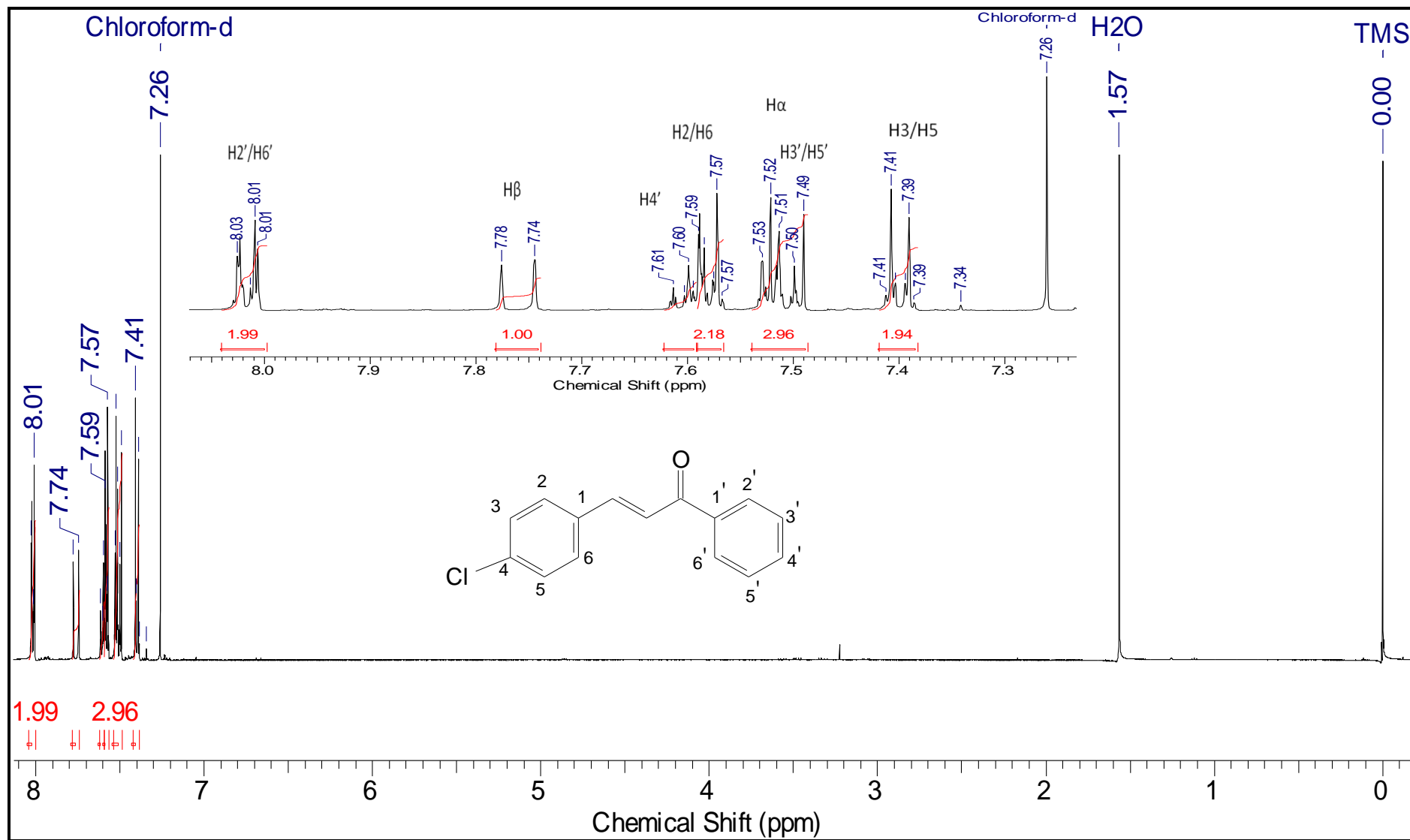


Figura 70. Espectro de RMN ^1H (500 MHz) do composto (35).

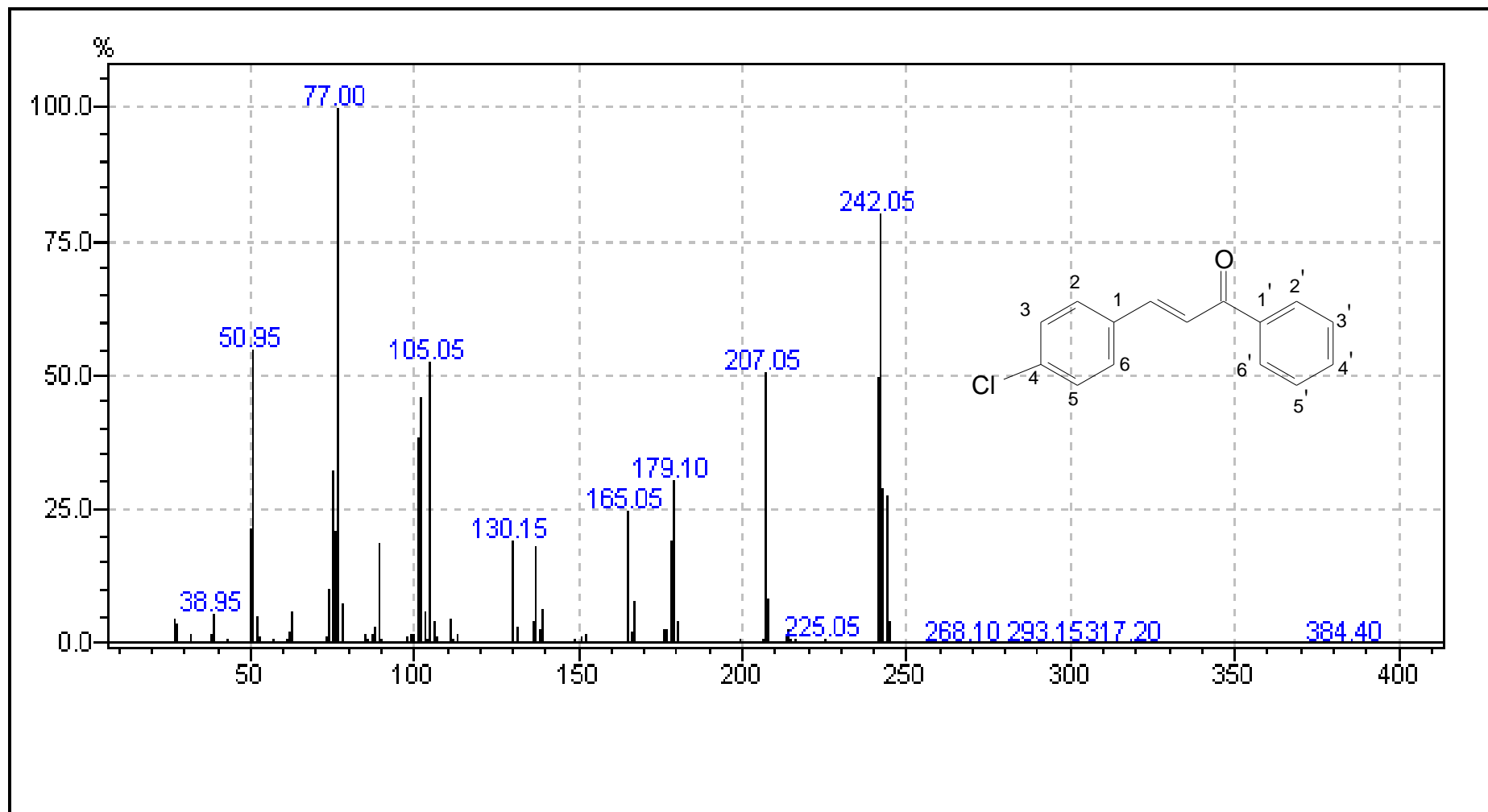


Figura 71. Espectro de massas do composto (35) obtido por CG-EM.

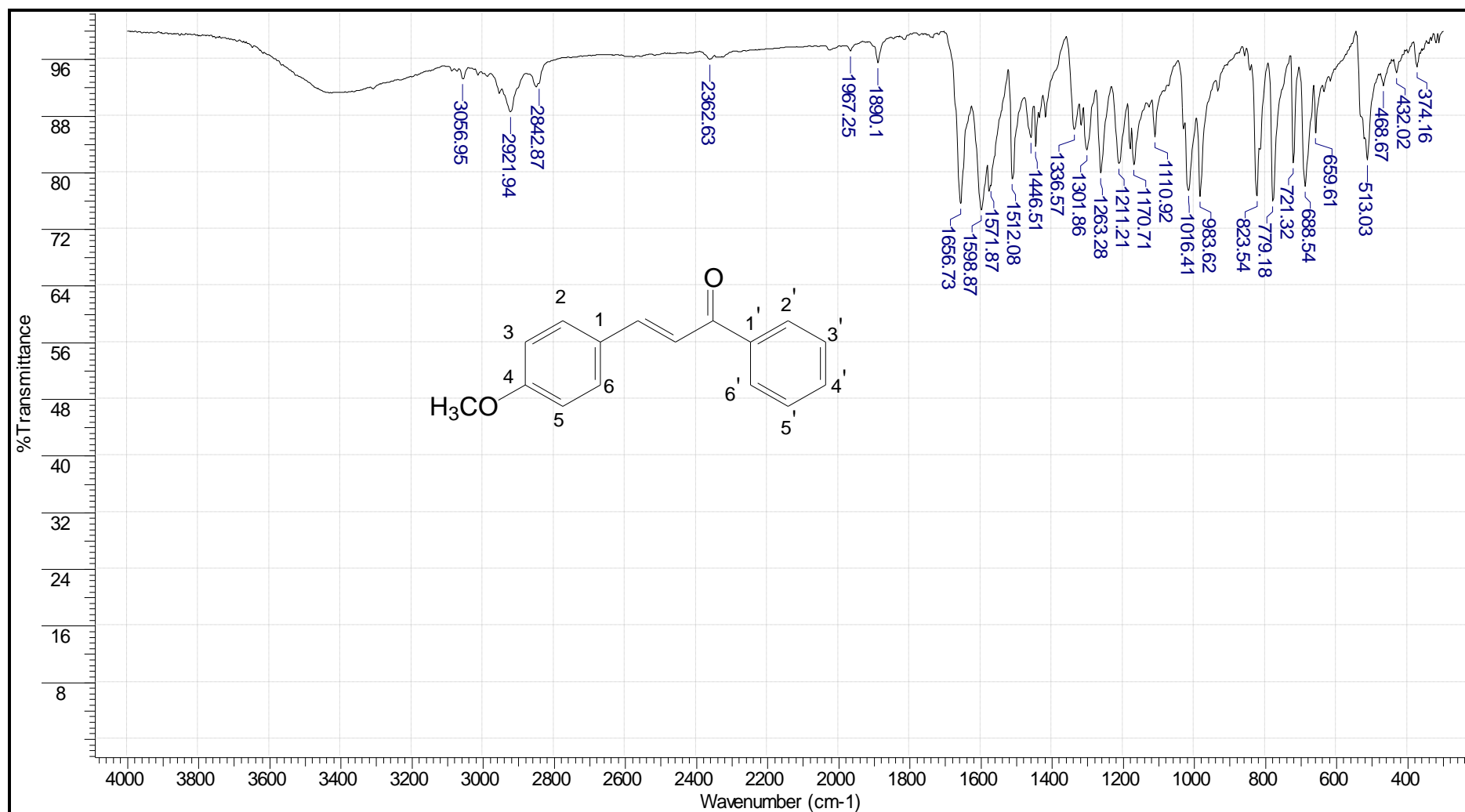


Figura 72. Espectro no IV (KBr) do composto (36).

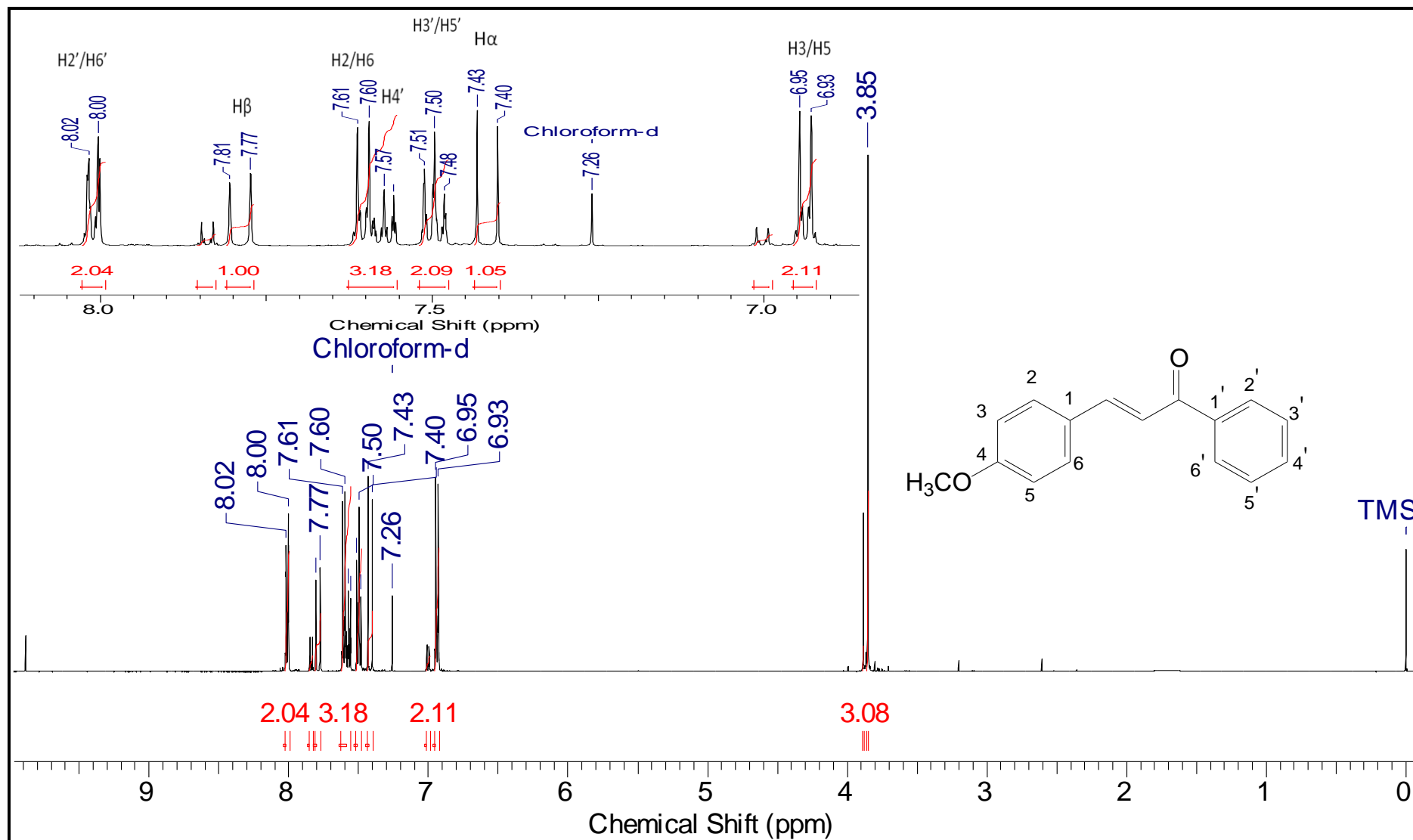


Figura 73. Espectro de RMN ^1H (400 MHz) do composto (36).

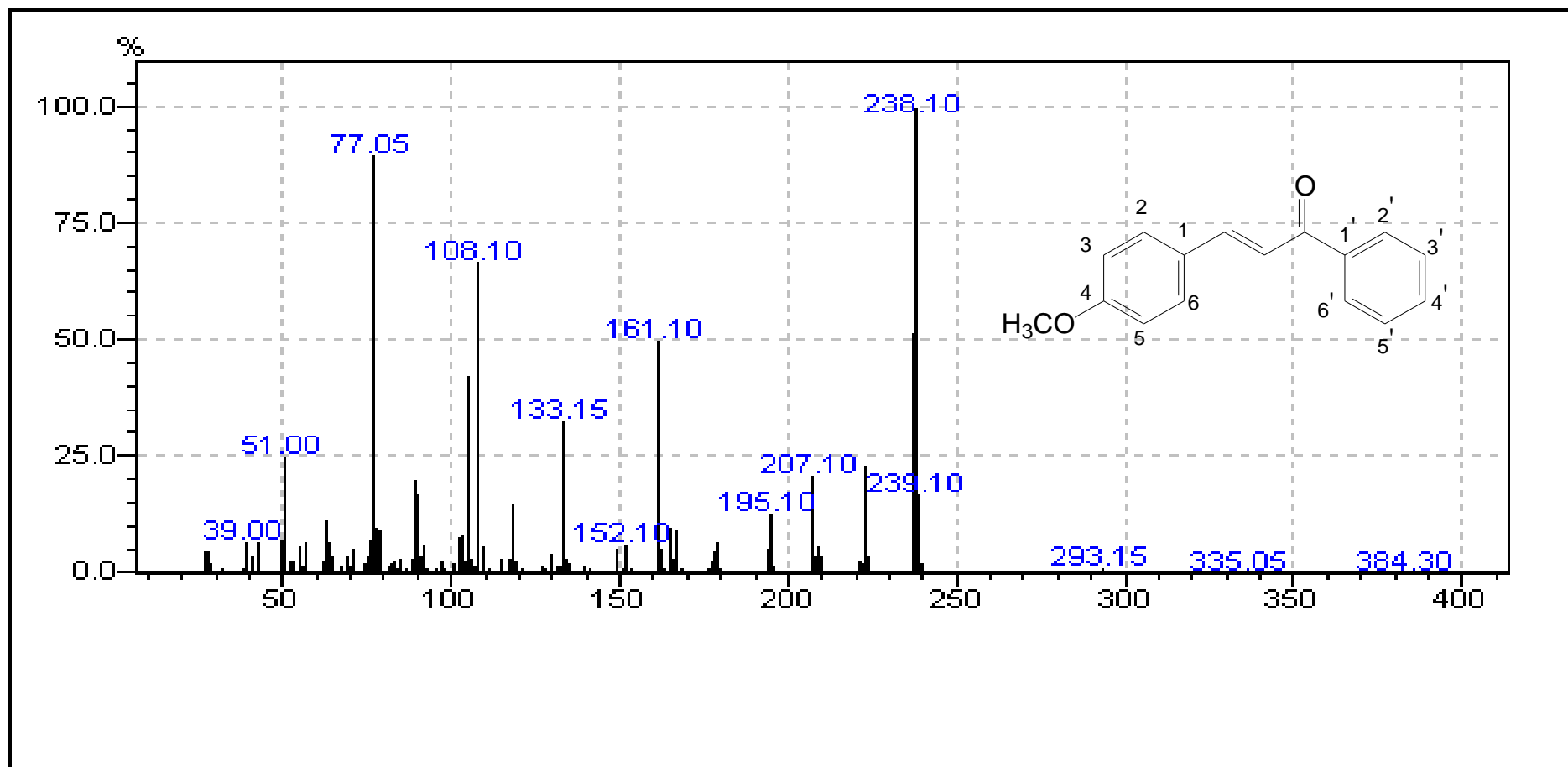


Figura 74. Espectro de massas do composto (36) obtido por CG-EM.

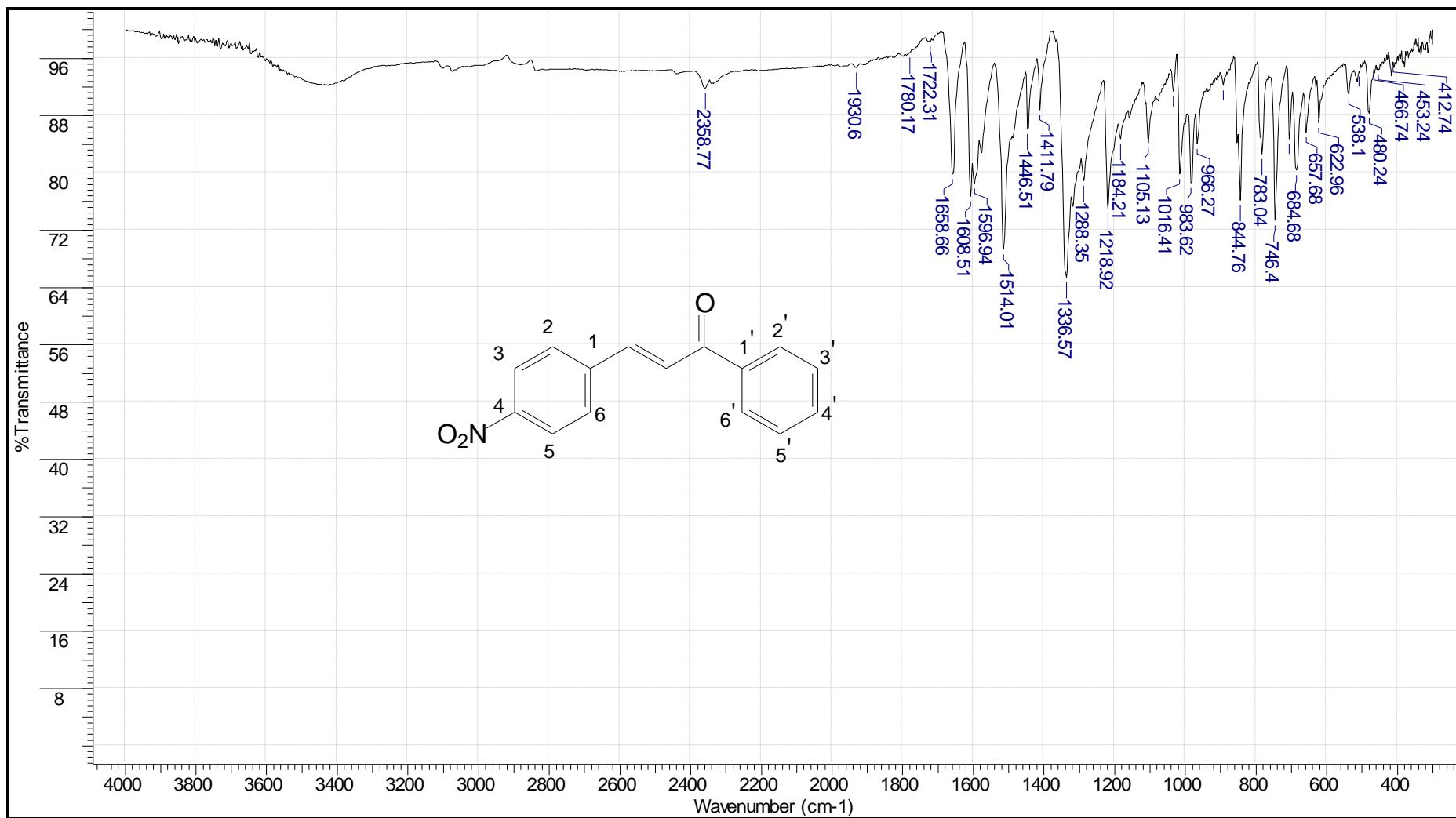


Figura 75. Espectro no IV (KBr) do composto (37).

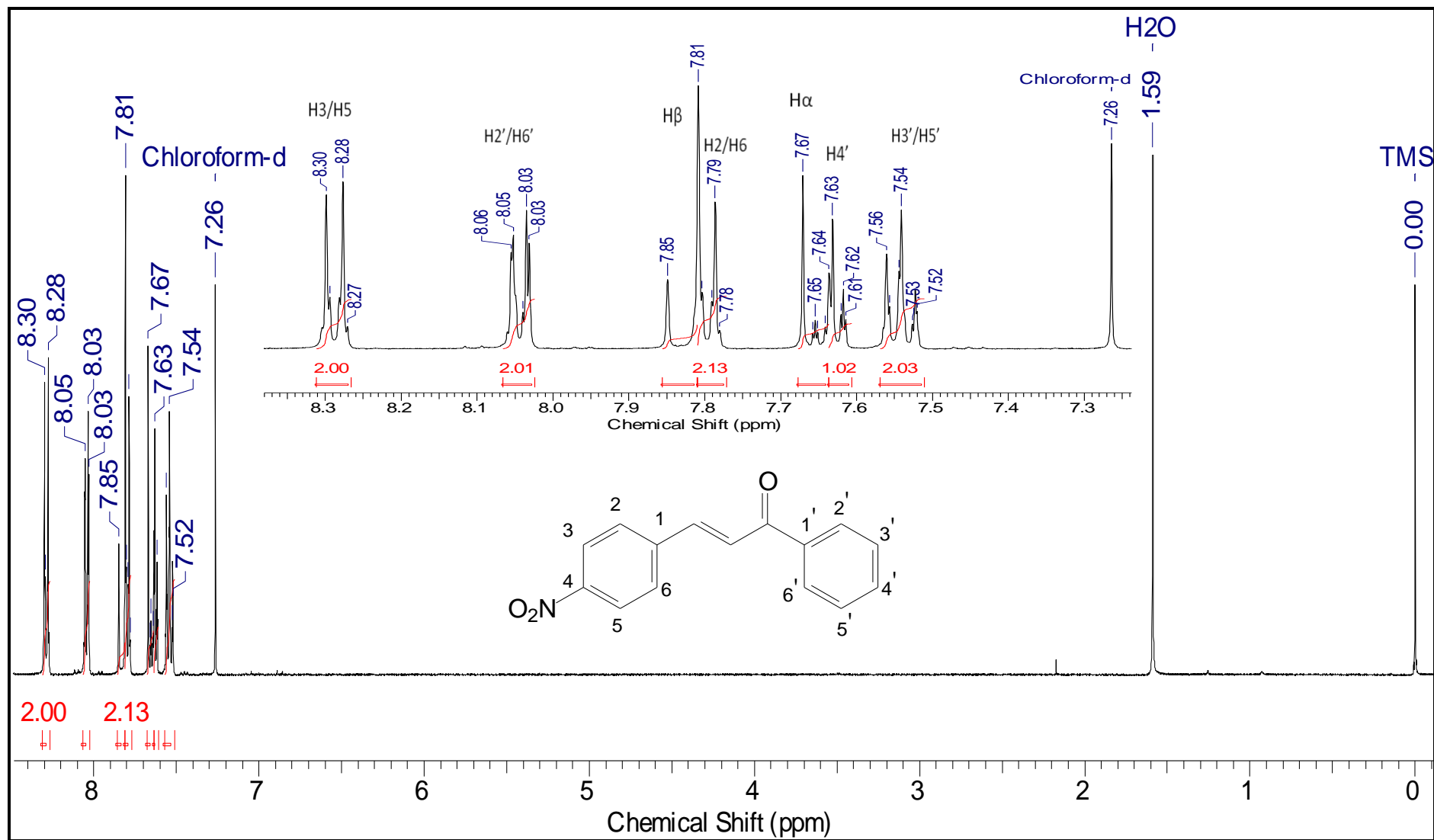


Figura 76. Espectro de RMN ^1H (400 MHz) do composto (37).

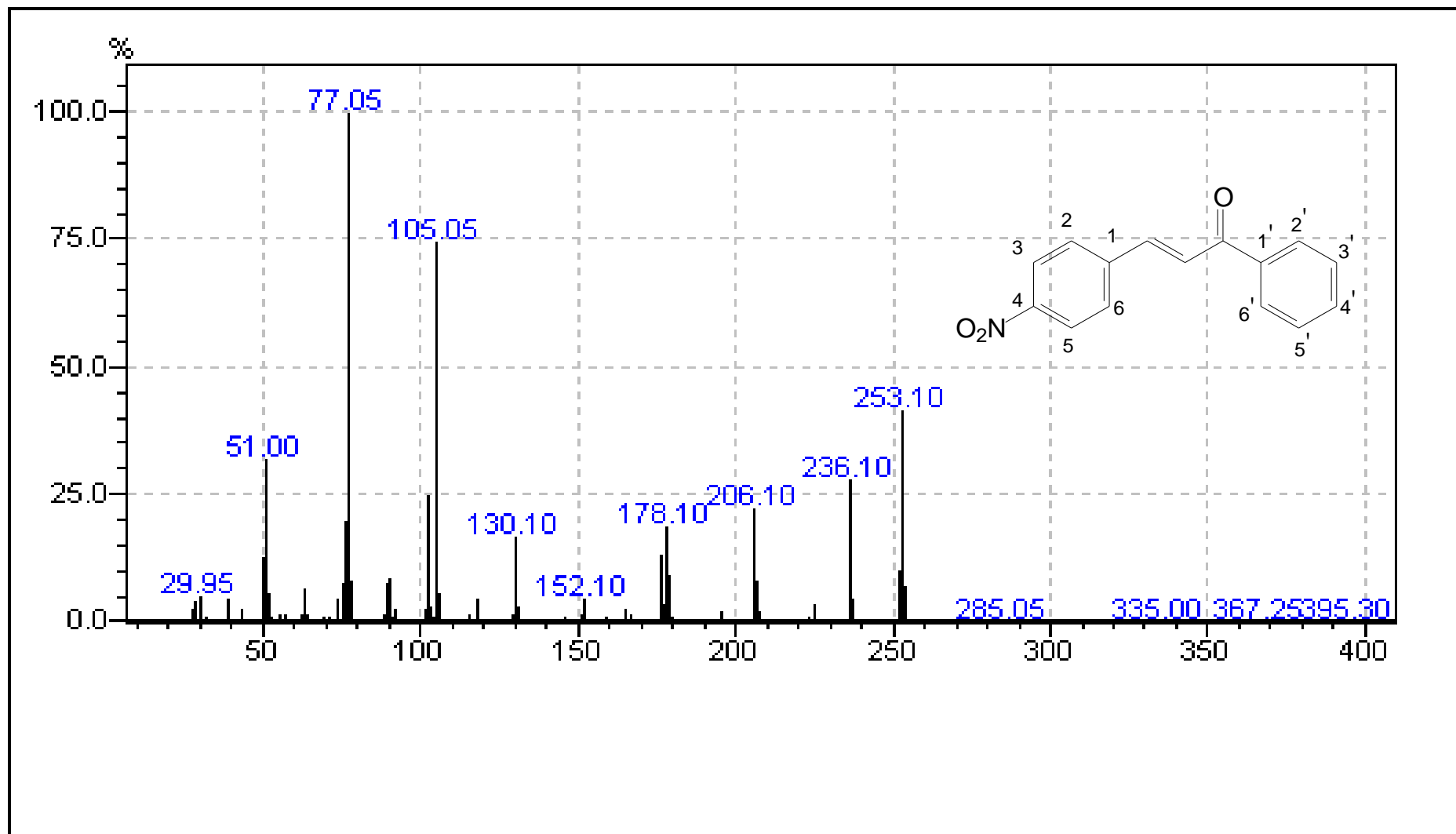


Figura 77. Espectro de massas do composto (37) obtido por CG-EM.