

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS INSTITUTO DE QUÍMICA

Síntese, otimização e avaliação da atividade biológica de derivados de chalconas

MURILO MACHADO DOS ANJOS

ORIENTADOR: PROF. DR. GUILHERME ROBERTO DE OLIVEIRA

GOIÂNIA- 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS INSTITUTO DE QUÍMICA

Síntese, otimização e avaliação da atividade biológica de derivados de chalconas

MURILO MACHADO DOS ANJOS

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás como exigência parcial, para obtenção do título de Mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Roberto de Oliveira

Goiânia 2015

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha mãe, Maria Conceição Machado dos Anjos, pela confiança em mim depositada e minha companheira de todos os momentos Rayane Lanna Natali, pela paciência ao longo desta jornada...

Agradecimentos...

Ao Prof. Dr. Guilherme Roberto de Oliveira, pela orientação e disposição.

Aos professores Valter Henrique Carvalho Silva, Heibbe Cristhian Benedito de Oliveira, juntamente com seu aluno Thiago e Caridad Noda Perez pelas contribuições à este trabalho.

Agradeço à Profa. Dra. Carmen Lúcia Cardoso e suas alunas Adriana Ferreira Lopes Vilela e Cláudia Seidl por terem realizados os testes anticolinesterásicos.

Aos companheiros de laboratório Rafael, Aline, Mirian, Fernanda, e Rosa por terem contribuido para minha formação nessa longa jornada.

Aos companheiros de corredor, Rodrigão e Vinicius, pelos bons momentos de proza por nós compartilhados.

Aos funcionários do Instituto de Química por sederem equipamentos e realizarem testes fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

E para todas as pessoas que contribuiram, direta ou indiretamente, com minha formação.

Lista de abreviaturas	i
Lista de figuras	ii
Lista de figuras do anexo	iv
Lista de quadros	vi
Lista de tabelas	vii
Resumo	. viii
Abstract	. 16
1. Introdução	. 17
2. Revisão bibliográfica	. 18
2.1 A Doença De Alzheimer	. 18
2.1.2. Relação entre a doença de alzhemimer e a Hipótese colinérgica	.21
2.2 Aspectos gerais sobre o câncer: definição, evolução da doença e tratamento.	.24
2.3 Novas propostas para tratamento da doença de alzheimer e cancer	. 29
2.4 Chalconas	. 29
2.4.1 Síntese de Chalconas	. 31
2.5 Modelagem Molecular	. 33
2.5.1 Método Hartree-Fock	. 33
2.5.3 Métodos Semi-Empíricos	. 34
2.5.4 Teoria Do Funcional Da Densidade (DFT).	. 34
3. OBJETIVOS	. 36
3.1 Objetivos Específicos	. 36
4. MATERIAIS E MÉTODOS	. 37
4.1 Procedimento Geral Para A Síntese De Chalconas	. 37
4.1.1. Dados Espectróscopicos Dos Compostos Sintetizados	. 38
4.2 Ensaio Anticolinesterásico	. 47
4.2.2. Ensaio De Ellman (Ellman Et Al., 1961)	. 48
4.2.3. Ensaio Falso-Positico Ellman (Rhee, I. Et Al, 2003)	. 48

Sumário

	4.2.4. Ensaio de Marston	49		
4.	3 Avaliação do potencial citotóxico in vitro	49		
	4.3.1 Análise Estatística	50		
4.	4. Procedimento Computacional	51		
5. R	esultados e discussão	55		
5.	1 Sintese das Chalconas	55		
5.	2 Atividade anticolinesterase	61		
5.	3. Modelagem molecular	66		
	5.3.1 Descritores Calculados	68		
	5.3.2 Orbitais de fronteira: Homo e Lumo	71		
	5.3.3 Ângulo de ligação (A)	72		
	5.3.4 Avaliação citotóxica in vitro dos compostos sintetizados	74		
6. C	onclusão	81		
7. P	7. Perspectivas futuras			
8. R	eferências bibliográficas	83		
ANE	ΞΧΟ	88		

LISTA DE ABREVIATURAS

Doença de alzheimer - D.A acetilcolina - ACh acetilcolinesterase - AChE butilcolinesterase - BuChE colina acetiltransferase - ChAT cromatografia em camada delgada - CCD clorofórmio deuterado - CDCl₃ dimetilsufóxido deuterado - DMSO-d₆ infra-vermelho - I.V ressonância magnética nuclear - RMN mega hertz - MHz número de ondas - cm⁻¹ mili mol - mmol micro litro - µL iodeto de acetiltiocolina - ACThI albumina sérica bovina - BSA potêncial hidrogeniônico - pH partes por milhão - ppm Deslocamento químico - δ Dubleto - d Sinpleto - s

Concentração inibitótia de 50% - IC₅₀

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Eventos bioquímicos relacionados com a DA (Fonte: Selkoe, 2004)20
Figura 2. Estrutura química da acetilcolina (1) (Ach)21
Figura 3. Processos bioquímcos envolvidos entre as céluluas pré-sináptica e pós- sináptica
Figura 4. Estrutura química da Tacrina (2)23
Figura 5. Estrutura química do composto donepezil (3)23
Figura 6. Estrutura química da galantina (4), rivastigmina (5) e memantina (6)24
Figura 7. Principais eventos envolvidos da metastase - cascata metastática (BARBOSA, 2008)
Figura 8. Relação entre a ação dos agentes antitumorais e o ciclo celular (BRUNTON; LAZO & PARKER, 2006)
Figura 9. Forma estrutural da glutationa28
Figura 10. Núcleo fundamental das chalconas30
Figura 11. Mecanismo geral da reação aldólica, evidenciando a formação da estrutura geral das chalconas (11)55
Figura 12.Espectro de RMN 1H do composto Mch – 1 57
Figura 13. Espectro de RMN ¹³ C do composto Mch – 158
Figura 14. Esquema reacional da formação das iminas59
Figura 15. Espectro de RMN de 1H do composto Mch –1460
Figura 16. Espectro de absorção no I.V do composto Mch – 1461
Figura 17. Catálise da acetiltiocolina e reação de Ellman62
Figura 18. Catálise da acetilcolinesterase com acetato de naftil e subseqüente formação do corante púrpura observado
Figura 19. CCD do ensaio de Ellman64
Figura 20. CCD do ensaio Falso-positivo de Ellman64
Figura 21. CCD do ensaio de Martson64
Figura 22. Esquema dos sítios catalíticos da enzima AChE (LEMES, 2013)65
Figura 23. Esquema representativo do modelo seguido para retirada dos descritores das moleculas

Figura 24. I	Fórmula utilizada para cálculo dos pesos de fisher de cada descritor6	39
Figura 25. I	Estruturas de ressonância para o composto Mch-3.	77
Figura 26. /	Ângulos de torsão para o composto Mch-7 e estruturas de ressonância7	79

LISTA DE FIGURAS DO ANEXO

Figura A - 1. Espectro de RMN ¹ H do composto Mch – 1, evidenciando a porção α,β – insaturada da chalcona
Figura A 2. Espectro de RMN ¹³ C do composto Mch – 190
Figura A 3. Espectro de infravermelho do composto Mch – 191
Figura A 4. Espectro de RMN de ¹ H do composto Mch – 292
Figura A 5. Espansão do espectro de RMN ¹ H Mch – 2, evidenciando o sistema α,β- insaturado93
Figura A 6. Espectro de I.V do composto Mch – 294
Figura A 7. Espectro de RMN ¹ H do composto Mch – 3, evidenciando a porção α,β- insaturado95
Figura A 8. Espectro de RMN de ¹³ C do composto Mch – 396
Figura A 9. Espectro de I.V do composto Mch – 397
Figura A 10. Espectro do composto Mch – 4 destacando os hidrogénios α,β – insaturados
Figura A 11. Espectro de I.V do composto Mch – 4
Figura A 12. Espectro de RMN ¹ H do composto Mch – 5, evidenciando o sistema α , β – insaturada
Figura A 13. Espectro de RMN ¹³ C do composto Mch – 5
Figura A 14. Espectro de I.V do composto Mch – 5 102
Figura A 15. Espectro de RMN ¹ H do composto Mch – 14 destacando a formação da ligação α,β – insaturada103
Figura A 16. Espectro de RMN ¹³ C do composto Mch – 6 104
Figura A 17. Espectro de I.V do composto Mch – 6 105
Figura A 18. Espectro de RMN ¹ H do composto Mch – 7 evidenciando a porção α,β – insaturada106
Figura A 19. Espectro de RMN ¹³ C do composto Mch – 7 107
Figura A 20. Espectro de infravermelho do composto Mch – 7
Figura A 21. Espector de RMN ¹ H do composto Mch – 8 evidenciando a porção α,β – insaturada da chalcona

Figura A	22. Espectro de RMN ¹³ C do composto Mch – 81	10
Figura A	23. Espectro de infravermelho do composto Mch – 8 1	11
Figura A α,β – insa	24. Espectro de RMN ¹ H do composto Mch – 9 destacando os hidrogênios iturados1	12
Figura A	25. Espectro de RMN ¹³ C do composto Mch – 9 1	13
Figura A	26. Espectro de infravermelho do composto Mch – 9 1	14
Figura A α,β – insa	27. Espectro de RMN ¹ H do composto Mch – 9 destacando os hidrogênios iturados	; 15
Figura A	28. Espectro de RMN ¹³ C do composto Mch – 10 1	16
Figura A	29. Espectro de infravermelho do composto Mch – 10 1	17
Figura A α,β – insa	30. Espectro de RMN ¹ H do composto Mch – 11 evidenciando os hidrogêni iturados1	os 18
Figura A	31. Espectro de RMN ¹³ C do composto Mch - 11 1	19
Figura A	32. Espectro de infravermelho do composto Mch – 11 1	20
Figura A α,β – insa	33. Espectro de RMN ¹ H do composto Mch – 12 evidenciando os hidrogêni iturados1	os 21
Figura A	34. Espectro de ¹³ C do composto Mch – 121	22
Figura A hidrogênio	35. Espectro de RMN ¹ H do compostos Mch – 13, destacando-se os α ,β-insaturados1	23
Figura A	36. Espectro de RMN de ¹³ C do composto Mch-13 1	24
Figura A	37. Espectro de infravermelho do composto Mch – 13 1	25
Figura A	38. Espectro de RMN ¹ H do composto Mch – 14 1	26
Figura A	39. Expansão da do espectro de RMN ¹ H do composto Mch – 14 1	27
Figura A	40. Especto de RMN ¹³ C do composto Mch – 141	28
Figura A	41. Espectro de I.V do composto Mch – 14 1	29
Figura A hidrogênio	42. Espectro de RMN ¹ H do compostos Mch – 13, destacando-se os α ,β-insaturados1	29
Figura A	43. Espectro de RMN ¹³ C do composto Mch – 15 1	29
Figura A	44. Espectro de infravermelho do composto Mch – 15	29

LISTA DE QUADROS

Quadro	1. Chalconas sintetizadas utilizando-se um catalizador inorgânico	31
Quadro	2. Chalconas sintetizadas utilizando-se a reação de Suzuki	32
Quadro	3. Estruturas dos compostos que foram otimizados	51
Quadro	4. Esquema reacional e rendimento das chalconas sintetizadas	56
Quadro	5. Chalconas sintetizadas para avaliação citotóxica	74
Quadro	6. Iminas sintetizadas para estudo citotóxico.	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Resultados dos ensaios realizados para a enzima AChE.	63
Tabela 2. Estruturas dos compostos que apresentam atividade perante a AChE	67
Tabela 3. Propriedades retiradas das moleculas otimizadas e suas simbologias	68
Tabela 4. Descritores físico-quimicos e seus respectivos pesos de fisher	70
Tabela 5. Energias dos orbitais de fronteira e do GAP dos compostos estudados	71
Tabela 6. Ângulos de ligação dos compostos otimizados	73
Tabela 7. Percentual de inibição (%) em dose única de 5 µm/ml e desvio padrão	76
Tabela 8. Ângulos de torsão para os compostos Mch-1 e Mch-7	78
Tabela 9. Concectração inibitória média (IC50).	80

RESUMO

SÍNTESE, OTIMIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOÓGICA DE DERIVADOS DE CHALCONAS. A população mundial veem envelhecendo e com isto algumas doenças tornam-se mais comum. A doença de Alzheimer (DA) é uma demencia causada pela perda da função cognitiva do indivíduo e as drogas empregadas no seu tratamento tem como base a inibição da enzima acetilcolinesteráse (AChE). O cancer é um conjunto de doenças que se desenvolvem pela multiplicação desordenada de células, pode estar relacionado com fatores genéticos como também hábitos alimentares e exposição à radiação, sendo o tratamento baseado em três principais técnicas: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Neste trabalho foram sintetizados 15 compostos (11 chalconas e 4 iminas), baseando-se na condensação de Claisen-Smth, sendo os mesmos caracterizados por RMN (1H 13C) e I.V. Estes compostos foram submetidos à atividade е anticolinesterásica pelo método modificado de Elman, utilizando-se CCD, e Martson, além da avaliação citotóxica para as linhagens tumorias SF-295 (glioblastoma - humano), HL-60 (leucemia promielítica aguda) e HCT-116 (colón). Os compostos não apresentaram atividade para a enzima AChE frente aos métodos empregado, sendo esta causa investigada utilizando métodos de modelagem molecular, onde buscou-se na literatura compostos ativos para esta enzima, que continham similiaridades com as estruturas sintetizadas neste trabalho. Foram calculados 80 descritores sendo estes submetidos à uma análise estátistica (peso de fisher) onde o número de variáveis foi reduzido para 24 e destas foram selecionadas o GAP e ângulo de ligação, onde observou-se que os valores dos compostos sintetizados, em sua maioria, estavam fora da faixa encontrada para os compostos ativos. Os estudos prévios de modelagem não são suficientes para determinar as causas da inatividade dos compostos, sendo necessário a realização de um estudo de estrutura e reatividade. A avaliação antitumoral dos compostos apresentou-se mais positiva, sendo as chalconas Mch-1 e Mch-7 ativas para duas linhagens celulares tumorais (HCT-116 e SF-265).

Palavra chaves: sintese de chalconas, atividade biológica e modelagem molecular.

ABSTRACT

SYNTHESIS, OPTIMIZATION AND ACTIVITY EVALUATION OF BIOLOGICAI CHALCONES DERIVATIVES. The world's population sees aging and some diseases that become more common. Alzheimer's disease (AD) is a dementia caused by loss of cognitive function of the individual and drugs used in their treatment is based on the inhibition of the enzyme acetylcholinesterase (AChE). Cancer is a group of diseases that develop due to the disorderly proliferation of cells may be related to genetic factors as well as dietary habits and exposure to radiation, the treatment being based on three main techniques: surgery, radiation and chemotherapy. In this work we synthesized 15 compounds (11 chalcones and 4 imines), based on the condensation of Claisen-Smth, and they are characterized by NMR (¹H and ¹³C), IV These compounds were submitted to acetylcholinesterase activity by the modified method of Elman, using CCD and Martson, in addition to the evaluation of cytotoxic tumorias lines SF-295 (glioblastoma - human), HL-60 (acute leukemia promielítica) and HCT-116 (colon). The compounds showed no activity for the enzyme AChE front of the methods employed, and this cause investigated using molecular modeling methods, which sought in the literature active compounds for this enzyme, containing resemblance with the structures synthesized in this work. 80 descriptors were calculated being submitted to statistical analysis (Fisher's weight) where the number of variables is reduced to 24 and these have been selected GAP and bond angle where it was observed that the values of the synthesized compounds, mostly It was found out of range for the active compounds. The previous modeling studies are not sufficient to determine the causes of inactivity of the compounds, being necessary to the realization of a structure and reactivity studies. The evaluation of the antitumor compounds presented become more positive as the MCH-1 e MCH-7 chalcones and active for two tumor cell lines (HCT-116 and SF-265).

Key word: synthesis of chalcones, biological activity and molecular modeling.

1. INTRODUÇÃO

O avanço tecnológico proporcionou á população mundial um aumento na expectativa de vida, onde em países desenvolvidos os mais velhos estão na faixa etária dos 80 anos.

Algumas doenças possuem como agravante a idade, sendo a doença de Alzheimer (DA) uma delas. Muito comum em pessoas na faixa etária dos 65 anos a DA tem como alguns de seus sintomas a morte dos neurônios, logo acarretanto na perda de memória e consequentemente em diminuição na parte cognitiva do indivíduo (DIAS et al., 2015). A forma de tratamento atual da DA busca somente amenizar os sintomas apresentados, como melhora da cognição, e baseia-se na hipótese colinérgica, visando amenizar o déficit colinérgico inibindo a atividade da acetilcolinesterase (AChE) (SAMADI et al., 2011).

Algumas classes de compostos estão sendo utilizadas para a produção de novos agentes inibidores de AChE onde derivados de chalconas estão sendo utilizados como protótipos para novos fármacos (BAG et al., 2013). As chalconas são provenientes da via da biossíntese de flavonóides e possuem uma ampla faixa de atividade biológicas, fato esse que desperta o interesse de diversos grupos de pesquisas e outro fator para sua ampla utilização é a simplicidade de sua síntese (BARBOSA et al., 2011; WU et al., 2011).

Logo, o objetivo deste trabalho é sintetizar derivados de chalconas e avaliar sua atividade frente a enzima acetilcolinesterase e fazer a correlação dos fatores estruturais que corroboram a atividade dos compostos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 2.1 A Doença De Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) é causada pela neurodegeneração da estrutura cerebral humana com perda da função cognitiva. Ela afeta mais de 37 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo que surgem globalmente cerca de 5 milhões de casos, um novo caso a cada 7 segundos (EL-DESOUKI, 2014). Essa doença foi descoberta a mais de 100 anos, e o interesse por pesquisar os sintomas, causas, fatores e tratamento teve seu avanço somente nos últimos 30 anos ("2014 Alzheimer's disease facts and figures", 2014).Os relatos iniciais mais comuns relacionados ao primeiro sintoma são a perda da capacidade de lembrar novas informações e com o avanço da doença outros sintomas vão surgindo como a perda de noção de tempo e espaço, dificuldade para se expressar e falar, além de causar, em alguns casos, apatia e depresão ("2014 Alzheimer's disease facts and figures", 2014).

Três estágios da doença foram descritos (Pallas & Camins, 2006):

1º Estágio: O início da DA tem-se pelo ataque dos neurônios do sistema límbico, particularmente aqueles localizados no hipocampo que correspondem no cérebro pela zona da memória, onde somente os neurônios colinérgicos são afetados, como se a mesma escolhesse somente os neurônios da memória. Neste estágio o hipocampo perde aproximadamente 25% de seu volume. Devido os neurônios afetados serem responsáveis pelas memórias de curto e longo prazo, as pessoas acometidas com esta doença possuem leve perda na capacidade de memorização. Este estágio inicial dura de dois a quatro anos.

2º estágio: A fase intermediária da doença é considerada a mais longa tendo duração de dois a dez anos. A enfermidade continua a degenerar, principalmente, o sistema límbico e o hipocampo continua a perder drasticamente neurônios, além de outras zonas do sistema límbico que fica danificadas. Um sintoma desta etapa é a dificuldade de se comunidar dos doentes devido perda da memória de curto prazo. Posteriormente, ocorre um declínio nos níveis da acetilcolina de certos neurônios, dentre estes estão

aqueles localizados no telencéfalo ventral, que em condições normais estão envolvidos no armazenamento de informações da memória de longo prazo. A pessoa, portanto, não consegue relembrar nenhuma informação nova. Durante esse estágio, a pessoa também apresenta mudanças de personalidade, confusão, raiva, tristeza, falta de orientação e concentração

3º Estágio: Acontece quando quase todo o sistema límbico é ocupado pela doença, além de 90% do hipocampo. Devido o estágio avançado da doença, fica quase impossível recuperar informações, justamente pelo enorme dano causado no sistema límbico. Os neurônios colinérgicos são afetados em todo o córtex cerebral causando uma perda nas memórias ali armazenadas. A pessoa esquece seu passado, amigos e família. Além disso, perde a memória ocasional e perde totalmente a capacidade de se comunicar e trabalhar. Esta fase dura de um a três anos em média e termina com a morte do paciente.

A Figura 1 mostra os eventos principais que estão ligados ao desenvolvimento da neurodestruição celular ocasionados durante o avanço da DA. O cérebro de uma pessoa normal possui moléculas da proteína precursora amilóide (APP) presentes no plasma (b) e em alguns tecidos intracelulares como os endossomos (a). A proteína é fragmentada pela enzima β-secretase (BACE) e também pelo complexo prenselina-γ-secretase (PS - γ) liberando a parte chamada de peptídeo β -amilóide. Em uma pessoa que apresenta a DA, parte do peptídeo β-amilóide pode sofrer oligomerização, primeiramente dentro da vesícula (c), e depois ser secretado no líquido intertiscial cerebral (d), onde os oligômeros solúveis difundem para as fendas sinápticas, podendo interferir com estas funções de uma forma, até então, desconhecida (e). Os oligômeros Aβ podem polimerizar-se formando fibras amilóides, que são insolúveis, as quais se juntam em placas esféricas, prejudicando estruturalmente e funcionalmente os axônios e dendritos adjacentes (f). A ativação de quinases no citoplasma dos neurônios leva a hiperfosforilação da proteína associada à síntese de microtúbulo (tau) e posteriormente a polimerização em filamentos insolúveis, que juntos formam emaranhados neurofibrilares (g).



Figura 1. Eventos bioquímicos relacionados com a DA (Fonte: Selkoe, 2004).

Existem algumas teorias que buscam explicar a causa da DA como, cascata amilóide (hipótese amilóide), hiperfoforilação da proteína tau, porém a que é mais amplamente discutida e estudada é a hipótese colinérgica.

2.1.2. Relação entre a doença de alzhemimer e a Hipótese colinérgica.

Os impulos nervosos via acetilcolina 1 (Figura 2) são considerados de vital importância para nossa vida, e uma das formas de diagnóstico para pacientes com DA estando relacionada com a perda/deficiência dessa capacidade de comunicação. A hipótese colinégica baseia-se nesta ideia, isto é, pessoas que possuem DA tem a enzima colina *acetiltransferase* (ChAT) reduzida. Esta enzima é responsável pela síntese de acetilcolina (ACh), logo estas pessoas apresentam uma significativa redução de ACh, principal responsável pela mediação dos neurônios com o restante do corpo (SZYMAŃSKI; MARKOWICZ; MIKICIUK-OLASIK, 2011).



Figura 2. Estrutura química da acetilcolina (1) (Ach).

A ACh é sintetizada dentro dos neurônios pela ChAT, que fica localizada em vesículas, sendo liberada na célula pré-sináptica, na presença de Colina. Após ser sintetizada, a ACh é transportada em vesículas dentro dos neurônios até ser liberada na fenda sináptica, para se ligar com os recptores muscarínicos e colinérgicos nicotínicos das células pré-sináptica e póssináptica (DUTHEY, 2013; SINGH et al., 2013). Quando a ACh transpassa a fenda sináptica ela rapidamente é hidrolisada, devido neste local possuir uma elavada concentração da enzima AChE, que converte à mesma em colina e acetato . E em sequência a colina é transportada para a membrana présináptica onde dá sequência ao ciclo (SEIDL, 2010)

Todavia, portadores de DA possuem uma deficiência nesse ciclo, devido a uma baixa produção da enzima ChAT, consequêntemente, baixa produção de ACh, logo, quanto maior for a concentração de colina maiores as chances de sintetizar ACh e por consequência, sua transmissão para as fendas sinápticas. Como a concentração de AChE é elevada nas fendas, inibir esta enzima promoveria uma maior permanência da ACh para promover a neurotransmissão, tornando-se de vital importância para o tratamento de DA (SERENIKI; VITAL, 2008). A Figura 3 esquematiza todo o processo que ocorre entre as células pré e pós-sinápticas.



Figura 3. Processos bioquímcos envolvidos entre as céluluas pré-sináptica e pós-sináptica.

Alguas drogas são utilizadas no tratamento com o objetivo de retardar os sintomas da DA, e baseiam-se, em sua maioria, em uma hipótese chamada colinérgica. Esta afirma que os neurônios colinérgicos são gravemente afetados no decorrer da doença, podendo ser estes males detectados tanto histopatologicamente, perda de neurônios, como quimicamente, perda de enzimas que sintetizam a ACh (PINTO; LANCTÔT; HERRMANN, 2011) e os pacientes acometidos com a DA, de acordo com esta hipótese, apresentavam o aumento de algumas enzimas como acetilcolinesterase (AChE) e butilcolinesterase (BuChE), que estão relacionados com o sistema colinérgico (LUO et al., 2011a).

Em 1993 foi aprovada a utilização do primeiro fármaco, o Tacrina (2) (Figura 4), que baseava-se na dupla inibição das enzimas AChE e BuChE, porém, alguns pacientes desenvolverem hepatite medicamentosa, obrigando a suspensão do mesmo (SERENIKI; VITAL, 2008). Atualmente, alguns pesquisadores tem sintetizados compostos tendo como ponto de partida essa molécula objetivando contornar os efeitos colaterais e melhorar sua atuação (LUO et al., 2011a, 2011b; SAMADI et al., 2011).



Figura 4. Estrutura química da Tacrina (2).

Atualmente são comercializados quatro tipos de drogas para o tratamento da DA, sendo elas: donepezil (**3**) (Aricept[®]), galantamina (**4**) (Reminyl[®]), rivastigmina (**5**) (Exelon[®]), memantina (**6**) (Namenda[®]). O composto **3** (**Figura 5**), também conhecido como E2020, surgiu na década de 80 como um inibidor da AChE e devido seus efeitos colaterais menos agressivos destacou-se rapidamente, além de apresentar uma seletividade maior quando comparado ao Tacrina, para a AChE do que para BuChE. Este perfil favorável é também complementado por suas propriedades farmacocinéticas, por exempo, um tempo de meia vida de 70 horas no plasma sanguineo (ROCCA et al., 2002).



Figura 5. Estrutura química do composto donepezil (3).

A composto **4** é um produto natural que desempenha sua ação também como inibidor de AChE, além de promover uma maior liberação de ACh na fenda sináptica. O composto **5**, atua também na inibição da AChE e BuChE. O farmáco composto **6**, é o único que possue seu modo de atuação diferente dos demais citados acima, pois este não atua inibindo as enzimas AChE e BuChE, mas sim na neuromodulação do glutamato (FUENTES; SLACHEVSKY CH, 2005). A estrutura química dessas moléculas orgânicas estão mostradas abaixo (**Figura 4**).



Figura 6. Estrutura química da galantina (4), rivastigmina (5) e memantina (6).

2.2 Aspectos gerais sobre o câncer: definição, evolução da doença e tratamento.

O cancêr é um conjunto de diversar doenças que possuem um ponto em comum: o crescimento desordenado de células que invadem tecidos e orgãos. Conforme estimativas do projeto Globocan 2012, liderado pela Agência Internacional de Pesquisas em Câncer (IARC), são constatados mais de 14,1 milhões de novos incidentes de cancêr, totalizando 8,2 milhões de mortes, globalmente, onde países em desenvolvimento destacam-se por possuirem um aumento progressivo desta doença, sendo os tipos mais frequentes para a população masculina o cancer de pulmão, estomago e figado já em mulheres tem-se o de mama, colo do útero e pulmão (MAHAPATRA; BHARTI; ASATI, 2015; INCA, 2015)

Estima-se que em 2030, teria-se 21,4 milhões de novos casos com 13,2 mihões de mortes, globalmente, e a situação no Brasil, tende a piorar, como evidenciado globalmente, pois estimativas do ano de 2014 apontam

impressionates 576 mil novos casos, demonstrando a magnitude deste problema para o país, onde o predominante é o câncer de prostata seguido pelo de mama (INCA, 2015).

O câncer por se manifestar em diversas partes do corpo, devido sua evolução desordenada, recebendo o nome de neoplasia, onde seu grau de periculosidade está relacionado com o tipo de tecido afetado, logo, dependo do local afetado o câncer é distinto. Outro fator importante em relação à taxa de crescimento do tumor é a caracterização deste como maligno e benigo, em geral, quando se tem uma evolução rápida este e caracterizado como maligno (COTRAN; KUMAR & COLLINS, 2000; INCA, 2015).

A metastase, é uma etapa do ciclo evolutivo da doença onde as células afetadas migram para outras partes do corpo, dificultanto o tratamento do enfermo e podem ser resumidas nas seguintes etapas : invasão e infiltracão de tecidos subjacentes por células tumorais, dada a permeação de pequenos vasos linfaticos e sanguineos; liberacao na circulação de celulas neoplasicas, tanto isoladas como na forma de pequenos embolos; sobrevivencia dessas celulas na circulação; sua retenção nos leitos capilares de orgãos distantes; seu extravasamento dos vasos linfaticos ou sanguineos, seguido do crescimento das células tumorais disseminadas (BARBOSA, 2008).

A realização do processo de mestastase depende da superação de fatores biológicos, para que as células neoplasicas se instalem em um novo orgão e tenham seu crescimento independente, tais eventos estão esquematizados abaixo (**Figura 7**):

25



Figura 7. Principais eventos envolvidos da metastase - cascata metastática (BARBOSA, 2008).

Pesquisas aponta que a origem das células cancerosas provém da modificação do DNA de células normais, onde tal tranformação ocorre por fatores genéticos, como histórico de familiares com incidência da doença, ou por hábitos alimentares e de vida, sendo o tabagismo e exposição à radiação comumente associados à esta efermidade (MAHAPATRA; BHARTI; ASATI, 2015; INCA, 2015). Tais modificações celularess são um grande foco de estudos, porém devido sua complexidade existem divergencias sobre o tema, mas todas possuem um aspecto em comum, mostrado pela **Figura 8**.



Figura 8. Relação entre a ação dos agentes antitumorais e o ciclo celular (BRUNTON; LAZO & PARKER, 2006).

A **Figura 8** apresenta todas as fases onde podem ser encontradas células modificadas, sendo elas: etapa anterior à biosíntese do DNA (G1); durante a síntese do DNA (S); após a síntese do DNA (G2); e na etapa mitótica, onde o duplo fragmento de DNA, dividi-se em duas células G1 e G₀ (podendo esta serer direcionada para outros ciclos celulares ou não, nomeadas como - fase repouso). As células afetatas não apresentam funções semelhantes às sadias, onde sua multiplicação é afetada drasticamente, tendo um aumento siginificativo, em relação as células normais (MICKLOS *et al*, 2005; BRUNTON; LAZO & PARKER, 2006).

O entendimento e controle desta doença requer uma ampla investigação dos mecanismos que estão envolvidos em cada processo, por exemplo,

durante o ciclo evolutivo da doença o nível de glutationa (**Figura 9**) são extremamente elevados, tendo este aumento influência nos processos enzimáticos de defesa do organismo (pulmões (SENTURKER & DIZDAROGLU, 1999; NAVARRO *et al.*, 1999; JÚNIOR *et al.*, 2001; INCA, 2014).



7 Figura 9. Forma estrutural da glutationa.

Os processos envolvidos no tratamento demandam muito do enfermo, tanto psicologicamente e fisicamente, sendo que as ténicas mais utilizadas são cirurgia, radioterapia e a quimioterapia (INCA, 2015).

A técnica cirúrgica é uma ferramenta muito eficiente e utilizada quando os tumores não sofreram metastase, empregada em muitos casos de leucemia, porém em combinações com outros tratamentos, como transplante de medula. A radioterapia constitui uma técnica que emprega a utilização de radiação ionizante tendo finalidade terapêutica, tendo resultados positivos na redução de tumores e até em processos de metastase, porém é necessario o controle rigoroso da quantidade de emissão que deverá chegar ao local afetado, buscando causar um menor dano ao paciente, fato este reduz muito sua utilização (ALMEIDA et al., 2005; MAHAPATRA; BHARTI; ASATI, 2015), apesar destas técnicas possuirem seus valores à mais utilizada é a quimioterapia.

No tratamento por quimioterapia utiliza-se agentes antineoplásicos que desenvolvem um papel no ciclo celular, bloqueando a duplicação do DNA, por interação ou ligação com o mesmo, o que levará a morte da célula. Estes medicamentos tem por finalidade permearem a membrana plasmática ou serem transformados em metabólito ativo dentro do citoplasma. Por atuarem em células que possuem elevada taxa de multiplicação, outras partes do

enfermo são afetadas, sendo este tratamento não seletivo, o que ocasiona diversos efeitos colaterais aos pacientes submetidos à este processo. Apesar da não seletividade é uma técnica muito empregada e também uma área muito explorada ciêntificamente, pois necessita-se de medicamentos antineoplásicos eficientes e com elevada especificidade, o que reduziria os efeitos colaterias nos pacientes (ALMEIDA et al., 2005 ; MICKLOS *et al*, 2005; FUCHS; WANNMACHER & FERREIRA, 2006)

2.3 Novas propostas para tratamento da doença de alzheimer e cancer

A busca por compostos ativos mais efetivos contra a doença de alzheimer e o cancer partem de um mesmo pressuposto: diminuição dos efeitos colaterais causados pelos medicamentos e aumento da efetividade da droga ao seu alvo biológico.

Tendo em vista que a maior parte das drogas disponíveis no mercado para o tratamento da doença de Alzheimer buscam a inibição das enzimas AChE e BuChE, novos candidatos a farmácos estão sendo desenvolvidos buscando estes alvos terapêuticos, logo, alguns grupos de pesquisa tem buscados híbridos de chalconas com atividade inibitória para estas enzimas (BAG et al., 2013; LIU et al., 2014), e exelentes resultados na inibição das mesmas foram relatados.

Ao mesmo tempo, esforços estão sendo desenvolvidos para a busca por uma droga neoplásica, buscando o tratamento do câncer, com derivados de chalconas, onde pesquisas relatam expressiva atividade em linhagem celular tumoral de mama, além de elencar diversas possibilidades de melhoramento da atividade por estudos de estrutura-reatividade (Vicenzo et al, 2000) .

Portanto, uma classe de composto torna-se interessante por apresentar atividade para estas duas doenças, muito distintas, à chalcona.

2.4 Chalconas

Chalconas são cetonas α , β -insaturadas contendo um sistema carbonílico conjugado que torna essa classe de compostos biologicamente ativa (THAKRAR; SHAH, 2012). Chalcona é um termo genérico dado aos compostos que possuem dois anéis fenilas, separados por uma cadeia de três

carbonos, contendo uma carbonila conjugada com uma dupla ligação, formando um sistema enona. Contrariamente à maioria dos outros flavonóides, o núcleo A das chalconas é numerado com números ordinários seguidos de uma linha (') e o núcleo B somente com números ordinários (**Figura 10**).



Figura 10. Núcleo fundamental das chalconas.

Tais compostos são os primeiros isoláveis da biossíntese dos flavonóides, encontrados nas plantas, porém em quantidades não satisfatórias, também sendo chamados de flavonóides de cadeia aberta. O isolamento da chalcona fica condicionado à quantidade da enzima chalcona *isomerase* que é responsável pela ação catalítica da ciclização das chalconas à flavonóides (GO; WU; LIU, 2005).

O grande interesse pela busca de uma forma mais eficiente de sintetizar as chalconas se deve ao fato destes compostos possuirem uma ampla faixa de atividades biológicas, apesar de sua estrutura ser relativamente simples, são relatadas diversas atividades biológicas como: atividade anti-inflamatório (BANDGAR et al., 2010a, 2010b; SEBTI et al., 2001; VOGEL et al., 2010; WU et al., 2011), antioxidante (SHENVI et al., 2013; WU et al., 2011), anti-malária (KUMAR et al., 2010), antibacteriana (MOREIRA OSÓRIO et al., 2012) anticâncer (DE VINCENZO et al., 2000; MAI et al., 2014; MOURAD et al., 2012), citotóxica (KUPCEWICZ et al., 2014) e antileishmania (BARBOSA et al., 2011; BOECK et al., 2006; NIELSEN et al., 1998).

Devido a quantidade de chalcona obtidas no processo natural ser irrisória, métodos sintéticos são utilizados para a obtenção deste produto em quantidades razoáveis, destacando-se a reação de Claisen- Schmidt.

2.4.1 Síntese de Chalconas

Nos últimos anos grupos de pesquisas veem buscando modos alternativos que cheguem a este intermediário chave na síntese de diversos flavonóides de uma forma eficaz, tentando reduzir o tempo e obtendo condições amenas para trabalho. Neste intuito a busca por catalisadores mais eficientes tem ganhado destaque.

Sebti et al (2001) empregou como catalisador a mistura de fosfato inorgânico com nitrato de sódio (NaNO₃), obtendo um catalisador básico para ser utilizado na reação de Claisen-Schmidt, onde a melhor condição encontrada foi quando utilizou uma razão de nitrato de sódio/NP de 1:2 m/m, tendo em vista que a quantidade inicial de NaNO₃ foi de 100 mg, com estas condições foram sintetizadas diversas chalconas com rendimentos excedendo 92% (**Quadro 1**).

R R'	р Н +	CH3	NaNO ₃ Metan	
	R	R'	R"	Rendimento % (tempo)
1	Н	Н	Н	98 (18)
2	CI	Н	н	94 (16)
3	Н	NO ₂	Н	94 (16)
4	OCH_3	Н	Н	91 (36)
5	Н	Н	OMe	90 (24)

Quadro 1. Chalconas sintetizadas utilizando-se um catalizador inorgânico.

Um problema ainda não solucionado utilizando este tipo de catalizador inorgânico é o tempo de reação que dentre as chalconas sintetizadas duram até 24 horas, porém o custo dos reagentes para a síntese do catalisador é muito barato comparado com outros empregados neste tipo de reação. EDDARIR et al (2003) estudaram a síntese de chalconas utilizando-se a reação de Suzuki entre os ácidos cinnamoyl clorides e ácido fenilbórico ou cloridratos benzóicos e ácidos fenil vinilborico e verificaram que os substituintes dos cloretos de acilo ou do ácido borônico não afetam a reação, tornando este método eficaz para a síntese de chalconas. Os compostos e as condições empregadas estão listados na **Quadro 2** abaixo.

+	он ^У Он <u>(i</u> он _{Cs}	PPh ₃) ₄ Pd ⁰ ₂ CO ₃ , tolueno R	O R' R'
R (para)	R' (meta)	R" (orto)	Rendimento (%)
Н	Н	Н	93
Н	CF_3	Н	77
Н	Н	CF_3	90
Н	NO ₂	Н	68
OMe	Н	Н	87
OMe	OMe	Н	80
	+ Creations of the second seco	+ + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + + +	+ $(PPh_{3})_{4}Pd^{0}$ $(PPh_{3})_{4}Pd^{0}$ $(S_{2}CO_{3}, tolueno)$ R (para) R' (meta) R'' (orto) H H H H H CF_{3} H H CF_{3} H H NO ₂ H OMe H H OMe H H

Quadro 2. Chalconas sintetizadas utilizando-se a reação de Suzuki.

Outro método encontrado na literatura para a síntese de chalconas utiliza-se irradiação ultrasônica. Por este método Li et al (2002) consiguiram sintetizar uma série de chalconas em consideráveis rendimentos (57-97%) e em um tempo relativamente curto quando comparado com o método sobre agitação. Como catalisadores utilizaram KOH pulverizado e fluoreto de potássio suportado em alumínia (KF-Al₂O₃), onde com este último sistema catalítico conseguiram reutilizar o suporte por mais duas vezes sem perder a atividade do mesmo. Apesar das buscas por métodos alternativos de síntese a metodologia mais empregada é a de Claisen- Schmidt.

2.5 Modelagem Molecular

A busca por novos medicamentos é um nicho que gera muita renda para as empresas da área. Para a produção de um novo fármaco são gastos milhões de dólares e anos de pesquisa, logo, a busca por uma ferramente que minimize esses anos de pesquisa torna-se algo viável

A interação de um fármaco com um seu alvo é específica, portanto, para entender sua atividade deve-se levar em consideração sua disposição no espaço, especificamente onde ocorre a interação entre o composto e a enzima ou receptor (BARREIRO et al., 1997).

O avanço tecnológico pertimitiu a utilização de técnicas como a relação estrutura atividade (REA), por esta ferramenta pode-se relacionar qual aspecto molecular confere atividade para um composto, juntamente com análises quimiométricas, pois, conseguem relacionar parâmetros físicos e químicos que conferem a atividade à um certo composto. (CABRERA et al., 2007).

Utilizando-se deste método, grupos de pesquisa buscam otimizar a atividade biológica de compostos e seus derivados. Cabrera et al, 2007, fizeram uma série de chalconas, flavononas e flavonas e avaliaram sua toxicidade frente a 3 linhagens celulares, e conseguiram relacionar uma dependencia da porção enona das chalconas com a atividade biológica, bem como relacionar a posição do substituinte que interfere na atividade do composto. Logo, a REA torna-se uma ferramenta útil na busca por novos protótipos de fármacos.

2.5.1 Método Hartree-Fock

Hartree em 1921, utilizando procedimentos matemáticos com base na estrutura eletrônica deu início aos métodos ab initio. Baseado neste, Fock, modificando-o incia-se o método Hartree-Fock que tem como princípio o desenvolvimento variacional à função de onda, está implantada pela determinante de Slater (PEREIRA, 2008).

O princípio geral deste método é determinar quais os coeficientes que levem à uma função de onda de menor energia. Ele considera que as

distribuições eletrônicas são independentes, fazendo uma correlação entre as posições dos elétrons, baseado no conceito de orbitais, instituído pela aproximação de Born-Oppenheimer, em que os elétrons são ditos dinâmicos e com movimento independente e livre, tendo vista que o núcleo é considerado estático (SANT'ANNA, 2002).

2.5.3 Métodos Semi-Empíricos

Os métodos semi-empíricos buscam desenvolver e tratar de um maneira quantitativa propriedades moleculares as com uma dada precisão, confiabilidade e minimizando os custos operacionais. Esta metodologia emprega restrições drástícas, como simplificação da função de onda (por exemplo, o uso da aproximação do elétron p como no método Pariser-Parr-Pople), sendo as mesmas amenizadas por parâmetros ajustáveis devido ao formalismo do método, sendo a causa do seu custo ameno. Esta metodologia é denominada de semi-empírica devido parte de sua estrutura ser baseada nos métodos ab initio, e a outra é determinada empiricamente. Os problemas encontrados no métodos são ocasionados pelas suas aproximações, também como as limitações decorrentes da otimização dos parâmetros (SANT'ANNA, 2002).

As metodologias mais empregadas são AM1 e PM3, que utilizam as mesmas equações, sendo a única diferença relativa à função de repulsão do núcleo, no método PM3 são utilizadas duas funções gaussianas enquanto que no AM1 podem ser empregadas de 1 a 4 gaussianas para cada elemento numérico de parametrização diferentes (ARROIO; HONÓRIO; DA SILVA, 2010).

2.5.4 Teoria Do Funcional Da Densidade (DFT).

A teoria do funcional da densidade (DFT), proposta por Hohenberg, Kohn e Sham, surge como um método diferente ao proposto por Hartree-Fock (HF), para se chegar a energia eletrônica de uma sistema, seja este molecular ou atômico. A base desta teoria era buscar descrever os elétrons integrantes do sistema, que estão sujeitos à um potencial externo, tomando como referencial a densidade eletrônica dos mesmos. Esta pequena adptação tornou-se uma grande vantagem, quando comparado ao método de HF, pois possibilitou que apenas uma função (densidade eletrônica) seria possível interpretar todo o sistema de elétrons (MOTA et al., 2015; ZHANG; MUSGRAVE, 2007).

3. OBJETIVOS

Tendo em vista que as chalconas apresentam diversos tipos de atividade biológica, inclusive contra as enzimas, AChE e BuChE, e atividade antitumoral, este trabalho tem como objetivo sintetizar derivados de chalconas e avaliar seu perfil citotóxido para estes alvos biológicos.

3.1 Objetivos Específicos

- Sintetizar os compostos propostos com bons rendimentos e caracteriza-los utilizando as técnicas adequadas.
- Otimização dos compostos sintetizados utilizando o método DFT.
- Avaliação da atividade citotóxica e anticolinesterásica e possível correlação com fatores estruturais.
4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os reagentes e solventes utilizados neste trabalho são todos de padrão analítico, sendo as marcas comerciais utilizadas Sigma-Aldrich, Merck e Vetec.

As reações foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando placas de alumínio com sílica gel (Sigma-Aldrich). Para eluição das placas foi utilizado hexano e acetato de etila em diferentes concentrações. As placas foram reveladas com o auxílio de luz ultravioleta (λ = 254 e 366 nm). Os compostos foram purificados por recristalização utilizando solventes adequados.

A caracterização foi realizada por ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C (RMN) tendo como solventes clorofórmio deuterado (CDCl₃) e dimetilsufóxido deuterado (DMSO-d₆), infra-vermelho (I.V) e ponto de fusão (P.F). Os experimentos de RMN foram realizados em um equipamento BRUKER AVANCE III – 500 MHz de 11,75 Tesla (UFG), os I.V em um equipamento MOBEM modelo M102 com transformada de Fourier e calibração interna e no Spectrum 100 da Perkin Elmer e, para realizar o I.V as amostras foram incorporadas em pastilhas de KBr e as absorções estão expressas em número de ondas (cm⁻¹) e o ponto de fusãom medido em um equipamento KARL KOLB Scientific-Technical-supplies FrankFurt/M Germany e expresso em graus Celsius (°C).

4.1 Procedimento Geral Para A Síntese De Chalconas

Em um balão de 50 mL foram adicionados 15 mL de etanol e solução aquosa de hidróxido de sódio 10%, adicionando em seguida a acetofenona (2 mmol) correspondente sendo o sistema deixado sob agitação até a completa dissolução da cetona. Após este período, foi adicionado o benzaldeído (2 mmol) e o sistema reacional foi mantido sob agitação à temperatura ambiente até a reação ser completada, sendo acompanhado por CCD. Findada a reação, a mistura reacional foi neutralizada com solução de ácido clorídrico 10% e adicionada água destilada, quando necessário. O produto foi seco e recristalizado em um solvente apropriado. Os dados espectroscópicos das moléculas obtidas são apresentados a seguir.

4.1.1. Dados Espectróscopicos Dos Compostos Sintetizados.

4.1.1.1. Síntesede(2E)-1-(4-aminophenyl)-3-(3,4,5trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one (Mch-1).



RMN ¹**H:** δ 3,82 (s ; 3H ; -OMe) ; δ 3,84 (s ; 6H ; 3-OMe e 5-OMe) ; δ 4,13 (sl ; 2H ; -NH₂) ; δ 6,63 (d ; 2H ; 8,54 Hz) ; δ 6,78 (s ; 2H ; -) δ 7,34 (d ; 1H ; 15,51 Hz) ; δ 7,62 (d ; 1H ; 15,51 Hz) ; δ 7,85 (d ; 2H ; 8,54 Hz).

RMN ¹³**C:** δ 54,49 (4-OMe) ; δ 60,75 (3-OMe e 4-OMe) ; δ 106,30 (2-C e 6-C) ; δ 114,36 (3'-C e 5'-C) ; δ 127,17 (C α) ; δ 131,58 (2'-C e 6'-C) ; δ 140,90 (4-C); δ 143,03 (C β) ; δ 153,95 (3'-C e 5'-C) ; δ 155,19 (4'-C) e δ 188,97(C=O).

I.V: 3446 e 3330 cm⁻¹ (v N-H) ; 3016 cm-1 (v C-Hsp²) ; 2989 (sp³) ; 1634 cm⁻¹ (C=O_{α,β}).

4.1.1.2. Síntese de (2E)-1-(4-aminophenyl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one (Mch-2).



RMN ¹**H:** δ 3,93 (s; 3H ; 3-OMe) ; δ 3,95 (s ; 3H ; 4-OMe) ; δ 4,15 (sl ; 2H ; -NH₂) ; δ 6,70 (d ; 2H ; 8,49 Hz) ; δ 6,89 (d ; 1H ; 8,30 Hz) ; δ 7,15 (d ; 1H ; 1,90 Hz) ; δ 7,22 (dd ; 1H ; 8,30 Hz e 1,90 Hz) ; δ 7,40 (d ; 1H ; 15,48 Hz) ; δ 7,74 (d ; 1H ; 15,48 Hz) ; δ 7,93 (d ; 2H ; 8,49 Hz).

RMN ¹³**C:** δ 56,01 (3-OMe e 4-OMe) ; δ 113,10 (3-C) ; δ 114,53 (6-C) ; δ 114,36 (3'-C e 5'-C) ; δ 121,32 (2-C) ; δ 122,85 (Ca) ; δ 128,01 (1-C) ; δ 131,58 (2'-C e 6'-C) ; δ 131,75 (1'-C) ; δ 145,30 (C β) ; δ 149,28 (5-C) ; δ 151,34 (4-C) ; δ 155,19 (4'-C) ; 188,97 (C=O_{α,β}).

4.1.1.3. Síntese de (2*E*)-1-(4-aminofenil)-3-(4-nitrofenil)prop-2-en-1-one (Mch-3).



RMN ¹**H:** δ 4,22 (s ; 2H) ; δ 6,71 (d ; 2H ; 8,67 Hz) ; δ 7,64 (d ; 1H ; 15,67 Hz ; H_a) ; δ 7,77 (d ; 2H ; 8,74 Hz ; 2-H e 6-H) δ 7,78 (d ; 1H ; 15,63 Hz ; H_b) ; δ 7,94 (d ; 2H ; 8,67 Hz ; 2'-C e 6'-C) e δ 8,26 (d ; 2H ; 8,74 Hz ; 3-C e 5-C).

RMN ¹³**C**: δ 114,23 (3'-C e 5'-C) ; δ 124,41 (C_a) ; δ 126,19 (3-C e 5-C) ; δ 128,97 (2'-C e 6'-C) ; δ 131,54 (1'-C) ; δ 140,14 (1-C) ; δ 141,89 (C_β) ; 148,57 (4-C) ; δ 151,79 (4'-C) e δ 187,30 (C=O_{α,β}).

I.V: 3487 e 3389 cm⁻¹ (v N-H) ; 3060 cm⁻¹ (v C-Hsp²) ; 1637 cm⁻¹ (C=O_{α,β}) ; 1586 cm⁻¹ (v NO₂) e 1324 cm-1 (v C-N).

4.1.1.4. Síntese de (2*E*)-1-(2-aminofenil)-3-(4-metilfenil)prop-2-en-1-one (Mch – 4).



RMN ¹**H:** δ 2,39 (s ; 3H ; -CH₃) ; δ 6,29 (sI ; 2H ; -NH₂) ; δ 6,69 (m ; 2H ; -) ; δ 7,22 (d ; 2H ; 8,0 Hz) ; δ 7,27 – 7,31 (m ; 1H) ; δ 7,53 (d ; 2H ; 8,0 Hz) ; δ 7,57 (d ; 1H ; 15,55 Hz ; H_a) ; δ 7,72 (d ; 1H ; 15,55 Hz ; H_β) ; e δ 7,84 – 7,86 (m ; 1H)

4.1.1.5. Síntese de (2*E*)-1-(2-aminophenyl)-3-(4-ethoxyphenyl)prop-2-en-1one (Mch- 5).



RMN ¹**H:** δ 1,43 (t; 3H; 7,0 Hz; -CH₃); δ 4,08 (q; 2H; 7,0 Hz; -OCH₂); δ 6,28 (broad single; 1H; -; -NH); δ 6,67 – 6,71 (m; 2H); δ 6,91 (d; 2H; 8,75 Hz); δ 7,86 (m; 1H); δ 7,49 (d; 1H; 15,55 Hz; H_a); δ 7,57 (d; 2H; 8,9 Hz); δ 7,71 (d; 1H; 15,55 Hz; H_b) e δ 7,85 (m; 1H).

RMN ¹³**C**: δ 14,95 (-CH₃); δ 69,84 (-OCH₃); δ 115,08 (3-C e 5-C); δ 116,05 (5'-); δ 117,48 (1'-C); δ 119,60 (C_a); δ 120,91 (3'-C); δ 128,06 (1-C); δ 130,17 (2-C e 6-C); δ 131,12 (2'-C); δ 134,25 (4'-C); δ 143,10 (C_β); δ 151,07 (6'-C); δ 160,97 (4-C) e δ 192,03 (C=O_{α,β}). **I.V:** $3500 - 3300 \text{ cm}^{-1}$ (v N-H); $3010 - 3050 \text{ cm}^{-1}$ (v C-Hsp²); $3000 - 2980 \text{ cm}^{-1}$ (v C-Hsp³); 1675 cm^{-1} (v C=O_{α,β}) e 1210 cm⁻¹ (v C-N).

4.1.1.6. Síntese de (2*E*)-1-(2-aminophenyl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one (Mch-6).



RMN ¹**H:** δ 3,93 (s ; 3H ; 4-OMe) ; δ 3,95 (s ; 3H ; 5-OMe) ; δ 6,29 (broad single ; 2H ; -NH₂) ; δ 6,70 (m ; 2H ; -) ; δ 6,89 (d ; 1H ; 8,36 Hz) ; δ 7,15 (d ; 1H ; 1,59 Hz) ; δ 7,22 (dd ; 1H ; 1,86 e 8,18 Hz) ; δ 7,28 (m ; 1H ; -) ; δ 7,47 (d ; 1H ; 15,50 Hz ; Ca) ; δ 7,69 (d ; 1H ; 15,50 Hz) ; δ 7,86 (m ; 1H ; -).

4.1.1.7. Síntese de (2E)-1-(2-aminofenil)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-2-en-1one (Mch-7).



RMN ¹**H**: δ 3,90 (s ; 3H ; - ; -CH₃) ; δ 3,92 (s ; 6H ; - ; -CH₃) ; δ 6,31 (sl ; 2H ; - ; -NH₂) ; δ 6,70 (dd ; 1H ; 1,20 e 8,34 Hz ; 5'-H) ; δ 6,71 (ddd ; 1H ; 1,50 e 7,0 Hz ; 4'-H) ; δ 6,85 (s ; 2H ; - ; 2-H e 6-H) ; δ 7,48 (d ; 1H ; 15,47 Hz ; H α); δ 7,65 (d ; 1H ; 15,47 Hz ; H β) ; δ 7,86 (dd ; 1H ; 1,20 e 8,34 Hz ; 2'-H)

RMN ¹³**C:** δ 58,21 (-OMe) ; δ 60,95 (-OMe) ; δ 105,51 (2-C e 6-C) ; δ 115,80 (5'-C) ; δ 117,30 (Ca) ; 119,10 (1'-C) ; δ 122,45 (3'-C) ; δ 130,77 (1-C) ; δ

41

130,93 (2'-C) ; δ 134,23 (4'-C) ; δ 140,12 (4-C) ; δ 143,07 (C β) ; 150,94 (6'-C) ; δ 153,45 (3-C e 5-C) e δ 191,54 (C=O)

I.V: 3469 e 3220 cm⁻¹ (vN-H) ; 3005 cm⁻¹ (v C-Hsp²) ; 2940 cm⁻¹ (v C-Hsp³) ; 1645 cm⁻¹ (v C=O) ; 1548 cm⁻¹ (v C=C) ;

4.1.1.8. Síntese de (2E)-3-(4-metilfenil)-1-(4-nitrofenil)prop-2-en-1-one (Mch – 8).



RMN ¹**H:** δ 2,40 (s ; 3H ; - ; -CH₃) ; δ 7,25 (d ; 2H ; 8,18 Hz ; 3-H e 5-H) ; δ 7,25 (d ;1H ; 15,68 Hz ; H α) ; δ 7,55 (d ; 2H ; 8,18 Hz ; 2-H e 6-H) ; δ 7,82 (d ; 1H ; 15,68 Hz ; H β) ; δ 8,13 (d ; 2H ; 9,0 Hz ; 3'-H e 5'-H) ; δ 8,34 (d ; 2H ; 9,0 Hz ; 2'-H e 6'-H)

RMN ¹³**C**: δ 21,79 (-CH₃) ; δ 120,58 (C α) ; δ 124,02 (3'-C e 5'-C) ; δ 128,96 (2-C e 6-C) ; δ 129,58 (3-C e 5-C) ; δ 130,07 (2'-C e 6'-C) ; δ 131,83 (1-C) ; δ 142,18 (4-C) ; δ 143,48 (1'-C) ; δ 147,14 (C β) ; δ 150,25 (4'-C) ; δ 189,31 (C=O).

I.V: 3023 cm⁻¹ (v C-Hsp²) ; 2996 cm⁻¹ (v C-Hsp³) ; 1660 cm⁻¹ (v C=O) ; 1525 e 1333 cm⁻¹ (v NO₂).

4.1.1.9. Síntese de (2E)-3-(4-metoxifenill)-1-(4-nitrofenil)prop-2-en-1-one (Mch – 9).



RMN ¹**H:** δ 3,87 (s ; 3H; - ; -OCH₃) ; δ 6,97 (d ; 2H ; 8,84 Hz ; 3-H e 5-H) ; δ 7,35 (d; 1H ; 15,59 Hz ; H α) ; δ 7,62 (d ; 2H; 8,84 Hz ; 2-H e 6-H) ; δ 7,82 (d; 1H ; 15,59 Hz ; H β) ; δ 8,13 (d ; 2H ; 8,96 Hz ; 2'-H e 6'-H) ; δ 8,34 (d ; 2H ; 8,96 Hz ; 3'-H e 5'-H).

RMN ¹³**C**: δ 55,69 (-OCH₃); δ 114,82 (3-C e 5-C); δ 119,82 (Ca); δ 124,02 (3'-C e 5'-C); δ 127,27 (1-C); δ 129,51 (2-C e 6-C); δ 130,83 (2'-C e 6'-C); δ 143,69 (1'-C); δ 146,91 (C β); δ 150,16 (4'-C); δ 162,49 (4-C); δ 189,20 (C=O).

I.V:3100 cm⁻¹ (v C-Hsp²); 2972 cm⁻¹ (v C-Hsp³) ; 1650 cm⁻¹ (v C=O_{α,β}) ; 1600 cm⁻¹ (v C=C) ; 1512 e 1338 cm⁻¹ (v NO₂) ; 1182 cm⁻¹ (v C-O-C).

4.1.1.10. Síntese de (2E)-3-(4-etoxifenil)-1-(4-nitrofenil)prop-2-en-1-one (Mch – 10).



RMN ¹**H:** δ 1,45 (t ; 3H ; 7,0 Hz ; -OCH₂CH₃) ; δ 4,10 (q ; 2H; 7,0 Hz ; -OCH₂CH₃) ; δ 6,94 (d ; 2H ; 8,57 Hz ; 3-H e 5-H) ; δ 7,35 (d ; 1H ; 15,54 Hz ; Ha) ; δ 7,61 (d; 2H ; 8,57 Hz ; 2-H e 6-H) ; δ 7,81 (d; 1H ; 15,54 Hz ; H β) ; δ 8,12 (d ; 2H ; 8,84 Hz ; 2'-H e 6'-H) ; δ 8,34 (d ; 2H ; 8,34 Hz ; 3'-H e 5'-H).

RMN ¹³**C**: δ 14,91 (-OCH₂CH₃) ; δ 63,99 (-OCH₂CH₃) ; δ 115,29 (3-C e 5-C) ; δ 119,06 (C α) ; δ 124,02 (3'-C e 5'-C) ; δ 127,09 (1-C) ; δ 129,51 (2-C e 6-C) ; δ 130,86 (2'-C e 6'-C) ; δ 143,74 (1'-C) ; δ 147,01 (C β) ; δ 150,16 (4'-C) ; δ 161,84 (4-C) ; δ 189,22 (C=O).

I.V: $3000 \text{ cm}^{-1} (v \text{ C-Hsp}^2)$; 2952 cm⁻¹ (v C-Hsp³); 1656 cm⁻¹ (v C=O_{α,β}); 1565 cm⁻¹ (v C=C); 1525 e 1341 cm⁻¹(v NO₂ simétrico e assimétrico); 1265 e 1040 cm⁻¹ (v C-O-C simétrico e assimétrico).

4.1.1.11.Síntese de (2E)-3-(3,4-dimetoxifenil)-1-(4-nitrofenil)prop-2-en-1one (Mch – 11).



RMN ¹**H:** δ 3,95 (s ; 3H ; - ; PhOCH₃) ; δ 3,96 (s; 3H ; - ; PhOCH₃) ; δ 6,92 (d ; 1H ; 8,38 Hz ; 3-H) ; δ 7,16 (d ; 1H ; 2,01 Hz ; 6-H) ; δ 7,26 (dd ; 1H ; 2,01 e 8,38 Hz ; 2-H) ; δ 7,33 (d ; 1H ;15,62 Hz ; H- α) ; δ 7,79 (d ; 1H; 15,62 Hz ; H- β) ; δ 8,13 (d ; 2H ; 8,86 Hz ; 3'-H e 5'-H); δ 8,35 (d ; 2H ; 8,86 Hz ; 2'-H e 6'-H).

RMN ¹³**C:** δ 56,02 (PhOCH₃) ; δ 56,05 (PhOCH₃) ; δ 110,25 (3-C) ; δ 111,23 (6-C); δ 119,29 (2-C) ; δ 123,75 (C α) ; δ 123,80 (3'-C e 5'-C) ; δ 143,46 (1'-C) ; δ 147,02 (C_{β}) ; δ 149, 42 (4-C) ; δ 149,95 (5-C) ; δ 152,12 (4'-C) ; δ 189,06 (C=O).

I.V: $3080 \text{ cm}^{-1} (v \text{ C-Hsp}^2)$; 2974 cm⁻¹ (v C-Hsp³); 1665 cm⁻¹ (v C=O_{α,β}); 1574 cm⁻¹ (v C=C); 1525 e 1341 cm⁻¹ (v NO₂); 1258 cm⁻¹ (v C-O-C).

4.1.1.12 (2E)-3-(4-etoxifeni)-1-(4-{[(E)-(4-etoxifenil)metilidene]amino}fenil)prop-2-en-1-one (Mch – 12).



RMN ¹**H** : δ 1,44 (m ; 6H) ; δ 4,10 (m ; 4H) ; δ 6,93 (d ; 2H ; 9,0 Hz) ; δ 6,98 (d ; 2H ; 9,0 Hz) ; δ 7,25 (d ; 3H) ; δ 7,45 (d ; 1H ; 15,59 Hz) ; δ 7,60 (d ; 2H ;

8,55 Hz) ; δ 7,80 (d ; 1H ; 15,59 Hz) ; δ 7,86 (d ; 2H ; 8,55 Hz) ; δ 8,07 (d ; 2H ; 8,55 Hz) ; δ 8,38 (s ; 1H).

4.1.1.13(2*E*)-3-(4-metoxifenil)-1-(4-{[(*E*)-(4metoxifenil)metilidene]amino}fenil)prop-2-en-1-one (Mch – 13).



RMN ¹**H** : δ 3,86 (s ; 3H ; 4'-OMe) ; δ 3,88 (s ; 3H ; -) ; δ 6,94 (d ; 2H ; 8,73 Hz) ; δ 7,00 (d ; 2H ; 8,73 Hz) ; δ 7,25 (d ; 2H ; 8,48 Hz) ; δ 7,46 (d ; 1H ; 15,57 Hz) ; δ 7,62 (d ; 2H ; 8,48 Hz) ; δ 7,81 (d ; 1H ; 15,57 Hz) ; δ 7,87 (d ; 2H ; 8,86 Hz) ; δ 8,07 (d ; 2H ; 8,86 Hz) ; δ 8,39 (s ; 1H)

RMN ¹³**C** : δ 55,64 (4-OMe) ; δ 55,69 (4"-OMe) ; δ 114,53 (3-C e 5-C) ; δ 119,93 (Ca) ; δ 121,18 (3'-C e 5'-C) ; δ 128,00 (1-C) ; δ 129,13 (2-C e 6-C) ; δ 130,07 (1"-C) ; δ 130,42 (2"-C e 6"-C) ; δ 131,10 (2'-C e 6'-C) ; δ 135,75 (1'-C) ; δ 144,48 (C β) ; δ 156,57 (4'-C) ; δ 161,02 (4"-C) ; δ 161,85 (4-C) ; δ 162,92 (HC=N) e δ 189,60 (C=O)

I.V: 3010 cm^{-1} (v C-H_{sp2}); 2960 cm⁻¹ (v C-Hsp³); 1637 cm⁻¹ (v C=O); 1597 cm⁻¹ (v C=C); v 1245 cm⁻¹ (v C-O-C).

4.1.1.14 (2*E*)-3-(4-metilfenil)-1-(4-{[(*E*)-(4metilfenil)metilidene]amino}fenil)prop-2-en-1-one (Mch – 14).



RMN ¹**H** : δ 2,40 (s ; 3H) ; δ 2,44 (s ; 3H) ; δ 7,23 (d ; 2H ; 7,8 Hz) ; δ 7,28 (d ; 2H ; 8,62 Hz) ; δ 7,30 (d ; 2H ; 7,88 Hz) ; δ 7,54 (d ; 1H ; 15,40 Hz) ; δ 7,56 (d ; 2H ; 8,0 Hz) ; δ 7,82 (d ; 2H ; 8,0 Hz) ; δ 7,83 (d ; 1H ; 15,40 Hz) ; δ 8,08 (d ; 2H ; 8,62 Hz) ; δ 8,43 (s ; 1H ; -)

RMN ¹³**C** : δ 21,78 (-CH₃) ; δ 21,93 (-CH₃) ; 121,22 (Ca) ; 121,25 (3'-C e 5'-C) ; δ 128,73 (2-C e 6-C) ; δ 129,37 (2"-C e 6"-C) ; δ 129,88 (3-C e 5-C) ; δ 129,96 (3"-C e 5"-C) ; δ 130,19 (2-C e 6-C) ; δ 132,55 (1"-C) ; δ 133,55 (1'-C) ; δ 135,81 (4"-C) ; δ 141,24 (4-C) ; δ 142,81 (C β) ; δ 144,82 (4'-C) ; δ 156,57 e δ 189,70 (C=O).

I.V: v 3005 cm⁻¹ (v C-Hsp²) ; 2950 cm⁻¹ (v C-Hsp³) ; v 1658 cm⁻¹ (v C=O) ; 1605 cm⁻¹ (v C=C) ;

4.1.1.15 2*E*)-3-(4-etilfenil)-1-(4-{[(*E*)-(4etilfenil)methylidene]amino}fenil)prop-2-en-1-one (Mch – 15).



RMN ¹**H** : δ 1,27 (m ; 6H) ; δ 2,72 (m ; 4H) ; δ 7,27 (m ; 4H) ; δ 7,33 (d ; 2H ; 8,30 Hz) ; δ 7,55 (d ; 1H ; 15,69 Hz) ; δ 7,59 (d; 2H ; 8,0 Hz) ; δ 7,83 (d ; 1H ; 15,69 Hz) ; δ 8,09 (d ; 2H ; 8,3 Hz) e δ 8,44 (s ; 1H);

RMN ¹³**C** : δ 15,53 ; δ 29,12 ; δ 121,22 (Ca) ; δ 121,31 (3'-C e 5'-C) ; δ 128,70 (3-C e 5-C) ; δ 128,77 (3"-C e 5"-C) ; δ 128,33 (2-C e 6-C) ; δ 129,47 (2"-C e 6"-C) ; δ 130,16 (2'-C e 6'-C) ; δ 132,78 (1-C) ; δ 133,79 (1'-C) ; δ 135,81 (1"-C) ; δ 144,86 (C β) ; δ 147,55 (4-C) ; δ 149,09 (4"-C) ; δ 156,61 (4'-C) ; δ 161,83 (C=N) e δ 189,74 (C=O);

I.V: 3020 cm⁻¹ (v C-Hsp²) ; 2965 cm⁻¹ (v C-Hsp³) ; 1657 cm⁻¹ (C=O) ; 1594 cm⁻¹ (v C=C);

4.2 Ensaio Anticolinesterásico

Os testes biológicos foram realizados por uma parceria com o Departamento de Química da USP Ribeirão Preto, no laboratório da Prof. Dr^a Carmem Lucia Cardoso. As amostras foram preparadas na concentração de 1 mmol L⁻¹ e solubilizadas em 100% DMSO . Os ensaios foram realizados em placas cromatográficas de sílica gel 60, sendo as placas preparadas, uma para cada ensaio, sem a realização de eluição dos compostos, aplicando volumes de 2,5 µL de cada amostra nas placas.

4.2.2. Ensaio De Ellman (Ellman Et Al., 1961)

Para a realização deste ensaio foi necessário a preparação das seguintes soluções:

- A) Tampão tris: pH 8 (ajustado com HCl 10% v/v).
- B) Reagente de Ellman (0,0099 g) e iodeto de acetilcolina, ACThI (0,00723 g) dissolvidos em 25 mL da solução A.
- C) Para preparação da solução enzimática foi necessário, antes, fazer duas soluções, uma dissolvendo 0,704 mg de AChE (pó liofilizado, Sigma, de peixe elétrico) em 304 µL de água deionizada (solução 1) e outra com 0,025 g de albumina sérica bovina (BSA) em 25 mL do tampão tris (solução 2). Em seguida, foram misturados 15 µL da solução 1 em 5 mL da solução 2, para então obter a solução enzimática utilizada no teste.

As amostras foram aplicadas na placa de CCD e em seguida borrifou-se a solução B (reagente de Ellman + substrato). Após três minutos foi pulverizado a solução C. O padrão utilizado foi a tacrina, sendo aplicado ao final de cada placa.

4.2.3. Ensaio Falso-Positico Ellman (Rhee, I. Et Al, 2003)

As seguintes soluções foram preparadas e utilizadas no ensaio:

- A) Tampão tris: pH 8,0 (ajustado com HCl 10% v/v).
- B) 0,0099 g do reagente de Ellman em 25 mL do tampão tris.
- C) 0,00723 g de ACThI em 25 mL do tampão tris.
- D) Para preparação da solução enzimática foi necessário, antes, fazer duas soluções, uma dissolvendo 0,704 mg de AChE (pó liofilizado, Sigma, de peixe elétrico) em 304 μL de água deionizada (solução 1) e outra com 0,025 g de albumina sérica bovina (BSA) em 25 mL do tampão tris (solução 2). Em seguida, foram misturados 15 μL da solução 1 em 5 mL da solução 2, para então obter a solução enzimática utilizada no teste.

As amostras foram aplicadas na placa de CCD. As soluções C e D foram incubas por 15 minutos á 37ºC. Após a incubação, borrifar primeiro a solução B sobre as placas de sílica e em seguida a mistura que foi incubada contendo o produto da reação enzimática.

4.2.4. Ensaio de Marston

As seguintes soluções foram preparadas e utilizadas no ensaio:

- A) Tampão tris: pH 7,8 (ajustado com HCl 10% v/v)
- B) Solução de BSA (0,025 g em 25 mL de tampão tris) + 84 µL de AChE
- C) 0,030 g fast blue + 12 mL água deionizada
- D) 0,0075 g α-nafhthyl + 3mL etanol

As amostras foram aplicadas nas placas e em seguida, as solução B foi borrifada sobre a placa e esta foi mantida em um "cuba úmida" a 37°C por 20 minutos. Após esse período as soluções C e D foram misturadas e borrifadas sobre as placas. O padrão utilizado neste ensaio também foi a Tacrina e aplicado no final da cada placa.

4.3 Avaliação do potencial citotóxico in vitro

A Avaliação do potencial citotóxico foi realizada na Universidade Federal do Ceará, No Laboratório de Oncologia Experimental, localizado na Faculdade de Medicina, da mesma instituição, que tem como coordenado o professor Manoel Odorico de Moraes, coordenador do projeto.

Análise de citotoxicidade pelo método do MTT vem sendo utilizada 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. Foi descrita primeiramente por Mosman (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-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células

metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE *et al.*, 1996).

As células foram plaqueadas na concentração de 0,1 x 10^6 cél/mL para as linhagens SF-295 e HL-60 e 0,7 x 10^5 cél/mL para a linhagem HCT-116. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante, removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595nm.

Células: As linhagens tumorais utilizadas, SF-295 (glioblastoma humano), PC-3 (próstata) e HCT-116 (colón) foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 \Box C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

Amostras: As amostras foram diluídas em DMSO puro estéril. As amostras foram testadas na concentração de 5 µg/mL. Para determinação da CI₅₀, as amostras foram testadas em concentrações crescentes em diluição seriada.

4.3.1 Análise Estatística

Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas. Amostras sem atividade (SA), com pouca atividade (PA, inibição de crescimento celular variando de 1 a 50%), com atividade moderada (MO, inibição de crescimento celular variando de 50 a 75%) e com muita atividade (MA, inibição de crescimento variando de 75 a 100%).

Os experimentos foram analisados segundo a média ± desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPad Prism*.

4.4. Procedimento Computacional

Vinte e cinco chalconas foram estudadas com a Teoria do Funcional de Densidade (DFT) (**Quadro 3**), sendo que 15 foram sintetizadas em nosso laboratório e as chalconas Mch-16 à Mch-25 foram buscadas na literatura.

Código	Estrutura química
Mch-1	H ₂ N OMe OMe
Mch-2	H ₂ N OMe OMe
Mch-3	H ₂ N NO ₂
Mch-4	O NH ₂ CH ₃
Mch-5	O NH ₂ OEt
Mch-6	O NH ₂ OMe OMe

Quadro 3. Estruturas dos compostos que foram otimizados.

Mch-7	O NH ₂ OMe OMe
Mch-8	O ₂ N Me
Mch-9	O ₂ N OMe
Mch-10	O ₂ N OEt
Mch-11	O ₂ N OMe OMe
Mch-12	
Mch-13	H MeO MeO
Mch-14	H Me Me
Mch-15	
Mch-16*	ОН

Mch-17*	O OH OMe
Mch-18*	O OH OMe
Mch-19*	O OH OH OMe
Mch-20**	H ₃ C O NH O O H
Mch-21**	NH OH
Mch-22**	H ₂ N ONH OH
Mch-23**	H ₃ C ONH OH OH
Mch-24**	O S NH O O H
Mch-25**	

*(HASAN et al., 2005) **(Kang et al, 2012).

Com base em estudos prévios, usando sistemas semelhantes, iniciamos o estudo teórico com otimizações de geometrias de todos os compostos estudados neste trabalho sem a inclusão de nenhum vínculo de simetria (LOPES et al., 2013; MOTA et al., 2015).

As otimizações das geométrias, foram realizadas juntamente com as frequências moleculares, usando um método da teoria do funcial da densidade (DFT) híbrido com correção de longo alcance (CAM-B3LYP), usando um conjunto de funções de base do tipo Pople VTZ (*Valence Triple Zeta* que consiste em um número de base mínima descrevendo o core eletrônico e o triplo de funções para descrever a valência atômica) como funções de polarização do tipo d e p, 6-311G(d,p) (Feller, D. et al, 2007; Feller, D., 1996; Schuchardt, K. L., 2007; Irikura, K. K., 1998; Frisch, M. J., et al. 2009)

Partindo da estrutura pré-otimizada em CAM-B3LYP/6-311G(d,p), foram realizados cálculos do tipo *single point,* utilizando o nível de cálculo TD-PBE1PBE/6-311+G(2d, p), para 15 estados de excitação. As superfícies dos orbitais moleculares HOMO e LUMO foram extraídas dos cálculos CAM-B3LYP/6-311G(d,p). Todos os cálculos foram realizados usando o programa Gaussian[®] 09 D.01 (FRISCH, M. J. et al.)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Sintese das Chalconas

As chalconas do presente trabalho foram sintetizas via reações de Claisen-Schmited e todas foram caracterizadas como citado nos procedimentos experimentais. Nestas condições a reação inicia-se pela abstração do hidrogênio alfa carbonílico da cetona (**7**) formando o íon enolato (**8**), que é estabilizado por ressonância. Esse ânion ataca o carbono carbonílico do aldeído formando um intermediário tetraédrico, o íon alcóxido (**9**). Em seguida, **9** abstrai um próton de uma molécula de água, regenerando o catalisador básico, formando a hidroxiacetona (**10**). a etapa final ocorre a desidratação de **10**, conduzindo ao produto da reação, uma cetona α,β -insaturada (**11**) (CAREY, F.A; SUNDBERG, J.R, 2007), como mostrado abaixo (**Figura 11**):



Figura 11. Mecanismo geral da reação aldólica, evidenciando a formação da estrutura geral das chalconas (11).

As chalconas sintetizadas neste trabalho estão listadas no **Quadro 4** abaixo:

	5 CH ₃ +	Б' R' <u> </u> 4 3'	NaOH Etanol T.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A 7.A	
	Acetofenona	Aldeído	Chalcona	
Código		R	R'	Rendimento (%)
Mch – 1		4-NH ₂	3- OMe 4-OMe 5- OMe	50
Mch – 2		4-NH ₂	3- OMe 4 - OMe	65
Mch – 3		4-NH ₂	4-NO ₂	40
Mch – 4		2-NH ₂	4-Me	63
Mch – 5		2-NH ₂	4- OEt	70
Mch – 6		2-NH ₂	3- OMe 4 - OMe	75
Mch – 7		2-NH ₂	3-OMe 4- OMe 5- OMe	68
Mch – 8		4-NO ₂	4-Me	86
Mch – 9		4-NO ₂	4-OMe	75
Mch – 10		4-NO ₂	4-OEt	90
Mch – 11		4-NO ₂	3- OMe 4 - OMe	80

Quadro 4. Esquema reacional e rendimento das chalconas sintetizadas

As chalconas sintetizadas foram caracterizadas por RMN de ¹H e ¹³C e I.V. Como exemplo, a caracterização do composto Mch – 1 será utilizada como modelo, cujo espectro de RMN ¹H esta representado na **Figura 12**.



Figura 12. Espectro de RMN 1H do composto Mch – 1.

Neste espectro observa-se dois simpletos (s) , um de média intesidade (δ H 3,82 ppm, 3H) e outro mais intenso (δ_{H} 3,84, 6H, OCH₃) que são referentes as três substituições do anel B em C5', C4' e C3'. O próximo sinal, em δ_{H} 4,13 ppm, com integral para 2H refere-se aos hidrogênios do grupo amina. Na região mais desblindada do espectro encontra-se os sinais dos hidrogênios aromáticos, sendo o primeiro um dupleto (d) δ_{H} 6,64 (d ; 2H ; 8,56 Hz) e em δ_{H} 6,78 (s ; 2H), referentes aos hidrogênios ligados aos carbonos C3/C5 e C2'/C6', respectivamente. Em δ_{H} 7,33 (d ; 1H ; 15,55 Hz) e δ_{H} 7,60 (d ; 1H ; 15,55 Hz), são os sinais referentes aos carbonos alfa (C_a) e carbono beta (C_β) e caracterizam a ligação dupla das chalconas com uma geometria trans.

No espectro de RMN ¹³C (**Figura 10**) os sinais δ 56,49 e 61,23 são referentes às metoxilas presentes no anel B, os sinais de 105,79 à 153,71 correspondem à região aromática, onde podemos destacar as absorções em 121,6 ; 143,5 ; 188,3. Estes sinais se referem aos carbonos alfa, beta e cabonílico, respectivamente.



Figura 13. Espectro de RMN 13 C do composto Mch – 1.

É interessante destacar que durante a síntese da série de 4aminochalconas, quando foram utilizados os aldeídos 4-metoxibenzaldeído, 4-etoxibenxaldeído, 4-metilbenzaldeído e 4-etilbenzaldeído isolou-se as iminas como produto da reação, ao contrário da chalcona esperada, como mostra a **Figura 14**.



Figura 14. Esquema reacional da formação das iminas.

A síntese de iminas geralmente é eficiente sob condições anidras e catálise levemente ácida, pois em valores de pH muito baixos ocorre a protonação do grupo amino comprometendo o seu ataque nucleofílico ao grupo carbonila do aldeído (CLAYDEN, et al. 2001). Deve-se destacar que essas condições são distintas das empregadas na síntese das moléculas deste trabalho

Uma possível explicação para a formação das iminas, deve-se ao método de purificação das chalconas. Durante a síntese, deve-se neutralizar o meio reacional com ácido diluído (HCI 10% v/v) e em sequência, tem-se a formação de um sólido (chalcona), que em seguida é filtrado e lavado com água destila. Após, o mesmo é recristalizado, geralmente em etanol, caso traços de ácido remanescentes da etapa de neutralização estejam presentes, tornam o ambiente propício para a formação das imina. A formação do produto é corroborada por dados de RMN ¹H e ¹³C e I.V (**Figura 15**).

I).001.001.1r.esp



Quando observa-se estruturalmente os compostos (chalconas e iminas) nota-se que a imina (Mch-14) apresenta uma ligação C=N diferente da chalcona (Mch -1), esta pequena diferença pode ser nitidamente vista em ambos os espectos de RMN quanto no I.V. Iminas tem como característica um hidrogênio ligado ao carbono hibridizado sp², este esta desblindado devido o efeito anisotrópico, e apresenta-se como um "s" entre 8,3 a 8,5 ppm.

Os dois simpletos "s" em δ_{H} 2,40 e 2,44 referem-se aos hidrogênios do grupo metila. Os sinais seguintes são 7,23 (d ; 2H ; 8,0 Hz), 7,25 (d ; 2H ; 8,66 Hz), 7,30 (d; 2H ; 8,0 Hz), 7,54 (d ; 1H ; 15,50 Hz), 7,56 (d ; 2H ; 7,95 Hz), 7,82 (d; 1H; 15,50 Hz), 7,82 (d; 2H; 8,10 Hz) 8,0 (d; 2H; 8,5 Hz) referentes as hidrogênios ligados aos C3"/C5", C3'/C5', Cα, C2'/C6', Cβ, C2"/C6" e C2/C6.

Informações importantes também podem ser coletadas no espectro de infravermelho (Figura 16).



Figura 16. Espectro de absorção no I.V do composto Mch - 14.

Na análise do espectro de absorsorção no I.V não são observados estiramentos na região de 3500 – 3400 cm⁻¹, característicos de hidrogênios ligados ao grupo amino. Cabe destacar outros sinais importantes que são referêntes ao composto Mch-14 sendo estes estiramentos da carbonila α , β -insaturada (1658 cm⁻¹), hidrogênios ligados à carbono hidridizado sp² e sp³, 3027 e 2915 cm⁻¹, respectivamente, dupla ligação entre carbonos (1601 – 1589 cm⁻¹) e a substituição do anel aromático na posição *para* (815 cm⁻¹).

5.2 ATIVIDADE ANTICOLINESTERASE

As chalconas e iminas sintetizadas neste trabalho foram submetidas a ensaios para determinação de atividade inibitória para а enzima acetilcolinesterase de peixe elétrico (AChE ee) (Electrophorus electricus) utilizando três tipos de ensaios: Ellman (ELLMAN et al., 1961; RHEE et al., 2001), Falso-positivo Ellman (RHEE, I. K.; VAN RIJN, R, M.; VERPOORTE, R, 2003) e ensaio de Marston (MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K., 2002). O método de Ellman baseia-se na medida da velocidade de produção da tiocolina formada através da hidrólise do análogo do substrato da

AChE, a ACh. A tiocolina formada reage com o chamado Reagente de Ellman (ácido 5,5-ditiobis[2-nitrobenzóico]) formando uma mistura de dissulfetos e um ânion amarelo com intensa absorção em 412 nm (**Figura 17**). Quando compostos inibidores de AChE são adicionados, observa-se uma diminuição na absorção.



Figura 17. Catálise da acetiltiocolina e reação de Ellman.

Um problema encontrado no método de Ellman é a necessidade dos compostos serem solúveis em água, este problema foi contornado por Rhee e Col (RHEE et al., 2001), quando adaptaram o teste para placas CCD, sendo as amostras solubilizadas em solventes orgânicos, e em seguida aplicadas em CCD.

No ensaio de Marston a atividade enzimática é detectada pela conversão do acetato de α -nafhthyl a α -naftol que reage com o sal de Fast Blue B formando um corante diazo de cor púrpura (**Figura 18**). Resultado positivo neste ensaio significa que o composto presente na amostra inibiu a enzima não ocorrendo, portanto, a formação do α -naftol e a conseqüente formação do corante.



Figura 18. Catálise da acetilcolinesterase com acetato de naftil e subseqüente formação do corante púrpura observado.

Os resultados dos testes estão listados na **Tabela 1**, assim como as CCD onde foram feitos os testes de Ellman (**Figura 19**), falso-positivo de Ellman (**Figura 20**) e Martson (**Figura 21**).

Tabela 1-	Resultados	dos ensaios	realizados	para a	enzima AChE.	

Idontificação do	Ensaio em CCD				
amostra	Método modificado de Ellman* (DTNB) ª	Ensaio Falso Positivo* (DTNB) ^b	Ensaio Marston ^c *		
Padrão *	+	-	+		
Mch- 1	-	-	-		
Mch- 2	-	-	-		
Mch- 3	-	-	-		
Mch- 4	-	-	-		
Mch- 5	-	-	-		
Mch - 6	-	-	-		
Mch-7	-	-	-		

Mch- 8	-	-	-
Mch- 9	-	-	-
Mch- 10	-	-	-
Mch- 11	-	-	-
Mch- 12	-	-	-
Mch -13	-	-	-
Mch – 14	-	-	-
Mch -15	-	-	-

aec(+) inibição, (-) não inibição; ^b(+) falso inibidor, (-) inibidor; *Padrão tacrina;



Figura 19. CCD do ensaio de Ellman.

M								
mi.	M2	M3	My	M7	M8	MIO	M 11	M 13
Miy	M15	MIT	M.8	Mig	M20	M 21	T	

Figura 20. CCD do ensaio Falso-positivo de Ellman.



Figura 21. CCD do ensaio de Martson.

Como pode ser observado na Tabela 1, os compostos testatos não inibiram a ação da enzima nos dois tipos de ensaios realizados (Ellman e

Marston), evidenciados pelo não surgimento de halos bracos nas cromatoplacas.

Para justificar tais resultados é necessário considerar a estrutura da enzima, esquematicamente, de acordo com os seus sítios catalíticos (Figura 22).



Figura 22. Esquema dos sítios catalíticos da enzima AChE (LEMES, 2013).

A AChE possui uma tríade catalítica que compreende os resíduos de aminoácidos Ser200, His440 e Glu327 revestidos com 14 resíduos aromáticos . O sítio ativo também contém uma "subunidade" aniônica, incluindo Trp84 como um resíduo chave para a interação com o grupo amônio quartenário do substrato acetilcolina e outros ligantes via interação cátion-pi, e outro resíduo aromático esta conservado (Phe330) e envolvido na interação (55). O sítio ativo da AChE consiste de três domínios principais: um locus esterático, compreendendo o sítio ativo da serina, um lócus aniônico, que esta a 14,7 Å à partir de serina esterática e região hidrofóbica (SINGH et al., 2013)

Compostos que são inibidores desta enzima atuam no sítio aniônico perifético (PAS) ou no sítio catalítico, compreendido pela triáde catalítica e o sítio aromático. Por exemplo, o medicamento Donezepil atua no sítio aromático (SILVA et al., 2014), logo, supõe-se que os compostos sintetizados não atuam sobre nenhum dos sítios catalíticos acima citados, portando não apresentando inibição da enzima em estudo.

5.3. MODELAGEM MOLECULAR

Para compreender a atividade biológica de uma dada substância é necessário estudar uma série de moléculas análogas a essa. Com o intuito de verificar o motivo das moleculas sintetizadas não possuirem atividade, de uma forma qualitativa, foi necessário buscar na literatura alguns compostos com estrutura semelhante que possuíam atividade sobre a AChE e comparar os parâmentos físico-químicos destas substâncias ativas com as nossas, inativas. Da literatura, as moléculas abaixo apresentaram atividade frente a enzima em estudo (**Tabela 2**).

Estrutura	IC ₅₀ (μΜ)
OH OH	59.2 ± 5.0*
	66.0 ± 0.8*
	92.9 ± 5.4*
	28.2 ± 0.5*
H ₃ C OH	56,1**
NH OH	83,3**
H ₂ N 0 NH 0 OH	95,8**
H ₃ C O NH O O O O O O O O O O O O O O O O O	75,9**
OH OH OH	75,4**
HO S NH O O H	57,4**

Tabela 2. Estruturas dos compostos que apresentam atividade perante aAChE.

*(HASAN et al., 2005) **(Kang et al, 2012).

As 25 estruturas foram então otimizadas e seus parâmetros retirados, tendo como referencial a nomenclatura da **Figura 20**.



Figura 23. Esquema representativo do modelo seguido para retirada dos descritores das moleculas.

5.3.1 Descritores Calculados

Foram calculados 80 descritores químicos retirados de 16 propriedades dentre elas estruturais, geométricas, físico-químicas e eletrônicas, listadas na **Tabela 3**.

Propriedade	Simbologia (unidade)		
Distância interatômica	d		
Angulo de ligação	A (°)		
Angulo Diedral	Τ (°)		
Momento de dipolo	μ		
Carga	Cg		
Ulta violeta	U.V		
Homo	-		
Homo -1	-		
Homo -2	-		

Tabela3.Propriedades retiradas das moleculas otimizadas e suassimbologias.

Lumo	-
Lumo -1	-
Lumo -2	-
Diferença de energia entre Homo e Lumo	GAP
Área Superficial	A _{sup.}
Volume	V
Energia de Hidratação	E _{hidra}
Log p	-
Refratividade Molecular	RM
Polarizabilidade	α

Obs: continuação da Tabela 3.

Com o intuito de reduzir a quantidade de descritores, discriminando aqueles que possuem maior influência na atividade dos compostos utilizou-se uma técnica estatística denominada peso de fisher, **Wab**, (JÚNIOR, 2014), mostrada na Figura 24.

$$Wab = \frac{[\bar{x}a - \bar{x}b]^2}{Sa^2 + Sb^2}$$
Xa = média dos compostos ativos
Xb = média dos compostos inativos
Sa^2 = desvio padrão dos compostos ativos
Sb₂ = desvio padrão dos compostos inativos

Г

Figura 24. Fórmula utilizada para cálculo dos pesos de fisher de cada descritor.

Para cada descritor foi calculado o peso de fisher sendo estes mostrados na Tabela 4.

Variavel	Peso de	Variavel	Peso de	Variavel	Peso de	Variavel	Peso de
d _(C1 - C2)	0.285308	d _(C-O)	0.00018	T _(C13-C14-C15-C7)	5.219993	Cg (C12)	0.001909
d _(C2 - C3)	0.031585	d (_{C13-C1)}	0.00711	T _(C14-C15-C7-C12)	0.030534	Cg (C13)	2.807035
d _(C3 - C4)	0.310786	A (C3-C4-R1)	0.73146	T _(C6-C1-C7-C12)	0.003296	Cg (O)	1.596326
d _(C4-R1)	0.000454	A (R1-C4-C5)	0.17002	μ	0.029534	Cg (C14)	0.460941
d _(C4-C5)	0.721034	A (C4-C5-C6)	0.00537	Cg _(C1)	22.91486	Cg (C15)	0.104766
d _(C5-C6)	0.033170	A (C5-C6-R2)	0.31946	$Cg_{(C2)}$	0.132652	U.V (1)	0.049102
d _(C6-R2)	0.000022	A (R2-C6-C1)	0.08652	Cg (C3)	0.028560	U.V (2)	0.004277
d _(C6-C1)	0.054336	A _(C1-C13-O)	0.09338	Cg (C4)	0.580002	LUMO +1	0.293833
d _(C7-C8)	1.532693	A (C1-C13-C14)	2.61686	Cg (R1)	2.385328	LUMO +2	0.202920
d _(C8-C9)	3.194742	A (O-C13-C14)	2.02001	Cg (C5)	1.780540	HOMO -1	1.538617
d _(C9-R5)	0.000100	A (C13-C14-15)	4.29511	Cg (C6)	0.134053	HOMO -2	1.001470
d _(C9-C10)	0.000031	A (C14-C15-C7)	1.57733	Cg (R2)	0.000428	НОМО	0.200661
d (C10-R4)	0.003721	A (C8-C9-R5)	0.39379	$Cg_{(C7)}$	42.59746	LUMO	0.042293
d _(C10-11)	1.013737	A (R5-C9-C10)	0.06685	Cg _(C8)	1.044128	GAP	0.010700
d (C11-R3)	0.000001	A (C9-C10-R4)	1.62277	Cg _(C9)	0.121755	A _{super}	0.109528
d _(C11-12)	2.717314	A (R4-C10-C11)	1.52877	$Cg_{(R5)}$	0.010965	Volume	0.579742
d _(C12-C7)	1.371160	A (C10-C11-R3)	0.11743	Cg _(C10)	0.276398	E _{hidra}	1.089314
d (_{C7 -15)}	0.781121	A (R3-C11-C12)	0.10956	Cg _(R4)	0.000033	Log P	0.205471
d _(C15-14)	0.506865	T _(C6-C1-C13-14)	0.00002	Cg _(C11)	2.764875	RM	0.835577

Tabela 4. Descritores físico-quimicos e seus respectivos pesos de fisher.

O maior valor apresentado para o peso de fisher foi de 42,5974, relacionado com a variável carga atômica do átomo 7 (C7). Analisando a tabela a maioria dos pesos ficaram abaixo de 0,5, logo adotou-se, como valores significativos, para desenvolver as correlações, os pesos maiores que 1.Utilizando este critério, do total de descritores (80) restaram apenas 24, sendo estes: d₇₋₈, d₈₋₉, d₁₀₋₁₁, d₁₁₋₁₂, d₁₂₋₇, d₁₄₋₁₃, A_{C1-C13-C14}, A_{O-C13-C14}, A_{C13-C14-C15}, A_{C14-C15-C7}, A_{C9-C10-R4}, A_{R4-C10-C11}, T_{C1-C13-C14-C15}, Cg c₁, Cg _{R1}, Cg₅, Cg₇, Cg₈, Cg₁₁, Cg₁₂, Cg₁₃, Lumo +2, Homo -1 e E_{Hidra}.

5.3.2 Orbitais de fronteira: Homo e Lumo

Utilizar os orbitais de fronteira molecular no estudo das propriedades de compostos é algo decorrente, devido os mesmos serem os responsáveis por complexos de transferências de carga. Os obitais de fronteira HOMO (orbital molecular ocupado de mais alta energia) e Lumo (orbital molecular desocupado de menor energia) são propridade eletrônicas que dizem respeito à reatividade dos compostos, onde o Homo, corresponde ao potencial de ionização (elétron doador) de uma substância e o Lumo à afinidade eletrônica (elétron-aceptor)(ARROIO; HONÓRIO; DA SILVA, 2010).

Além dos valores de energia do Homo e Lumo, foram retirados os descritores Lumo +1 e +2, que correspondem aos dois orbitais de fronteira acima do orbital molecular desocupado de maior energia e Homo +1 e +2, relativo aos dois orbitais de fronteira abaixo do orbital molecular ocupado de maior energia), e a diferença de energia entre o Homo e o Lumo (GAP), moléculas que possuem um alto valor de GAP são consideradas menos reativas enquanto que aquelas que possuem baixos valores de GAP são mais reativas ((ZHANG; MUSGRAVE, 2007).

Os dados relativos aos compostos estão ilustrados na Tabela 5.

Compostos	LUMO +1	LUMO +2	HOMO -1	HOMO -2	номо	LUMO	GAP
Mch-1	-0.0186	-0.00961	-0.23205	-0.24731	-0.22560	-0.07111	0.15449
Mch-2	-0.02173	-0.01213	-0.23833	-0.25737	-0.22783	-0.07213	0.15570
Mch-3	-0.06763	-0.0387	-0.26982	-0.27267	-0.23895	-0.10787	0.13108
Mch-4	-0.02391	-0.01812	-0.24497	-0.25917	-0.22928	-0.07763	0.15165
Mch-5	-0.02069	-0.02069	-0.23287	-0.23287	-0.22556	-0.07268	0.15288
Mch-6	-0.02078	-0.01265	-0.2327	-0.25611	-0.22563	0.07358	0.29921
Mch-7	-0.02231	-0.00315	-0.23507	-0.2513	-0.22806	0.0774	0.30546
Mch-8	-0.08016	-0.03967	-0.28252	-0.28843	-0.28252	-0.10612	0.17640
Mch-9	-0.07674	-0.03791	-0.27935	-0.29242	-0.24508	-0.10394	0.14114
Mch-10	-0.07582	-0.03736	-0.27859	-0.29097	-0.24354	-0.10339	0.14015
Mch-11	-0.0763	-0.02821	-0.27675	-0.27936	-0.24203	-0.10357	0.13846
Mch-12	-0.02508	-0.00863	-0.27215	-0.29919	-0.26689	0.05038	0.31727
Mch-13	-0.02688	-0.00984	-0.27392	-0.30120	-0.26848	-0.05149	0.21699

Tabela 5. Energias dos orbitais de fronteira e do GAP dos compostos estudados.

Mch-18 Mch-19	0.03682 -0.03931	-0.02389 -0.01486	-0.24352 -0.24474	-0.27614 -0.26722	-0.23694 -0.23623	-0.07808 -0.08128	0.15886 0.15495
Mch-20	-0.04745	-0.03409	-0.25056	-0.26920	-0.24045	-0.07437	0.16608
Mch-21	-0.05134	-0.03605	-0.25305	-0.27053	-0.24109	-0.07542	0.16567
Mch-22	-0.03801	-0.03104	-0.23924	-0.25335	-0.23746	-0.07234	0.16512
Mch-23	-0.04709	-0.03379	-0.25042	-0.26400	-0.23703	-0.07433	0.16270
Mch-24	-0.05095	-0.03581	-0.25281	-0.26464	-0.23759	-0.07528	0.16231
Mch-25	-0.04273	-0.03615	-0.24875	-0.26357	-0.2368	-0.07401	0.16279

Obs: continuação da Tabela 9.

Quando observa-se a **Tabela 5** nota-se que os valores de GAP estão entre 0,13108 (Mch-3) a 0,31725 (mch-12). Os compostos que possuem atividade sobre a enzima AChE são Mch-16 a Mch-25, e os valores de GAP para eles estão na faixa de 0,15495 à 0,16608, comparando com os compostos inativos (Mch-1 a Mch-15), oberva-se que quase todos estão fora desta limite, salvo os compostos Mch-1 e Mch-2.

Os maiores valores de GAP foram obtidos para os compostos Mch-6, Mch-7 e Mch-12, sendo todos estes inativos, logo, pode-se supor que à inatividade destes compostos se deve á uma certa estabilidade química, comprovado pelo alto valor de GAP (MATI, K.; LABONOV, V.S., 1996).

5.3.3 Ângulo de ligação (A)

Um importante fator que esta relacionado com efeitos estéricos, e consequentemente com a interação entre substrato e enzima é o ângulo de ligação, formado por três átomos. Estes ângulos estão ligados à geometria da molécula, que também é um fator de relevância quando se trata da interação do recptor com a amostra. Na **Tabela 6** estão selecionados os ângulos que apresentaram maior significancia para a atividade dos compostos, segundo o critério de fisher.
Compostos	A (C1-C13-C14)	A (C13-C14-C15)
Mch-1	119.28655	119.64169
Mch-2	119.30922	119.70646
Mch-3	119.371450	119.485340
Mch-4	118.818640	119.966140
Mch-5	118.822460	119.928140
Mch-6	118.876970	119.868100
Mch-7	118.842870	119.893110
Mch-8	121.071520	125.246060
Mch-9	121.062990	125.317580
Mch-10	121.084230	125.337750
Mch-11	121.052010	125.317300
Mch-12	118.271610	119.698600
Mch-13	118.666360	119.452160
Mch-14	118.602470	119.645170
Mch-15	118.355010	119.687410
Mch-16	122.55907	125.17159
Mch-17	122.55295	125.13218
Mch-18	122.59149	125.28568
Mch-19	122.56735	125.18462
Mch-20	121.00607	125.17108
Mch-21	121.01281	125.18555
Mch-22	121.03264	125.22208
Mch-23	121.03361	125.12419
Mch-24	121.01142	125.11923
Mch-25	121.02317	125.11296
Peso de fisher	2.616863	4.295115

Tabela 6. Ângulos de ligação dos compostos otimizados.

Os ângulos de ligação dos compostos ativos formados pelos átomos C13-C14-C15 e C1-C13-C14 estão na faixa de 125,11296 – 125,28568 e 121,00607 – 122,59149, respectivamente. Observa-se que a variação do ângulo formado pelos átomos C13-C14-C15 não excede 0,2º, justificando a maior significância atribuida pelo peso de fisher. Comparando os valores dos ângulos dos compostos ativos com os inativos nota-se que para os átomos C13-C14-C15 a maioria dos compostos inativos estão fora da faixa de ângulos

formados pelos mesmos átomos dos compostos ativos, sendo a unica exceção o composto Mch-8.

5.3.4 Avaliação citotóxica in vitro dos compostos sintetizados

As chalconas e iminas sintetizadas neste estudo estão apresentadas nas **Quadro 5 e Quadro 6**, respectivamente, e foram avaliadas citotóxicamente frente diferentes linhagens celulares, com o intuito de análisar seu perfil de inibição *in vitro*. Os compostos que possuiram uma taxa de inibição maior que 75 % em pelo menos duas linhagens tumorais testadas forma selecionados para avaliações subsequentes.



Quadro 5. Chalconas sintetizadas para avaliação citotóxica.

Quadro 6. Iminas sintetizadas para estudo citotóxico.



Apesar do grande número de estudos relacionados com a atividade citotóxica de chalconas, o mecanismo de ação destes compostos não foi totalmente descoberto, sendo que este trabalho irá se basear na hipótese envolvendo a adição de um nucleófilo bioorgânico, com a glutationa ao carbono β da porção α , β -insaturada envolvendo uma adição de Michael (SINGH; ANAND; KUMAR, 2014; WANG et al., 2009).

Ao fazermos uma análise da ação do carbono β como eletrófilo para a reação de Michael, temos que os aneis A e B da chalcona irão influênciar sua reatividade frente a grupos como tióis (glutationa), amino e hidróxi, sendo estes últimos presentes em aminoácidos, muito abundantes no meio intracelular, porém devido este eletrófilo possuir um caráter de base mole, irá possuir uma maior afinidade com os grupos tióis da glutationa (MAHAPATRA; BHARTI; ASATI, 2015).

Os compostos (Mch-1 a Mch-3) foram testatos em uma concentração de 5 µg/mL, utilizando o método de MTT nas seguintes células tumorais SF-295, HL-60 e HCT-116. Os resultados do ensaio estão listados na **Tabela 7**, onde estão expressos as porcentagens de inibição e o desvio padrão.

75

Amostras	SF-295	DP	HL-60	DP	HCT-116	DP
Mch-1	49,91	6,99	80,85	10,48	79,02	-
Mch-2	15,63	10,41	SA*	-	37,40	5,25
Mch-3	65,00	6,25	37,65	3,32	82,90	1,78
Mch-5	23,73	2,83	15,35	10,0	36,75	7,72
Mch-6	11,74	2,53	SA*	-	33,74	7,03
Mch-7	58,07	6,10	95,23	2,18	81,05	2,39
Mch-9	13,84	6,00	SA*	-	SA*	-
Mch-10	SA*	-	SA*	-	SA*	-
Mch-11	SA*	-	SA*	-	SA*	-
Mch-13	1,96	5,36	SA*	-	28,81	2,78
Mch-14	10,16	-	SA*	-	SA*	-

Tabela 7. Percentual de inibição (%) em dose única de 5 µm/ml e desvio padrão.

*SA = sem atividade

Ao se examinar os dados da **Tabela 7**, dentre as p- aminochalconas testadas (Mch-1 a Mch-3), apenas o composto Mch-1 possui taxa de inibição maior que 75% para duas linhagens de células tumorais. Cabe destacar que apesar do composto Mch-3 não ser considerado relevante para o estudo do Cl₅₀, este possui uma certa seletividade perante as linhagens testadas, pois sua inibição para a linhagem celular HCT-116 foi acima de 80%. Ao compararmos com o resultado obtido para o composto Mch-1 a atividade do composto Mch-3 também foi maior para a linhagem SF-295 sendo o único valor de inibição inferior entre estes compostos o percentual de inibição para a linhagem HL-60. Podemos análisar este fato em termos da sua estrutura eletrônicas (**Figura 25**).



Figura 25. Estruturas de ressonância para o composto Mch-3.

Grupos retiradores de elétrons que estão na posição para do anel aromático atuam como desativantes, diminuindo sua densidade eletrônica e, consequentemente, aumentam a elétrofiliciadade do carbono β do sistema enona, apesar da atividade deste composto ser menor em uma linhagem, mostrandando que existem outros fatores que governam a interação entre o substrato e o alvo biológico (MAHAPATRA; BHARTI; ASATI, 2015; WANG et al., 2009)

Observando as estruturas dos compostos testados, nota-se que em Mch-1 e Mch-2, o **anel B** da chalcona esta substituído por grupos metoxi nas posições 3,4 e 5 / 4 e 5, respectivamente, comparando os resultados em todas as linhagens testadas o composto Mch -1 foi mais ativo que o Mch-2, levando em consideração estes aspectos o padrão de substuição dos grupos metoxi no anel B proporciona uma atividade significativa para o composto e que quando este padrão é quebrado ocorre uma diminuição na atividade (SHENVI et al., 2013)

Os compostos Mch-5 a Mch-7 possuem o mesmo substituinte no **anel A** da chalcona, grupo amina na posição 2, e padrões de substituição distintos no **anel B**, com os seguintes substituintes: grupo etoxi na posição para (Mch-5), grupo metoxi na posição meta e para (Mch-6) e grupo metoxi nas posições meta e para (Mch-7). Nas linhagens testadas, notaa-se que o composto Mch-7 possui uma maior atividade frente todas as células tumorais, e que o padrão de

substituição no **anel B**, com grupos metoxi nas possições 3,4 5 torna-se importante para a atividade do composto.

Outros fatores podem ser relevantes quando comparamos as atividades dos compostos Mch-1 e Mch-3, que apresentam os mesmos substituintes no **anel B** da chalcona, se diferindo apenas na posição do grupo amino presente no anel A: posição para (Mch-1) e posição orto (Mch-3). A **Tabela 8** mostra alguns valores de ângulos diedrais retirados do estudo de modelagem molecular à respeito dos angulos $\theta_{1e} \theta_{2..}$

R_1 R_2 OMe				
Composto	R ₁	R ₂	Ângulo determin <u>métoc</u> θ ₁	de torsão nado pelo do AM1 θ ₂
Mch-1	NH ₂	н	5,910	1,6152

Tabela 8. Ângulos de torsão para os compostos Mch-1 e Mch-7.

Go et al (2005) analisaram algumas propriedades físico-químicas e estruturais que alteram a atividade de chalconas, mais especificamente da porção enona, responsável pela ligação à glutationa. Os substituintes na porção A do anel da chalcona podem alterar a planaridade do anel B, dependendo da posição em que se encontram, e como uma consequencia, diminuir a conjugação com o grupo carbonila.

Os compostos Mch-1 e Mch-3 possuem diferentes valores do ângulo de torsão $\theta_1 \ e \ \theta_2$ como mostrados na **Tabela 8** tendo como consequência diferentes valores de inibição frente as linhagens celulares testadas, onde notase que o composto Mch-3 possui ângulos de torsão bem distintos quando

comparados com o Mch-1 e melhores valores de inibição para as linhagens testadas. Dado os expostos acima, um elevado ângulo de torsão propícia uma menor conjugação do grupo amino com a carbonila, favorecendo a deslocalização dos elétrons da carbonila com o carbono β, diminuindo sua densidade eletrônica e aumentando sua reatividade como aceptor de Michael, como mostrado na **Figura 26 (**CAREY, 2007).



Figura 26. Ângulos de torsão para o composto Mch-7 e estruturas de ressonância.

Os compostos que apresentaram um percentual de inibição superior à 75 % em mais de duas linhagens celulares, foram submetidos ao estudo de dose letal (IC_{50}), sendo os resultados mostrados na **Tabela 9**.

	HCT-116	HL-60		
Composto	Inibição média (ug/mL)			
	Intervalo de confiança de 95%			
Mch-3	4,19	≥5		
	(3,03 – 5,81)	-		
Mch-15	2,21	2,08		
	(1,74 – 2,82)	(1,58 – 2,72)		
Doxorrubicina	0,12	0,02		
	(0,09-0,17)	(0,01-0,02)		

Tabela 9. Concectração inibitória média (IC50).

Pode ser observado que apesar dos composto possuirem taxa de inibição acima de 75% paras as duas linhagens celulares mostradas, se compararmos com o padrão utilizado, as taxas de inibição são ligeiramente altas, logo apesar de serem potencialmente ativos algumas mudanças em sua estrutura devem ser feitas para otimizar esta atividade. Ao comparar os valores do IC_{50} entre os compostos, novamente o Mch-15 é mais efetivo quando comparado com Mch-1, isto se deve aos argumentos citados anteriormente.

6. CONCLUSÃO

Os derivados de chalconas propostos para a realização deste trabalho foram sintetizadas com bons rendimentos, além disto, foi possível observar a formação de um produto secundário (imina), devido ao excesso de ácido no sistema reacional que possibilitou a catálise da chalcona correspondete, sendo a imina isolada, e encontrada quando utilizou-se os seguintes aldeídos: 4-etilbenzaldeído, 4-metilbenzaldeído, 4-metoxibenzaldeído e 4-etoxibenzaldeído.

Os compostos sintetizados foram submetidos à testes bilógicos, sendo eles: avalição anticolinesterásica e perfil citotóxico frente as linhagens tumorais (SF-295, HL-60 e HCT-116).

As chalconas e iminas não se mostraram ativas frente a enzima acetilcolinesterase, onde foi necessário a realização de estudos de modelagem molecular das estruturas propostas e, como um padrão, buscou-se na literatura compostos com certa semelhança e que posuiam atividade para esta enzima para uma possível correlação de descritores físicos e químicos, sendo que este estudo permitiu relacionar os seguintes parâmetros físicos e químicos, GAP e angulo de ligação. Apesar dos valores indicados pelos descritores serem muito distintos dos compostos sintetizados (inativos), um estudo mais detalhado é necessário para predizer o que torna as moleculas inativas.

O teste citotóxico para as linhagens descritas acima obtiveram um melhor resultado, sendo dois compostos ativos (Mch-3 e Mch-15) e para estes foi determinado o IC_{50} onde o menor valor encontrado foi para o composto Mch-15 (2,08 µg/mL) frente a linhagem celular HL-160.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

• Realizar o estudo de estrutura e reatividade dos compostos sintetizados e sintetizar novas estutras a partir dos dados obtidos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

2014 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's & Dementia**, v. 10, n. 2, p. e47–e92, mar. 2014.

ALMEIDA, V. DE et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quim Nova**, v. 28, n. 1, p. 118–29, 2005.

ARROIO, A.; HONÓRIO, K. M.; DA SILVA, A. B. Propriedades químicoquânticas empregadas em estudos das relações estrutura-atividade. **Quim. Nova**, v. 33, n. 3, p. 694–699, 2010.

BAG, S. et al. Design, synthesis and biological activity of multifunctional α , β -unsaturated carbonyl scaffolds for Alzheimer's disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 9, p. 2614–2618, Maio 2013.

BANDGAR, B. P. et al. Synthesis and biological evaluation of nitrogencontaining chalcones as possible anti-inflammatory and antioxidant agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 2, p. 730–733, 15 jan. 2010a.

BANDGAR, B. P. et al. Synthesis and biological evaluation of simple methoxylated chalcones as anticancer, anti-inflammatory and antioxidant agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 3, p. 1364–1370, 2010b.

BARBOSA, M. B. A. Ações de enfermagem para o controle do câncer: uma proposta de integração ensino-serviço. Rio de Janeiro (RJ): INCA, 2008.

BARBOSA, T. P. et al. Design, synthesis and antileishmanial in vitro activity of new series of chalcones-like compounds: A molecular hybridization approach. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 14, p. 4250–4256, 2011.

BARREIRO, E. J. et al. Molecular modeling: a tool for rational drug design in medicinal chemistry. **Química nova**, v. 20, n. 3, p. 300–310, 1997.

BOECK, P. et al. Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 5, p. 1538–1545, 1 mar. 2006.

CABRERA, M. et al. Synthetic chalcones, flavanones, and flavones as antitumoral agents: Biological evaluation and structure–activity relationships. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 10, p. 3356–3367, maio 2007.

CAREY, Francis et al. **Advanced Organic Chemistry**. part A e Part B. 5 ed. Spring Verlag, 2007.

DE VINCENZO, R. et al. In vitro evaluation of newly developed chalcone analogues in human cancer cells. **Cancer Chemotherapy And Pharmacology**, v. 46, n. 4, p. 305–312, 2000.

DIAS, K. S. T. et al. Aplicações Recentes da Abordagem de Fármacos Multialvo para o Tratamento da Doença de Alzheimer. **Revista Virtual de Química**, 2015.

DUTHEY, B. Background paper 6.11: Alzheimer disease and other dementias. **A Public Health Approach to Innovation**, p. 1–74, 2013.

EL-DESOUKI, R. A. K. M. New insights on Alzheimer's disease. **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, v. 2, n. 2, p. 57–66, jun. 2014.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88–95, 1961.

FUENTES, P.; SLACHEVSKY CH, A. Enfermedad de Alzheimer: actualización en terapia farmacológica. **Revista médica de Chile**, v. 133, n. 2, p. 224–230, 2005.

GO, M. L.; WU, X.; LIU, X. L. Chalcones: an update on cytotoxic and chemoprotective properties. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 4, p. 481–499, 2005.

HASAN, A. et al. Synthesis and inhibitory potential towards acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and lipoxygenase of some variably substituted chalcones. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, v. 20, n. 1, p. 41–47, fev. 2005.

JÚNIOR, W. R. D. L. ESTUDO DA RELAÇÃO ESTRUTURA ATIVIDADE DE CHALCONAS COM AÇÃO ANTITUMORAL. 2014.

KUMAR, R. et al. Reinvestigation of structure–activity relationship of methoxylated chalcones as antimalarials: Synthesis and evaluation of 2,4,5-trimethoxy substituted patterns as lead candidates derived from abundantly available natural β -asarone. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 11, p. 5292–5301, nov. 2010.

KUPCEWICZ, B. et al. Cytotoxic activity of substituted chalcones in terms of molecular electronic properties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 17, p. 4260–4265, 1 set. 2014.

LEMES, L. F. N. FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. [s.l.] Universidade de Brasília, 2013.

LIU, H. et al. Design, synthesis and pharmacological evaluation of chalcone derivatives as acetylcholinesterase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 3 out. 2014.

LUO, W. et al. Design, synthesis and evaluation of novel tacrinemultialkoxybenzene hybrids as dual inhibitors for cholinesterases and amyloid beta aggregation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 2, p. 763–770, jan. 2011a.

LUO, W. et al. Synthesis and evaluation of heterobivalent tacrine derivatives as potential multi-functional anti-Alzheimer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 6, p. 2609–2616, jun. 2011b.

MAHAPATRA, D. K.; BHARTI, S. K.; ASATI, V. Anti-cancer chalcones: Structural and molecular target perspectives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 98, p. 69–114, jun. 2015.

MAI, C. W. et al. Chalcones with electron-withdrawing and electron-donating substituents: Anticancer activity against TRAIL resistant cancer cells, structure– activity relationship analysis and regulation of apoptotic proteins. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 77, p. 378–387, 22 abr. 2014.

MOREIRA OSÓRIO, T. et al. Antibacterial activity of chalcones, hydrazones and oxadiazoles against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 1, p. 225–230, 1 jan. 2012.

MOTA, A. A. R. et al. Theoretical Photophysics (DFT) of Fluorescent Benzothiadiazole Probes. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 1, 2015.

MOURAD, M. A. E. et al. Design, synthesis and anticancer activity of nitric oxide donating/chalcone hybrids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 907–913, ago. 2012.

NIELSEN, S. F. et al. Antileishmanial Chalcones: Statistical Design, Synthesis, and Three-Dimensional Quantitative Structure–Activity Relationship Analysis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, n. 24, p. 4819–4832, 1 nov. 1998.

PEREIRA, A. M. Estudo ab-initio e DFT das nitrosaminas. João Pessoa-Paraíba, 2008.

PINTO, T.; LANCTÔT, K. L.; HERRMANN, N. Revisiting the cholinergic hypothesis of behavioral and psychological symptoms in dementia of the Alzheimer's type. **Ageing Research Reviews**, fev. 2011.

RHEE, I. K. et al. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of chromatography A**, v. 915, n. 1, p. 217–223, 2001.

ROCCA, P. et al. Donepezil in the treatment of Alzheimer's disease: long-term efficacy and safety. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 26, n. 2, p. 369–373, 2002.

SAMADI, A. et al. Cholinergic and neuroprotective drugs for the treatment of Alzheimer and neuronal vascular diseases. II. Synthesis, biological assessment, and molecular modelling of new tacrine analogues from highly substituted 2-aminopyridine-3-carbonitriles. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 122–133, jan. 2011.

SANT'ANNA, C. M. R. Glossário de termos usados no planejamento de fármacos (recomendações da IUPAC para 1997). **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 505–512, 2002.

SEBTI, S. et al. Calcined sodium nitrate/natural phosphate: an extremely active catalyst for the easy synthesis of chalcones in heterogeneous media. **Tetrahedron Letters**, v. 42, n. 45, p. 7953–7955, 5 nov. 2001.

SEIDL, C. Pesquisa de substâncias naturais inibidoras da acetilcolinesterase. 2010.

SERENIKI, A.; VITAL, M. A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. **Rev Psiquiatr Rio Gd Sul**, v. 30, n. 1 supl 0, 2008.

SHENVI, S. et al. Synthesis, anticancer and antioxidant activities of 2,4,5-trimethoxy chalcones and analogues from asaronaldehyde: Structure–activity relationship. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, p. 435–442, abr. 2013.

SILVA, T. et al. Alzheimer's disease, enzyme targets and drug discovery struggles: From natural products to drug prototypes. **Ageing Research Reviews**, v. 15, p. 116–145, maio 2014.

SINGH, M. et al. Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: From nerve toxins to neuroprotection. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 70, p. 165–188, dez. 2013.

SINGH, P.; ANAND, A.; KUMAR, V. Recent developments in biological activities of chalcones: A mini review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 85, p. 758–777, out. 2014.

SZYMAŃSKI, P.; MARKOWICZ, M.; MIKICIUK-OLASIK, E. Synthesis and biological activity of derivatives of tetrahydroacridine as acetylcholinesterase inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, v. 39, n. 4, p. 138–142, ago. 2011.

THAKRAR, S.; SHAH, A. A rapid and highly efficient microwave synthesis of highly functionalized chalcones derivatives. v. 4, n. 1, p. 394–402, 2012.

VOGEL, S. et al. Synthesis, cytotoxicity, anti-oxidative and anti-inflammatory activity of chalcones and influence of A-ring modifications on the pharmacological effect. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 6, p. 2206–2213, jun. 2010.

WANG, J. et al. Chalcone Derivatives Inhibit Glutathione S-Transferase P1-1 Activity: Insights into the Interaction Mode of α , β -Unsaturated Carbonyl Compounds. Chemical Biology & Drug Design, v. 73, n. 5, p. 511–514, maio 2009.

WU, J. et al. Evaluation and Discovery of Novel Synthetic Chalcone Derivatives as Anti-Inflammatory Agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 23, p. 8110–8123, 8 dez. 2011.

ZHANG, G.; MUSGRAVE, C. B. Comparison of DFT Methods for Molecular Orbital Eigenvalue Calculations. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 111, n. 8, p. 1554–1561, mar. 2007.

Anexo



Figura A - 1. Espectro de RMN ¹H do composto Mch – 1, evidenciando a porção α , β – insaturada da chalcona.



Figura A 2. Espectro de RMN 13 C do composto Mch – 1.





Figura A 3. Espectro de infravermelho do composto Mch – 1.



Figura A 4. Espectro de RMN de ¹H do composto Mch -2.



Figura A 5. Espansão do espectro de RMN ¹H Mch – 2, evidenciando o sistema α , β -insaturado.



Figura A 6. Espectro de I.V do composto Mch – 2.



Figura A 7. Espectro de RMN ¹H do composto Mch – 3, evidenciando a porção α , β -insaturado.



Figura A 8. Espectro de RMN de 13 C do composto Mch – 3.



Figura A 9. Espectro de I.V do composto Mch - 3.



Figura A 10. Espectro do composto Mch – 4 destacando os hidrogénios α , β – insaturados.



Figura A 11. Espectro de I.V do composto Mch – 4.



Figura A 12. Espectro de RMN ¹H do composto Mch – 5, evidenciando o sistema α , β – insaturada.



Figura A 13. Espectro de RMN 13 C do composto Mch – 5.



Figura A 14. Espectro de I.V do composto Mch – 5.



Figura A 15. Espectro de RMN ¹H do composto Mch – 14 destacando a formação da ligação α , β – insaturada.



Figura A 16. Espectro de RMN 13 C do composto Mch – 6.



Figura A 17. Espectro de I.V do composto Mch – 6.



Figura A 18. Espectro de RMN ¹H do composto Mch – 7 evidenciando a porção α,β – insaturada.





Figura A 20. Espectro de infravermelho do composto Mch - 7.


Figura A 21. Espector de RMN ¹H do composto Mch – 8 evidenciando a porção α,β – insaturada da chalcona.



Figura A 22. Espectro de RMN 13 C do composto Mch – 8.



Figura A 23. Espectro de infravermelho do composto Mch - 8.



Figura A 24. Espectro de RMN ¹H do composto Mch – 9 destacando os hidrogênios α , β – insaturados.



Figura A 25. Espectro de RMN 13 C do composto Mch – 9.

113



Figura A 26. Espectro de infravermelho do composto Mch – 9.



Figura A 27. Espectro de RMN ¹H do composto Mch – 9 destacando os hidrogênios α,β – insaturados



Figura A 28. Espectro de RMN 13 C do composto Mch – 10.



Figura A 29. Espectro de infravermelho do composto Mch – 10.



Figura A 30. Espectro de RMN ¹H do composto Mch – 11 evidenciando os hidrogênios α , β – insaturados.





Figura A 32. Espectro de infravermelho do composto Mch – 11.



Figura A 33. Espectro de RMN ¹H do composto Mch – 12 evidenciando os hidrogênios α , β – insaturados.





Figura A 35. Espectro de RMN ¹H do compostos Mch – 13, destacando-se os hidrogênios α , β -insaturados.



Figura A 36. Espectro de RMN de ¹³C do composto Mch-13.



Figura A 37. Espectro de infravermelho do composto Mch – 13.



Figura A 38. Espectro de RMN ¹H do composto Mch – 14.



Figura A 39. Expansão da do espectro de RMN ¹H do composto Mch – 14.



Figura A 40. Especto de RMN 13 C do composto Mch – 14.



Figura A 41. Espectro de I.V do composto Mch – 14.



Figura A 42. Espectro de RMN ¹H do compostos Mch – 13, destacando-se os hidrogênios α , β -insaturados.



Figura A 43. Espectro de RMN 13 C do composto Mch – 15.



Figura A 44. Espectro de infravermelho do composto Mch – 15.