



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

TAMYRYS FERNANDES VILAR BENTO

**SÍNTESE DA 2',4,4'-TRIMETÓXICHALCONA E ESTUDO CITOTÓXICO *IN VITRO*
EM CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS**

JOÃO PESSOA – PB

2019

TAMYRYS FERNANDES VILAR BENTO

SÍNTESE DA 2',4,4'-TRIMETÓXICALCONA E ESTUDO CITOTÓXICO *IN VITRO* EM
CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biotecnologia do Centro de Biotecnologia, da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Luís Cezar Rodrigues
Co-orientador: Ms. Luiz André de Araújo Silva

JOÃO PESSOA - PB

2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

B478s Bento, Tamyrys Fernandes Vilar.
SÍNTESE DA 2',4,4'-TRIMETÓXICALCONA E ESTUDO
CITOTÓXICO IN VITRO EM CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS /
Tamyrys Fernandes Vilar Bento. - João Pessoa, 2019.
41 f.

Orientação: Luis Cezar Rodrigues Rodrigues.
Coorientação: Luiz André de Araújo Silva Silva.
TCC (Especialização) - UFPB/CBiotec.

1. Chalcona. 2. Citotoxicidade. 3. Síntese Orgânica. 4.
Condensação Aldólica. I. Rodrigues, Luis Cezar
Rodrigues. II. Silva, Luiz André de Araújo Silva. III.
Título.

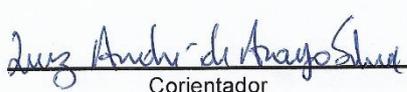
UFPB/BC

ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

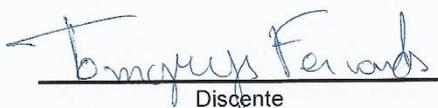
Aos vinte dias do mês de setembro de 2019, às 14:00h, em sessão pública na sala 01 do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) deste Campus Universitário, na presença da Banca Examinadora presidida pelo Professor Dr. Luis César Rodrigues (DB/CBIOTEC/UFPB) e composta pelos avaliadores: M.e Luiz André de Araújo Silva (PPgDITM /UFPB), orientador; 1. Prof. Dr. Kristerson Reinaldo de Luna Freire (DBCM/CBIOTEC/UFPB), 2. M.e Flávio Valadares Pereira Borges (PgPNSB/UFPB); a discente Tamyras Fernandes Vilar Bento, matrícula 11423575, apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: "**SÍNTESE DA 2',4,4'-TRIMETOXICALCONA E ESTUDO CITOTÓXICO IN VITRO EM CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS**", como requisito curricular indispensável para a integralização do Curso de Graduação em Biotecnologia. Após reunião em sessão reservada, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela APROVAÇÃO do referido trabalho, divulgando o resultado formalmente ao discente e demais presentes e eu, Luis César Rodrigues, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais avaliadores e pela discente.


Presidente da Banca Examinadora


Avaliador 1


Orientador


Avaliador 2


Discente

João Pessoa/PB, 20 de setembro de 2019.

Dedico este trabalho à minha futura cachorra,
muito provavelmente uma Dobermann Pinscher.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos meus bons professores, em especial meu orientador professor Luís Cezar Rodrigues, homem cuja criatividade e cujo espírito libertário eu admiro.

A Sâmia Sousa Duarte, do laboratório de OncoFarmacologia, pela prestatividade e trabalho em equipe.

Ao meu co-orientador, Luiz André, pelo bom humor, simplicidade e auxílio neste trabalho.

A minha vó, Lizeth, uma mulher de fé e compaixão ao próximo.

A minha irmã, Tawany, uma das poucas amigas que tenho.

Ao meu padastro, Fernando, pelo cuidado e proteção.

A Deus, pelo dom da vida.

“I was waiting for something extraordinary to happen but as the years wasted on nothing ever did unless I caused it”

(Charles Bukowski)

RESUMO

As chalconas são compostos naturais, cetonas aromáticas α , β -insaturadas em que a carbonila e a porção olefínica estão ligadas à grupamentos aromáticos, são uma classe de compostos precursores da biossíntese de flavonoides nas plantas e também podem ser sintetizadas em laboratório. São o núcleo central de diversas atividades farmacológicas importantes relatadas na literatura, atuam como antibacterianos, anti-helmínticos, amebicidas, anti-úlceras, antivirais, inseticidas, antiprotozoários, anticâncer, citotóxicos imunossupressores e antioxidantes. Por possuírem esse amplo espectro de atividades biológicas com importantes propriedades, o objetivo deste trabalho é a síntese da 2',4,4'-trimetoxichalcona e seu teste de citotoxicidade em quatro linhagens de células tumorais humanas: HL-60 (leucemia promielocítica aguda), HCT-116 (carcinoma colorretal humano), MCF-7 (adenocarcinoma da mama humano) e K562 (leucemia mielóide crônica) e em células normais L929 (fibroblasto murino). O estudo das chalconas tornou-se um objeto de interesse contínuo nas universidades e na indústria porque apesar de alterações em sua estrutura oferecerem um alto grau de diversidade que se mostra útil para o desenvolvimento de novos agentes medicinais, muito do potencial farmacológico das chalconas ainda não é utilizado. A síntese da 2',4,4'-trimetoxichalcona foi bem-sucedida e no ensaio de viabilidade celular por redução de Tetrazólio (MTT), a linhagem HL-60 destacou-se apresentando potencial inibitório em 84,5% com uma IC_{50} de aproximadamente 20,84 μ M.

Palavras-chave: Chalcona, Síntese Orgânica, Citotoxicidade, Condensação Aldólica.

ABSTRACT

Chalcones are a class of natural compounds, α , β -unsaturated aromatic wherein its carbonyl and olefinic moiety are attached to its aromatic groups, they are a class of precursor compounds of flavonoids biosynthesis in plants and can also be synthesized in the laboratory. They are the central nucleus of several important pharmacological activities reported in the literature, acting as antibacterial, anthelmintic, amoebicides, anti-ulcers, antivirals, insecticides, antiprotozoans, anticancer, immunosuppressive cytotoxic and antioxidants. Due to those important properties, the purpose of this work is the organic synthesis of 2',4,4'-trimethoxychalcone and its cytotoxicity test against four human tumor cell lines: HL-60 (human promyelocytic leukemia), HCT-116 (human colorectal carcinoma), MCF-7 (human breast adenocarcinoma) and K562 (chronic myeloid leukemia) and also evaluated in normal cells L929 (murine fibroblast). The study of chalcones has become an object of continuing interest in universities and industry because although changes in their structure offer a high degree of diversity that is useful for the development of new medicinal agents, much of the pharmacological potential of chalcones has not yet been covered and used. The synthesis of 2',4,4'-trimethoxychalcone was successful and in the viability cell assay (MTT assay), the HL-60 strain was found to have an inhibitory potential of 84.5% and an IC_{50} of approximately 20.84 μ M.

Key words: Chalcone, Organic Synthesis, Cytotoxicity, Aldol Condensation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esqueleto de uma chalcona em cores.....	16
Figura 2 – Estrutura geral de uma chalcona.....	17
Figura 3 – Esquema geral da condensação aldólica.....	18
Figura 4 – Mecanismo de condensação aldólica na reação da síntese da 2', 4, 4'-trimetoxicchalcona.....	19
Figura 5 - Rota sintética para reação da síntese da 2', 4, 4'-trimetoxicchalcona	21
Figura 6 – 2',4,4'-trimetoxicchalcona.....	21
Figura 7 – Esquema da síntese do 1,3-dimetoxibenzeno (composto 1).....	22
Figura 8 – Esquema da síntese da 2,4-dimetoxiacetofenona (composto 2).....	23
Figura 9 – Esquema da síntese da 2', 4, 4'-trimetoxicchalcona (composto 3).....	24
Figura 10 – Reação de redução do MTT.....	25
Figura 11 - Espectro completo de RMN de ^1H da 2,4-dimetoxiacetofenona (solvente CDCl_3).....	28
Figura 12 - Espectro completo de RMN de ^{13}C da 2,4-dimetoxiacetofenona (solvente CDCl_3).....	29
Figura 13 - Espectro completo de RMN de ^1H da 2',4,4'-trimetoxicchalcona (solvente CDCl_3).....	31
Figura 14 - Espectro completo de RMN de ^{13}C da 2',4,4'-trimetoxicchalcona (solvente CDCl_3).....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeito do composto 3 a substância ABK na viabilidade das células MCF-7, HL-60, K562, HCT-116 (tumorais) e L929 (não tumoral), após 72 h de tratamento.....	33
Tabela 2: Determinação da CI_{50} da substância ABK em células tumorais (HL-60 e MCF-7), após 72 h de tratamento.....	36

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Efeito do composto 3 na viabilidade de células MCF-7	34
Gráfico 2 – Efeito do composto 3 na viabilidade de células HL-60.....	35
Gráfico 3 – Efeito do composto 3 (50 μ M) na viabilidade de células HL-60.....	37
Gráfico 4 – Efeito do composto 3 (50 μ M) na viabilidade de células K562.....	37
Gráfico 5 – Efeito do composto 3 (50 μ M) na viabilidade de HCT-116.....	38
Gráfico 6 – Efeito do composto 3 (50 μ M) na viabilidade de MCF-7.....	38
Gráfico 7 – Efeito do composto 3 (50 μ M) na viabilidade de L929.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS

CCDA – Cromatografia Em Camada Delgada Analítica

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNP – 2,4-dinitrofenilhidrazina

HCT-116 – linhagem de células de carcinoma colorretal humano

HL-60 – linhagem de células de leucemia promielocítica aguda

IC₅₀ - metade da concentração inibitória máxima

K562 – linhagem de células de leucemia mielóide crônica

L929 – linhagem de células de fibroblasto murinho

MCF-7 – linhagem de células de adenocarcinoma mamário humano

MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

Rf – Fator de Retenção

RMN – Ressonância magnética nuclear

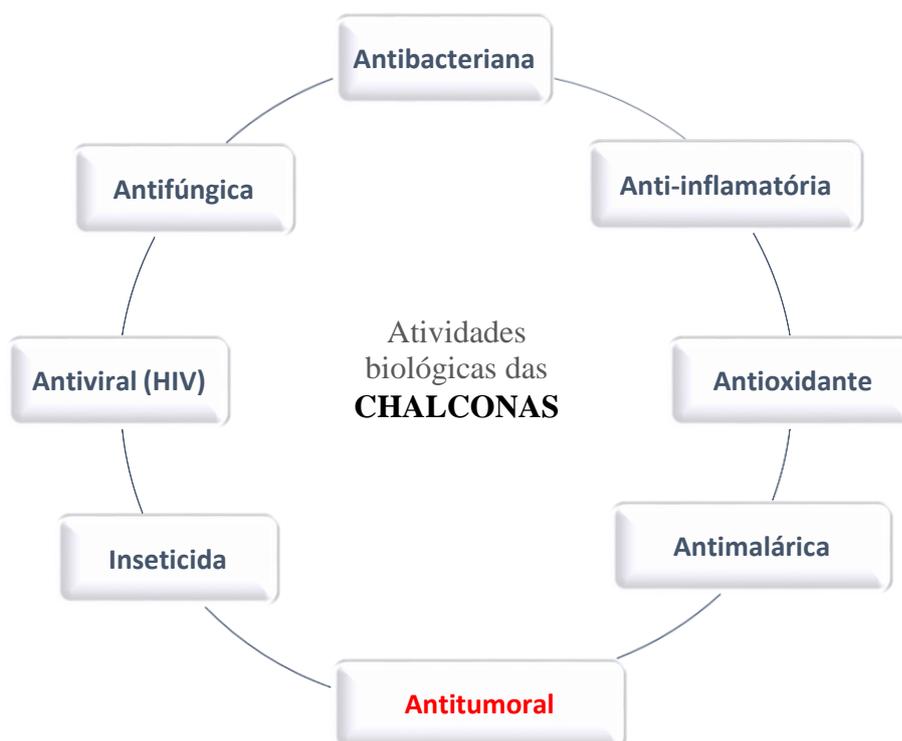
UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1 CHALCONAS	17
2.1.1 Atividades biológicas das chalconas	17
2.1.2 Síntese de fármacos	18
2.1.3 Síntese das chalconas.....	18
2.2 TOXICIDADE	20
3. OBJETIVOS	21
3.1 OBJETIVO GERAL	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 MATERIAIS	22
4.2 SÍNTESE	22
4.2.1 Preparação de 1,3-dimetoxibenzeno	22
4.2.2 Preparação de acetofenona	23
4.2.3 Preparação de chalcona.....	24
4.3 ENSAIO CITOTÓXICO.....	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1 DADOS ESPECTRAIS.....	27
5.1.1 Acetofenona	27
5.1.2 Chalcona	30
5.2 ATIVIDADE CITOTÓXICA	33
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
REFERÊNCIA	43
GLOSSÁRIO	43

1. INTRODUÇÃO

Chalconas e derivados de chalconas têm um grande número de diferentes atividades biológicas, que são altamente apreciadas em muitas áreas. Elas são bioativos contra praticamente todos os eucariotos e alguns procariontes, e suas moléculas (ZHOU E XING, 2015). Apesar de os mecanismos de ação no que diz respeito aos alvos celulares diretos e aos modos de interação com os alvos não terem sido rigorosamente caracterizados, chalconas naturais ou sintéticas com diferentes substituintes revelam uma variedade de atividades biológicas que beneficiam a saúde humana. Sendo assim, as chalconas podem ser candidatas a agentes terapêuticos neste contexto. Neste contexto, numerosos estudos foram realizados sobre suas atividades farmacológicas, tanto de chalconas naturais como das sintéticas, são elas: anti-inflamatório, antioxidante, anti-inflamatório infeccioso (como antileishmanial e antimalárico e antituberculose), a antiviral e, acima de tudo, atividades antitumorais (SINGH et al.,2014), no que consiste este trabalho.



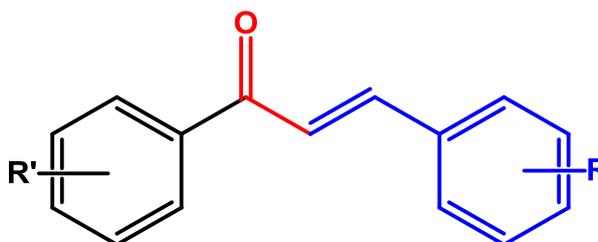
A experiência em estudos de Química Orgânica sintética com purificação e caracterização tem objetivo desenvolver moléculas que possam ser usadas no processo de validação de potenciais alvos terapêuticos para doenças humanas, fazendo um link com a Química

Medicinal. Os avanços obtidos através dessas parcerias são sensíveis e de alto impacto para as sociedades mundiais.

Devido à grande demanda por novos compostos antitumorais, antimicrobianos e anti-inflamatórios (NEWMAN 2016) e pelas importantes atividades biológicas das chalconas relatadas na literatura (DÍAZ-TIELAS 2016) e sua atividade contra uma variedade de linhas de células tumorais, este trabalho enfoca a preparação de 2', 4,4'-trimetoxicchalcona. Segundo Sun (2016), a maioria das patologias relacionadas ao câncer são resistentes a medicamentos ou desenvolvem resistência durante o tratamento.

O esqueleto de uma chalcona como mostrado na figura abaixo em cores, obtém-se de a partir de uma reação entre uma cetona aromática (em preto) e uma acetofenona (em azul).

Figura 1 – Esqueleto de uma chalcona em cores



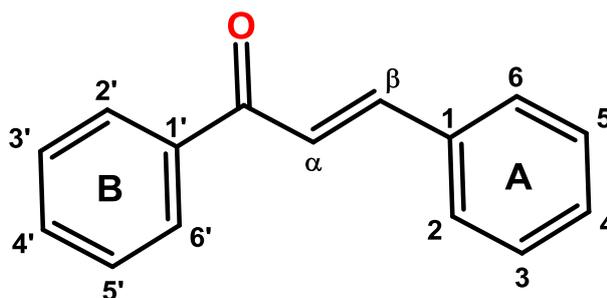
Fonte: Autor, 2019.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CHALCONAS

As chalconas são cetonas α , β -insaturadas em que a carbonila e a porção olefínica estão ligadas à grupamentos aromáticos (WALTER et al., 2000) que pertencem a uma classe de compostos da família dos flavonoides, logo, são metabólitos secundários extraídos como polifenóis de vegetais. A ocorrência natural das chalconas ocorre na forma da planta garantir pigmentos das pétalas e sua ação alelopática, ajudando no processo de polinização e atuação contra patógenos, sendo também encontradas no cerne, folhas, frutos e raízes (NI; MENG; SIKORSKI, 2005).

Figura 2 – Estrutura geral de uma chalcona



Fonte: Autor, 2019.

2.1.1 Atividades biológicas das chalconas

Chalconas possuem uma vasta gama de derivados estudados, suas estruturas tem um apelo medicinal considerável, apresentam atividades biológicas relevantes. Como exemplo de atividade antibacteriana e atividade antifúngica há trabalhos reportados de síntese de algumas chalconas contendo a porção indol, chalconas substituídas heterocíclicas introduzidos para o tratamento do câncer de mama, distúrbios de menopausa e osteoporose, chalconas mostrando atividade inseticida também e síntese de hidroxichalconas com substituição de flúor mostraram considerável atividade contra o imuno-vírus humano (HIV) (YERRAGUNTA et al., 2013).

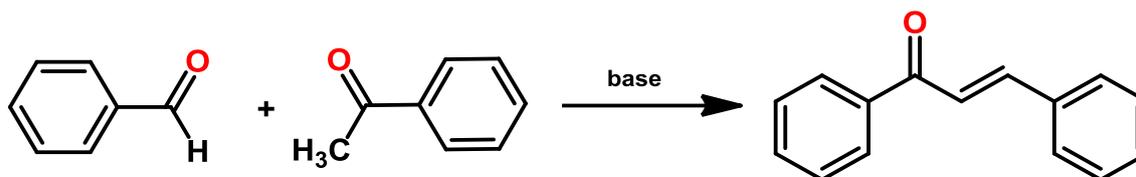
2.1.2 Síntese de fármacos

No marco histórico no processo de desenvolvimento da indústria farmacêutica mundial temos a descoberta da salicilina (analgésico e antitérmico) em 1829, a partir da planta *Salix alba*. Dez anos depois, em 1839, através de modificações estruturais, a salicilina gerou o ácido salicílico, que foi novamente modificado e, em 1897, obteve-se o ácido acetilsalicílico (AAS), princípio ativo da Aspirina®, um dos fármacos mais vendidos no mundo (VOLTOLINI, 2010). O AAS foi o pioneiro dos fármacos sintéticos. A síntese de fármacos é um importante capítulo da química orgânica, permite a construção de molécula, em seus diversos níveis de complexidade garantindo um maior grau de pureza, bem como a diminuição de efeitos colaterais, é também ecologicamente e economicamente viável e apresenta facilidade relativa de obtenção perante aos produtos naturais.

2.1.3 Síntese das chalconas

Em questão de síntese, a obtenção de tais compostos se mostra economicamente viável, uma vez que não são necessárias condições experimentais drásticas (elevadas temperaturas, excesso de reagentes e longos períodos reacionais), tampouco utilização de catalisadores caros (MELO, 2015). Várias metodologias são propostas para a síntese das chalconas, entretanto, a mais simples e comum ocorre por meio da condensação aldólica. Consiste na reação entre uma acetofenona e uma cetona aromática, utiliza-se como meio básico uma solução alcoólica de hidróxido de sódio. É uma reação razoavelmente citada na literatura como método para obtenção de chalconas (CALVINO et al., 2006; CHENG et al., 2008).

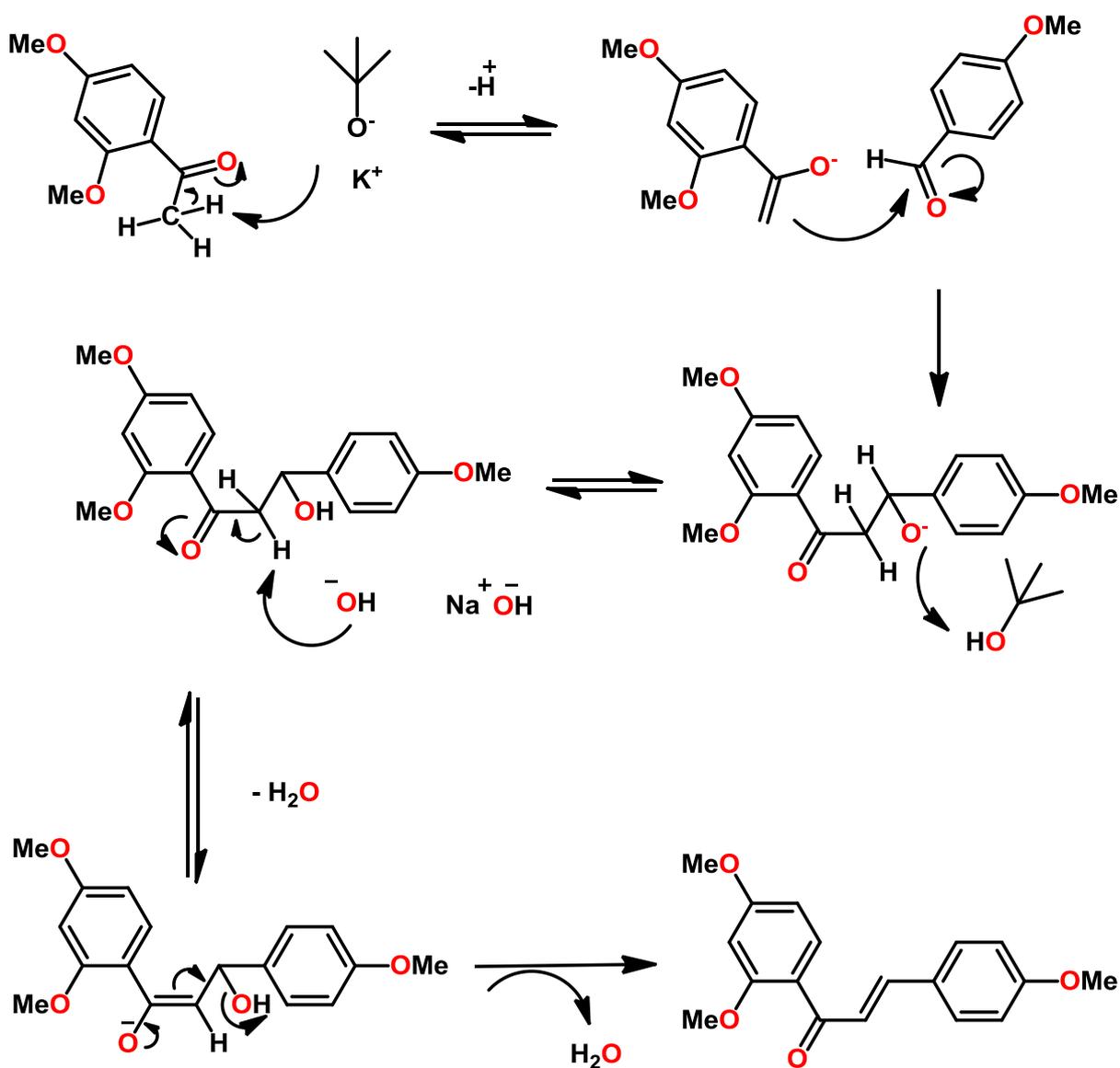
Figura 3 – Esquema geral da condensação aldólica



Fonte: Autor, 2019.

Tem-se o ataque da base à cetona formando o enolato. Este nucleófilo por sua vez ataca a carbonila do aldeído. A base presente no meio retira o hidrogênio ácido formando o composto insaturado.

Figura 4– Mecanismo de condensação aldólica na reação da síntese da 2', 4, 4'-trimetoxicchalcona



Fonte: Autor, 2019.

Cetonas e aldeídos são eletrófilos naturais mas na presença de uma base forte se tornam nucleófilos e neste caso o carbono alfa desprotonado da cetona ataca a carbonila do aldeído que sofre redução e depois desidratação, condensando as moléculas (YURKANIS, 2006)

2.2 TOXICIDADE

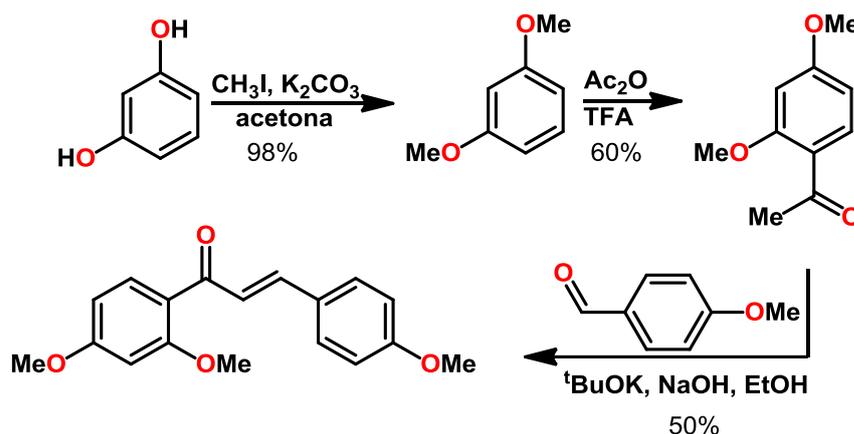
O câncer ocorre quando as células do corpo humano frequentemente se multiplicam com a incapacidade de serem controladas e, assim, formam tumores com potencial de metástase (NALL, 2018). Os tratamentos atuais lançam mão de quimioterapia, radioterapia e medicamentos agressivos. Tratamentos como quimioterapia podem causar muita dor aos pacientes e enfraquecer o sistema imunológico, portanto, existe hoje um foco no uso de tratamentos terapêuticos anticâncer alternativos e seus desenvolvimentos nas universidades. As plantas medicinais de potencial extrativo foram usadas ao longo dos anos na Medicina por suas propriedades naturais de cura (GREENWELL 2015) e com isto os compostos característicos do reino vegetal também foram estudados por suas propriedades para inibir o crescimento e iniciar a apoptose de células cancerígenas. As chalconas são metabólitos secundários que podem ser considerados como possíveis fontes alternativas para tratamentos neste contexto (MARTEL-FRACHET 2015).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL **Erro! Indicador não definido.**

- Sintetizar chalcona derivada do resorcinol e avaliar suas atividades de citotoxicidade.

Figura 5 - Rota sintética para reação da síntese da 2', 4, 4'-trimetoxicchalcona

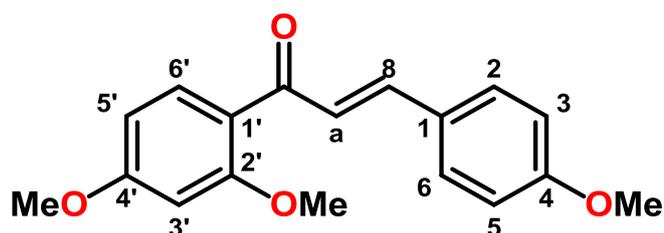


Fonte: Autor, 2019.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar a 2',4,4'-trimetoxichalcona.

Figura 6 – 2',4,4'-trimetoxichalcona



Fonte: Autor, 2019.

- Testar a citotoxicidade das substâncias *in vitro* através do ensaio de MTT em células normais e tumorais, confirmando o potencial inibitório das chalconas frente à HL-60 (leucemia promielocítica aguda), HCT-116 (carcinoma colorretal humano), MCF-7 (adenocarcinoma da mama humano) e K562 (leucemia mielóide crônica).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Para determinação do fator de retenção (Rf) o produto foi avaliado por CCDA em placas de sílica em gel 60 da Sigma-Aldrich com eluente 2:8 de AcOEt/hexano. O resorcinol foi adquirido da Riedel-de Haën (Alemanha), o carbonato de potássio e o iodeto de metila foram obtidos da Sigma-Aldrich (Estados Unidos) e solvente orgânico acetona da Tedia (Estados Unidos). O agitador magnético utilizado foi obtido da Fisatom modelo 752A e a lâmpada ultravioleta da marca OSRAM PURITEC (HNS 6W G5) de comprimento de onda de 254 nm. A estrutura química foi desenhada no software ChemDraw Ultra 12.0 versão teste (CambridgeSoft Corporation).

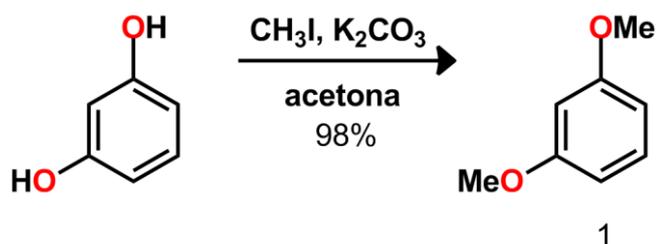
O composto 2 foi identificado por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), registrado em espectrômetros VARIAN operando sob frequência de 500 MHz para RMN de ^1H e 125 MHz para RMN de ^{13}C sendo as amostras sido dissolvidas em CDCl_3 .

O revelador DNP (2,4-dinitrofenilhidrazina) utilizado para identificar aldeídos e cetonas, foi preparado de acordo com instruções de Wagner e Bladt, 2001. Ao mergulhar a placa na solução reveladora, observa-se pontos laranjas em fundo branco para revelação positiva. O composto 2 foi identificado por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), registrado em espectrômetros BRUKER operando sob frequência de 400 MHz para RMN de ^1H e 101 MHz para RMN de ^{13}C sendo as amostras sido dissolvidas em CDCl_3 .

4.2 SÍNTESE

4.2.1 Preparação de 1,3-dimetoxibenzeno

Figura 7 – Esquema da síntese do 1,3-dimetoxibenzeno (composto 1)

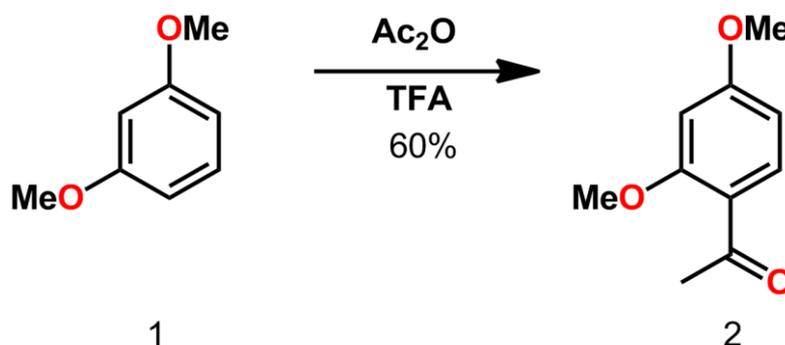


Fonte: Autor, 2019.

A uma solução agitada de 1,3-diidroxibenzeno (resorcinol) (10g, 90mmol) e acetona (100mL) em um balão de fundo plano de 500mL em banho de gelo, foram adicionados carbonato de potássio (K_2CO_3) (31g, 220mmol) e iodeto de metila (CH_3I) (13mL, 200mmol) gota a gota por um período de 10min. Após adição completa, a solução foi agitada overnight à temperatura ambiente. A reação foi monitorada por cromatografia em camada fina (CCDA). Após terminada a reação a acetona foi evaporada sob pressão reduzida (rotaevaporador). O produto bruto foi diluído com água destilada e extraído duas vezes com clorofórmio. Os extratos da fase orgânica foram secos com sulfato de sódio (Na_2SO_4), este retirado com filtração simples com funil e filtro de papel, e concentrar no rotaevaporador. O 1,3-dimetoxibenzeno (composto 1) foi obtido com 98% de rendimento. O procedimento é uma adaptação baseada no trabalho de Gudipudi (2014).

4.2.2 Preparação de acetofenona

Figura 8 – Esquema da síntese da 2,4-dimetoxiacetofenona (composto 2)



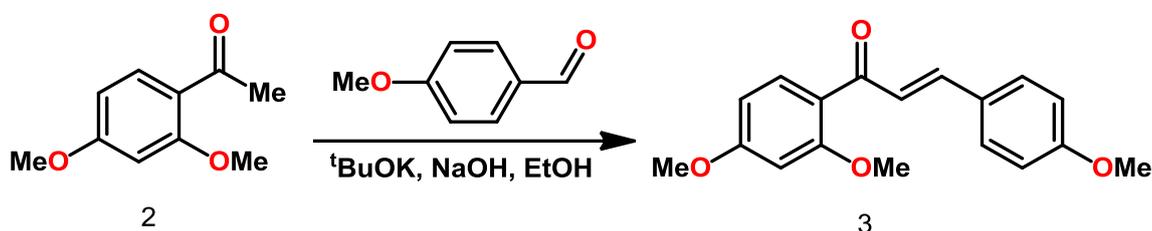
Fonte: Autor, 2019.

O 1,3-dimetoxibenzeno (5 g, 36 mmol), anidrido acético (7 mL, 102 mmol) e ácido trifluoroacético (TFA) (37 mL) foram misturados em um balão, em agitador magnético à temperatura ambiente. Após 1,5 horas, uma solução aquosa de bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) a 10% (50 mL) foi adicionada e agitada. A CCDA foi realizada (hexano / acetato de etila 9:1), mostrando um produto mais polar (R_f : 0,5) uma vez comparado ao 1,3-dimetoxibenzeno (R_f : 0,6). A 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNP) revelou grupos carbonila na acetofenona. O

produto bruto foi diluído com água e extraído duas vezes com AcOEt (50 mL). A fase orgânica foi seca (Na_2SO_4), filtrada, e concentrada no rotaevaporador, o produto foi purificado por cromatografia em coluna usando 100% hexano como eluente (GUANGCHANG & XU, 2018). O produto obtido foi um líquido cor marrom, rendimento de 4g (60%). Nomenclatura IUPAC: 1-(2,4-dimetóxfenil)etanona.

4.2.3 Preparação de chalcona

Figura 9 – Esquema da síntese da 2', 4, 4'-trimetoxicchalcona (composto 3)



Fonte: Autor, 2019.

Em um balão de fundo redondo de 50 mL foi preparada uma solução de acetofenona (1 g, 5 mmol) em etanol (30 mL), foi adicionado p-anisaldeído (755 mg, 5 mmol), terc-butoxido de potássio (622 mg, 5 mmol) e NaOH em proporção catalítica. A solução foi agitada durante uma semana, o produto bruto foi diluído com água e extraído duas vezes com acetato de etilo (50 mL). A fase orgânica foi seca (Na_2SO_4) filtrada e concentrada, a 2', 4, 4'-trimetoxicchalcona (composto 3), foi purificada por cromatografia em coluna com sistema de eluição isocrático de AcOEt/hexano 1:9. O produto obtido foi um sólido amarelo de rendimento de 0,82g (50%), ponto de fusão de 95°C , R_f de 0,5 (em eluente de 2:8 de AcOEt/Hexano). Nomenclatura IUPAC: 2-propen-1-ona, 1-(2,4-dimetóxfenil)-3-(4-metóxfenil). O composto 3 também foi encaminhado para análise por RMN.

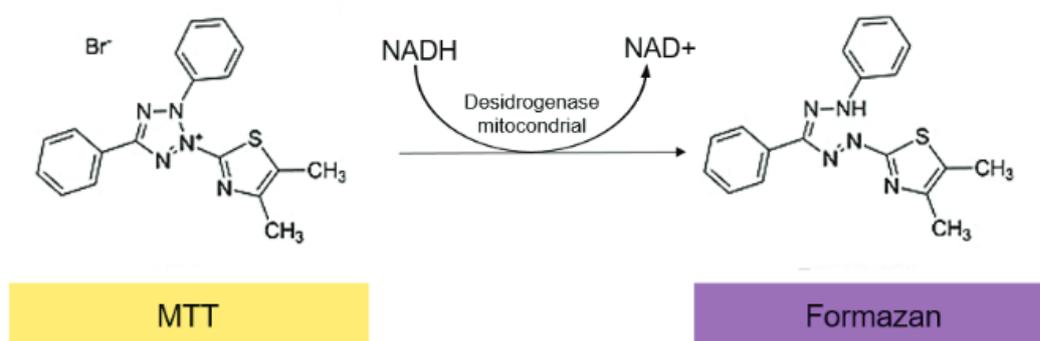
4.3 ENSAIO CITOTÓXICO

Para a avaliação da citotoxicidade foram utilizadas as linhagens de células tumorais humanas HL-60 (leucemia promielocítica aguda), HCT-116 (carcinoma colorretal humano), MCF-7 (adenocarcinoma mamário humano), K562 (leucemia mielóide crônica) e a célula não tumoral L929 (fibroblasto murino), mantidas em meio de cultura RPMI-1640. O meio foi suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de solução de antibiótico (penicilina

e estreptomicina). As células foram mantidas em estufa a 37 °C, em atmosfera úmida enriquecida com 5% de CO₂.

A citotoxicidade foi mensurada por meio do ensaio de redução do MTT, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MOSMANN, 1983), é um teste colorimétrico. O MTT que é um sal de coloração amarela e solúvel em água, mas se reduz à formazan, pela atividade das enzimas desidrogenases que é um sal de coloração arroxeadada e insolúvel em água, esquema mostrado na figura abaixo. O teste do MTT quantifica o dano induzido por um agente no metabolismo celular através da observação da viabilidade mitocondrial e, conseqüentemente. Dessa forma, a redução do MTT a formazan é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e à viabilidade celular. É um dos testes mais utilizados devido à sua sensibilidade de detecção de citotóxicantes (EMBRAPA, 2018)

Figura 10 – Reação de redução do MTT



Fonte: Embrapa, 2018.

As células foram adicionadas em placas de 96 poços, na concentração de 3×10^5 células/mL (HCT-116, MCF-7 e L929) e 5×10^5 células/mL (HL-60 e K562). Em seguida, foram preparadas soluções estoque de 20 mM das substâncias, dissolvidas em DMSO (100%), da qual foram produzidas soluções de trabalho nas concentrações testes (3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200 μ M), diluídas em meio RPMI-1640, não ultrapassando a concentração final de 0,5% de DMSO. O DMSO (20%) foi utilizado como controle positivo. Após 72 h de incubação as placas foram centrifugadas (500 g, 5 min, 25 °C), foi removido 110 μ L do sobrenadante, sendo adicionado 10 μ L de MTT (5 mg/mL) (Sigma-aldrich). As placas foram incubadas por 3 h em estufa de 5% de CO₂, a 37 °C, para redução do sal e formação dos cristais de formazan.

Após o período de incubação, foi adicionado 100 μ L de SDS (dodecil sulfato de sódio) (10% HCL 0,01 N), para a solubilização dos cristais de formazan. As placas foram cobertas com um papel alumínio e deixadas overnight em um agitador. A absorbância foi medida em um leitor de placa, no comprimento de onda de 570 nm.

Os experimentos foram realizados em triplicata ou quadruplicata e a percentagem de inibição foi calculada no programa GraphPad Prism 5.0. Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico da amostra testada: amostra sem atividade (1 a 20% de inibição), com pouca atividade (inibição de crescimento celular variando de 20 a 50%), com atividade moderada (inibição de crescimento celular variando de 50 a 70%) e com muita atividade (inibição de crescimento variando de 70 a 100%).

Amostra	Inibição de crescimento celular
Sem atividade	1 a 20%
Pouca atividade	20 a 50%
Moderada	50 a 70%
Alta atividade	70 a 100%

Para a determinação da CI_{50} , foram testadas diferentes concentrações das substâncias (3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200 μ M), em quadruplicata, sendo realizado o ensaio como descrito anteriormente. Os dados foram analisados no programa GraphPad Prism 5.0, realizando o teste ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados de ressonância magnética nuclear ^1H e ^{13}C confirmaram que os compostos isolados são a acetofenona e a chalcona esperadas, como mostrado na literatura (VOLTOLINI, 2010).

5.1 DADOS ESPECTRAIS

5.1.1 Acetofenona

O produto obtido foi um líquido amadeirado, com rendimento de 4g (60%), com Rf de 0,15 (em eluente de 2:8 de AcOEt/hexano). Nomenclatura IUPAC: 1-(2,4-dimetóxilfenil)etanona.

Acetofenona - 2,4-dimetoxiacetofenona (composto 2) –: $^1\text{H RMN (400 MHz, CDCl}_3)$ δ 7,82 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H), 6,50 (dd, $J = 8,7, 2,3$ Hz, 1H), 6,44 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H), 3,87 (s, 3H), 3,84 (s, 3H), 2,56 (s, 3H). $^{13}\text{C RMN (101 MHz, CDCl}_3)$ δ 198,22, 164,70, 161,22, 132,75, 120,98, 105,12, 98,30, 55,53, 55,45. 31,77.

No espectro de ^1H podemos observar o sinal do hidrogênio da metoila carbonílica (do grupo acil) na forma de um singlete que aparece em 2,56 ppm com integral para 3H.

No espectro de RMN de ^{13}C observa-se 10 sinais pertencentes à acetofenona sintetizada, 4 sinais de carbonos não hidrogenados 120,98, 161,22, 164,70 e 198,22 ppm (acima da linha base) e 3 sinais de carbonos metílicos 55,53, 55,45 e 31,77 ppm (abaixo da linha base) e 3 sinais de carbonos metínicos 132,75, 105,12, 98,30,, sendo o δ de 31,77 característico de metila do grupo acil. O pico com descolamento químico de 198,30 ppm é típico do carbono quartenário carbonílico de cetonas com sinal menos intenso e em região de δ característica de carbonila.

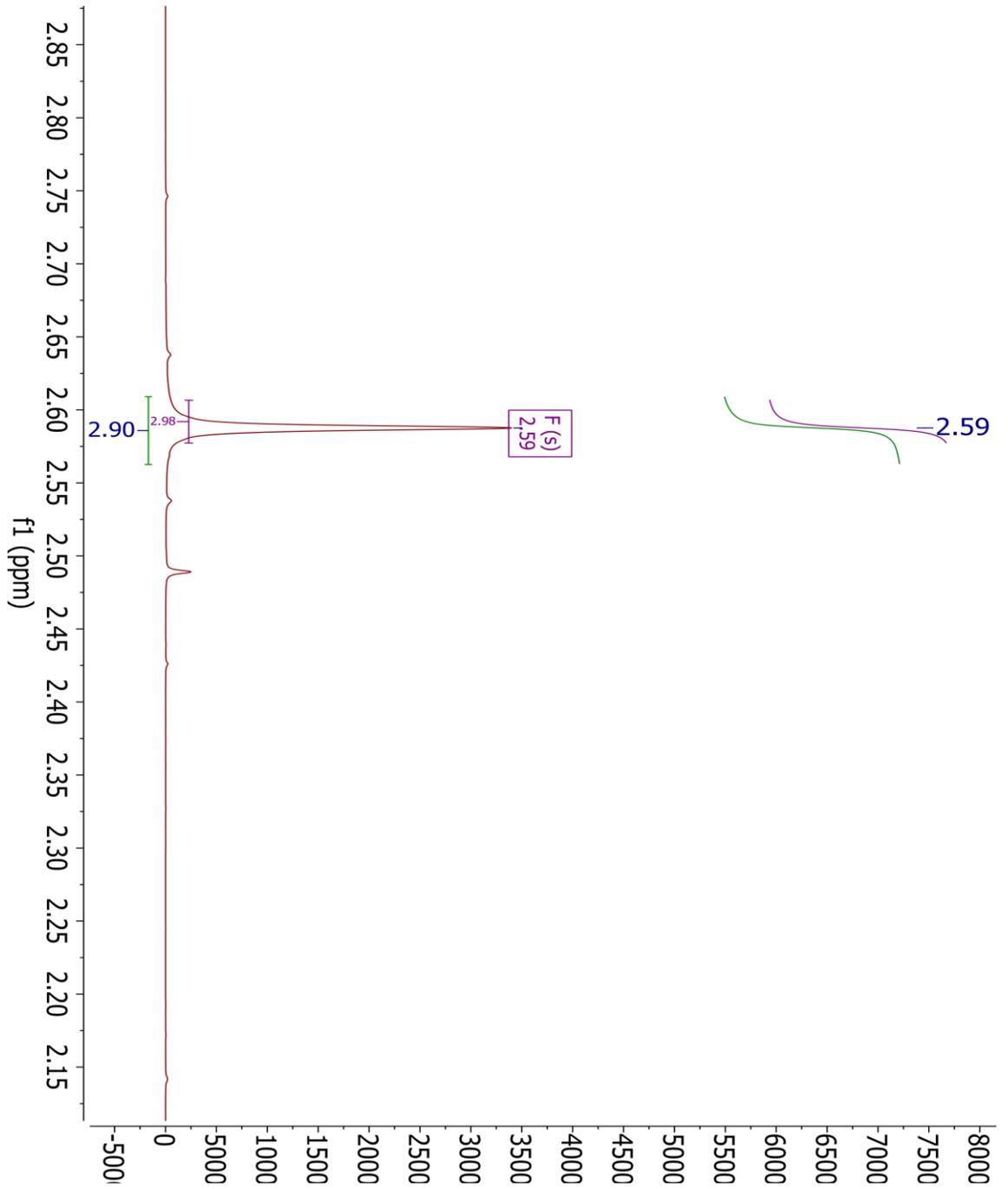
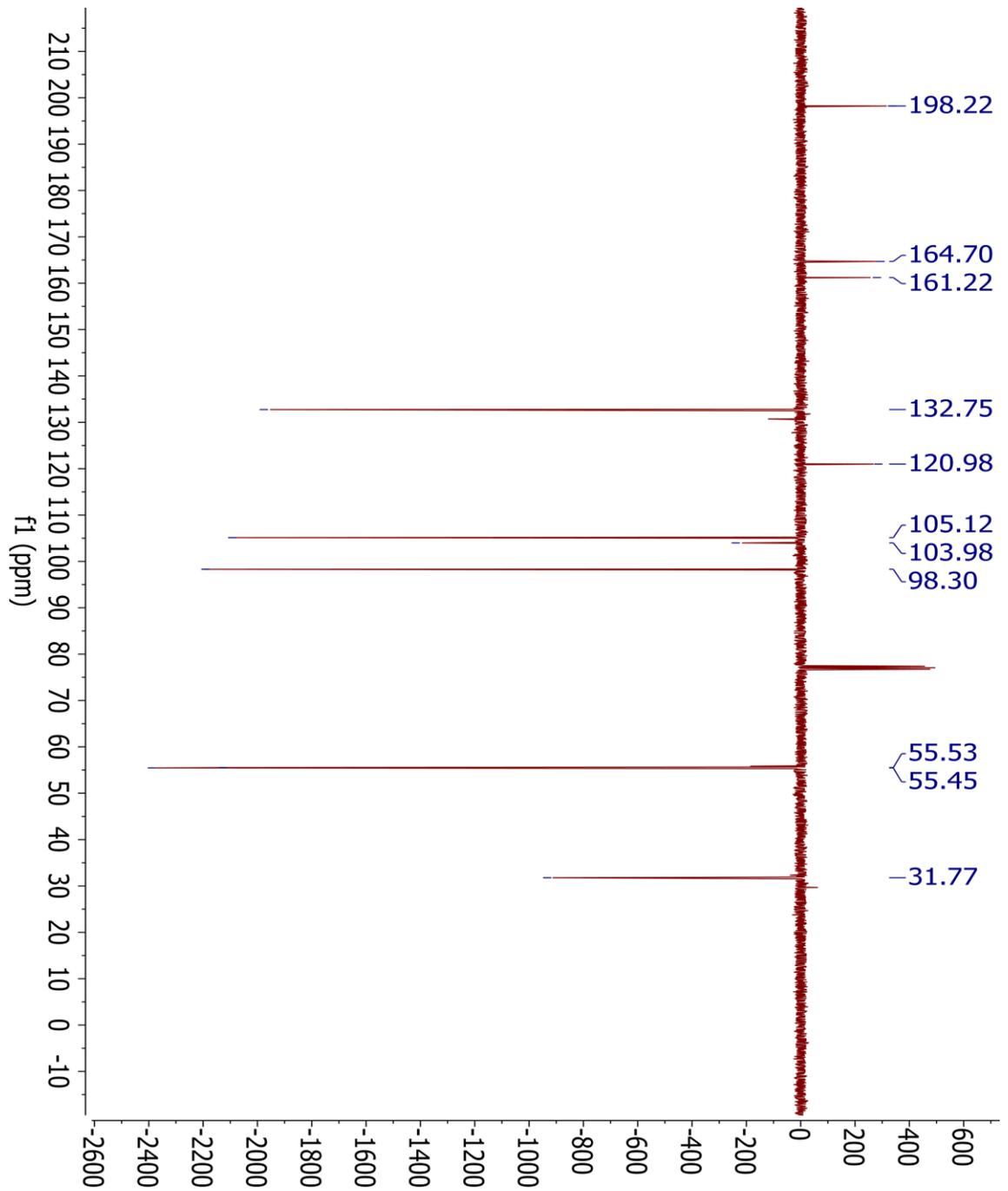
Figura 11 - Espectro completo de RMN de ^1H da 2,4-dimetoxiacetofenona (solvente CDCl_3)

Figura 12 - Espectro completo de RMN de ^{13}C da 2,4-dimetoxiacetofenona (solvente CDCl_3)

5.1.2 Chalcona

O produto obtido foi um sólido (granulado) amarelo, com rendimento de 0,82g (50%), com ponto de fusão de 95°C e Rf de 0,5 (em eluente de 2:8 de AcOEt/hexano). Nomenclatura IUPAC: 2-propen-1-ona, 1-(2,4-dimetóxfenil)-3-(4-metóxfenil).

Chalcona - 2', 4, 4'-trimetoxichalcona (composto 3): ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃)
δ 7,73 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 7,64 (d, *J* = 15,7 Hz, 1H), 7,54 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H), 7,38 (d, *J* = 15,7 Hz, 1H), 6,90 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H), 6,55 (dd, *J* = 8,6, 2,2 Hz, 1H), 6,49 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H), 3,88 (s, 3H), 3,85 (s, 3H), 3,82 (s, 3H). **¹³C RMN (126 MHz, CDCl₃)** δ 190,74, 164,05, 161,32, 160,34, 142,15, 132,78, 130,05, 128,22, 125,09, 122,52, 114,38, 105,22, 98,75, 55,83, 55,60, 55,44.

No espectro de ¹H podemos observar o sinal do hidrogênio α na forma de um duplete que aparece em 7,38 ppm. Já o hidrogênio β aparece um pouco mais deslocado, em 7,64 ppm, também como dublete. Ambos, hidrogênio α e β, aparecem acoplados com *J* igual a 15,62 Hz, valor esperado para os hidrogênios E da dupla ligação da chalcona. Já os sinais referentes aos hidrogênios das metoxilas aparecem em 3,82, 3,85 e 3,88 ppm neste espectro, todas como singletos e integral para 3H cada.

No espectro de RMN de ¹³C observa-se 16 sinais pertencentes à chalcona sintetizada. 6 sinais de carbonos não hydrogenados (acima da linha base) e 7 sinais de carbonos metínicos e 3 de carbonos metílicos (abaixo da linha base). O pico com descolamento químico de 190,74 ppm é típico do carbono quartenário com sinal menos intenso e em região característica de carbonila, sendo atribuída ao C1'.

Figura 13 - Espectro completo de RMN de ^1H da 2', 4, 4'-trimetoxicchalcona (solvente CDCl_3)

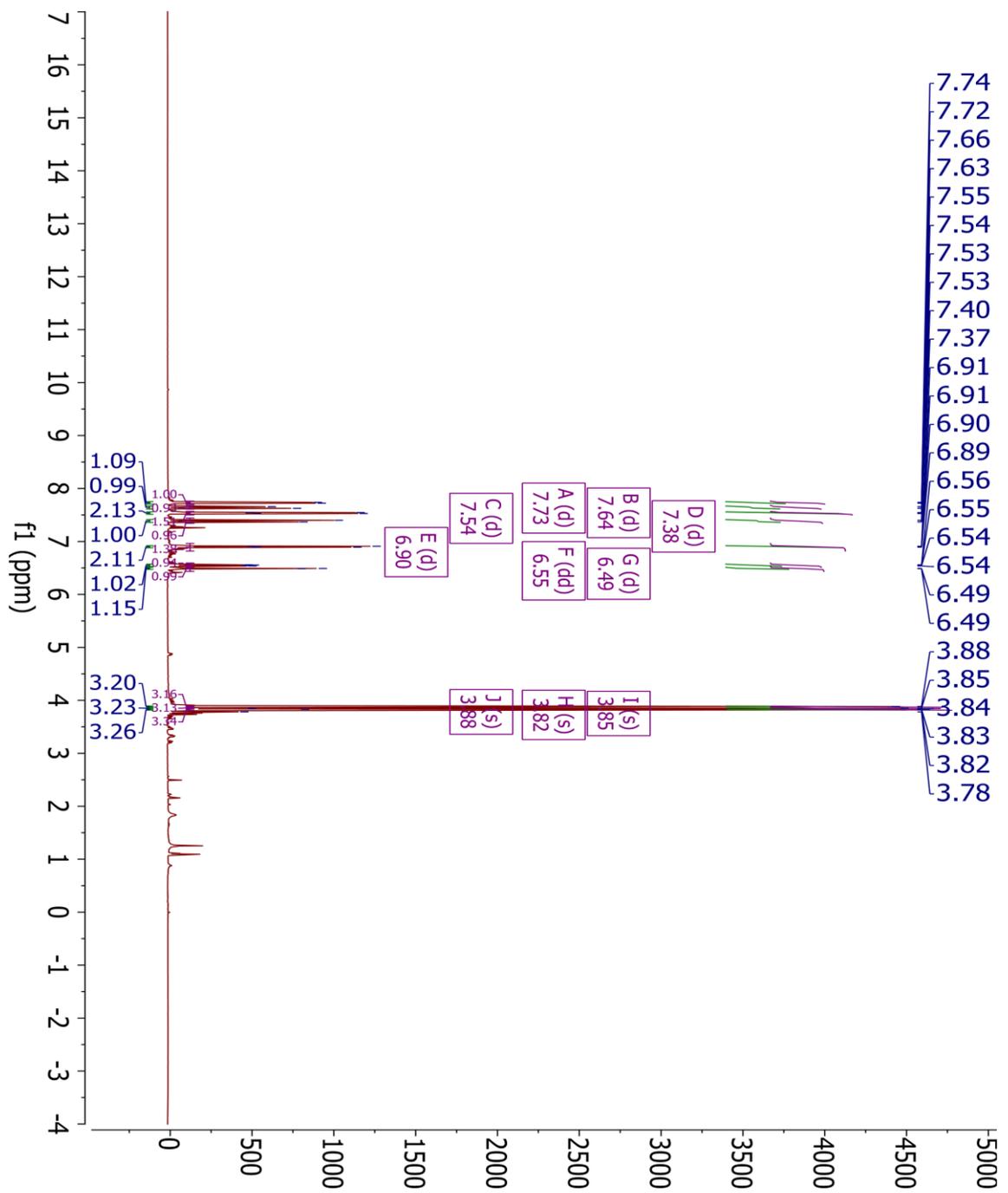
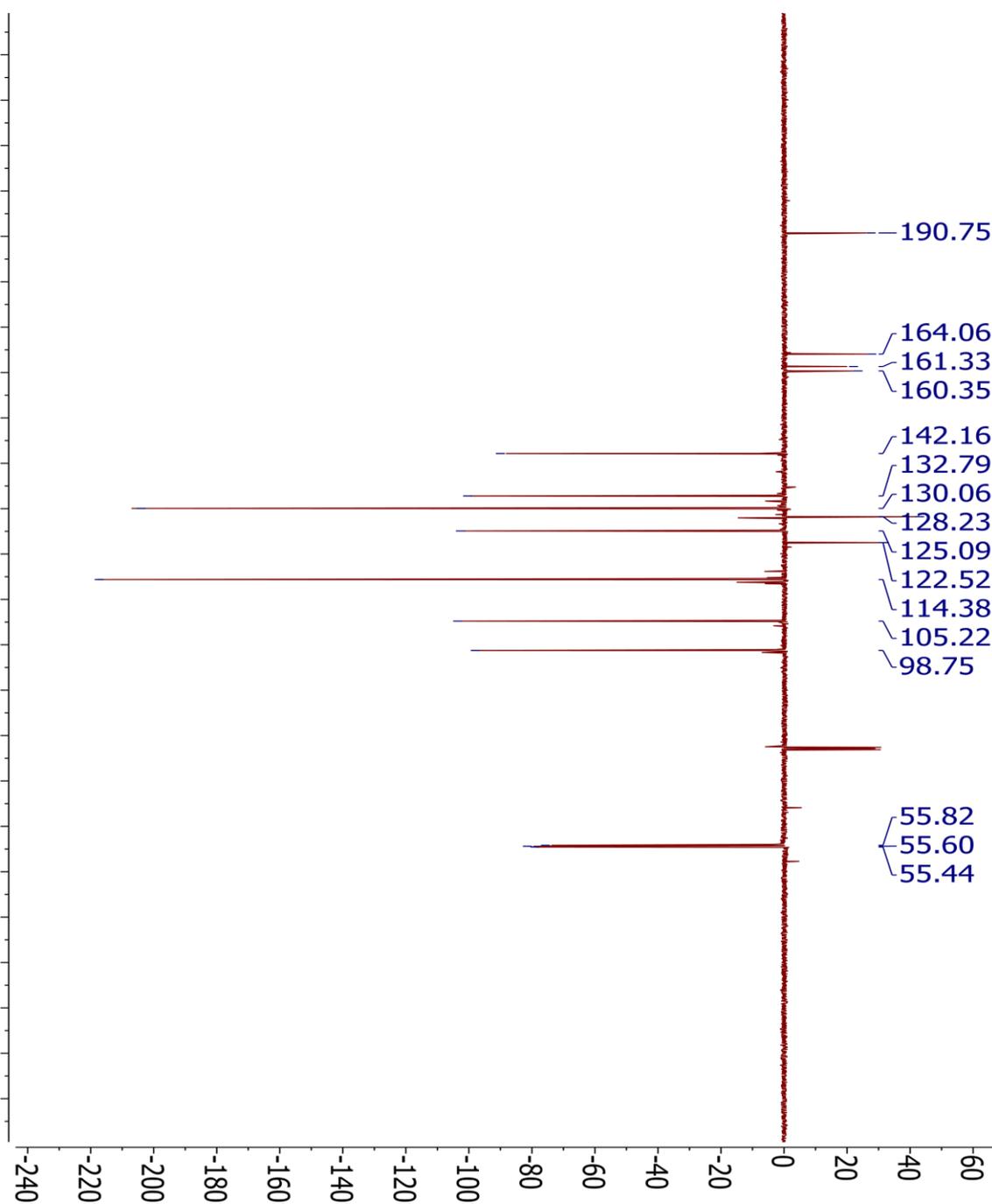


Figura 14 - Espectro completo de RMN de ^{13}C da 2', 4, 4'-trimetoxicchalcona (solvente CDCl_3)



5.2 ATIVIDADE CITOTÓXICA

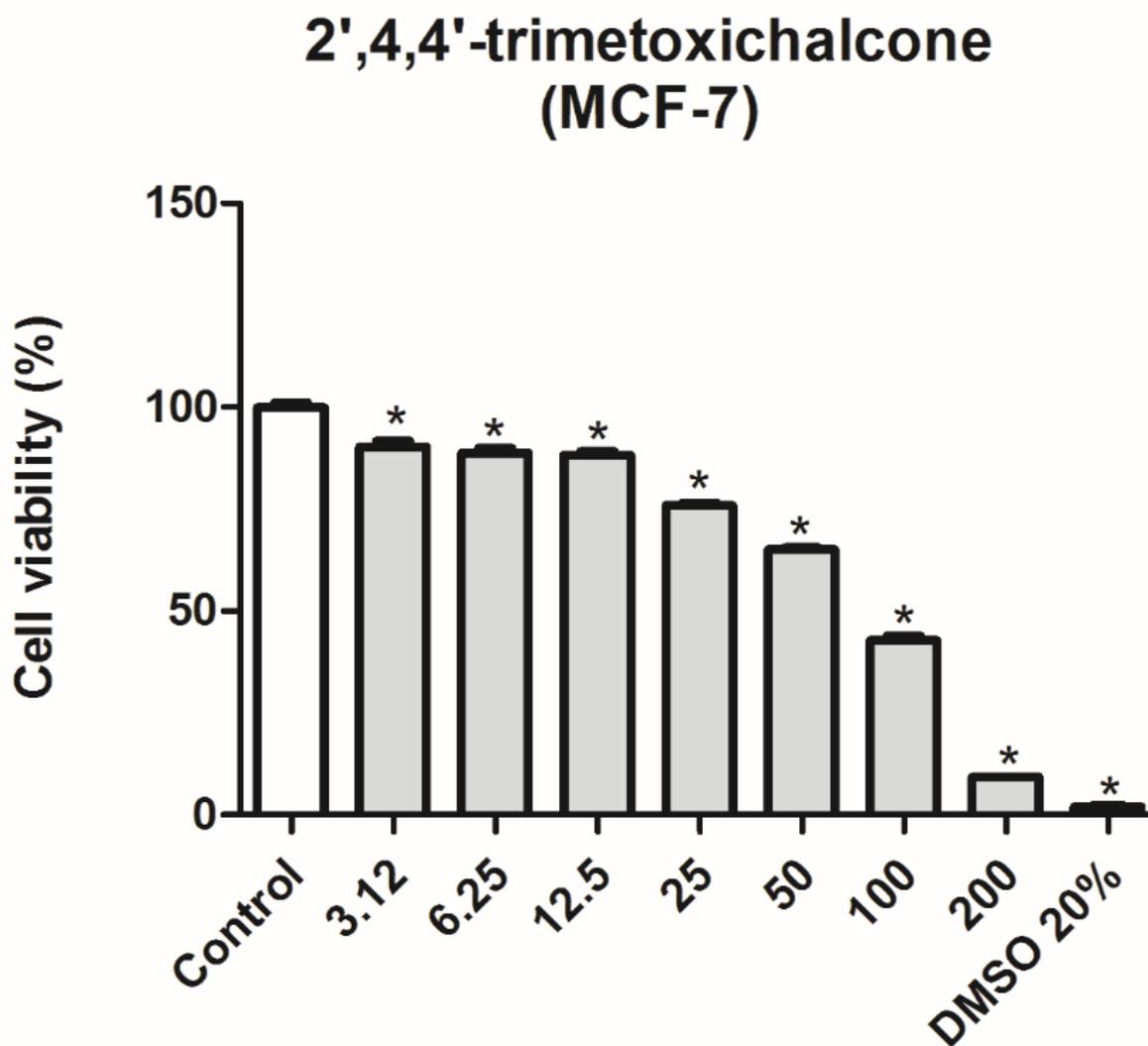
As amostras foram submetidas a uma análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a um nível de 5% de probabilidade. Eles foram inicialmente testados com citotoxicidade a 50 μ M, o efeito do composto 3 na viabilidade das células MCF-7, HL-60, K562, HCT-116 (tumor) e L929 (não tumoral) após 72 h de tratamento podem ser vistos nos gráficos (Gráficos 1-6) e na tabela (Tabela 1) abaixo.

Tabela 1: Efeito do composto 3 a substância ABK na viabilidade das células MCF-7, HL-60, K562, HCT-116 (tumorais) e L929 (não tumoral), após 72 h de tratamento.

Substância	Porcentagem de inibição				
	MCF-7	HL-60	K562	HCT-116	L929
Composto 3	40,1 \pm 0,24%*	84,5 \pm 0,57%*	34,7 \pm 1,07%*	38,9 \pm 1,52%*	16 \pm 0,52%*

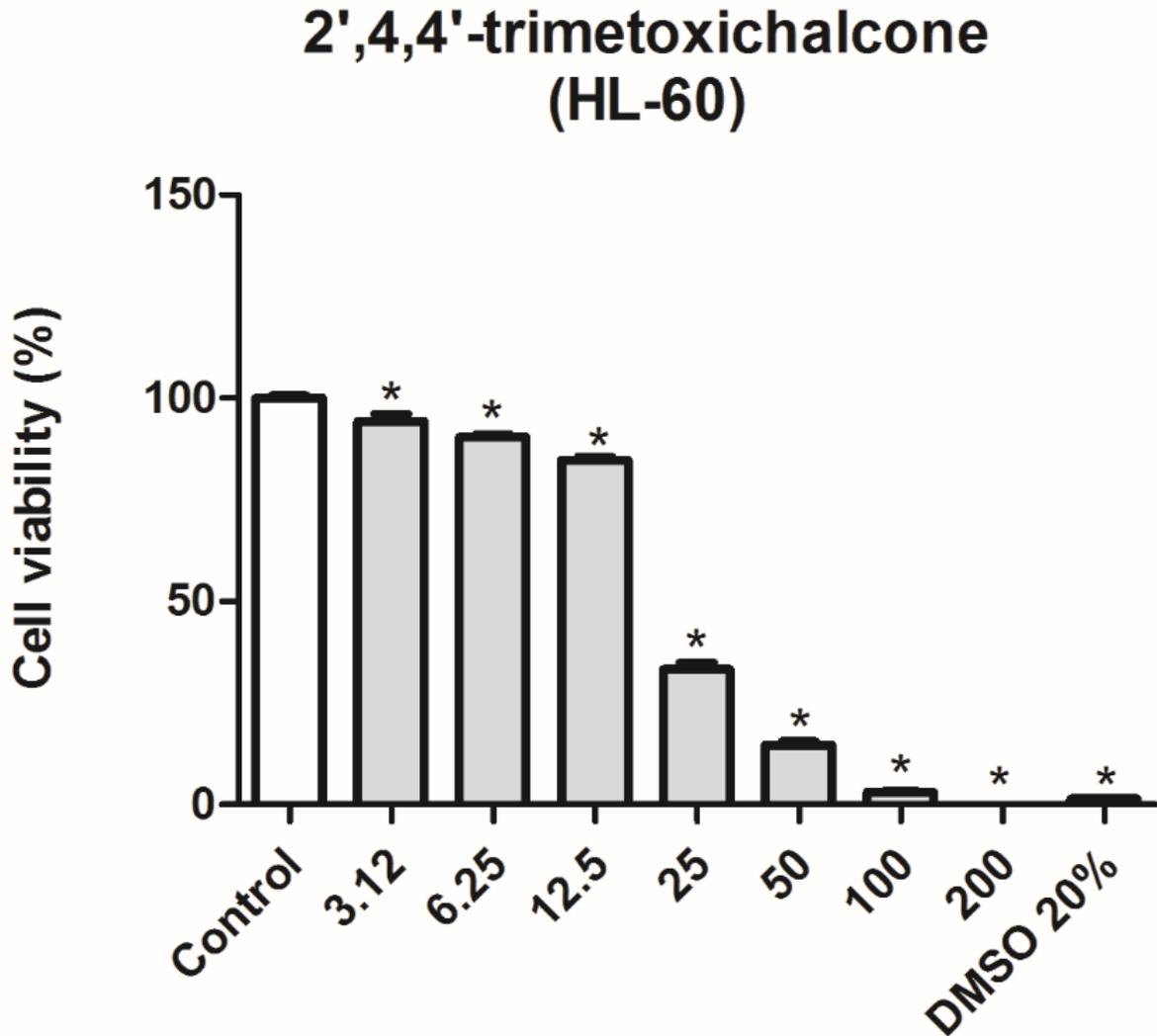
Os resultados são expressos como média \pm erro padrão de um experimento independente em triplicata ou quadruplicata, testado na concentração de 50 μ M. Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao controle não tratado.

Gráfico 1 – Efeito do composto 3 na viabilidade de células MCF-7



MCF-7 cultivadas por 72 horas na presença do composto 3 nas concentrações de 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 e 200 μM . A análise de variância *one way* ANOVA foi utilizada para analisar os dados de variabilidade celular e compará-los com o controle (células não tratadas), seguida do pós-teste de Tukey, a significância estatística foi definida como * $p < 0,05$ em relação ao controle não tratado.

Gráfico 2 – Efeito do composto 3 na viabilidade de células HL-60



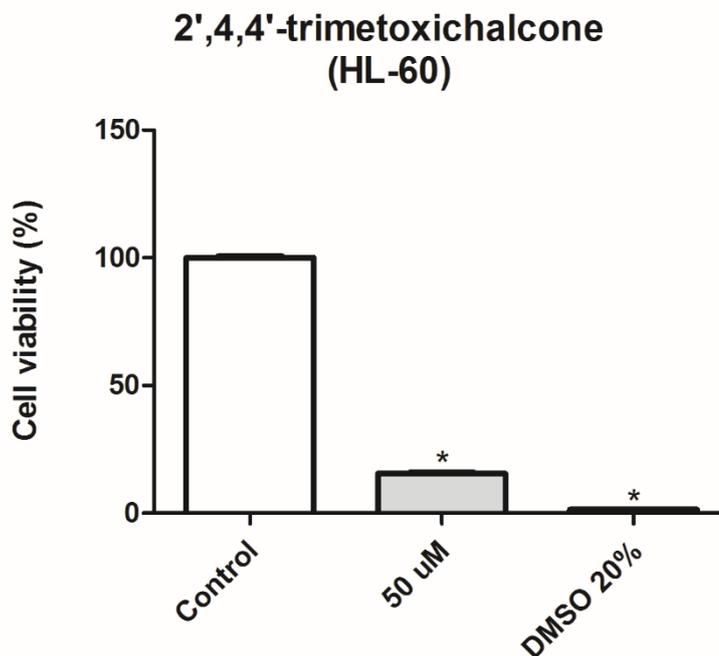
HL-60 cultivadas por 72 horas na presença do composto 3 nas concentrações de 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 e 200 μM . A análise de variância *one way* ANOVA foi utilizada para analisar os dados de variabilidade celular e compará-los com o controle (células não tratadas), seguida do pós-teste de Tukey, a significância estatística foi definida como * $p < 0,05$ em relação ao controle não tratado.

O composto 3 mostrou uma grande atividade na linhagem HL-60 (inibição de 84,5%), mas nas outras linhagens tumorais (MCF-7, K562 e HCT) foi obtida pouca atividade. Na célula não tumoral L929, o composto 3 não mostrou atividade. Posteriormente, a metade da concentração inibitória máxima (IC₅₀) dessa molécula nas duas linhas tumorais (MCF-7 e HL-60) foi calculada por apresentarem as maiores porcentagens de inibição (Tabela 1), os gráficos podem ser vistos abaixo (Gráficos 1 e 2) Para a determinação de IC₅₀, diferentes concentrações da substância (3,12, 6,25, 12,5, 25, 50, 100 e 200µM) foram testadas em quadruplicado. Em conclusão, o composto 3 foi mais citotóxico para a cepa HL-60, com um IC₅₀ de aproximadamente 20,84µM.

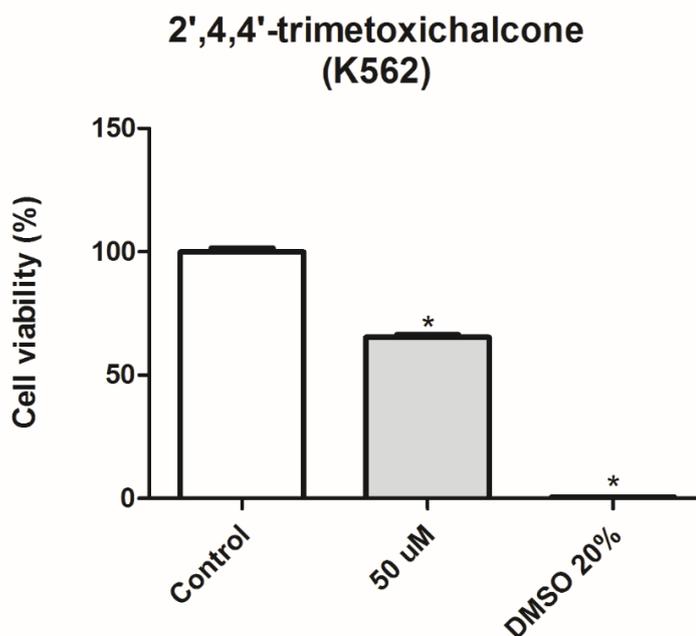
Tabela 2: Determinação da CI₅₀ da substância ABK em células tumorais (HL-60 e MCF-7), após 72 h de tratamento.

Substância	IC ₅₀ (µM)	
	MCF-7	HL-60
ABK	67,23	20,84

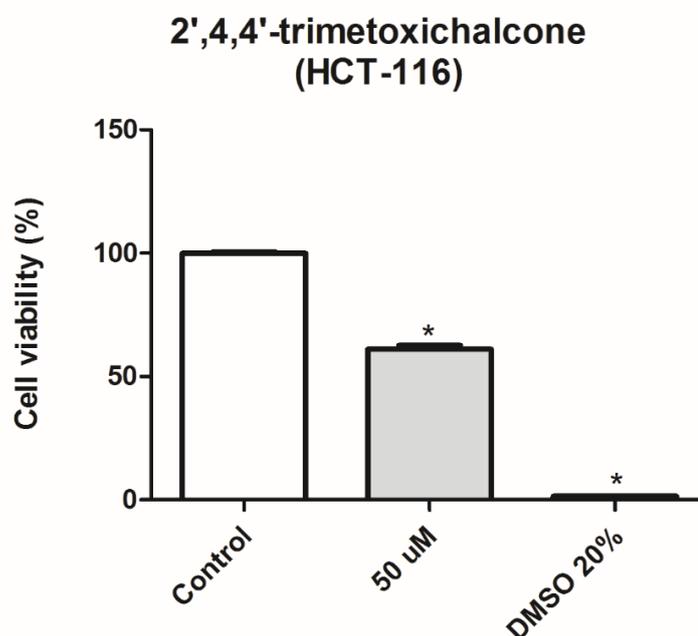
CI₅₀ determinada a partir de um experimento independente em quadruplicata.

Gráfico 3 – Efeito do composto 3 (50 μ M) na viabilidade de células HL-60

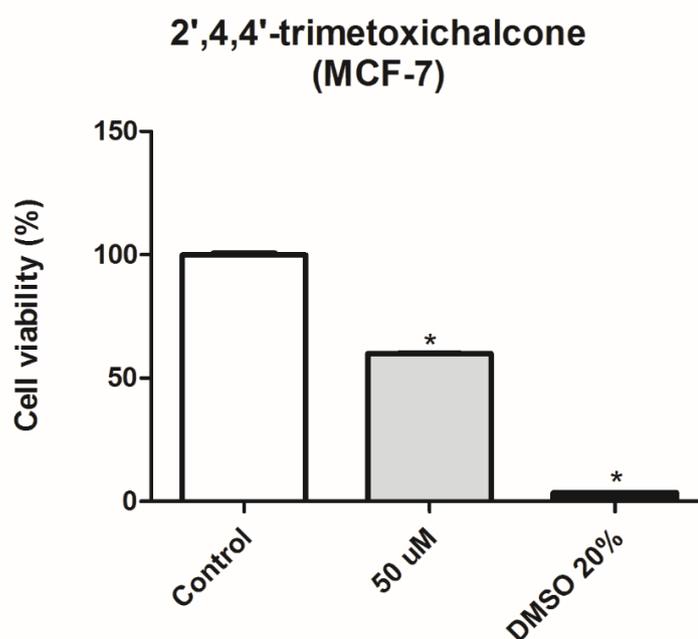
HL-60 cultivadas por 72 horas na presença do composto 3 nas concentrações de 50 μ M. A análise de variância *one way* ANOVA foi utilizada para analisar os dados de variabilidade celular e compará-los com o controle (células não tratadas), seguida do pós-teste de Tukey, a significância estatística foi definida como * $p < 0,05$ em relação ao controle não tratado.

Gráfico 4 – Efeito do composto 3 (50 μ M) na viabilidade de células K562

K562 cultivadas por 72 horas na presença do composto 3 nas concentrações de 50 μ M. A análise de variância *one way* ANOVA foi utilizada para analisar os dados de variabilidade celular e compará-los com o controle (células não tratadas), seguida do pós-teste de Tukey, a significância estatística foi definida como * $p < 0,05$ em relação ao controle não tratado.

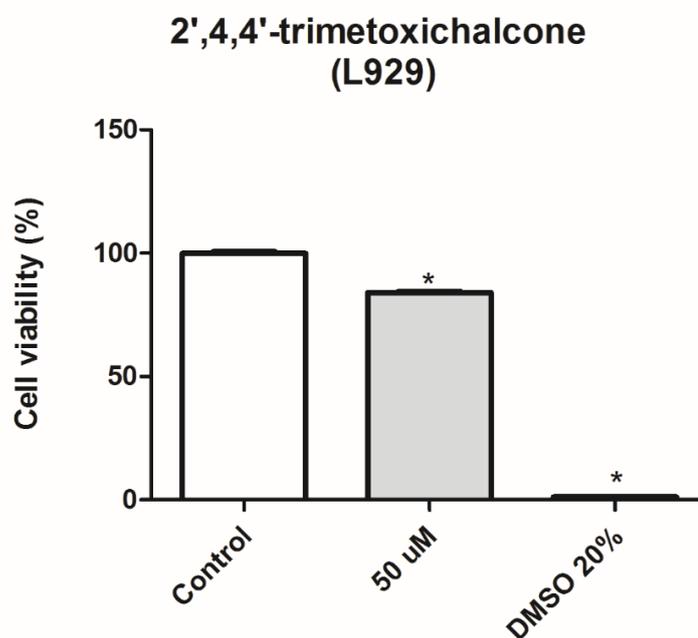
Gráfico 5 – Efeito do composto 3 (50 μM) na viabilidade de HCT-116

HCT-116 cultivadas por 72 horas na presença do composto 3 nas concentrações de 50 μM . A análise de variância *one way* ANOVA foi utilizada para analisar os dados de variabilidade celular e compará-los com o controle (células não tratadas), seguida do pós-teste de Tukey, a significância estatística foi definida como * $p < 0,05$ em relação ao controle não tratado.

Gráfico 6 – Efeito do composto 3 (50 μM) na viabilidade de MCF-7

MCF-7 cultivadas por 72 horas na presença do composto 3 nas concentrações de 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 e 200 μM . A análise de variância *one way* ANOVA foi utilizada para analisar os dados de variabilidade celular e compará-los com o controle (células não tratadas), seguido do pós-teste de Tukey, a significância estatística foi definida como * $p < 0,05$ em relação ao controle não tratado.

Gráfico 7 – Efeito do composto 3 (50 μM) na viabilidade de L929



L929 cultivadas por 72 horas na presença do composto 3 nas concentrações de 50 μM . A análise de variância *one way* ANOVA foi utilizada para analisar os dados de variabilidade celular e compará-los com o controle (células não tratadas), seguida do pós-teste de Tukey, a significância estatística foi definida como * $p < 0,05$ em relação ao controle não tratado.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A síntese da 2',4,4'-trimetoxichalcona foi bem-sucedida com 50% de rendimento e em relação aos resultados biológicos ela se destacou na linhagem HL-60, apresentando excelente potencial inibitório, maior do que 50% (**84,5%**), com uma IC_{50} de aproximadamente 20,84 μ M.

REFERÊNCIAS

CALVINO, V.; PICALLO, M.; LÓPEZ-PEINADO, A. J.; MARTÍN-ARANDA, R. M.; DURÁN-VALLE, C. J. Ultrasound accelerated Claisen-Schmidt condensation: A green route to chalcones. **Appl. Surf. Sci.**, 252, 6071, 2006.

CHENG, J.-H.; HUNG, C.-F.; YANG, S.-C.; WANG, J.-P.; WON, S.-J.; LIN, C.-N. Synthesis and cytotoxic, anti-inflammatory, and anti-oxidant activities of 2',5'-dialkoxychalcones as cancer chemopreventive agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 16, 7270-7276, 2008.

GREENWELL, M.; RAHMAN, PK.; Medicinal Plants: Their Use in Anticancer Treatment. **Int J Pharm Sci Res.** ;6(10):4103-4112., 2015.

GUANGCHANG L & XU, B. Hydrogen bond donor solvents enabled metal and halogen-free Friedel–Crafts acylations with virtually no waste stream. **Tetrahedron Letters** 59: 869-872, 2018.

GUDIPUDI, G.; SAGURTHI, S. & PERUGU, S. Rational design and synthesis of novel 2-(substituted-2H-chromen-3-yl)-5-aryl-1-Himidazole Derivatives As An Anti-Angiogenesis And Anti-Cancer Agent. **RSC Advances**, 4(99): 56489-56501, 2014.

HOSSAY A, LINDSALL SM, MAMBOURY M, RZEPA HS & SPIVEY AC. Total Synthesis of (+)-Lophirone H and Its Pentamethyl Ether Utilizing an Oxonium–Prins Cyclization. **Organic Letters** 19: 2486-2489, 2017.

ÍAZ-TIELAS C, GRAÑA E, REIGOSA MJ & SÁNCHEZ-MOREIRAS AM. Biological Activities And Novel Applications Of Chalcones. **Planta Daninha** 34(3), 2016.

MARTEL-FRACHET, V.; KERAMIDAS, M.; NURISSO, A.; DEBONIS, S.; ROME, C.; JEAN-LUC C.; BOUMENDJEL, A.; SKOUFIAS DA.; RONOT, X.; A Chalcone Acting As A Microtubule Inhibitor With In Vivoantitumor Activity Against Bladder Carcinoma. **Oncotarget** 6(16): 14669–14686, 2015.

MAGALHÃES, W. L. E.; LUNDGREN, E.; T. D. M. Método de determinação de concentrações não citotóxicas para avaliação da capacidade protetora da lignina contra danos ao DNA. **Embrapa**, 2018.

MELO, L. R. Síntese, Caracterização e estudo fotofísico de chalconas fluorescentes, **UNB**, 2015.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunological Methods** 65 (1-2): 55–63, 1993.

NALL, R. What To Know About Cancer, 2018. Disponível em: <<https://www.medicalnewstoday.com/articles/323648.php>> . Acesso em 29 de maio 2019.

NEWMAN, D.J. & CRAGG, G..M Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products** 79(3): 629-661, 2016.

N, L; MENG, C. Q; SIKORSKI, J. A. Recent advances in therapeutic chalcones. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v14, 1669-1691, 2005.

SINGH P.; ANAND A.; KUMAR V. Recent developments in biological activities of chalcones: A miniReview. **European Journal of Medicinal Chemistry**, n.85, 758 e 777, 2014.

SUN, Y. Tumor Microenvironment and Cancer Therapy Resistance. **Cancer Letters**, 380(1): 205-215, 2016.

VOLTOLINI, B. G. Obtenção de chalconas heterocíclicas via condensação de claisen-schmidt e avaliação do seu potencial como inibidores da enzima yoph. **UFSC**, 2010.

WALTER, M. E., CORRÊA R., MONTANARI, C. A., NUNES, R. J. Estudo de QSAR/QSPR de chalconas antinociceptivas. In: Reunião Anual De Química ,23.,2000. Poços de Caldas. Anais da 23ª reunião anual de química. Poços de Caldas: **SBQ**, 2000. Disponível em: <<http://www.s bq.org.br/ranteriores/23/resumos/1491-1/index.html>> . Acesso em 07 junho 2019.

YERRAGUNTA V.; KUMARASWAMY T.; SUMAN D.; ANUSHA V.; PATIL P.; SAMHITHA T. A review on Chalcones and its importance. **PharmaTutor**, 1(2), 54-59, 2013.

YURKANIS, B. P. Química Orgânica. **Pearson Prentice Hall**, v.2. São Paulo: 2006.

ZHOU B.; XING C. Diverse Molecular Targets for Chalcones with Varied Bioactivities. **Medical chemistry**, n.5, 388-404, 2015.

GLOSSÁRIO

Alelopatia: dano provocado por uma planta em outro organismo, causado pela liberação no meio ambiente de metabólitos secundários tóxicos.

Bioativos: substâncias que possuem efeito sobre um organismo, célula ou tecido vivos.

Cepa: é um termo da biologia e da genética para se referir a um grupo de descendentes com um ancestral comum que compartilham semelhanças morfológicas ou fisiológicas.

Clorofórmio deuterado: é um solvente utilizado para a realização de análises por ressonância magnética, no qual os hidrogênios ou prótons são substituídos um isótopo mais instável, o deutério.

Concentração do fármaco que induz metade do efeito máximo (IC_{50}): curva de dose-reposta que representa a concentração para qual 50% da população exibe uma resposta, após uma duração de exposição especificada.

Insaturação: ligação π na cadeia carbônica de uma molécula.

Overnight: durante a noite.