

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO FARMÁCIA

**ESTUDO DA APOCININA E DIAPOCININA E SEUS DERIVADOS DE
CHALCONAS COMO ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANOS
POTENCIAIS: SÍNTESE, AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIBACTERIANA,
ANTIOXIDANTE E DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS**

Carmem Lucia dos Santos Machado

Orientador: Prof. Dr. Fávero Reisdorfer Paula

URUGUAIANA
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO FARMÁCIA

**ESTUDO DA APOCININA E DIAPOCININA E SEUS DERIVADOS DE
CHALCONAS COMO ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANOS
POTENCIAIS: SÍNTESE, AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIBACTERIANA,
ANTIOXIDANTE E DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS**

Carmem Lucia dos Santos Machado

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós Graduação em Ciências
Farmacêuticas como um dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Ciências
Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Fávero Reisdorfer Paula

URUGUAIANA
2016

Carmem Lucia dos Santos Machado

**ESTUDO DA APOCININA E DIAPOCININA E SEUS DERIVADOS DE
CHALCONAS COMO ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANOS
POTENCIAIS: SÍNTESE, AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIBACTERIANA,
ANTIOXIDANTE E DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Fávero Reisdorfer Paula
Orientador

Prof. Dr. Michel Mansur Machado
Universidade Federal do Pampa

Prof. Dr. Elton Luís Gasparotto Denardin
Universidade Federal do Pampa

Uruguaiana, 24 de junho de 2016.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, por me dar força e coragem para vencer os desafios diários. Obrigada pelas pessoas que colocou no meu caminho e que em cada momento foram importantes, fazendo com que eu tivesse mais vontade para conseguir meus objetivos.

Ao meu orientador, professor Fávero Reisdorfer Paula, pela oportunidade e confiança. Num momento em que tudo parecia ser impossível, você me deu um belo “puxãozinho de orelha”, acreditou em mim e me ensinou que sonhos podem virar realidade basta realmente querer. Obrigada por tudo!

Ao meu pai, minhas irmãs Thais e Liliane, sempre estão presentes nos momentos bons da minha vida.

A minha família, aos meus amigos e aos colegas de trabalho que se fizeram presentes neste período e que direta ou indiretamente contribuíram um pouco para que meu trabalho fosse concretizado.

Aos alunos de iniciação científica, Gustavo Santi e Danilo Baptista que, ajudaram e contribuíram muito para realização desde trabalho.

Ao professor Michel Mansur Machado, foi sempre prestativo e muito atencioso quando precisei de sua ajuda. Muito obrigada!

Aos demais professores do PPGF que colaboraram para meu crescimento intelectual e, principalmente aos meus colegas que fizeram presentes nesses dois anos, de muito companheirismo e lealdade.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura química dos salicilatos (1) Aspirina, (2) ácido salicílico e (3) salicina.....	09
Figura 2.	Estrutura química básica das chalconas.....	10
Figura 3.	Mecanismo reacional da condensação Claisen-Schmidt (formação de intermediários I, II, III, IV e o produto final chalcona).....	11
Figura 4.	Estrutura química básica das 4-carboxichalconas obtidas por Nielsen <i>et al.</i> 2004.....	13
Figura 5.	Estrutura química da licochalcona-C (A) e isoliquiritigenina (B).....	13
Figura 6.	Estrutura química de 4-aminochalconas com atividade bactericida.....	14
Figura 7.	Estrutura química dos derivados da 2-hidroxichalcona (A) e chalcona prenilada (B).....	15
Figura 8.	Esquema de oxidação da apocinina catalizado pelo ferro e formação da diapocinina.....	16
Figura 9.	Padrão de substituição das chalconas derivadas da apocinina e da diapocinina.....	20
Figura 10.	Esquema de reação de obtenção da chalconas derivadas da apocinina.....	21
Figura 11.	Esquema de reação de obtenção da diapocinina a partir da apocinina.....	24
Figura 12.	Esquema de obtenção de chalconas derivadas da diapocinina a partir de benzaldeídos e diapocinina. Condições e reagentes: NaOH 20%, MeOH, T °C ambiente, 10 a 24 horas.....	24
Figura 13.	Esquema de diluições dos compostos estudados.....	28
Figura 14.	Aplicação de ferramenta de replicação molecular de chalconas derivadas da apocinina.....	33
Figura 15.	Estrutura química da Rushchalcona IV.....	33
Figura 16.	Mecanismo de reação e formação das chalconas.....	35
Figura 17.	Espectro de infravermelho médio do composto 3,4,5-trimetoxi chalcona derivado da apocinina.....	38
Figura 18.	Espectro de RMN ¹ H da ((E)-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona).....	41
Figura 19.	Esquema da formação dos derivados da diapocinina.....	42
Figura 20.	Curva de calibração do DPPH em faixa de concentração 10 a 50 µM..	44
Figura 21.	Curva de calibração do padrão Trolox no ensaio de radical ABTS.....	47
Figura 22.	Foto da microplaca do ensaio da atividade sequestrante pelo radical ABTS para a apocinina e diapocinina, após seis minutos de incubação	49

Figura 23.	Halos de inibição da bactéria <i>S. aureus</i> em contato com os compostos chalconas (trimetoxi e dimetoxi) derivadas da apocinina.....	50
Figura 24.	Mapa dos sítios de densidade local de potencial de ionização da apocinina e da diapocinina usando Spartan' 08 for Windows e método DFT/3BLYP 6.31*G.....	57
Figura 25.	Espectro IV da apocinina.....	70
Figura 26.	Espectro de RMN ¹ H da apocinina.....	70
Figura 27.	Espectro de IV da (E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-phenylprop-2-en-1-one.....	71
Figura 28.	Espectro de RMN ¹ H da (E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-phenylprop-2-en-1-one.....	72
Figura 29.	Espectro de IV da (E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one.....	72
Figura 30.	Espectro de RMN ¹ H da (E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one.....	73
Figura 31.	Espectro de IV da (E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one.....	74
Figura 32.	Espectro de RMN ¹ H da (E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one.....	74
Figura 33.	Espectro de IV da Bis-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)ethanone.	75
Figura 34.	Espectro de RMN ¹ H da Bis-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)ethanone.....	75
Figura 35.	Espectro de IV da Bis-(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-phenylprop-2-en-1-one.....	76
Figura 36.	Espectro de RMN ¹ H da Bis-(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-phenylprop-2-en-1-one.....	76
Figura 37.	Espectro de IV da Bis-(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one.....	77
Figura 38.	Espectro de RMN ¹ H da Bis-(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one.....	77
Figura 39.	Espectro de IV da Bis-(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one.....	78
Figura 40.	Espectro de RMN ¹ H da Bis-(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one.....	78
Figura 41.	Espectro de IV da Bis-(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one.....	79
Figura 42.	Espectro de RMN ¹ H da Bis-(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one.....	79
Figura 43.	Análise de toxicidade da (E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-	80

	phenylprop-2-en-1-one.....	
Figura 44.	Análise de toxicidade da (E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one.....	81
Figura 45.	Análise de toxicidade da (E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one.....	81
Figura 46.	Análise de toxicidade da (E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one.....	82
Figura 47.	Análise de toxicidade da Bis-(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-phenylprop-2-en-1-one.....	82
Figura 48.	Análise de toxicidade da Bis-(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one.....	83
Figura 49.	Análise de toxicidade da Bis-(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one.....	83
Figura 50.	Análise de toxicidade da Bis-(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one.....	84
Figura 51.	Análise de toxicidade da apocinina.....	84
Figura 52.	Análise de toxicidade da diapocinina.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Valores dos tempos de reação, rendimento e pontos de fusão dos compostos obtidos.....	36
Tabela 2.	Substituições e características físico-químicas relatadas na literatura presente nas chalconas derivadas da apocinina.....	37
Tabela 3.	Frequências características de grupos funcionais encontrados nas aminochalconas.....	38
Tabela 4.	Atribuições de picos obtidos pela espectrometria de Infravermelho dos compostos obtidos.....	39
Tabela 5.	Resultados das análises espectroscópicas de RMN ¹ H e ¹³ C dos compostos obtidos.....	40
Tabela 6.	Valores utilizados para a construção da curva de calibração do ensaio de DPPH.....	43
Tabela 7.	Resultados obtidos das leituras de absorbâncias, com ensaio de DPPH para os compostos propostos.....	44
Tabela 8.	Resultados em porcentagem obtidos no ensaio sequestrante de radical pelo DPPH em microplaca.....	45
Tabela 9.	Curva de calibração do padrão Trolox no ensaio de radical ABTS.....	46
Tabela 10.	Resultados obtidos com a leituras das absorbâncias no ensaio sequestrante de radical ABTS.....	47
Tabela 11.	Resultados obtidos no ensaio sequestrante de radical ABTS.....	48
Tabela 12.	Medida dos halos de inibição do crescimento bacteriano das chalconas derivadas da apocinina e diapocinina, e do padrão cloranfenicol.....	50
Tabela 13.	Valores de propriedades físico-químicas calculadas com o programa Molinspiration.....	53
Tabela 14.	Média dos valores de propriedades físico-químicas de antibacterianos utilizadas como referência para o estudo de substâncias antibacterianas (O'Shea e Moser, 2008).....	53
Tabela 15.	Valores dos descritores de propriedades físico-químicas calculadas utilizadas para avaliação da reatividade molecular da apocinina e da diapocinina.....	55
Tabela 16.	Risco de efeitos tóxicos calculados no programa Osiris Property Explorer [®] para as chalconas derivadas da apocinina e diapocinina.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Ácido Acetilsalicílico
ABTS	2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ADMET	Absorção, distribuição, metabolismo, excreção, toxicidade.
BHT	Butilhidroxitolueno
DPPH	1,1-difenil-2-picril-hidracilo
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
MIC	Concentração Inibitória Mínima
QSAR	<i>Quantitative structure active-relationship</i>
REA	Relação Estrutura-Atividade
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SRA	<i>Structure-Activity Relationship</i>
TBARS	Teste das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TPSA	Área de superfície topológica polar
VM	Volume Molar
nRot	Número de rotações
nOH	Número de grupos de receptores de ligação de hidrogênio
nOHNH	Doadores de ligações de hidrogênio
ClogP	Coefficiente de partição
%PSA	Área de superfície polar relativa
CLogD	Coefficiente de distribuição
E Δ f	Energia de formação

Ω	Índice de eletrofilicidade global
D	Dureza
S	Maciez
μ	Potencial químico
GAP	<i>Bandgap</i>
HOMO	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>
LUMO	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	01
2	OBJETIVOS.....	03
2.1	OBJETIVO GERAL.....	03
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	03
3	JUSTIFICATIVA.....	04
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	05
4.1	ANTIBACTERIANOS E RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	05
4.2	RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO.....	07
4.3	PRODUTOS NATURAIS NA DESCOBERTA DE FÁRMACOS.....	08
4.4	CHALCONAS.....	09
4.4.1	Propriedades antibacterianas das chalconas.....	11
4.4.2	Propriedades antioxidantes das chalconas.....	14
4.5	APOCININA E SEU DÍMERO DIAPOCININA.....	15
4.6	PLANEJAMENTO E DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS	17
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
5.1	PLANEJAMENTO DAS CHALCONAS.....	20
5.2	REAGENTES UTILIZADOS.....	20
5.3	EQUIPAMENTOS UTILIZADOS.....	21
5.4	OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS ESTUDADOS.....	21
5.5	SÍNTESE DA DIAPOCININA.....	24
5.6	CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DAS CHALCONAS.....	27
5.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ACEPTORA DE RADICAIS DOS COMPOSTOS ESTUDADOS.....	27
5.7.1	Ensaio sequestrante de radical pelo DPPH em microplacas.....	27
5.7.2	Atividade antioxidante total pelo radical ABTS em microplacas.....	29
5.8	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	30
5.8.1	Ensaio de avaliação da atividade antibacteriana.....	30
5.9	MODELAGEM MOLECULAR.....	31
5.9.1	Estudo de propriedades físico-químicas.....	31
5.9.2	Análise de Toxicologia <i>in silico</i>, obtenção de perfis <i>druglikeness</i> e <i>drugscore</i>, e Determinação de Propriedades ADMET.....	32

5.9.3	Estudos de Relações Estrutura-Atividade.....	32
6	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	33
6.1	PLANEJAMENTOS DE FÁRMACOS.....	33
6.2	SÍNTESE DAS CHALCONAS.....	34
6.3	SÍNTESE DA DIAPOCININA.....	41
6.4	ENSAIO SEQUESTRANTE DE RADICAL PELO DPPH EM MICROPLACA.....	42
6.5	ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL PELO RADICAL 2,2'-AZINOBIS(3-ETILBENZOTIAZOLINA-6-ÁCIDO SULFÔNICO) – ABTS EM MICROPLACA.....	46
6.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	49
6.7	MODELAGEM MOLECULAR DOS COMPOSTOS BIOATIVOS.....	51
6.8	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE <i>IN SÍLICO</i>	57
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
8	PERSPECTIVAS.....	60
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
10	ANEXOS.....	70

RESUMO

A apocinina é uma acetofenona que apresenta estrutura pequena e possui diversas atividades biológicas. Sua estrutura pode ser oxidada em certas condições químicas ou biológicas e resultar na formação do seu dímero, a diapocinina. As chalconas são compostos que contêm em sua estrutura básica a porção 1,3-diarilpro-2-em-1-ona e se caracterizam por apresentar ampla variedade de atividades biológicas, como atividade antioxidante e antibacteriana. Estudos demonstram que modificações estruturais nos anéis aromáticos das chalconas resultam na obtenção de compostos com atividade aceptora de radicais e antibacterianas. Neste trabalho foram realizadas a síntese de chalconas derivadas da apocinina e diapocinina, a avaliação da atividade antioxidante e antibacteriana. Adicionalmente foram realizados estudos de modelagem molecular, determinação de propriedades físico-químicas e a avaliação da toxicidade *in silico*, com a finalidade de se obter compostos que possam ser utilizadas como protótipos a novos fármacos. As chalconas derivadas da apocinina e da diapocinina, com substituintes 4-OCH₃, 3,4-OCH₃, e 3,4,5-OCH₃ ligados ao anel B, e não substituída (H), foram sintetizadas através da condensação de Claisen-Schmidth, dos benzaldeídos com a apocinina e diapocinina, em meio básico, temperatura ambiente, por 24 horas. Ao final de cada reação, os compostos foram analisados e purificados por recristalização ou em cromatografia em coluna. Os compostos foram caracterizados por CCD, ponto de fusão, espectroscopia de infravermelho (IV), e por ¹H e ¹³C RMN. A análise de capacidade aceptora de radicais das moléculas sintetizadas, foram realizadas através do emprego do método colorimétrico de análise do DPPH e ABTS, utilizando como padrão BHT e Trolox, respectivamente, nas concentrações 6,75, 12,5, 25, 50, 100, 200 e 400 µM. A avaliação da atividade antibacteriana dos compostos obtidos foi realizada através do método de difusão ágar-cilindro e leitura de halos de inibição, onde foram testadas as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (bactéria Gram positiva) e *Escherichia coli* ATCC 25922 (bactéria Gram negativa), utilizando como padrão o antibiótico cloranfenicol. A análise de toxicidade *in silico*, como a genotoxicidade, mutagenicidade, efeitos irritante e sobre sistema reprodutor, foi realizado através do programa computacional *Osiris Property Explorer*. Os compostos apresentaram atividade aceptora do radical DPPH e ABTS na faixa de concentração de 400 a 12,5µM, sendo superiores ao padrão de BHT e Trolox. No ensaio de avaliação da atividade antibacteriana todos os compostos apresentaram atividade antibacteriana frente à cepa *Staphylococcus aureus*, sendo, no entanto, inferior ao padrão cloranfenicol. Não foi observada atividade contra a cepa *Escherichia coli*. A partir da análise da toxicidade *in silico* observou-se que somente os compostos que tinham grupamentos OCH₃ substituídos em posição *para*, apresentaram risco médio e alto para efeito irritante e tóxico para o sistema reprodutor. Os demais compostos apresentaram risco teórico baixo de desenvolver os efeitos tóxicos citados. Diante dos resultados obtidos, observa-se que as chalconas derivadas da apocinina e diapocinina se apresentam como compostos promissores para o estudo e o desenvolvimento de agentes com atividade antioxidante, com ação antibacteriana e baixa toxicidade teórica, sendo assim demonstrando potenciais agentes para se utilizar na terapêutica.

Palavras-chave: Apocinina, Diapocinina, Chalconas, Antioxidante, Antibacteriano.

ABSTRACT

The apocynin is an acetophenone which has little structure and has several biological activities. Its structure can be oxidized in certain chemical or biological conditions and result in the formation of the dimer, the diapocinina. The chalcones are compounds containing in its basic structure portion 1,3-diaryl-pro-2-en-1-one and are characterized by having variety of biological activities such as antibacterial and antioxidant activity. Studies show that structural modifications on the aromatic rings of chalcones result in obtaining the compounds with acceptor radical and antibacterial activity. In this work were performed chalcones derived synthesis of apocynin and diapocinina, the evaluation of antioxidant and antimicrobial activity. It was also performed molecular modeling studies, determination of physico-chemical properties and toxicity evaluation *in silico*, in order to obtain compounds which can be used as prototypes of new drugs. The derivatives of the chalcones and apocynin diapocinina, substituents 4-OCH₃, 3,4-OCH₃, and 3,4,5-OCH₃ attached to B ring, unsubstituted (H) were synthesized by Claisen-Schmidt condensation, of benzaldehydes with apocynin and diapocinina, in basic medium at room temperature for 24 hours. After each reaction, the compounds were analyzed and purified by recrystallization or column chromatography. The compounds were characterized by TLC, melting point, infrared spectroscopy (IR) and ¹H and ¹³C NMR. The acceptor capacity analysis of radical synthesized molecules were carried out by employing the colorimetric method of analysis of DPPH and ABTS using standard as BHT and Trolox, respectively, at concentrations 6.75, 12.5, 25, 50, 100 200 and 400 µM. The evaluation of the antibacterial activity of the obtained compounds was performed by the method of agar-cylinder diffusion and reading inhibition zones, where *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gram positive bacterium) and *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram negative bacteria) were tested using as standard antibiotic chloramphenicol. The analysis of *in silico* toxicity, such as genotoxicity, mutagenicity, and irritating effects on reproductive system, was performed using the computer program Osiris Property Explorer. The compounds showed acceptor activity of DPPH and ABTS radical in the concentration range of 400 to 12,5µM, being superior to the standard of BHT and Trolox. The evaluation of the antibacterial activity test all compounds showed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* strain being, however, lower than the standard chloramphenicol. There was no activity against *Escherichia coli* strain. From the analysis of *in silico* toxicity it was observed that only compounds which had OCH₃ groups substituted in the para position, exhibited medium and high risk of irritating and toxic effect on the reproductive system. Other compounds showed low theoretical risk of developing toxic effects reported. Considering the results, it is observed that the derivatives of apocynin and diapocinina chalcones present as promising compounds for the study and development of agents having antioxidant activity, antibacterial action and low theoretical toxicity, thus demonstrating potential agents for use in therapy.

Key-words: Apocynin, Diapocinina, Chalcones, Antioxidant, Antibacterial.

1. INTRODUÇÃO

O planejamento e desenvolvimento de novos fármacos é um conjunto de conhecimentos que engloba inovação, descoberta, síntese ou modificação molecular, extração, isolamento, identificação de substâncias bioativas, assim como o estudo de suas respectivas relações estrutura-atividade (REA) (PANCOTE, 2009).

A história do desenvolvimento de fármacos começou a partir da realização de estudos que buscavam o isolamento dos princípios ativos de fontes naturais e o entendimento do seu mecanismo de ação (VIEGAS, 2006). Neste contexto, a busca incessante por produtos e a pesquisa de substâncias de origem natural que foram utilizados pela humanidade como forma de alívio e cura de doenças tem se mantido constante, uma vez que vários fármacos utilizados na terapêutica foram obtidos desta fonte. Desta forma, o estudo de substâncias bioativas obtidas a partir de fontes naturais direciona a pesquisa e o desenvolvimento de compostos com atividade biológica promissora (VIEGAS, 2006).

Em paralelo ao estudo de substâncias de origem natural encontra-se a química orgânica, uma ciência que permite a obtenção de substâncias derivadas de protótipos de fontes naturais em laboratório, e, deste modo, permite a síntese de substâncias candidatas a fármacos novos. A aplicação desta ciência na obtenção de compostos sintéticos demanda o conhecimento dos mecanismos das reações químicas, o uso de catalisadores, e a aplicação de procedimentos de purificação e identificação estrutural dos intermediários e produtos finais de reação (KOROLKOVAS, 1988; FERREIRA, 2003). A síntese orgânica é usada para se obter compostos bioativos de fontes naturais e também para construir análogos de moléculas de interesse.

O processo de planejamento e desenvolvimento de compostos bioativos envolve estudos interdisciplinares das áreas de química, física e a farmacologia, como a avaliação das relações estrutura-atividade (*Structure-Activity Relationship* - SAR) e das interações entre compostos ativos e receptor biológico, combinados à realização de estudos farmacocinéticos e toxicológicos, experimentais e *in silico* (via computacional). Estas metodologias se apresentam como ferramentas úteis que favorecem a obtenção de novos compostos a partir de estruturas químicas protótipo de origem natural (ARROIO *et al.*, 2010).

Compostos fenólicos de origem vegetal tem amplo emprego na terapêutica e devido a este fato, tem sido alvo de pesquisas e estudos para promover sua aplicação como agente terapêutico. Um destes compostos, a apocinina (4-hidroxi-3-metoxi acetofenona), pertencente

à classe dos metóxi-catecóis, foi descrita pela primeira vez por Schmiedeberg em 1883 e isolada a partir das raízes de *Apocynum cannabinum* (cânhamo canadense). Os extratos desta planta foram usados como remédios para tratar hidropisia e problemas cardíacos. Em 1971, a apocinina foi identificada durante isolamento da raiz *Picrorhiza kurroa* (Scrophulariaceae), uma planta nativa cultivada nas montanhas da Índia, Nepal, Tibet e do Paquistão, muito conhecida na medicina tradicional indiana (*Ayurveda*) (KANEGAE *et al.*, 2007; STENFANSKA & PAWLICZAK, 2009).

As chalconas são consideradas precursores da via de biossíntese de flavonoides e tem grande incidência em plantas, possuindo pigmentação amarela até vermelha (ANDERSEN & MARKHAM, 2006). Um fator de diversificação encontrado nas chalconas de origem naturais é posição dos grupamentos químicos presentes nos anéis A e B, conforme a figura, na página 10. Geralmente, observam-se grupos hidroxilas, metoxilas, O-glicosilas, C-glicosilas e C-alquilas, distribuídos nas posições *orto*, *meta* e *para* (ZUANAZZI, 2002). As chalconas naturais ocorrem principalmente na forma hidroxilada e vários estudos têm relatado suas propriedades biológicas (NAVARINI *et al.*, 2009)

A apocinina e as chalconas têm sido utilizadas como compostos bioativos promissores em modelos experimentais de doença que envolvem as espécies reativas de oxigênio (EROS), através de sua capacidade para impedir seletivamente a formação de radicais livres, como íons de oxigênio e peróxidos (ISMAIL *et al.*, 2014). O efeito inibitório de geração de EROS é importante para o tratamento de patologias vasculares, inflamatórias e neurodegenerativas (XIAOYU *et al.*, 2011). Para combater esse estresse oxidativo, o organismo produz um arsenal de antioxidantes para a sua defesa, o que às vezes é insuficiente para proteger eficientemente o organismo da presença de EROS (STOLK *et al.*, 1994). Desta forma, a pesquisa de substâncias com potencial efeito antioxidante é importante uma vez que as mesmas poderão ser utilizadas para proteger o organismo humano contra as EROS.

A elevação da resistência à terapia antimicrobiana criou uma necessidade substancial para a concepção de agentes antimicrobianos que possam ser utilizados para combater infecções bacterianas multirresistentes. Alguns estudos relatam o efeito antibacteriano potencial da apocinina e de chalconas derivadas, o que torna este conjunto de moléculas promissoras para o desenvolvimento de agentes terapêuticos novos (JANAKI, 2013). Neste cenário, é necessária uma avaliação mais aprofundada da apocinina e de chalconas para fins do aperfeiçoamento do perfil farmacoterapêutico e de seu potencial emprego na clínica como agentes antioxidantes ou antibacterianos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho apresentou como objetivo geral o estudo de características químicas e biológicas da apocinina, da diapocinina, e de chalconas derivadas destas, através da obtenção, da determinação das propriedades físico-químicas e avaliação da atividade aceptora de radicais e antibacteriana.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar, purificar e caracterizar chalconas derivadas da apocinina e da diapocinina candidatas a novos fármacos;
- Avaliação da atividade aceptora de radicais dos compostos propostos através de ensaios DPPH e o ABTS;
- Avaliação da atividade antibacteriana frente às cepas gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e gram-negativas (*Eschericia coli*) através da técnica da análise com cilindros de aço inoxidável aos compostos estudados;
- Realização de modelagem molecular dos compostos obtidos;
- Determinação de propriedades físico-químicas, estereoeletrônicas e de lipofilicidade via modelagem molecular dos compostos e posterior avaliação das relações estrutura-atividade (SAR) dos compostos estudados;
- Avaliação dos perfis *Druglikeness* e *Drugscore* dos compostos obtidos;
- Aplicação de metodologia de toxicidade *in silico* e predição do risco teórico de toxicidade dos compostos.

3. JUSTIFICATIVA

O uso de antibióticos promove a cura da maioria das infecções bacterianas causadas por cepas patogênicas, e seu uso indiscriminado aumenta a possibilidade da bactéria ser exposta aos mesmos podendo resultar no surgimento de resistência aos medicamentos antibacterianos. Este processo é uma consequência natural da adaptação da célula bacteriana a exposição aos antibióticos e é grave problema de saúde pública no mundo. A ocorrência da resistência bacteriana demonstra a necessidade crescente de desenvolvimento e obtenção de novas substâncias, eficazes e seguras, que possam ser adicionadas ao arsenal terapêutico.

As espécies reativas do oxigênio (EROs) são geradas a partir de processos oxidativos biológicos e estão envolvidas em processos fisiológicos normais e também em disfunções no organismo humano. Para combater a formação das EROs os organismos de homens e animais tem sistemas de defesa apropriados para manter estáveis as concentrações dessas espécies reativas. Quando as EROs são formadas acima da capacidade do organismo de neutralizá-las, acabam induzindo a formação de danos às células, tecidos, ou órgãos, podendo até resultar no surgimento de enfermidades. Estes fatos sugerem que o uso de terapia com substâncias que reduzem o volume de EROs geradas pode ser benéfica para o organismo humano. Desta forma, a obtenção de substâncias antioxidantes eficazes, seguras e com boa aceitação pelos pacientes, é proposta viável para o desenvolvimento de produtos que promovam a manutenção da saúde pública.

No cenário do desenvolvimento de compostos com atividade antibacteriana e antioxidante reconhecidas se destaca a modificação estrutural de moléculas, que se apresenta como alternativa promissora para o estudo e a busca de novos agentes bioativos. Entre os métodos que delineiam a modificação molecular da estrutura química de substâncias ativas destaca-se a hibridização molecular, que é uma estratégia eficaz para propor alterações e a obtenção de compostos novos com atividade biológica potencial.

Este estudo visa à investigação da atividade biológica de compostos derivados da estrutura química da apocinina e da diapocinina, e suas chalconas, que são compostos fenólicos, de origem natural, apresentam propriedades aceptoras de radicais livres e antibacterianas potenciais, através da sua síntese orgânica, com inserção de grupos substituintes no anel B, e da avaliação da atividade aceptora de radicais e antibacterianas. Esta pesquisa tem a finalidade de obter informações que direcionem a busca de compostos

candidatos a fármacos antibacterianos e/ou aceptores de radicais, que possam ser empregados como antioxidantes.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Antibacterianos e Resistência Bacteriana

A descoberta do antibiótico penicilina em 1939 revolucionou o tratamento de doenças infecciosas bacterianas e seu emprego proporcionou o aumento da expectativa de vida da população e a cura de diversas enfermidades causadas por bactérias patogênicas (GUIMARÃES, MOMESSO, PUPO, 2010). A partir da penicilina novas classes de antimicrobianos foram descobertas o que contribuiu para a expansão do arsenal terapêutico com ação antibacteriana. Entre estes se destacam diversos antibióticos e antibacterianos sintéticos como os macrolídeos, tetraciclina, derivados do cloranfenicol, fluorquinolonas, vancomicina, lincosamídicos, entre outros (GUIMARÃES, MOMESSO, PUPO, 2010).

Os antibacterianos apresentam mecanismos de ação molecular diferentes entre si e podem ser classificados de acordo com estes; a saber: fármacos que atuam na parede celular ou na membrana celular, inibidores da síntese proteica ou do DNA bacteriano (GUIMARÃES, MOMESSO, PUPO, 2010).

Neste cenário, as bactérias tem desenvolvido resistência aos antibacterianos disponíveis na terapêutica com resultante perda da eficácia ou mesmo do efeito do fármaco. A resistência bacteriana é grave problema de saúde pública, uma vez que apresenta distribuição global com índices acentuados de morbidade e mortalidade (SANTOS, 2004). A Organização Mundial da Saúde estimou no ano de 2014 que um paciente infectado pela bactéria *Staphylococcus aureus* metilicina resistente apresenta 64% maior de óbito em comparação a outro indivíduo contaminado com uma bactéria não resistente a antibióticos.

O surgimento da resistência se deve principalmente ao uso indiscriminado e inadequado dessa classe de medicamentos (SANTOS, 2004; NOVARETTI *et al.*, 2014). As causas do uso inapropriado de antibióticos variam em diferentes locais ou países, mas podem ser descritas de uma maneira geral como a realização de prescrições inapropriadas, uso sem prescrição médicas, compra de medicação para um dia de tratamento, entre outras (SANTOS, 2004; WANNMACHER, 2004).

A resistência bacteriana se torna particularmente grave quando ocorrem bacteremias em pacientes portadores do vírus da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). O tratamento indicado para indivíduos com quadro clínico de SIDA e com infecções bacterianas ocorre através do uso simultâneo de antibióticos potentes. Neste cenário, a ausência de defesas normais do organismo humano, aliado ao uso maciço de medicamentos, proporciona a formação de ambiente favorável ao surgimento de cepas mutantes e resistentes à terapêutica atual (TUMBARELLO *et al.*, 2002).

As bactérias patogênicas antibiótico-resistentes de maior relevância médica são *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp.*, também denominadas ESKAPE pela comunidade científica internacional. Estes microrganismos são conhecidos agentes causadores de infecções com elevada morbidade e mortalidade em indivíduos infectados em ambientes hospitalares (KUMARASAMY *et al.*, 2010, WRIGHT, 2012).

O tratamento das infecções causadas por bactérias antibiótico-resistentes ocorre através do emprego de fármacos considerados a última defesa contra infecções bacterianas como a vancomicina, as carbapenemas, a teicoplanina, a tigeciclina e a linezolida (RAYNER & MUNCKHOF, 2005). No entanto, a resistência bacteriana tem evoluído rapidamente, uma vez que já foram isoladas, em diversos locais do mundo, cepas de *Enterococcus spp.* vancomicina-resistentes e *Staphylococcus aureus* vancomicina-parcial resistentes, o que impede o uso da vancomicina (KURUP *et al.*, 2008). No Brasil, OLIVEIRA *et al.* (2001) isolaram cepas de *Staphylococcus aureus* vancomicina-parcial resistente em hospitais do estado de São Paulo. Estas cepas mostraram-se resistentes a dezenove tipos de antibióticos (OLIVEIRA *et al.*, 2001).

Diante destes fatos, os órgãos de saúde pública em todo o mundo tem buscado a realização de ações que possam bloquear o surgimento da resistência bacteriana, o que causa sobrecarga financeira a instituições de saúde e governos. COOPER e SHALES (2011) relatam que nos Estados Unidos os custos anuais em serviços hospitalares em decorrência da resistência bacteriana ultrapassam montantes de vinte bilhões de dólares.

A descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos de agentes que atuem por mecanismos de ação diferentes aos fármacos em uso atualmente é uma necessidade para a manutenção da saúde da população. As substâncias de origem natural são alternativas interessantes para a escolha de compostos candidatos ao desenvolvimento de novos fármacos, uma vez que podem apresentar estrutura diversa, muitas vezes complexa, dos agentes

químicos utilizados como fármacos antibacterianos. Estes compostos podem exercer atividade biológica por mecanismos de ação novos, através de interações específicas e reconhecimento por alvos macromoleculares em bactérias patogênicas (WALSH, 2003). A pesquisa de substâncias ativas oriundas da natureza com o objetivo de desenvolver novos agentes antibacterianos é uma alternativa viável para solucionar o problema da resistência. Neste contexto, a descoberta de novos alvos bioquímicos e a potencialização da atividade de compostos com atividade antimicrobiana conhecida são ferramentas de destaque na busca de novos agentes bioativos que sejam eficazes no tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes (WRIGHT, 2012).

4.2 Radicais Livres e Estresse Oxidativo

Espécies reativas de oxigênio (EROS) ou de nitrogênio (ERN) são compostos orgânicos ou inorgânicos que apresentam um ou mais elétrons não pareados centrados nos átomos de oxigênio e nitrogênio (HALLIWELL, 1991; VISIOLI, 2000). Em organismos vivos, estas substâncias são radicais formados a partir do metabolismo, como a oxidação proteica e respiração celular, entre outros processos, e exercem efeito sobre diversas estruturas e organelas celulares. Entre os principais efeitos citam-se a peroxidação lipídica e o dano oxidativo do DNA celular (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990; HALLIWELL, 2007). A formação das EROS no corpo humano, e a subsequente oxidação de moléculas biológicas, constituem um mecanismo de dano tecidual presente em vários processos patológicos como inflamação, derrame, infarto do miocárdio, arteroesclerose, doença de Alzheimer e Parkinson, e em alguns tipos de câncer (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; VICTOR *et al.* 2009; DE ROSA *et al.* 2010).

O organismo humano apresenta mecanismos de defesa antioxidante que podem prevenir o efeito tóxico causado pelas espécies reativas de oxigênio, como a glutatona peroxidase, e as enzimas catalase e superóxido dismutase (VISIOLI, 2000). No entanto, quando o volume de EROS formadas é muito grande o mecanismo de defesa do organismo não consegue evitar os danos causados pelos radicais livres. Desta forma, é necessário o uso de substâncias que possuam ação sequestrante de radical ou antioxidante, via alimentação ou de medicamentos, para auxiliar o organismo para evitar a ocorrência de danos celulares. Neste contexto, estudos e pesquisas que envolvem compostos de origem natural candidatos a

fármacos novos têm contribuído significativamente para ajudar na captação de radicais livres (SHEBIS *et al.*, 2013).

4.3 Produtos naturais na descoberta de fármacos

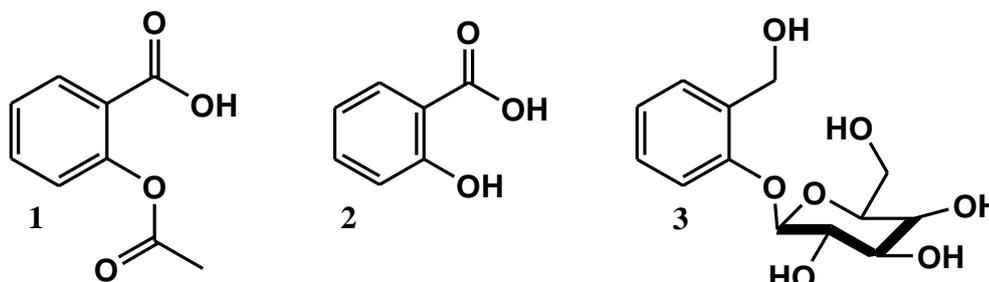
A natureza é uma fonte imensa de recursos naturais biologicamente ativos, que podem ser a origem de fármacos novos através de sua estrutura original ou adaptados por síntese química planejada (BAKER, 2007). As substâncias ativas naturais, desde muitos anos, contribuem para o tratamento de muitas doenças que atingem os seres humanos (MONTANARI & BOLZANI, 2001).

Atualmente, existem diversas estratégias e metodologias disponíveis para que se possa descobrir, planejar e obter fármacos novos, e a química de produtos naturais é uma ciência que complementa os processos utilizados com grande chance de êxito. Este fato é comprovado de acordo com os diversos casos históricos de descoberta de fármacos de origem natural, como a morfina, quinina, cânfora, e cocaína, o que contribuiu muito para o tratamento de diversas doenças (MANN, 1992; MONTANARI & BOLZANI, 2001). Neste cenário, observa-se que os primeiros estudos de fontes naturais, com fundamentação científica, se iniciaram a partir do século XIX com o isolamento de princípios ativos de plantas medicinais. Logo, com a estrutura isolada, foi realizada a síntese de suas estruturas químicas, a obtenção de análogos, e o aperfeiçoamento molecular que potencializou seu efeito.

Uma descoberta que marcou o desenvolvimento e aperfeiçoamento de fármacos foi o descobrimento dos salicilatos obtidos da planta *Salix alba*, conhecida popularmente como chorão ou salgueiro. Suas cascas foram utilizadas por séculos na Europa, Ásia e África, para tratar dor e febre. A partir do estudo desta planta foi obtido um glicosídeo natural, a salicilina, que foi identificada como princípio ativo principal (BARREIRO & BOLZANI, 2009). A partir desta molécula foi sintetizado o ácido salicílico que apresentava muitos efeitos colaterais. Com a finalidade de melhorar esses efeitos Felix Hoffmann sintetizou o ácido acetilsalicílico (AAS) em 1889, realizando um processo de acetilação do grupo hidroxila do ácido salicílico, o que caracterizou na obtenção de um fármaco sintético oriundo da otimização de um produto natural (VIEGAS, BOLZANI, BARREIRO, 2006). O AAS ainda é o analgésico mais consumido no mundo e continua em evidência como alvo de inúmeras pesquisas sobre suas aplicações terapêuticas (MENEGATTI *et al.*, 2001). A estrutura química dos derivados salicilatos é apresentada na figura 1.

Outro fato de destaque foi o descobrimento e desenvolvimento dos antibióticos que tiveram seu início a partir da descoberta da penicilina-G em 1928 por Alexander Fleming (BARREIRO & FRAGA, 2001).

Figura 1 – Estrutura química dos salicilatos (1) ácido acetil salicílico, (2) ácido salicílico e (3) salicina.



Os estudos sobre a relação entre estrutura química e atividade biológica com a finalidade de aplicação em planejamento racional de compostos bioativos de origem natural e sintéticos tiveram início na década de 40 do século XX, especificamente durante o período da segunda Guerra Mundial (YUNES, PEDROSA, CECHINEL, 2001). A aplicação deste processo no estudo dos derivados da penicilina auxiliou no desenvolvimento de ampla gama de antibióticos novos com estrutura análoga a penicilina e com vantagens terapêuticas em relação à penicilina original (HANSCH E DEUTSCH, 1965).

Durante o transcorrer do século XX, vários fármacos de origem natural (aminoglicosídeos, tetraciclina, macrolídeos, peptídeos, entre outros), eficazes para o tratamento de patógenos bacterianos, foram introduzidos entre os anos de 1960-1980, concomitantemente ao período onde os estudos sobre dosagens, utilização e administração de antibacterianos foram aprofundados (GUIMARÃES, MOMESSO, PUPO, 2010). Estas substâncias serviram como protótipos para o aperfeiçoamento de suas estruturas químicas originais. A partir da década de 80, as principais ferramentas utilizadas para a busca de novos antibióticos foram a genômica e as triagens de coleções de compostos, tanto para a projeção de novos fármacos, quanto para o entendimento do mecanismo de resistência bacteriana (GUIMARÃES, MOMESSO, PUPO, 2010).

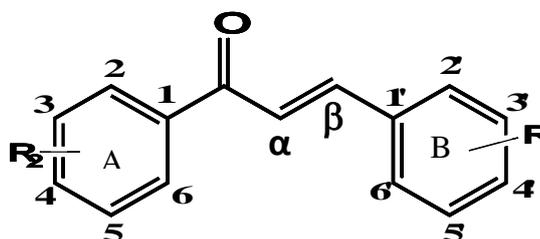
Nos dias atuais, a pesquisa e o desenvolvimento de novos fármacos segue um planejamento prévio das etapas de desenvolvimento de compostos candidatos a fármacos, onde os produtos naturais bioativos ainda são destaques, tanto como substâncias ativas ou como protótipos, o que contribui significativamente para o desenvolvimento de antibacterianos novos.

4.4 Chalconas

As chalconas são compostos precursores da via de biossíntese de flavonoides com distribuição ampla no reino vegetal, cuja estrutura apresenta grupo cromóforo que resulta em coloração que vai do amarelo até o vermelho (ANDERSEN & MARKHAM, 2006). As chalconas de origem naturais ocorrem principalmente na forma hidroxilada ou ligadas a hexoses (NAVARINI *et al.*, 2009), sendo que a classificação primária destas moléculas considera geralmente o número de grupos substituintes presentes no anel B. Neste contexto, os grupamentos químicos substituintes mais comuns ligados aos anéis aromáticos são as hidroxilas, metoxilas, *O*-glicosilas, *C*-glicosilas e *C*-alquilas (ZUANAZZI, 2002).

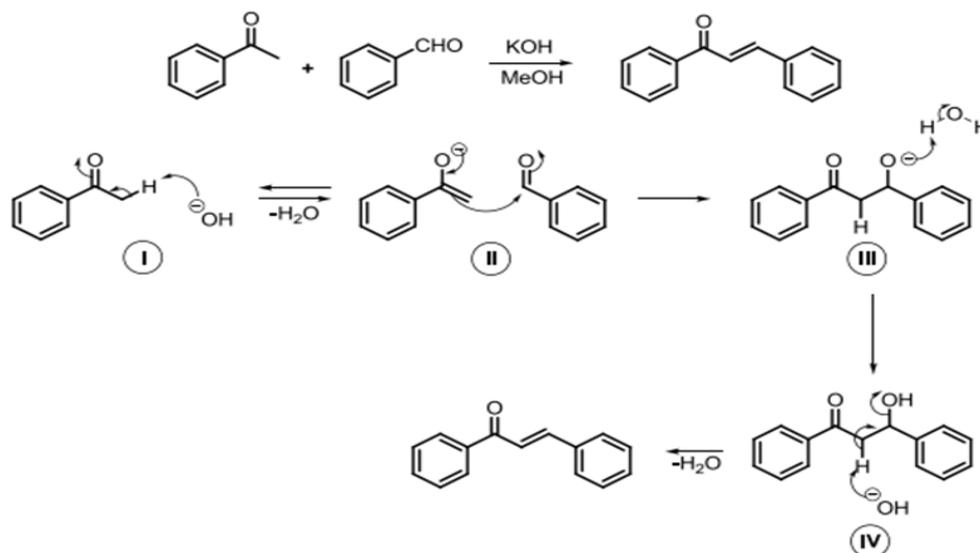
Segundo SIMÕES *et al.*, (2007), as chalconas são definidas quimicamente como 1,3-diaril-2-propen-1-onas, caracterizadas por cadeia aberta, com um fragmento enona de três carbonos ligados a dois anéis aromáticos. São cetonas α,β -insaturadas em que um anel aromático está diretamente ligado à carbonila (anel A) e o outro ao carbono β da função olefínica (anel B), figura 2.

Figura 2 – Estrutura química básica das chalconas.



Estas substâncias foram inicialmente sintetizadas em laboratório no século XIX (SHIMOKORIYAMA, 1962), sendo que são normalmente obtidas através da reação de condensação de Claisen-Schmidt entre uma cetona e um aldeído aromático em presença de catalisadores básicos. O uso desta reação para obtenção de chalconas é demonstrada na figura 3, onde na primeira etapa do mecanismo reacional o íon enolato é formado pela retirada de um próton do carbono α ao grupo carbonila, da metila, pelo íon hidroxila. O íon enolato reage com o aldeído aromático e forma o composto β -alcoxicetona, o qual é protonado pela água presente no meio. Logo em seguida ocorre uma reação de desidratação para a obtenção da cetona α,β -insaturada (CZAKO & KURTI, 2005).

Figura 3 – Mecanismo reacional da condensação Claisen-Schmidt (formação de intermediários I, II, III, IV e o produto final chalcona).



Fonte: Adaptado de VIEIRA, 2014.

As chalconas apresentam diversas atividades biológicas descritas na literatura, entre as quais citam-se as ações diurética, anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral, antimalarial, antifúngica, antimutagênica, inibitória da enzima β -lactamase, antimalárica, antileishmania, antitumoral, antioxidante, potencial agente antidiabético, entre outras (ISHITSUKA *et al.*, 1982; DIMMOCK *et al.*, 1998; DIMMOCK *et al.*, 1999; NIELSEN *et al.*, 2004; GO, WU, LIU, 2005; VALLA *et al.* 2006; PATIL *et al.*, 2007; BANDGAR & GAWANDE, 2009; HANS *et al.* 2010).

Neste contexto, a atividade antibacteriana e antioxidante das chalconas se encontra como as mais estudadas com vistas ao desenvolvimento de agentes terapêuticos (DEVIA, PAPPANO, DE BAPTISTA, 1998; LÓPEZ *et al.*, 2001; NOWAKAWSKA, 2007). As chalconas se apresentam desta forma como substâncias de origem natural com estrutura química protótipo para a realização de estudos visando explorar a atividade antibacteriana e antioxidante e se obter compostos bioativos candidatos a fármacos novos (DEVIA *et al.*, 1999).

4.4.1 Propriedade Antibacteriana das Chalconas

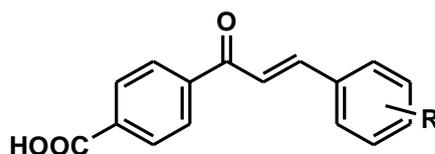
A atividade antibacteriana das chalconas isoladas da natureza ou sintetizadas tem sido amplamente registrada na literatura (NIELSEN *et al.*, 2004; NIELSEN *et al.* 2005; SIVAKUMAR, PRYA, DOBLE, 2009).

Alguns autores sugerem que a atividade antibacteriana esta associada à reatividade da função cetoenona α,β -insaturada (LÓPEZ *et al.*, 2001; YAZDAN *et al.*, 2015) ou podem interferir com a parede celular bacteriana (SIVAKUMAR, PRYA, DOBLE, 2009). Neste contexto, LI *et al.* (2016) demonstraram que uma chalcona inibe a enzima sortase A de *Listeria monocytogenes*, uma enzima cisteína transpeptidase que participa da formação da parede celular bacteriana.

Em relação à atividade antimicrobiana, a efetividade das chalconas e seus derivados frente a microrganismos Gram-positivos é frequentemente maior em comparação a bactérias Gram-negativas. No entanto, alguns análogos também podem inibir o crescimento de microrganismos Gram-negativos (OPLETALOVA, 2000), como já relatado para a bactéria *Escherichia coli* (ALVAREZ *et al.*, 2004). Já como relato da efetividade de tais compostos frente às cepas Gram-positivas se pode citar *Bacillus cereus* (ÁVILA *et al.*, 2008), *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* (ALCARAZ *et al.*, 2004; ÁVILA *et al.*, 2008), *Staphylococcus epidermidis* (DIMMOCK *et al.*, 1999), dentre outras.

NIELSEN *et al.* (2004) descreveram a aplicação de bioisosterismo ao grupo 4'-hidroxi nas hidroxichalconas e substituição por grupos bioisósteros de variados graus de acidez o que resultam em compostos mais potentes e mais solúveis (estrutura básica ilustrada na figura 4). Ao trocar o grupo hidroxila por um grupo carboxila resultou em um composto potente com uma elevada solubilidade aquosa. A otimização e a análise SAR resultou em chalconas carboxílicas solúveis e potentes possuindo dibromo ou trifluorometila na substituição no anel B. Os valores de MIC (concentração inibitória mínima) para estes compostos foram encontrados de 2 μ M e 40 μ M, respectivamente, quando testados contra a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*. A presença dos referidos grupos substituintes no anel B promoveu elevação do carácter lipofílico na citada região molecular, enquanto que o grupo ácido carboxílico no anel A contribuiu para a solubilidade aquosa requerida.

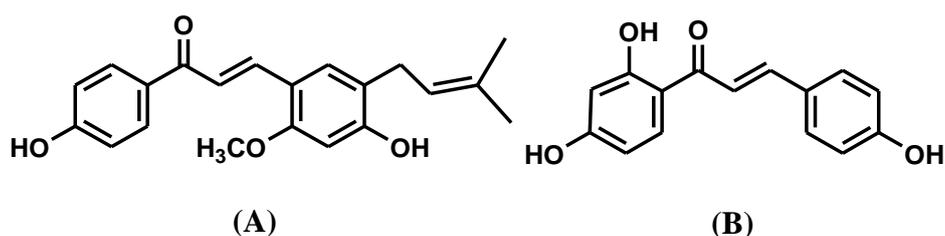
Figura 4 – Estrutura química básica das 4-carboxichalconas obtidas por Nielsen *et al.* 2004.



TSUKIYAMA *et al.* (2002) isolou os compostos retrochalcona e licochalcona-C a partir *Glycyrrhiza inflata* e submeteu as mesmas a avaliação da atividade antibacteriana frente

a 17 cepas de microrganismos e verificaram que as substâncias apresentaram forte atividade contra a cepa *Bacillus spp.* Em outro estudo, MACHADO *et al.* (2005) isolaram a isoliquiritigenina, que mostrou atividade antibacteriana frente a *S. aureus*, cepas Gram-positivas. A estrutura química da licochalcona C e da isoliquiritigenina estão demonstradas na figura 5.

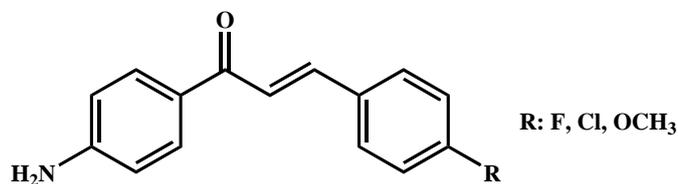
Figura 5 – Estrutura química da licochalcona-C (A) e isoliquiritigenina (B).



Nos trabalhos desenvolvidos por Nielsen *et al.* (2004 e 2005), os autores testaram análogos de chalconas contra *Staphylococcus aureus* e concluíram que a presença do grupo hidroxila em posição C-4' é importante para a atividade antibacteriana.

Segundo PRASAD *et al.* (2009), estudos com 4-aminochalconas têm demonstrado atividade antimicrobiana similar ou superior a fármacos antibacterianos disponíveis na terapêutica, como a penicilina G contra *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris* e *Escherichia coli*. As estruturas químicas dos compostos podem ser observadas na figura 6. Outro derivado, a 3-aminochalcona apresentou potência superior frente à *Escherichia coli*, sendo similar à antibiótico amicacina (PRASAD, 2009).

Figura 6 – Estrutura química de 4-aminochalconas com atividade bactericida.



Fonte: Adaptado de PRASAD, 2009.

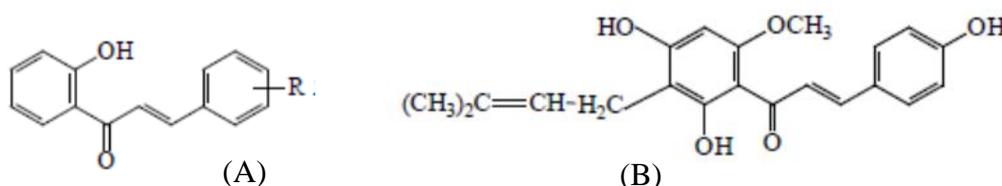
4.4.2 Propriedade Antioxidante das Chalconas

As chalconas são compostos que apresentam capacidade de atuar como agenteceptor de EROs, e conseqüentemente como antioxidante, na inativação dos radicais livres em compartimentos celulares lipofílicos e hidrofílicos. Este efeito é determinado pela presença de grupamentos hidroxila (-OH) presente em sua estrutura que podem doar elétrons e suportar a deslocalização em torno do sistema aromático (CERQUEIRA, MEDEIROS, OHARA, 2007). Desta forma, as chalconas contribuem para inibição e redução das lesões causadas por radicais livres nas células.

A modulação das propriedadesceptoras de radicais das chalconas ocorre a partir da inserção de grupos hidroxila ou metoxi nos anéis aromáticos, isto é, de acordo com o padrão de substituição de sua estrutura química. Um exemplo deste processo foi descrito por SIVAKUMAR, PRABHAKAR, DOBLE (2011) que avaliaram a capacidadeceptorade radicais de 25 chalconas *in vitro*, com substituintes metoxila (-OCH₃) e tiometila (-SCH₃) no anel A e OH no anel B, respectivamente, e observaram atividade comparado ao ácido ascórbico e BHT (butilhidroxitolueno), no ensaio de eliminação de radicais DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidracilo).

Em outro estudo, DINKOVA-KOSTOVA *et al.* (2001) avaliaram um grupo de 2-hidroxicalconas e verificaram que alguns representantes desta classe de compostos elevam a concentração de glutatona *in vitro*, o que está relacionado com maior proteção do organismo contra o dano causado por EROs. MIRANDA *et al.* (2000), estudaram chalconas preniladas contendo grupos substituintes hidroxila, e substâncias análogos e verificaram que estas moléculas apresentaram atividade antioxidante promissora no ensaio de TBARS *in vitro*.

Figura 7– Estrutura química dos derivados da 2-hidroxicalcona (A) e chalcona prenilada (B).



KIM *et al.* (2008) prepararam uma série de chalconas hidroxiladas com diversos substituições nos anéis A e B, e suas atividadesceptoras de radicais foram avaliadas pelo teste DPPH. Os compostos com substituintes na posição *orto*, *meta* e *para* dos anéis (2',4' e

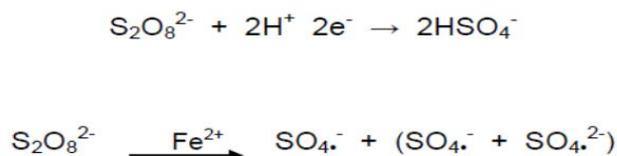
3',4') (2',5'), mostraram excelentes atividades antioxidantes comparados ao ácido ascórbico e ácido α -tocoferol, utilizados como substâncias de referências. Já compostos com substituição em posição *meta* tiveram sua atividade reduzida comparada ao controle. Portanto os resultados indicam que a substituição de dois grupos hidroxila no anel B são fatores estruturais importantes melhoria da atividade sequestradora de radical. Enquanto a substituições no anel A, não aparenta exercer influência na atividade antioxidante.

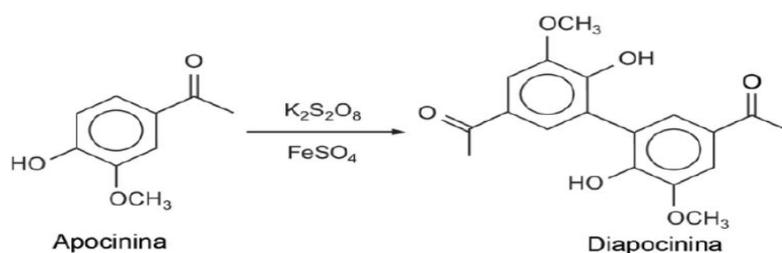
4.5 Apocinina e seu Dímero Diapocinina

A apocinina é uma molécula de estrutura pequena com diversas atividades biológicas citadas na literatura (DASARI *et al.*, 2008). Foi isolada pela primeira vez das raízes de *Apocynum cannabinum* (cânhamo canadense) em 1883. Esta substância foi isolada também da raiz *Picrorhiza kurroa* (Scrophulariaceae), que é uma planta nativa pequena, perene cresce em altitudes elevadas nas montanhas da Índia, Nepal, Tibet, e do Paquistão, conhecida na medicina tradicional indiana (*Ayurveda*) (LUCHTEFELD *et al.*, 2008).

Apocinina é uma acetofenona, 4'-hidroxi-3'-metoxi-acetofenona, ligeiramente solúvel em água fria, mas muito solúvel em água quente, álcool, benzeno, clorofórmio e éter. Sua estrutura pode ser oxidada e em certas condições resultar na formação do seu dímero, a diapocinina. Com a utilização do persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$) e de sulfato de ferro II ($FeSO_4$), a reação de oxidação ocorre rapidamente (LUCHTEFELD *et al.*, 2008; DASARI *et al.*, 2008). A diapocinina pode ser encontrada no corpo humano a partir da biotransformação da apocinina por uma enzima peroxidase, que promove a oxidação desta substância e consequente formação do dímero (STOLK *et al.*, 1994; XIMENES *et al.*, 2007). O esquema da reação de síntese da diapocinina a partir da apocinina pode ser visualizado na figura 8 a seguir.

Figura 8 – Esquema de oxidação da apocinina catalizado pelo ferro e formação da Diapocinina.





Fonte: Adaptado de SMITH *et al.*, 2008.

A apocinina apresenta ação de inibição de NADPH oxidases, aceptora de radical, e inibição da produção dos mediadores fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e da interleucina-10 (IL-10) liberados em leucócitos polimorfonucleares (HEUMÜLLER *et al.*, 2008; KANEGAE *et al.*, 2010; PETRÔNIO *et al.*, 2013). As NADPH oxidases (NOXs) são uma família de enzimas que catalisam a redução de elétron único de oxigênio molecular. Seu produto, o radical ânion superóxido (O^{2-}), é o precursor para muitas espécies reativas de oxigênio (ROS), incluindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila (OH), e ácido hipocloroso (HOCl), que são essenciais para a função microbicida oxidativa das células (BABIOR, 2004).

Segundo STENFANSKA & PAWLICZAK (2008), o mecanismo de inibição das NADPH oxidases não é totalmente conhecido, mas envolve o comprometimento da translocação para a membrana do p47-phox e p67-phox componente citosólica do complexo de NADPH-oxidase (STOLK *et al.*, 1994; JOHNSON *et al.*, 2002). Além disso, sugere-se que a apocinina também iniba a expressão de NOX, tais como p47-phox, p67-phox e gp91-phox (HUR *et al.*, 2010; LI, *et al.*, 2012).

No contexto apresentado, HEUMÜLLER *et al.* (2008) sugeriram que a apocinina apresenta um efetivo inibidor na formação em neutrófilos e macrófagos de peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila tóxicos a células humanas, sem interferir na formação de outras espécies reativas. ALMEIDA *et al.* (2011) sintetizaram um composto derivado da apocinina, com átomo de flúor na posição do grupo acetil, que inibiu a produção de EROs de maneira mais eficiente em comparação a apocinina. No presente estudo, os autores sugerem que este composto se apresenta como alternativa a ser submetida a pesquisas de desenvolvimento de um novo agente anti-inflamatório e acceptor de radical.

Outros compostos estruturalmente similares a apocinina, como a vanilina e o ácido vanílico, também apresentam efeitos de aceptores de radicais livres. CASTOR *et al.* (2010) atribuiu também a estes três compostos a capacidade de exercer efeito pró-oxidante frente a

compostos endógenos do organismo humano, como a glutatona. Este fato pode conduzir a um desequilíbrio redox intracelular e causar danos a tecidos e células. Estes resultados indicam que há necessidade da realização de novos estudos para se estabelecer os efeitos benéficos ou tóxicos causados por esta substância e seus análogos naturais ou sintéticos.

A apocinina também tem sido extensivamente estudada para fins de pesquisa e obtenção de substâncias com atividade antibacteriana. Em estudos relatados por JANAKI *et al.*, 2013, novas chalconas derivadas da apocinina e foram obtidas e submetidas a avaliação da atividade antibacteriana contra as bactérias gram-negativas e gram-positivas. Os resultados apresentados revelaram que entre os análogos testados, os compostos com anéis heteroaromáticos tais como benzofurano, furano e piridina exibiram excelente atividade antibacteriana. Enquanto os compostos contendo flúor na sua estrutura apresentaram atividade antibacteriana reduzida.

HEUMÜLLER *et al.* (2008) recomendaram que estudos que abordem atividades biológicas causadas pela apocinina devem, se possível, considerar a avaliação da diapocinina em paralelo, uma vez que o efeito desta pode ser maior em relação a substância de origem. Neste contexto, DASARI *et al.* (2008) sugeriram que a avaliação do efeito tóxico dos compostos diapocinina deve ser realizado uma vez que os dados disponíveis até o citado ano eram muito limitados e não proviam informações importantes sobre a aplicação segura deste como fármaco. Neste cenário, as atividades aceptoras de radicais e antibacteriana de derivados da apocinina e das chalconas, descritas na literatura, evidenciam a necessidade de realização de novos estudos envolvendo estas moléculas bioativas.

4.6 Planejamento e desenvolvimento de novos fármacos

O surgimento de moléculas naturais isoladas ou sintéticas a serem utilizados na terapêutica teve seu início em meados do século XIX e apresentou crescimento amplo durante o transcorrer do século XX. Este processo ocorreu principalmente pelo desenvolvimento de conhecimento, tecnologias novas e da introdução de metodologias experimentais e teóricas que proporcionaram o planejamento de estruturas químicas candidatas a novos fármacos. Diante desse processo a aplicação de ferramentas de planejamento de compostos bioativos e fármacos têm alcançado destaque no desenvolvimento de novas moléculas com atividade biológica (BARREIRO, 2002; GUIDO, 2010).

Atualmente, o processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos é dividido em duas fases: sendo a fase I chamada de descoberta, pré-clínica ou pesquisa básica, e a fase II

clínica. Na fase I, as pesquisas se direcionam a identificação e otimização de moléculas pequenas com potencial de desenvolvimento clínico e da avaliação dos efeitos biológicos e tóxicos, além da elucidação do mecanismo de ação molecular. Na fase II os compostos bioativos promissores são submetidos à avaliação em conjunto de pessoas saudáveis ou enfermas para fins de investigação da principalmente da eficácia e dosagem a ser utilizada, além da verificação de ocorrência de possíveis efeitos tóxicos *in vivo*, e avaliação de características ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção, toxicidade) (GUIDO, 2010). A pesquisa de fármacos apresenta período de tempo de até 12 anos desde o processo do desenvolvimento de um novo fármaco para introdução de um novo medicamento na terapêutica (SILVA, 1998).

O planejamento de fármacos é o conjunto de ferramentas ou estratégias utilizadas para direcionar a modificação molecular da estrutura química de um determinado composto bioativo com o objetivo de aperfeiçoar a sua atividade biológica e/ou diminuir a sua toxicidade. Estas ferramentas têm como finalidades facilitar a obtenção, alterar as propriedades físico-químicas para beneficiar o seu uso, facilitar a compreensão sobre o mecanismo de ação e aperfeiçoar o perfil farmacológico de uma molécula bioativa. O uso destas metodologias pode reduzir o tempo de pesquisa utilizado para concluir a fase I do desenvolvimento de fármacos.

As principais estratégias experimentais utilizadas no planejamento de fármacos envolvem a modificação molecular da estrutura de uma molécula protótipo realizada através de suas propriedades físico-químicas ou biológicas. A modificação molecular, também chamada de variação molecular ou manipulação molecular, é uma estratégia de aperfeiçoar atividade farmacológica, de um composto biologicamente ativo (KOROLKOVAS & FERREIRA, 1988). Esta metodologia leva à identificação de novos compostos que podem atuar pelos mesmos mecanismos de ação de um protótipo, sendo conhecidos como análogos. As principais metodologias são a simplificação, adição, replicação e hibridização molecular, e bioisosterismo.

Entre estas estratégias de modificação estrutural destaca-se a hibridização molecular, que é uma ferramenta que combina estruturas químicas ou grupos farmacofóricos de duas moléculas ativas visando à obtenção de um híbrido novo com melhor eficácia terapêutica que os protótipos originais (VIEGAS *et al.*, 2007). Desta forma, esta ferramenta pode ser baseada na junção de fármacos distintos (hibridização molécula tipo estrutura-estrutura) ou de grupos farmacofóricos de fármacos distintos (hibridização molecular do tipo farmacofórica)

(ARAÚJO *et al.*, 2015). Esta ferramenta tem as finalidades de promover a ocorrência de sinergismo de ação farmacológica, possibilitar a terapia de dupla ação farmacológica, ou modular os efeitos secundários não desejáveis (NEPALI *et al.*, 2014).

As principais estratégias teóricas envolvem a aplicação de métodos computacionais para o planejamento de novos compostos bioativos. Estas podem ser divididas em abordagem direta, quando se conhece e se usa a estrutura química de uma biomacromolécula alvo (receptor), e a indireta, quando somente se usa a estrutura química do composto bioativo (ligante) objeto de estudo. As principais ferramentas da abordagem direta são o ancoramento molecular (*Docking*), *de novo* design, e a triagem virtual (*Virtual Screening*). As principais estratégias da abordagem indireta são a modelagem molecular da estrutura química e propriedades físico-químicas dos ligantes, o estudo de farmacóforo e das relações entre estrutura química e atividade biológica (qualitativa, REA, e quantitativa, QSAR – do inglês *Quantitative structure active-relationship*), e busca de similaridade estrutural (MONTANARI, 2010).

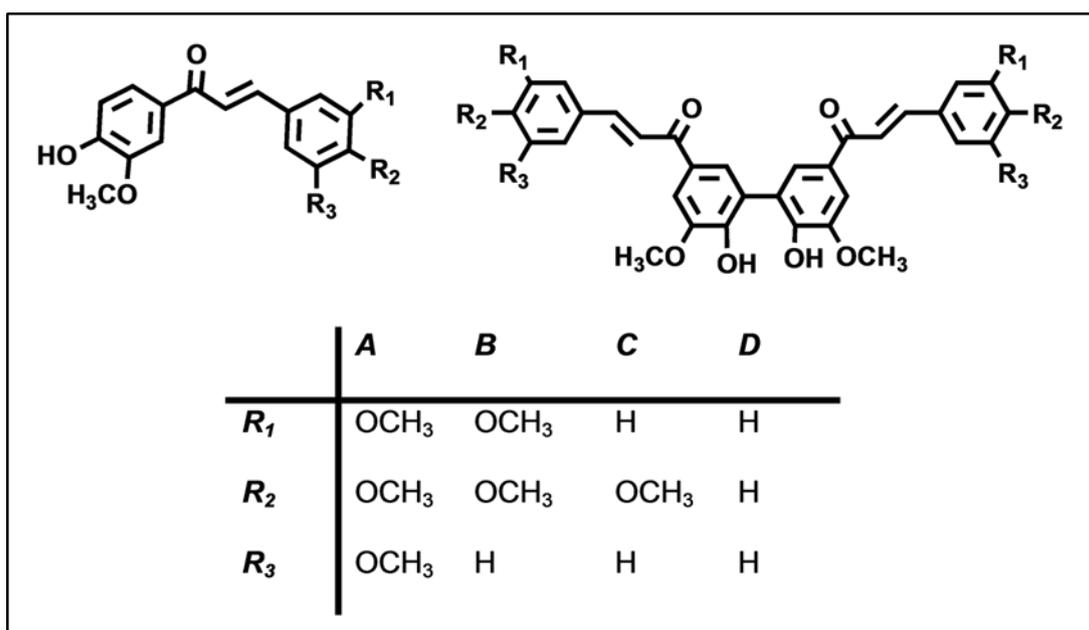
A modelagem molecular é um conjunto de técnicas computacionais utilizadas para desenho, determinação e visualização *in silico* da estrutura química de fármacos, ligantes e da macromolécula alvo, e para a obtenção de suas propriedades físico-químicas estereoeletrônicas e de hidrofobicidade (BARREIRO *et al.*, 1997; TANG *et al.*, 2006). Esta ferramenta é uma estratégia geralmente utilizada para identificar, classificar e quantificar as propriedades que possam exercer contribuições da estrutura química, e suas propriedades, sobre a atividade biológica. De posse destes dados é possível delinear as ações a serem realizadas no processo de substituição molecular e no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (BARREIRO E FRAGA, 2008). Em outras palavras, as alterações moleculares são efetuadas a partir das propriedades físico-químicas que condicionam a ação dos compostos bioativos e com isso é possível se obter candidatos a fármacos com potencial aplicação na terapêutica.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Planejamento das Chalconas

O padrão de substituição das chalconas derivadas da apocinina envolveu a ausência e inserção de grupos metoxilas ligados as posições 3 (R_1), 4 (R_2) e 5 (R_3). Os derivados chalconas da diapocinina seguiram a aplicação de ferramenta de sugestão de modificação molecular intitulada replicação molecular, seguindo o mesmo padrão de substituição das chalconas de apocinina, figura 9. Desta forma, é possível avaliar a influência das propriedades de lipofilicidade e de volume molecular entre os compostos derivados da apocinina e da diapocinina sobre as atividades aceptora de radicais e antibacteriana.

Figura 9 - Padrão de substituição das chalconas derivadas da apocinina e da diapocinina.



5.2 Reagentes

Os benzaldeídos, a apocinina, o 2,2-difenil-1-picrildrazil (DPPH), 2,6-di-terc-butil-4-metil-fenol (BHT), o 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), e o persulfato de potássio utilizado no trabalho foram de grau sintético (Sigma-Aldrich®, USA). O sulfato ferroso, o cloreto férrico e o ferrocianeto de potássio foram de grau analítico (Vetec, Brasil). Os demais reagentes utilizados como etanol, diclorometano, DMSO, metanol foram

de grau analítico (Sigma-Aldrich[®], Merck[®] e Vetec[®]). Os reagentes foram adquiridos junto à Sigma-Aldrich, USA. Utilizou-se água destilada e desionizada Milli-Q.

5.3 Equipamentos

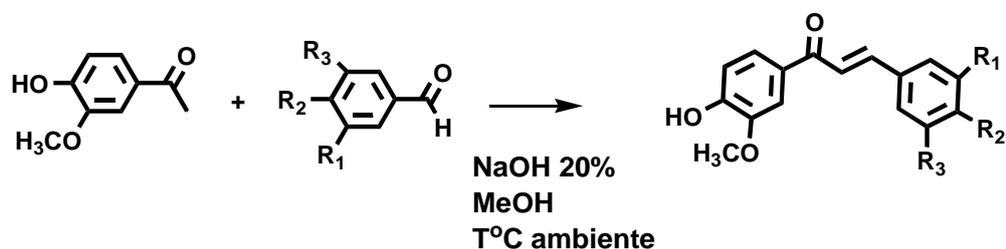
Os equipamentos utilizados neste trabalho foram Espectrofotômetro UV/Vis Agilent, Espectrofotômetro de Infravermelho médio com acessório de reflexão atenuada Perkin Elmer (ATR-FTIR); Evaporador rotativo digital Büchi R-215; Estufa de cultura bacteriológica; Fusiômetro digital Gehaka PF1500 FARMA, Agitador magnético com aquecimento Fisaton, balança analítica Shimadzu, DSC Shimadzu, Autoclave.

5.4 Obtenção dos compostos estudados

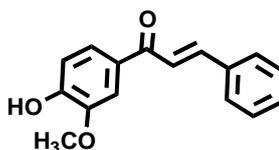
5.4.1 Chalconas derivadas da apocinina

Para a síntese das chalconas foi empregada a reação de condensação de Claisen-Schmidt onde a acetofenona (3 mM) foi inicialmente dissolvida em metanol e em solução de NaOH (10%) e logo após foi inserido o respectivo benzaldeído (3 mM) no meio reacional. A mistura foi posta em agitação em temperatura ambiente pelo período de 10 a 24 horas, figura 10. Após o término da reação, a mistura de reação foi acidificada com solução de HCl (2 M) e o precipitado formado foi filtrado sob pressão reduzida. Os compostos foram purificados por recristalização em etanol ou por cromatografia em coluna (BATOVSKA *et al.*, 2007; NIELSEN *et al.*, 2004).

Figura 10 - Esquema de reação de obtenção da chalconas derivadas da apocinina.

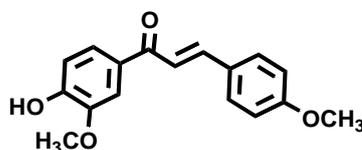


5.4.1a Síntese das chalconas derivadas da apocinina

(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-phenylprop-2-en-1-one

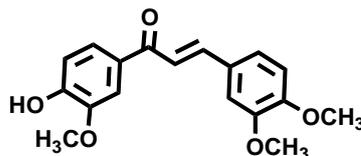
Para a síntese da Apocinina-H, utilizou-se 0,600g acetofenona (hidroxi -3-metoxiacetofenona) (3,54mM) e adicionou-se 550µL benzaldeído-H (3,54mM), onde foram dissolvidos em 40mL de metanol e 15mL de solução de NaOH (20%). A mistura foi exposta sob agitação pelo período de 10 a 24 horas, sob a proteção da luz, e em temperatura ambiente. Após o término da reação, o composto formado foi acidificado em pH 1 com solução de HCl (2 M) e o precipitado formado foi filtrado sob pressão reduzida. A seguir, foi recolhido e armazenado no dessecador. (BATOVSKA *et al.*, 2007; NIELSEN *et al.*, 2004).

Fórmula Molecular: C₁₆H₁₄O₃

(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one

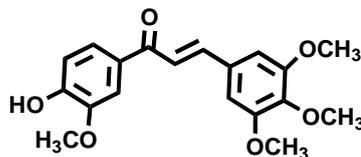
Utilizou-se 0,600g da apocinina (3-metoxi-4-hidroxi acetofenona) (3,54mM) onde foram dissolvido em 40 mL de metanol e 15 mL de solução de NaOH (20%). Logo após, acrescentou-se 430µL de 4-metoxibenzaldeído (3,54mM). A mistura foi exposta sob agitação, pelo período 10 a 24 horas, sob a proteção da luz, em temperatura ambiente. Após o término da reação, o composto formado foi acidificado em pH 1 em solução de HCl (2 M) e o precipitado formado foi filtrado sob pressão reduzida. Em seguida, foi recolhido e armazenado no dessecador (BATOVSKA *et al.*, 2007; NIELSEN *et al.*, 2004, HARA *et al.*, 2014, WU, *et al.*, 2012).

Fórmula Molecular: C₁₇H₁₆O₄

(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one

Utilizou-se 0,600g de acetofenona (hidroxi-3-metoxiacetofenona) (3,54mM) e adicionou-se 0,594g de 3,4-metoxibenzaldeído (3,54mM), onde foram dissolvidos em 40mL de metanol e 15mL de solução de NaCl (20%). Em seguida, a mistura foi mantida sob agitação, pelo período de 10 a 24 horas, sob proteção da luz, e em temperatura ambiente. Após o término da reação, o composto formado foi edificado em pH 1 em solução de HCl (2 M), e o precipitado formado foi filtrado sob pressão reduzida. Logo após, foi recolhido e armazenado em dessecador (BATOVSKA *et al.*, 2007; NIELSEN *et al.*, 2004, JANAKI, *et al.*, 2013, HARA *et al.*, 2014).

Fórmula Molecular: C₁₈H₁₈O₅

(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one

Utilizou-se 0,600g de acetofenona (hidroxi -3-metoxiacetofenona) (3,54mM) e adicionou-se 0,708g de Trimetoxibenzaldeído (3,54mM), onde foram dissolvidos em 40 mL de metanol e 15mL de solução de NaOH (20%). A mistura foi exposta sob agitação, pelo período de 10 a 24 horas, sob a proteção da luz, e em temperatura ambiente. Após o término da reação, o composto formado foi acidificado em pH 1 em solução de HCl (2 M). O precipitado formado foi filtrado sob pressão reduzida. Logo após, foi recolhido e armazenado em dessecador (BATOVSKA *et al.*, 2007; NIELSEN *et al.*, 2004, HARA *et al.*, 2014).

Fórmula Molecular: C₁₉H₂₀O₆

5.5 Síntese da Diapocinina

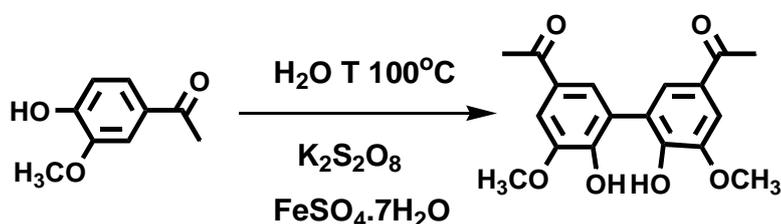
Bis-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)ethanone

A diapocinina foi sintetizada conforme descrito por DAMASI *et al.* (2008), onde foi pesada 2g de apocinina (acetovallinone, Sigma-Aldrich) e dissolvida em 200mL água

desionizada, sob agitação e aquecimento constante, até solução entrar em ebulição suave. Após essa etapa foi adicionado 0,15g sulfato ferroso e 1,6g persulfato de potássio. Após 5 minutos sob agitação, o precipitado formado foi filtrado a quente e a vácuo. A purificação da diapocinina ocorreu através de recristalização em solução de 25 mL de NaOH 3 M e, 15 mL de HCl 6 M, sob agitação. Após esta etapa lavou-se o precipitado formado com água fervente por três vezes. O produto foi seco em dessecador.

Fórmula Molecular: C₁₈H₁₈O₆

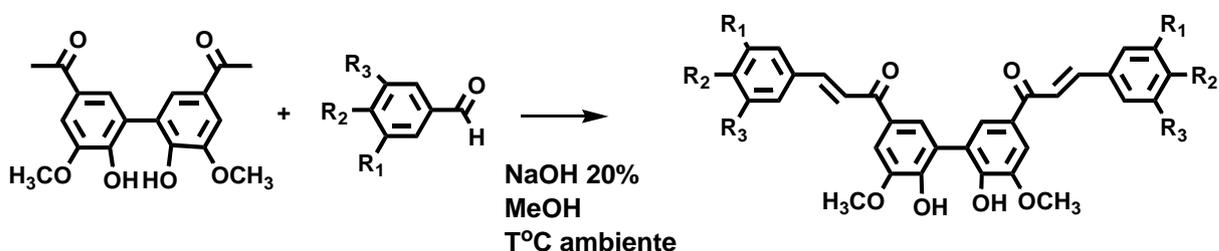
Figura 11: Esquema de reação de obtenção da diapocinina a partir da apocinina.



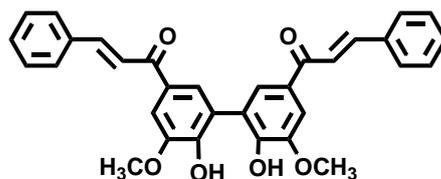
5.5.1 Chalconas derivadas da diapocinina

Os derivados de chalconas da diapocininas foram sintetizados com o emprego do método utilizado para a obtenção das chalconas derivadas da apocinina com adaptação. Foi utilizado o dobro da concentração de aldeídos utilizada para fins de reação com os dois grupamentos acetil da diapocinina.

Figura 12: Esquema de obtenção de chalconas derivadas da diapocinina a partir de benzaldeídos e diapocinina. Condições e reagentes: NaOH 20%, MeOH, T °C ambiente, 10 a 24 horas.



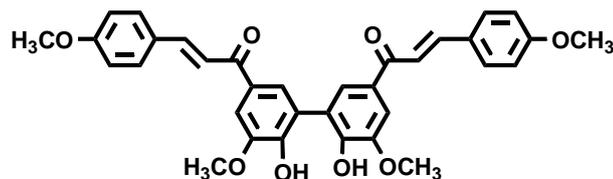
Bis-(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-phenylprop-2-en-1-one



Para a síntese da chalcona não substituída derivada da diapocinina, utilizou-se 0,100g (0,302mM) de diapocinina e dissolveu-se em 25 mL de metanol e 10mL de solução de NaOH (20%). Logo em seguida acrescentou-se 31 μ L de benzaldeído não substituído (0,302mM). A mistura foi submetida à agitação em temperatura ambiente por um período de 24 horas, sob a proteção da luz. Após o término da reação, o composto formado foi acidificado em pH 1 em solução de HCl (2 M). O precipitado formado foi filtrado sob pressão reduzida. Logo após, foi recolhido e armazenado em dessecador (LUO, 2008).

Fórmula Molecular: C₃₂H₂₆O₆

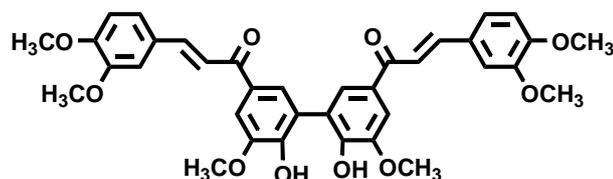
Bis-(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one



Utilizou-se 0,100g (0,302mM) de diapocinina, e adicionou-se 37 μ L (0,302mM) metoxi-benzaldeído, onde foram dissolvido em 25mL de metanol e 10mL de solução de NaOH (20%). A mistura foi exposta sob agitação, pelo período de 24hs, em temperatura ambiente, sob proteção da luz. Logo após o término da reação, o composto formado foi acidificado em pH 1 em solução de HCl (2 M). O precipitado formado, foi filtrado sob pressão reduzida. Em seguida, foi recolhido e armazenado em dessecador (LUO, 2008).

Fórmula Molecular: C₃₄H₃₀O₈

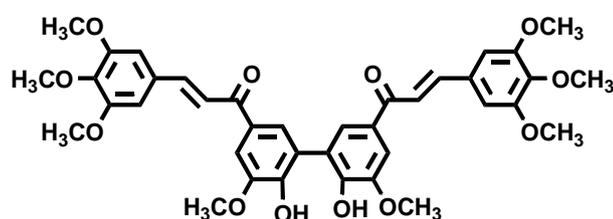
Bis-(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one



Para a síntese da Dimetoxi-Diapocinina, utilizou-se 0,100g (0,302mM) de diapocinina e adicionou-se 0,051g de 3,4-metoxi - benzaldeído (0,302mM), onde foram dissolvidos em 25mL de metanol e 10mL de solução de NaOH (20%). A mistura foi exposta sob agitação, pelo período de 24 horas, em temperatura ambiente, sob a proteção da luz. Após o término da reação, o composto formado foi acidificado em pH 1 em solução de HCl (2 M) .O precipitado formado foi filtrado sob pressão reduzida. Em seguida, foi recolhido e armazenado em dessecador (LUO, 2008).

Fórmula Molecular: $C_{36}H_{34}O_{10}$

Bis-(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one



Utilizou-se 0,100g (0,302mM) de diapocinina e acrescentou-se 0,120g de Trimetoxi - benzaldeído (0,302mM), onde foram dissolvidos em 25mL de metanol e 10mL solução de NaOH (20%). A mistura foi exposta sob agitação, pelo período de 10 a 24 horas, em temperatura ambiente, sob a proteção da luz. Após o término da reação, o composto formado foi acidificado em pH 1 com solução de HCl (2 M) . O precipitado formado foi filtrado sob pressão reduzida. Em seguida, foi recolhido e armazenado em dessecador (DASARI *et al.*, 2008).

Fórmula Molecular: $C_{38}H_{38}O_{12}$

5.6 Caracterização Estrutural das chalconas

A comprovação da obtenção das chalconas planejadas foi realizada por meio de análise do ponto de fusão (com o uso de fusiômetro ou análise térmica DSC Shimadzu), de espectroscopias de infravermelho e ressonância magnética nuclear de próton e carbono 13 (RMN 1H e RMN ^{13}C).

As análises de ressonância magnética nuclear foram realizadas na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP-SP, em colaboração com o Prof. Dr. Gustavo Henrique Goulart Trossini.

5.7 Avaliação da atividade aceptora de radicais dos compostos estudados

A avaliação da atividade antioxidante dos compostos obtidos foi realizada através dos métodos do ensaio sequestrante de radical pelo DPPH e da atividade antioxidante total pelo radical ABTS.

5.7.1 Ensaio sequestrante de radical pelo DPPH em microplacas

a) Determinação da curva do DPPH

Para a realização deste ensaio foi preparada uma solução inicial de DPPH em concentração de 100 μM em metanol. A seguir foram preparadas soluções nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 μM e mantidas em ambiente escuro e transferidas para cubetas de vidro para a realização de leituras em espectrofotômetro UV/Visível a 550nm. O metanol foi utilizado como solvente de calibração. A partir das leituras foi obtida a curva de calibração da análise do DPPH.

b) Preparo de soluções e análise

Para a realização do ensaio da capacidade de inibição de radical DPPH foram preparadas as seguintes soluções: solução metanólica de DPPH 0,1mM; solução metanólica de cada composto em concentração de 2,0 mM; solução metanólica de antioxidante BHT 2,0 mM, utilizado como controle positivo (MIRANDA & FRAGA, 2006).

c) Ensaio DPPH

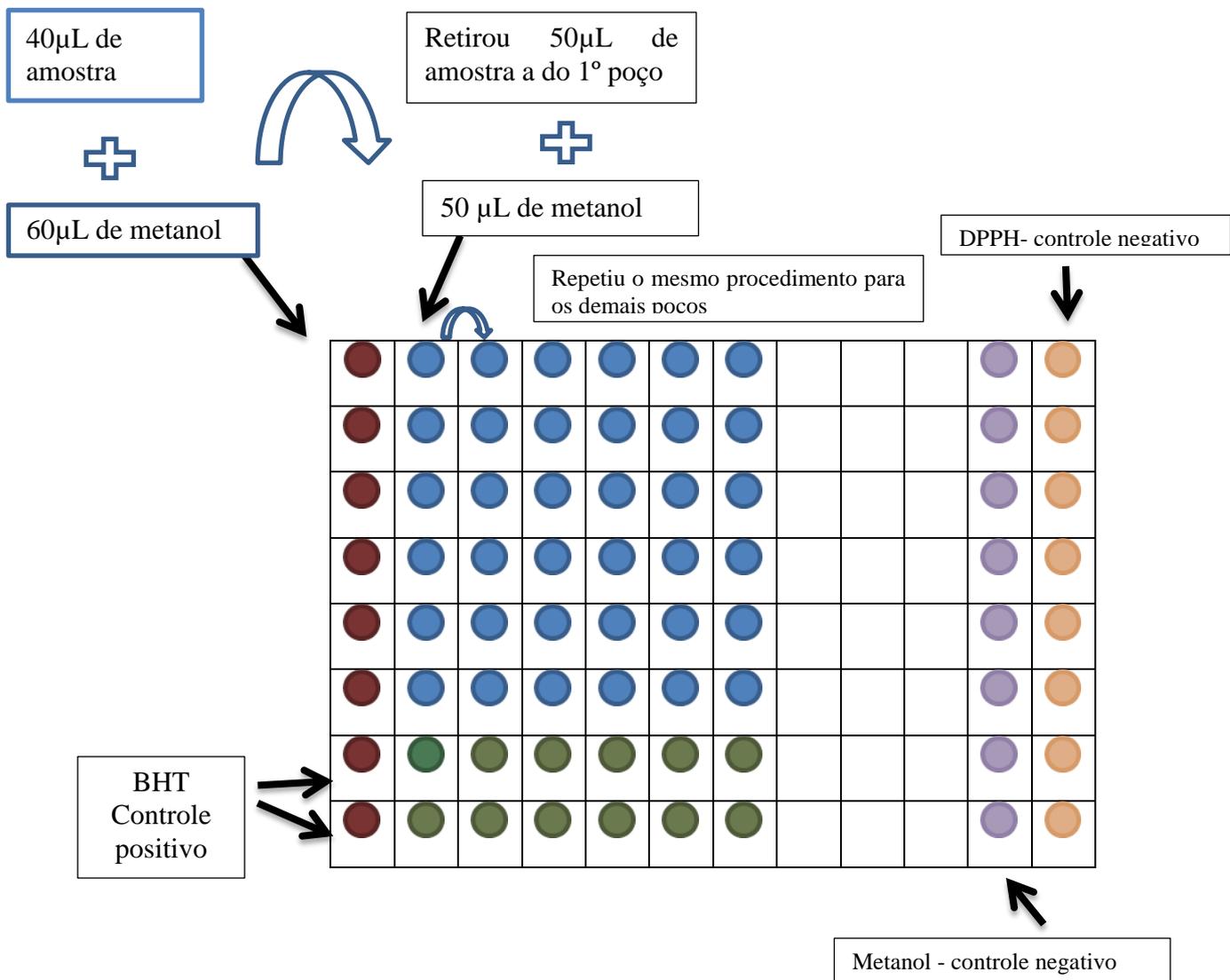
Adicionou-se a solução de 400 μM de cada composto nos primeiros poços na placa e em seguida foi realizada as diluições até se atingir as concentrações 200 μM , 100 μM , 50 μM , 25 μM , 12,5 μM e 6,25 μM . Após esta etapa foram adicionados 50 μL da solução de metanol e da solução de DPPH. A placa foi mantida em ambiente escuro por 30 minutos, e em seguida

foi feitas as leituras em um espectrofotômetro UV-VIS no comprimento de onda de 550 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata. A inibição da coloração foi expressa em porcentagem de atividade sequestradora (%), através da fórmula (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006).

$$\% = \frac{Ac - Aa}{Ac} \times 100$$

%: Atividade sequestradora
Ac: Absorbância do controle
Aa: Absorbância da amostra

Figura 13. Esquema de diluições dos compostos estudados.



5.7.2 Atividade antioxidante total pelo radical ABTS em microplacas

a) Preparo das soluções

Para realização do ensaio de determinação de inibição do ABTS foram preparadas as soluções de ABTS 7,0 mM (estoque), persulfato de potássio e trolox. Para a solução de ABTS pesou-se 192 mg de ABTS e dissolveu-se em água destilada. A solução foi transferida para balão volumétrica de 50 mL e completou-se o volume com água destilada. Esta solução foi armazenada sob refrigeração em período de até um mês.

A solução de persulfato de potássio 140 mM foi preparada a partir da pesagem de 378,4mg de persulfato de potássio e dissolução em água destilada. A solução foi transferida para balão volumétrica de 10 mL onde completou-se o volume com água destilada. Esta solução ficou em ambiente refrigerado por até um mês.

A solução do radical ABTS* foi preparada com o uso de 5,0 mL de solução estoque ABTS e adição de 88 μ L da solução de persulfato de potássio. A partir de seu preparo, a solução foi mantida em ausência de luz à temperatura ambiente por período de 16 horas. Após as 16 horas, tomou-se 1,0 mL desta solução e diluiu-se em etanol para leitura em espectrofotometria UV/vis a 650 nm. A solução foi diluída no citado solvente até se obter uma absorbância de aproximada de 0,70 preconizada para a realização do ensaio (RUFINO *et al.*, 2007). Esta solução é preparada e utilizada apenas no dia da análise.

A solução de Trolox 2,0 mM foi preparada a partir de 25 mg de Trolox e diluição em álcool etílico até completar o volume em um balão volumétrico de 50 mL.

b) Curva padrão do Trolox

A partir da solução de Trolox (2mM) foram preparadas soluções de concentração 100 a 1000 μ M com a finalidade de obtenção de curva de calibração para o Trolox. Em ambiente escuro, tomou-se alíquotas de 30 μ L de cada solução e misturou-se com 3 mL da solução de radical. Após 6 minutos as amostras foram analisadas em espectrofotometria UV/Vis a 650 nm. O etanol foi utilizado como solvente para calibração do espectrofotômetro.

c) Ensaio ABTS

Foi preparada uma solução etanolica de todos os compostos em concentração de 2,0 mM. A partir desta solução tomou-se uma alíquota e adicionou-se a aos poços da microplaca até atingir a concentração de 200 μ M. A partir desta concentração diluiu-se a mesma nos

poços seguintes até atingir as concentrações de 100µM, 50µM, 25µM, 12,5µM e 6,75µM. Após as diluições, foi adicionada a solução radical de ABTS* nos poços. Como controle positivo foi utilizado a solução de Trolox 2,0 mM como substância de referência da atividade sequestradora de radical livre. As microplacas foram mantidas em ambiente escuro por 6 minutos e retiradas para leitura em espectrofotômetro UV/Vis no comprimento de onda 650 nm.

A inibição do radical ABTS*, caracterizada por inibição de coloração azul-esverdeada, foi expressa em porcentagem de atividade sequestradora (%), através da fórmula (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006).

$$\% = \frac{Ac - Aa}{Ac} \times 100$$

%: Atividade sequestradora

Ac: Absorbância do controle

Aa: Absorbância da amostra

5.8 Avaliação da atividade antibacteriana

A avaliação da atividade antibacteriana das chalconas foi realizada através dos métodos do ensaio microbiológico por difusão em ágar - cilindro em placa (Farmacopéia Brasileira, 5ed., 2010, JANAKI *et al.*, 2013).

5.8.1 Delineamento do ensaio microbiológico

Os microrganismos utilizados para verificar atividade antibacteriana foram *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (bactéria Gram positiva) e *Escherichia coli* ATCC 25922 (bactéria Gram negativa). O meio de cultura utilizado foi agar e para o preparo da solução do inóculo foi utilizada solução salina (NaCl 0,9%), as condições de incubação foram 18-24hs a 35°C +/- 2°C.

5.8.2 Preparo da amostra

A concentração de 20 µg/mL dos compostos estudados foi utilizada para a realização dos ensaios antibacterianos. Estes compostos foram diluídos em solução aquosa de até 1,0% de DMSO.

5.8.3 Preparo da camada base

O meio de cultura foi preparado de acordo com a recomendação do fabricante (massa, volume de reconstituição e esterilização). Após o preparo o ágar foi distribuído em placa de Petri previamente esterilizada, visando à distribuição uniforme na camada base. Logo após a solidificação, as placas foram devidamente tampadas. Todos os procedimentos foram realizados em uma capela de fluxo laminar.

5.8.4 Preparo do inóculo

O preparo do inóculo foi realizado um repique, com alça de platina num tubo de ensaio contendo 5 mL de meio de cultura inclinado, incubou-se por 32 – 35°C, por 24 horas. Após foi pegou um quantidade de indeterminada de inóculo e diluiu em solução fisiológica estéril, e em seguida processou-se a padronização do inóculo em espectrofotômetro no comprimento de onda de 530 nm, diluindo-se a suspensão bacteriana com solução fisiológica estéril até a obtenção da absorbância na faixa de 0,08 a 0,1. A partir disso, foi feita a inoculação da suspensão no meio (McFarland, 1907).

5.8.5 Ensaio de avaliação da atividade antibacteriana

As soluções dos compostos foram distribuídos em placas de Petri, especificamente em cilindros de aço inoxidável, logo após solidificação da camada base e adição da suspensão bacteriana na placa. A distribuição dos cilindros ocorreu de maneira que se obtenha um ângulo de 60° e um raio de 2,8 cm. Em seguida incubou-se em estufa por 18-24 horas sob temperatura de 35°C +/- 2°C para crescimento bacteriano. Foi utilizado como controle cloranfenicol. Após o período determinado foi realizado a leitura dos halos de inibição com auxílio de paquímetro digital (Farmacopeia Brasileira, 5 ed., 2010).

5.9 Modelagem Molecular

5.9.1 Estudo de propriedades físico-químicas

O programa computacional *Spartan for Windows, versão 08*, Wavefunction, Inc. USA, foi empregado para o desenho, a otimização de geometria molecular da estrutura e cálculos dos valores de algumas propriedades de efeito eletrônico de energia de HOMO e de LUMO das chalconas. Estas propriedades foram determinadas com o emprego dos métodos semi-

empírico AM1 e empíricos teoria do funcional de densidade com o emprego de base de dados teóricos 6-31G*.

O programa Molinspiration foi utilizado para determinação de valores de propriedades físico-químicas de área de superfície polar (PSA), peso molecular, número de grupos aceptores e doadores de ligação de hidrogênio (nON e nOHNH, respectivamente), associadas a Regra dos cinco de Lipinski (LIPINSKI, 1997). Este programa é acessado *on line* no site <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties> e foi disponibilizado por Peter Erti, Pesquisador da Novartis, para uso da comunidade científica.

5.9.2 Análise de Toxicologia *in silico*, obtenção de perfis *druglikeness* e *drugscore*, e Determinação de Propriedades ADMET

Para o estudo teórico da toxicidade (através dos efeitos mutagênico, tumorigênico, irritante e decorrências no sistema reprodutor) e dos perfis de *druglikeness* e *drugscore* das 4chalconas empregou-se o programa computacional *Osiris Property Explorer*, Actelion Pharmaceuticals, disponível de forma gratuita no endereço digital <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>.

5.9.3 Estudos de Relações Estrutura-Atividade

Para o estudo das relações estrutura-atividade (SAR) serão utilizados os valores de propriedades físico-químicas e fatores estruturais para avaliação prévia e qualitativa da influência da estrutura química das chalconas propostas sobre as atividades aceptora de radicais, antibacteriana e, se determinadas, de toxicidade predita.

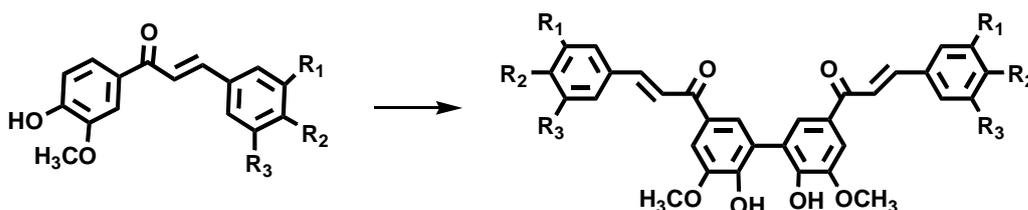
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Planejamento dos compostos

A principal proposta de trabalho desenvolvida consistiu em estudar a apocinina e diapocinina e suas atividades biológicas potenciais. A diapocinina é um composto obtido a partir da replicação molecular da estrutura química da apocinina. Esta ferramenta consiste em duplicar a estrutura química de um composto ativo com a finalidade modificar as propriedades físico-químicas ou alterar o perfil farmacoterapêutico da molécula escolhida (BARREIRO & FRAGA, 2008; ARAÚJO *et al.*, 2015).

Outra etapa envolveu o estudo de chalconas derivadas da apocinina e da diapocinina, cujas moléculas também foram escolhidas através da ferramenta de replicação molecular da estrutura química das chalconas, figura 14.

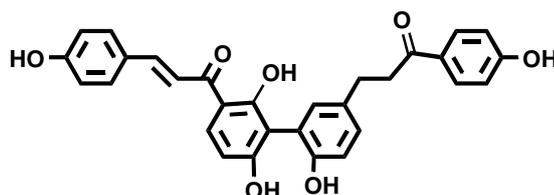
Figura 14: Aplicação de ferramenta de replicação molecular de chalconas derivadas da apocinina.



Os compostos a serem obtidos contêm o núcleo diapocinina ligados a duas porções estruturais características das chalconas. As estruturas derivadas da diapocinina são análogas a outras disponíveis na natureza como a Rushchalcona IV (figura 15), isoladas de galhos e casca de caule da planta *Rhus pyroides*, com comprovada atividade antiprotozoário e citotóxica (MIHIGO *et al.* 2010, MDEE *et al.* 2003).

Desta forma estes compostos se apresentam como substâncias promissoras para o estudo de agentes candidatos a agentes terapêuticos novos.

Figura 15: Estrutura química da Rushchalcona IV.



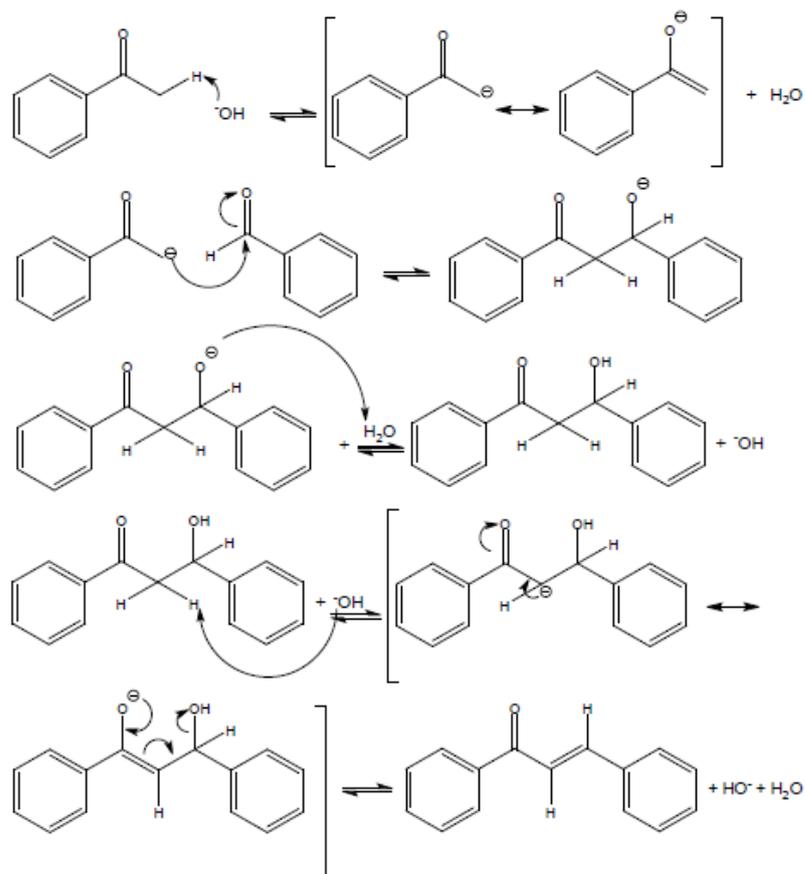
Os grupos substituintes ligados ao anel B da estrutura das chalconas foram escolhidos com a presença ou ausência de grupo metoxila (-OCH₃), que caracteriza variação da lipofilicidade de acordo com o aumento do número de grupos ligados ao citado anel. Esta variação de grupos ligados ao anel pode apresentar variedade de atividades biológicas, como atividade antioxidante e antibacteriana (NIELSEN *et al.* 2004; KIM *et al.* 2008; BANDGAR *et al.* 2010; JANAKI *et al.* 2013). Esse trabalho propôs à formação de oito compostos derivadas da apocinina e da diapocinina, com grupos 4-H, 4-OCH₃, 3,4-OCH₃, 3,4,5-OCH₃ ligados ao anel B.

6.2 Síntese das chalconas

As chalconas derivadas da apocinina e da diaponina foram sintetizadas de acordo com a reação de condensação de Claisen-Schmidth utilizando-se a apocinina (3-metoxi-4-hidroxi-acetofenona) variando-se os benzaldeídos (mono, di ou trissubstituídos) em quantidades equimolares. A apocinina foi dissolvida em metanol seguida da adição da solução de hidróxido de sódio (NaOH) 20% (catalisador) e do benzaldeído e mantida sob agitação a temperatura ambiente por um período variável de 4-30 horas sob proteção da luz.

Segundo MARIÑO (2013) e de acordo com VOGEL (1989), a reação de Claisen-Schmidth tem seu princípio com a condensação aldólica, seguida por desidratação básica (figura 16). Na primeira etapa da reação ocorre a desprotonação da cetona da acetofenona, onde o catalizador alcalino remove o hidrogênio ácido alfa da molécula para formar um carbânion, que é estabilizado por ressonância. Este carbânion, através de um ataque nucleofílico, ataca o carbono carbonílico do aldeído formando um íon alcóxido (intermediário tetraédrico), que ao ser protonado por um dos hidrogênios da água gera o produto da condensação e regenera o catalizador alcalino. Nesta etapa, a formação da enona conjugada ocorre por desidratação e, em condições básicas, um hidrogênio ácido é abstraído da posição alfa para resultar em um íon enolato, que elimina o grupo de saída (-OH) resultado, assim, na geração da chalcona (VOGUEL, 1989).

Figura 16 - Mecanismo de reação e formação das chalconas.



As reações de obtenção das chalconas foram monitoradas através do emprego de cromatografia em camada delgada, realizadas em placas de alumínio com sílica gel 60GF 254 da Sigma-Aldrich e visualizadas em luz ultravioleta e visível em comprimentos de onda de $\lambda=254$ e 366nm . As fases móveis utilizadas foram diclorometano ou clorofórmio puros ou em combinações variáveis com etanol (5 – 10%) e acetato de etila e hexano (60:40).

Os compostos foram filtrados sob pressão reduzida e mantidos no dessecador, e novamente foram avaliados por CCD, para verificação da necessidade de purificação a qual ocorreu através de cromatografia em coluna, fase estacionária Sílica Vetec[®] (230-400 mesh) com ou recristalização com água e etanol para os derivados da apocinina e água para os derivados da diapocinina.

Tabela 1 - Valores dos tempos de reação, rendimento e pontos de fusão dos compostos obtidos.

Composto	Substituinte	Tempo de Reação (h)	Rendimento (%)	Ponto de Fusão (°C)
----------	--------------	---------------------	----------------	---------------------

Apocinina	R ₁ , R ₂ , R ₃ : H	24	24,10	116.9 - 117.5
Apocinina	R ₁ : OCH ₃	24	74,54	134.4 – 135.4
Apocinina	R ₁ , R ₂ : OCH ₃	24	44,76	151.3 – 152.5
Apocinina	R ₁ , R ₂ , R ₃ : OCH ₃	24	69,90	191,2 – 192
Diapocinina original	-	5 min	31,10	304*
Diapocinina	R ₁ , R ₂ , R ₃ : H	24	93,3	311*
Diapocinina	R ₁ : OCH ₃	24	98,1	-
Diapocinina	R ₁ , R ₂ : OCH ₃	24	55,5	305*
Diapocinina	R ₁ , R ₂ , R ₃ : OCH ₃	24	54,2	-

* Pontos de fusão determinados com o emprego de DSC Shimadzu.

As chalconas derivadas da apocinina, apresentam substituintes já relatados na literatura, como no trabalho de HARA *et al.* (2014) que sintetizaram dez chalconas, entre essas, quatro apresentaram substituições semelhante no anel B. Segundo, JANAKI *et al.* (2013) sintetizou-se e caracterizou-se onze compostos, desses, dois apresentaram semelhança a chalcona derivada da apocinina contendo como grupos substituintes 3,4,5 trimetoxilas ligados ao anel B. WU *et al.* (2011) propuseram a síntese de composto semelhante a chalcona acima citada. Na tabela 2 estão demonstradas as seguintes substituições relatadas na literatura e algumas características físico-químicas.

Após as reações de síntese e purificação dos compostos realizou-se a caracterização estrutural destes através de análises de ATR-FTIR, RMN ¹H e ¹³C, onde observou-se que na maioria das reações houve a ocorrência de impurezas e/ou sub-produtos, que não foram detectadas em cromatografia em camada delgada. Neste procedimento, os compostos de partida e os produtos se situaram na mesma banda de migração, o que caracterizou inicialmente em ausência de impurezas. Na síntese das chalconas derivadas da apocinina, as amostras dos compostos derivados da apocinina 4-OCH₃, 3,4-OCH₃, 3,4,5-OCH₃ tiveram sua formação comprovada pelas análises de RMN. Para os derivados da diapocinina somente o composto não substituído teve sua formação confirmada.

De acordo com CORREA (2009), as chalconas podem ser facilmente caracterizadas por espectroscopia de infravermelho, devido à presença de grupamentos funcionais característicos, como a carbonila e a insaturação conjugada à mesma (Tabela 3).

Os resultados da caracterização espectral dos outros compostos estudados neste projeto se encontram expressos em anexo I. Foi escolhido o composto 3,4,5-trimetoxichalcona derivado da apocinina, ((*E*)-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona), cujo espectro de infravermelho médio (medido em espectrômetro ATR-FTIR Shimadzu) do composto encontra-se ilustrado na figura 16. As atribuições comuns das bandas de infravermelho para as estruturas de chalconas estão expressas na tabela 3.

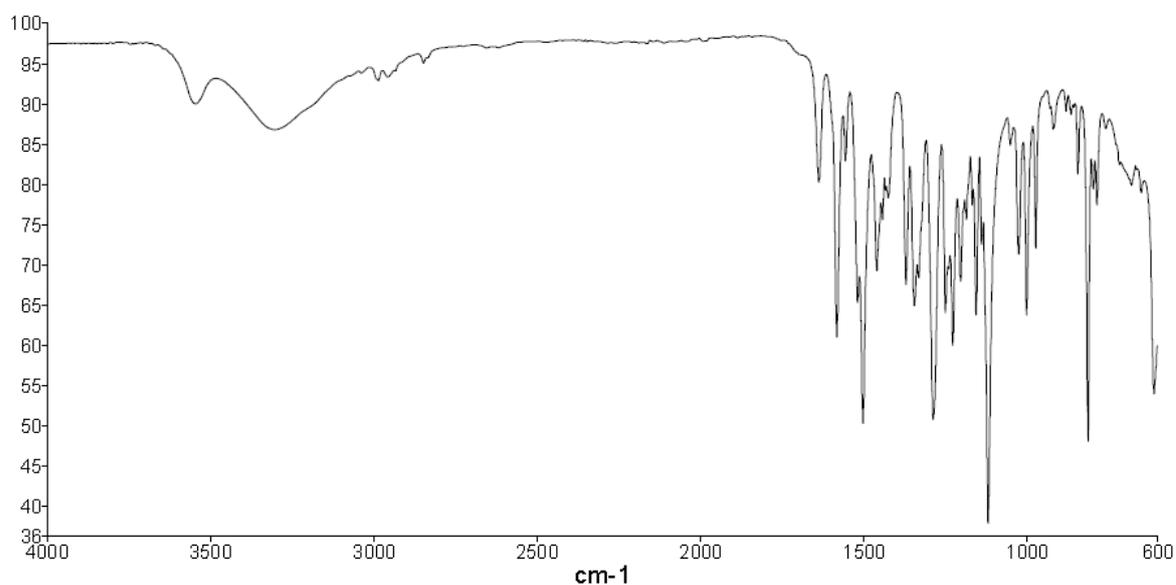
Tabela 2 - Substituições e características físico-químicas relatadas na literatura presente nas chalconas derivadas da apocinina.

Composto	Substituinte	Rendimento (%)	Ponto de Fusão (°C)	Referências
Apocinina	R ₁ : OCH ₃	-	-	HARA <i>et al.</i> , 2014
	R ₄ : OCH ₃	-	-	WU, <i>et al.</i> , 2011.
Apocinina	R ₂ , R ₄ : OCH ₃	94	109-111	JANAKI <i>et al.</i> , 2013.
	R ₂ , R ₅ : OCH ₃	96	111-113	HARA <i>et al.</i> , 2014
	R ₁ , R ₂ : OCH ₃	-	-	WU <i>et al.</i> , 2011.
	R ₂ , R ₃ : OCH ₃	69,1	82,5–84,2	-
Apocinina	R ₁ , R ₂ , R ₃ : OCH ₃	-	-	HARA <i>et al.</i> , 2014

TABELA 3 - Frequências características de grupos funcionais encontrados nas chalconas.

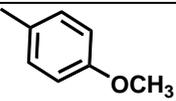
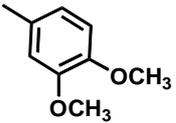
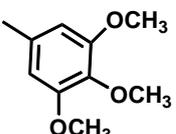
Banda de absorção (cm ⁻¹)	Atribuição
3200 e 3400	Amina primária aromática
1820 – 1660	Grupo carbonila (C=O)
1660 – 1600	Alcenos (C=C)
1600 e 1475	Anel aromático
800 – 850	Anel aromático <i>para</i> substituído

Fonte: Adaptado de Pavia *et al.*, 2010.

Figura 17: Espectro de infravermelho médio do composto 3,4,5-trimetoxichalcona derivado da apocinina.

No espectro demonstrado na figura 17, verifica-se a presença de uma deformação em $3335,92\text{ cm}^{-1}$ caracterizando a presença de álcool, uma deformação em $1650,34$ atribuída a carbonila, $1506,15\text{ cm}^{-1}$ relacionada à ligação olefínica, e outra deformação angular em $850,27\text{ cm}^{-1}$ relacionado aos anéis aromáticos substituídos. Os dados da espectroscopia de infravermelho de todos os compostos estão demonstrados na tabela 4.

Tabela 4 – Atribuições de picos obtidos pela espectrometria de Infravermelho dos compostos obtidos.

Compostos *	Grupos substituintes	IV (cm^{-1})
Apocinina (1)		$3192,01\text{ cm}^{-1}$ (O-H); $1641,73\text{ cm}^{-1}$ ($\text{R}_2\text{C}=\text{O}$) $1278,45\text{ cm}^{-1}$; $1247,60\text{ cm}^{-1}$ (C-O); $772,75\text{ cm}^{-1}$; $778,47\text{ cm}^{-1}$ (anel aromático); $1163,45\text{ cm}^{-1}$ (C-O de álcoois e fenóis).
Apocinina (2)		$3529,89\text{ cm}^{-1}$ (O-H); $2942,90\text{ cm}^{-1}$ (-C-H); $1582,88\text{ cm}^{-1}$, $1665,62\text{ cm}^{-1}$ (C=C) de anel aromático; $1202,80\text{ cm}^{-1}$ (fenóis); $1282,85\text{ cm}^{-1}$ (C-O); $802,68\text{ cm}^{-1}$; $843,63\text{ cm}^{-1}$ (anel aromático).
Apocinina (3)		$3534,92\text{ cm}^{-1}$; $3097,02\text{ cm}^{-1}$ (H-O); $1581,34\text{ cm}^{-1}$ (-C=C-) em aromático; $1202,14\text{ cm}^{-1}$ (fenóis); $1176,28\text{ cm}^{-1}$ (C-O); $786,59\text{ cm}^{-1}$ (anel aromático).

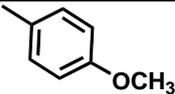
Diapocinina (4)		3367.47cm ⁻¹ (O-H); 1667.93cm ⁻¹ (R ₂ C=O), 1614.38cm ⁻¹ (C=O); 1588.93cm ⁻¹ (C=C de aromático).
Diapocinina (5)		3367.47cm ⁻¹ (O-H); 1649.46cm ⁻¹ (C=C); 918.76cm ⁻¹ (O-H); 763.27cm ⁻¹ ; 684,61 cm ⁻¹ (anel aromático).

*(1)metoxi-apocinina, (2)dimetoxi-apocinina, (3)trimetoxi-apocinina, (4)diapocinina (5) diapocinina-H.

Os espectros de RMN ¹H foi registrado em 300 MHz, utilizando aparelho Bruker ADVANCE DPX-300. As amostras foram analisadas em dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆) como solvente. Os deslocamentos químicos (δ) estão expressos em partes por milhão (ppm) e calibrados de acordo com o sinal referente ao DMSO-d₆, registrado a 2,51 ppm para RMN ¹H. As atribuições de RMN ¹H e ¹³C dos grupos das chalconas estão expressas na tabela 5.

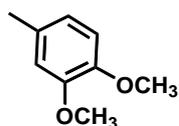
A partir da análise de RMN ¹H da 3,4,5-trimetoxi-chalcona derivada da apocinina sintetizada pode-se evidenciar um singleto equivalente a 3 hidrogênios em 3,72 ppm da metoxila aromática (-OCH₃) do anel ligado a apocinina, e um singleto de maior intensidade em 3,87 ppm referente aos três grupamentos metoxila (3,4,5-OCH₃) ligados ao anel B, multipletos na faixa de 6 a 8 ppm referente aos hidrogênios ligados aos anéis aromáticos, dois singletos referentes aos hidrogênios α e β insaturados, na região entre 7,62 a 7,67 ppm. Os valores especificados para cada composto estão demonstrados na tabela 5. O espectro de RMN ¹H e do mesmo composto está demonstrado na figura 18.

Tabela 5: Resultados das análises espectroscópicas de RMN ¹H e ¹³C dos compostos obtidos.

Composto	Radical	RMN (DMSO) δ ppm
Apocinina (1)		<p>RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) 3,82 (s, 3H, H-4), 3,88 (s, 3H, H-12), 6,92 (d, 1H, J= 8,27 Hz, H-3), 7,01 (d, 2H, J= 8,62 Hz, H-10,11), 7,63 (m, 1H, H-1), 7,69 (s, 1H, H-2), 7,76 -7,84 (m, 4H, J= 8,69 Hz, H-6,7,8,9), 9,98 (sl, 1H, H-5).</p> <p>RMN ¹³C (75 MHz, DMSO, δ ppm) 55,9 (4'-OCH₃); 56,2 (3-OCH₃); 114,2 (3 CB-arom ou 5 CB-arom); 115,5 (2 CA-arom); 117,4 (5 CA-arom); 121,4 (Cvinilico); 123,7 (6 CA-arom); 127,5 (1 CB-arom ou 6 CB-arom); 131,6 (1 CA-arom); 145,2 (Cvinilico); 151,9 (3 CA-arom ou 4 CA-arom); 159,9 (</p>

Apocinina

(2)



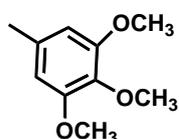
4 CB-arom); 189,5 (CO).

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) 3,82 (s, 3H, H-4), 3,87 (s, 6H, H-11,12), 6,92 (d, 1H, J= 8,21 Hz, H-3), 7,02 (d, 1H, J= 8,28 Hz, H-10), 7,38 (d, 1H, J= 8,35 Hz, H-8), 7,51 (s, 1H, H-9), 7,61/7,67 (d, 2H, J= 18,0 Hz, H-6,7), 7,77 (s, 1H, H-7), 7,81 (d, 1H, J= 8,10 Hz, H-1), 9,99 (sl, 1H, H-5).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO, δ ppm) 56,2 (3, 3',4'-OCH₃); 111,6 (2 CB-arom); 115,2 (5 CB-arom ou 1 CA-arom); 117,4 (5 CA-arom); 119,7 (5 CB-arom); 121,4 (Cvinilico); 123,6 (6 CA-arom); 128,5 (1 CB-arom); 131,5 (1 CA-arom); 138,4 (2 CB-arom); 145,2 (Cvinilico); 149,0 (3 CB-arom ou 4 CB-arom); 151,5 (4 CA-arom ou 3 CA-arom); 189,7 (CO).

Apocinina

(3)



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) 3,72 (s, 3H, H-4), 3,87 (s, 9H, H-10,11,12), 6,94 (d, 1H, J= 8,25 Hz, H-3), 7,21 (s, 2H, H-8,9), 7,62 (s, 1H, H-6), 7,67 (s, 1H, H-2), 7,85-7,88 (m, 3H, H-1,2,7)

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO, δ ppm) 56,2 (3, 3',4',5'-OCH₃); 103,9 (2 e 3 CB-arom); 115,5 (2 CA-arom); 117,4 (5 CA-arom); 121,4 (Cvinilico); 123,6 (6 CA-arom); 129,5 (1 CB-arom); 131,5 (1 CA-arom); 138,4 (4 CB-arom); 145,2 (Cvinilico); 150,7 (3,5 CB-arom); 151,5 (3 CA-arom ou 4 CA-arom); 189,7 (CO).

Diapocinina

(4)

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) 2,49 (s*, CH₃), 3,89 (s, 6H, OCH₃), 7,45 (m, 4H, H-2,6), 9,47 (s, 2H, 4-OH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO, δ ppm) 29,3 (CH₃); 56,1 (OCH₃); 113,3 (4C-arom); 123,3 (2CA-arom); 128,1 (1C-arom); 130,9 (3C-arom); 147,1 (6C-arom); 151,8 (5C-arom); 199,8 (CO).

Diapocinina

(5)



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) 3,98 (s, 6H, H-3'), 7,43-7,52 (m, 4H, H1, 2), 7,72 (d, 2H, H-5,6), 7,82 - 8,00 (m, 10H, H-7,8,9,10), 9,60 (sl, 2H, H-4).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO, δ ppm) 56,2 (3-OCH₃); 114,2 (4 CA-arom); 115,5 (6 CA-arom); 121,3 (Cvinilico); 124,4 (5 CA-arom); 126,4 (2 ou 6CB-arom); 128,0 (1CA-arom ou 3 ou 4 ou 5CB-arom); 132,0 (2CA-arom ou 1 CB-arom); 145,5 (Cvinilico); 148,5 (2CA-arom); 152,4 (3 CA-arom); 189,7 (CO).

Compostos: (1) metoxi-apocinina, (2) dimetoxi-apocinina, (3) trimetoxi-apocinina, (4) diapocinina, (5) diapocinina-H.

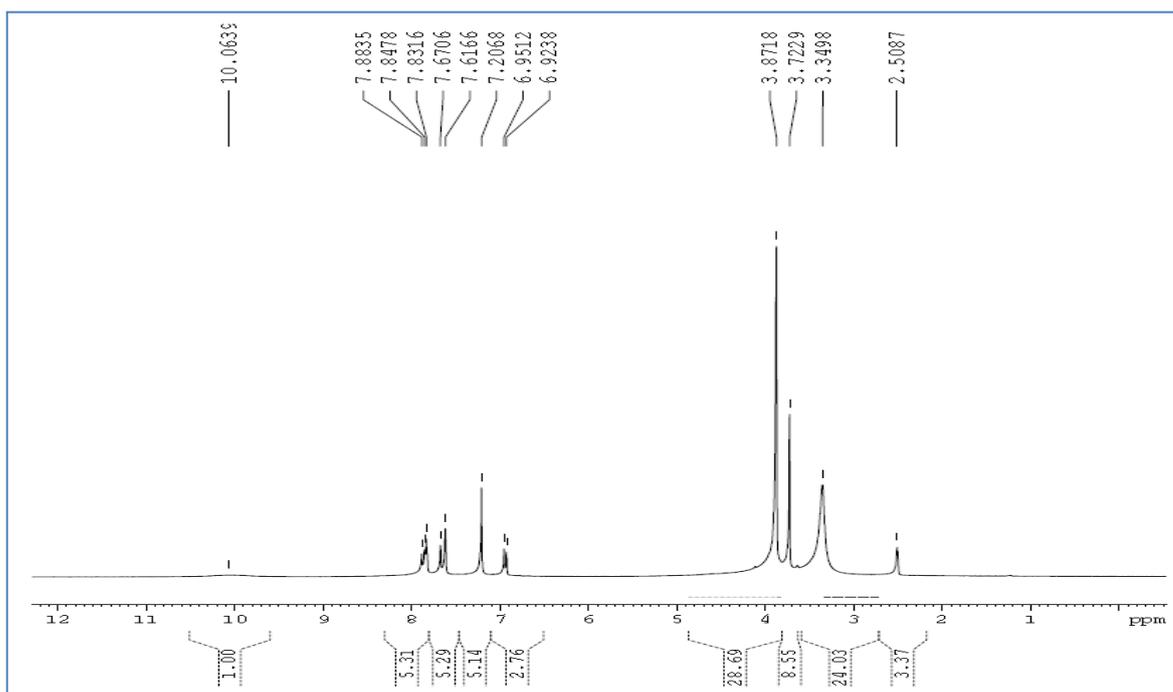


Figura 18 - Espectro de RMN ¹H da ((E)-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona).

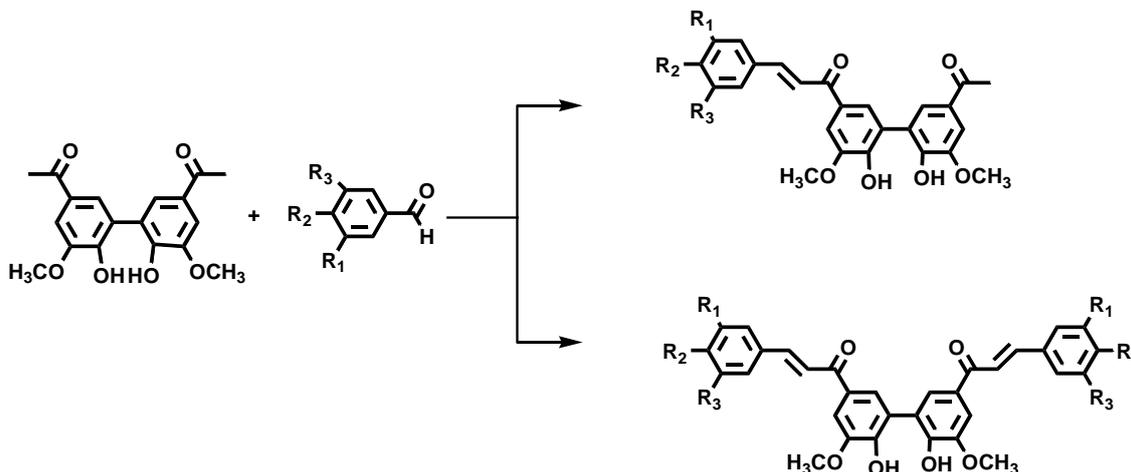
6.3 Síntese da diapocinina

A síntese da diapocinina seguiu de acordo com os procedimentos sugerido por DASARI *et al.* (2008). Os derivados chalconas da diapocinina foram obtidos a partir do emprego da reação de condensação de Claisen-Schmidt variando os benzoaldeídos utilizados. Após o término das reações de síntese foi avaliada a pureza dos produtos formados através da CCD, onde não foram observadas bandas de migração nas placas cromatográficas para outros produtos ou material de partida. Em uma análise mais detalhada como RMN ¹H e ¹³C, primeiramente, verificou-se que a diapocinina e a chalcona não substituída derivada da diapocinina, foram os únicos compostos formados ou puros. Os derivados mono, di e trissubstituídos (4'-OCH₃, 3',4'-OCH₃, e 3',4',5'-OCH₃) apresentaram sinais característicos da presença do material de partida, diapocinina e o aldeído, sem comprovação da formação dos compostos propostos. O composto trissubstituído apresentou o sinal de deslocamento químico característico da presença de metila em 2.5 ppm, o que caracteriza a não formação ou formação parcial da chalcona derivada da diapocinina, conforme a figura 19.

A hipótese para não formação dos compostos está relacionada ao tempo reduzido de reação de síntese, onde se sugere aumentar o tempo e elevar a temperatura reacional. Outro fato importante refere-se à diapocinina, que é de difícil solubilização em solvente metanol utilizado na reação de Claisen-Schmidt, mesmo em pH alcalino (aproximado de 10,0).

Sugere-se ainda a presença de solvente DMSO ou clorofórmio para dissolvê-la o que pode influenciar na otimização da reação de síntese dos compostos propostos. O isolamento dos compostos propostos encontra-se em andamento e serão confirmados a partir de experimentos realizados no laboratório.

Figura 19 - Esquema da formação dos derivados da diapocinina.



6.4 Ensaio sequestrante de radical pelo DPPH

A análise da capacidade aceptora de radicais das moléculas sintetizadas e do padrão BHT, foram realizadas através do emprego de método colorimétrico de análise do DPPH em microplacas (96 poços) (SOARES *et al.* 1997). O ensaio espectrofotométrico do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) é um teste realizado de maneira simples e muito empregado. O DPPH é um radical livre estável, de origem não natural (MIRANDA & FRAGA, 2006).

Segundo MIRANDA & FRAGA (2006), o ensaio fundamenta-se na propriedade do DPPH apresentar uma forte absorção no espectro visível, no comprimento de onda padronizado, caracterizado por uma coloração violácea intensa, devido à presença de elétrons livres. Quando o DPPH é colocado em presença de substâncias capazes de sequestrar radicais livres, a absorção é inibida, resultando em uma deslocação estequiométrica em relação ao número de elétrons retirados e independente de qualquer atividade enzimática. O grau de descoloração indica a capacidade sequestradora de radical livre (LEHUÉDÉ *et al.*, 1999; MATHIESEN *et al.*, 1997).

Os compostos como polifenóis, heteroaril-pirrol, acetofenonas, e entre outros apresentam capacidade de deslocar elétrons, conferindo a estes compostos propriedades

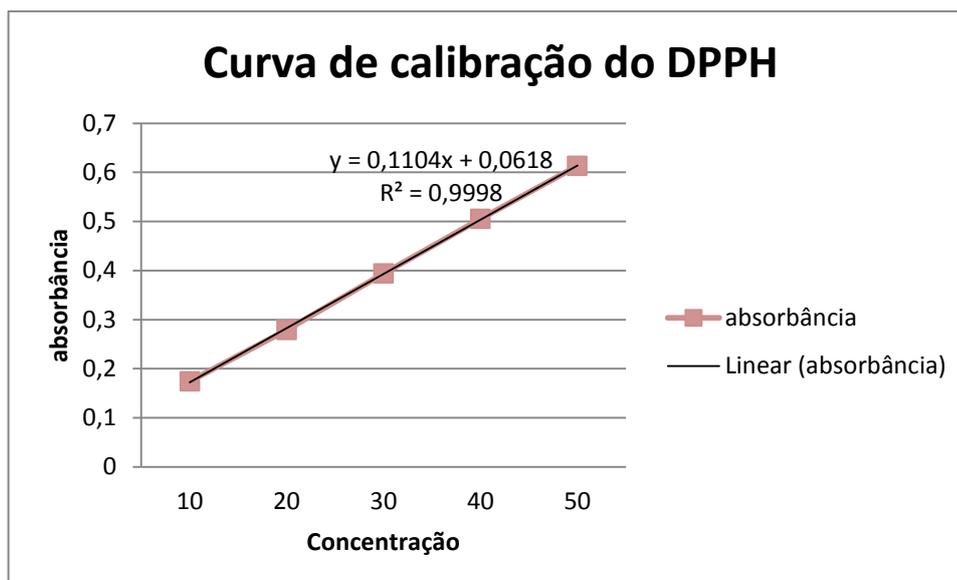
oxidáveis. Os compostos estudados neste trabalho, a apocinina, diapocinina, e suas chalconas derivadas, dentre das diversas propriedades farmacológicas, apresentam potencial para exercer atividade antioxidante, uma vez que o número e a posição de grupamentos hidroxila (-OH) e metoxila (-OCH₃) em relação ao grupo funcional carboxila em compostos fenólicos colabora para a captura das espécies reativas. Neste cenário, a presença dos citados grupos substituintes na posição *orto* e *para* em relação ao grupamento carboxila está relacionado a uma maior capacidade antioxidante aos compostos (MIRANDA & FRAGA, 2006), o que ressalta a necessidade de avaliar a capacidade aceptora de radicais dos compostos propostos.

A determinação da atividade sequestrante de radical DPPH da apocinina, diapocinina e derivados chalconas iniciou-se a partir da construção da curva padrão de calibração do DPPH e da análise de absorvância das substâncias. A construção da curva ocorreu na faixa de concentração de 10 a 50 µM, que correspondeu à linearidade da curva de calibração, conforme a figura 20. Os valores de absorvância para as referidas concentrações foram ilustrado conforme na tabela 6.

Tabela 6: Valores utilizados para a construção da curva de calibração do ensaio de DPPH.

Concentração (µM)	Absorbância
10	0,174
20	0,279
30	0,394
40	0,505
50	0,613

Figura 20 - Curva de calibração do DPPH em faixa de concentração 10 a 50 µM.



A partir desta etapa foram determinadas as concentrações dos compostos e do BHT, utilizado como substância padrão, que apresenta atividade antioxidante reconhecida. O ensaio da atividade sequestrante pelo radical DPPH foi realizado em microplaca, em triplicada e em concentrações na faixa de 6,75 a 400 μM . A solução de DPPH, em presença dos compostos, foi submetida à leitura em tempos 0 e, mantida em ambiente escuro, após 30 minutos. Na tabela 7 estão ilustradas as médias das absorbâncias das amostras e do BHT obtidas no ensaio.

Tabela 7 - Resultados obtidos das leituras de absorbâncias, com ensaio de DPPH para os compostos propostos.

Concentração μM	Apocinina	Metoxi- apocinina	Dimetoxi- apocinina	Trimetoxi- apocinina	Diapocinina	Diapocinina- H	BHT
400	1,839	0,624	2,337	0,576	2,105	0,576	0,628
200	1,838	0,687	2,592	0,644	2,248	0,644	0,629
100	1,867	0,684	2,582	0,668	2,301	0,668	0,628
50	1,883	0,725	2,698	0,708	2,378	0,708	0,644
25	1,931	0,722	2,606	0,714	2,335	0,714	0,696
12,5	1,988	0,725	2,684	0,730	2,441	0,730	0,733
6,75	1,952	0,738	2,624	0,757	2,341	0,757	0,712

Logo após os dados obtidos descritos na tabela 7 e como medida de análise qualitativa, calculou-se a porcentagem (%) de atividade sequestrante de radical dos compostos em análise, comparando-se a concentração de 400 μ M a 6,75 μ M. Os resultados desta análise estão demonstrados na tabela 8.

Tabela 8 - Resultados em porcentagem obtidos no ensaio sequestrante de radical pelo DPPH em microplaca.

Concentração μ M	Apocinina %	Metoxi- apocinina %	Dimetoxi- apocinina %	Trimetoxi- apocinina %	Diapocinina %	Diapocinina- H %	BHT %
400	55,65	78,56	43,64	84,47	49,24	79,42	78,37
200	55,67	76,39	37,49	84,47	47,16	80,55	78,63
100	54,97	76,50	37,73	83,89	45,52	80,38	78,39
50	53,10	75,09	34,94	82,92	43,52	79,31	77,82
25	53,43	75,19	37,15	82,78	43,86	79,52	76,03
12,5	52,06	75,09	35,27	82,39	42,70	78,80	74,76
6,75	52,92	74,64	36,72	81,74	44,56	79,11	76,06

Conforme a tabela 8, podemos verificar que os compostos derivados da apocinina 4'-OCH₃, 3',4',5'-OCH₃ e a diapocinina não substituída apresentaram atividade sequestrante de radical superior ao padrão BHT. Os resultados obtidos demonstram atividade sequestrante em concentração 12,5 μ M foram superiores para os três compostos citados. Os demais compostos apresentaram atividade sequestrante, mas foram inferiores quando comparado ao controle, o BHT. Segundo MIRANDA & FRAGA (2006), os compostos com ação sequestrante de radical conhecido devem apresentar valores de 90 – 100% de atividade. No entanto, todos os compostos avaliados e inclusive o BHT, substância padrão, apresentaram valores inferiores aos descrito na literatura, o que pode ser resultado do tempo da incubação utilizado, ou da reduzida solubilidade dos compostos.

A partir dos resultados expressos é possível realizar a comparação entre a apocinina e a diapocina, onde a apocinina demonstrou capacidade de captura de DPPH maior que seu dímero diapocinina. De acordo com este ensaio, se sugere que a apocinina se apresenta como melhor candidato a estrutura protótipo para o desenvolvimento de compostos com atividade antioxidante potencial.

6.5 Ensaio da atividade antioxidante total pelo radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) - ABTS em microplacas

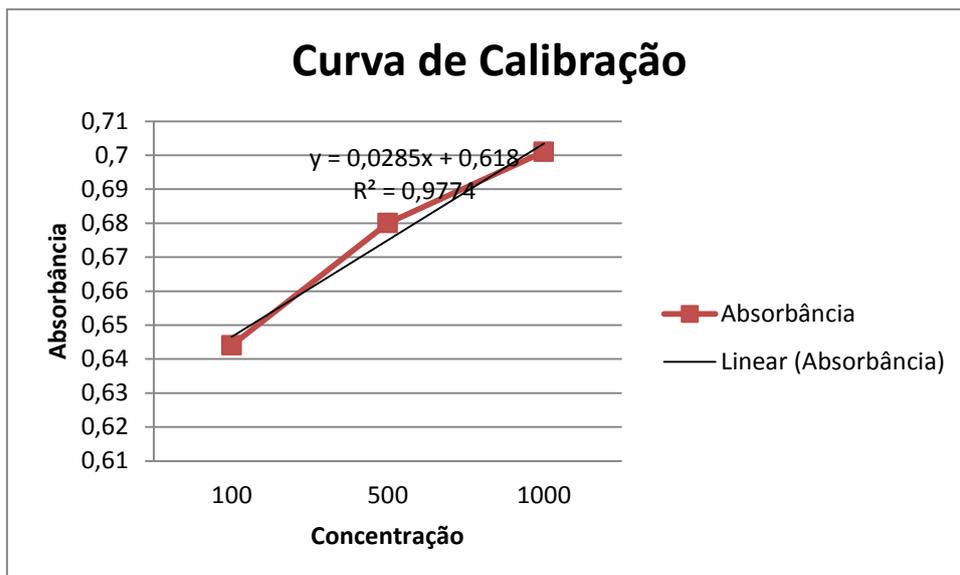
A análise da capacidade aceptora de radicais das moléculas sintetizadas e do padrão Trolox, foram realizadas através do emprego de método colorimétrico de análise do radical ABTS⁺, em microplacas (96 poços).

O radical catiônico 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) é utilizado como agente fenólicos com capacidade aceptora de radicais. O ABTS⁺⁺ é um radical gerado pela reação entre o ABTS e persulfato de potássio, que apresenta coloração verde-azulada escura. O ensaio foi realizado segundo PELLEGRINI *et al.* (1999), observando-se o decréscimo da absorvância em comprimento de onda determinado proporcional ao efeito antioxidante dos compostos testados. A primeira etapa envolveu a realização da construção da curva padrão do Trolox utilizando variadas concentrações (100, 500, 1000µM), e logo após a realização do ensaio. Os resultados das leituras das absorvâncias realizadas em espectrofotômetro UV/visível estão descritos na tabela 9.

Tabela 9. Curva de calibração do padrão Trolox no ensaio de radical ABTS.

Concentração µM	Absorbância
100	0,644
500	0,680
1000	0,701

Figura 21 - Curva de calibração do padrão Trolox no ensaio de radical ABTS.



Logo após a construção da curva de calibração do Trolox, determinou as concentrações dos compostos e do controle, o Trolox. Em seguida realizaram as diluições nas microplacas.

Após seis minutos de incubação na presença da substância controle, o Trolox, que é um análogo sintético da Vitamina E, foram determinadas as absorbâncias e a percentagem da atividade antioxidante da apocinina, diapocinina e suas chalconas derivadas. Na tabela 10, estão expressas as médias das absorbâncias das amostras e do padrão Trolox.

Tabela 10: Resultados obtidos com as leituras das absorbâncias no ensaio sequestrante de radical ABTS.

Concentração µM	Apocinina	Metoxi- apocinina	Dimetoxi- apocinina	Trimetoxi- apocinina	Diapocinina	Diapocinina- H	Trolox
400	0,057	0,328	0,06	0,097	0,103	0,354	0,203
200	0,045	0,292	0,046	0,065	0,052	0,329	0,183
100	0,044	0,266	0,049	0,067	0,042	0,257	0,190
50	0,039	0,285	0,046	0,109	0,054	0,262	0,173
25	0,061	0,268	0,052	0,168	0,068	0,257	0,183
12,5	0,087	0,331	0,114	0,216	0,130	0,283	0,185
6,75	0,171	0,343	0,133	0,222	0,125	0,353	0,179

Em seguida, os dados obtidos descritos na tabela 10 e como medida de análise qualitativa, determinou-se a percentagem (%) de atividade sequestrante de radical dos compostos em análise, comparando-se a concentração 400 μ M a 6,75 μ M. Estes estão demonstrados na tabela 11.

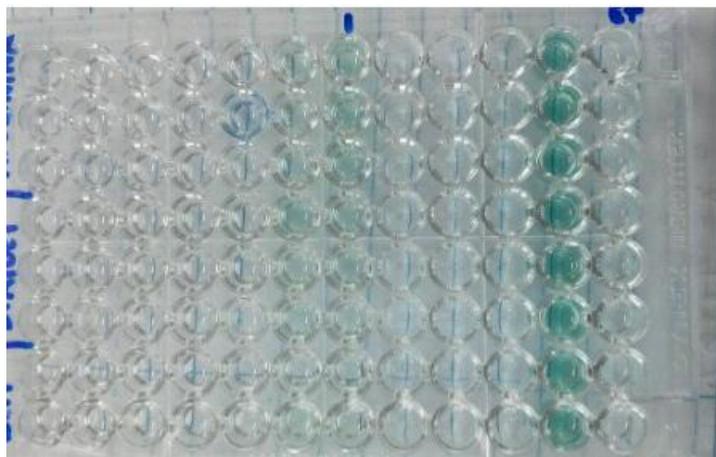
Tabela 11: Resultados obtidos no ensaio sequestrante de radical ABTS em microplaca.

Concentração μ M	Apocinina %	Metoxi- apocinina %	Dimetoxi- apocinina %	Trimetoxi- apocinina %	Diapocinina %	Diapocinina- H %	Trolox %
400	85,38	26,12	82,55	68,60	71,54	21,15	54,56
200	88,46	34,23	86,62	78,96	85,63	26,72	59,17
100	88,71	40,09	85,75	78,31	88,39	42,76	58,04
50	90	35,81	86,62	64,72	85,08	41,64	61,62
25	81,79	39,63	84,88	45,63	81,21	42,76	59,65
12,5	77,69	25,45	58,13	30,09	64,08	36,90	58,65
6,75	56,15	22,74	61,33	28,15	65,46	21,38	60,25

A partir da tabela 11, observa-se que os compostos apocinina, diapocinina, e os derivados da apocinina 3',4'-OCH₃, 3',4',5'-OCH₃, apresentaram atividade sequestrante superior ao controle, o Trolox nas concentrações 400, 200, 100 e 50 μ M. Os demais compostos apresentaram atividade sequestrante do ABTS, porém inferiores aos demais destacados. Porém como mencionado no ensaio do DPPH, para ter ação sequestrante devem estar entre 90 – 100%, e, neste caso, somente a apocinina demonstrou atividade sequestrante comprovada, na concentração de 50 μ M. Os demais compostos e o controle, Trolox, apresentaram valores inferiores aos descrito na literatura.

A partir dos resultados, realizou-se a comparação entre a apocinina e a diapocinina, onde se verificou que a apocinina apresentou atividade sequestrante superior ao seu dímero diapocinina e ao Trolox, substância controle. Porém em concentrações menores a diapocinina, apresentou maior atividade. Esse ensaio comprovou a atividade antioxidante da apocinina, no entanto, devem ser realizados estudos mais aprofundados para comprovação da atividade antioxidante da mesma.

Figura 22 - Foto da microplaca do ensaio da atividade sequestrante pelo radical ABTS para a apocinina e diapocinina, após seis minutos de incubação.



6.6 Avaliação da atividade antibacteriana

A apocinina é uma substância que apresenta diversas atividades biológicas descritas na literatura. A atividade antibacteriana deste composto não é totalmente estudada. Neste contexto, HOREMANS *et al.* (2016) verificaram que a apocinina não apresentou atividade contra a bactéria *Helicobacter pylori* quando incubada *in vitro*. A apocinina tem sido utilizada como estrutura protótipo para o desenvolvimento de substâncias antibacterinas novas, como derivados chalconas da apocinina (JANAKI *et al.* 2013; RAO *et al.* 2013, KUMAR *et al.* 2015). As chalconas são um conjunto de moléculas com estrutura química derivada do núcleo diaril 1,3-propenona e sua atividade antibacteriana é reconhecida para diversos derivados desta molécula base (KROMANN *et al.*, 2004; NIELSEN *et al.*, 2004; NOWAKAWSKA, 2007; SAHU *et al.*, 2012). NOWAKAWSKA (2007) descreveu que a porção estrutural cetona ligada aos carbonos α,β -insaturada é responsável pela sua ligação com o grupo tiol de proteínas essenciais de bactérias.

A avaliação da atividade antibacteriana da apocinina e dos compostos obtidos, além do antibiótico de referência cloranfenicol, foi realizada através do método adaptado difusão ágar-cilindro, frente à *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gram positiva) e *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram negativa). Este método, desenvolvido inicialmente por BACHARACH & CUTHBERTSON em 1948, tem sido utilizado até o presente momento para avaliação

inicial da atividade antibacteriana de compostos candidatos a fármacos antibacterianos (SAHU *et al.* 2014; KUSHWABA *et al.* 2014).

Os compostos apocinina, diapocinina e chalconas derivadas destes apresentaram atividade frente a *S. aureus* somente não sendo observada atividade frente à cepa Gram negativa estudada. Os resultados para a atividade antibacteriana frente à cepa de *S. aureus* ensaiada estão demonstrados na tabela 12 e figura 23.



Figura 23 - Halos de inibição da bactéria *S. aureus* em contato com os compostos chalconas (trimetoxi e dimetoxi) derivadas da apocinina.

Tabela 12 – Medida dos halos de inibição do crescimento bacteriano das chalconas derivadas da apocinina e diapocinina, e do padrão cloranfenicol.

Compostos	Substituintes	Halos de Inibição	Halos de Inibição
		<i>Staphylococcus aureus</i> (mm)*	<i>Escherichia coli</i> (mm)*
Apocinina	Original	20,25	-
	4-OCH ₃	17,45	-
	3,4-OCH ₃	17,98	-
	3,4,5-OCH ₃	18,25	-
Diapocinina	Original	18,41	-
	H	18,53	-
Cloranfenicol		36,52	47,91

*Média obtida a partir do valor de três halos de inibição

A partir destes resultados verificou-se que a apocinina apresenta atividade antibacteriana maior que a determinada para a diapocinina. Os compostos derivados da

apocinina e da diapocinina apresentaram atividade menor em relação aos compostos de partida apocinina e diapocinina. RAO *et al.* (2013) estudaram uma série de compostos derivados da apocinina com variação estrutural no anel B, e que apresentavam o grupo etilazida ligado a hidroxila do anel da apocinina, e verificaram que os mesmos apresentaram atividade antibacteriana contra cepas de *Staphylococcus aureus* MTCC 96 e *Escherichia coli* MTCC 433. Em outro estudo, KUMAR *et al.* (2015) sintetizaram derivados de chalconas com o grupo 3-cloro-metilbenzeno ligado a hidroxila da apocinina e também verificaram a ocorrência de atividade antibacteriana frente a cepas Gram positivas e Gram negativas.

Nesta mesma linha de estudo, JANAKI *et al.* (2013) estudaram chalconas derivadas da apocinina sem grupos químicos ligados a hidroxila da apocinina e verificaram que as doze moléculas obtidas apresentaram atividade contra cepas de *Staphylococcus aureus* MTCC 96 e *Escherichia coli* MTCC 433. No entanto, a atividade observada foi menor que a determinada por KUMAR *et al.* (2015). Este fato evidencia que mudança na estrutura química da apocinina pode resultar em atividade antibacteriana diversa, e neste caso, com atuação frente a cepas Gram negativas. As chalconas derivadas da apocinina obtidas neste trabalho podem ter apresentado resultado diverso do observado na literatura devido à cepa de *Escherichia coli* estudada ser diferente da descrita na literatura, uma vez que as mesmas podem apresentar susceptibilidade diferente aos compostos estudados.

Os compostos estudados não apresentaram atividade maior que o padrão cloranfenicol, no entanto, se apresentam como protótipos para o desenvolvimento de agentes terapêuticos novos.

6.7 Modelagem Molecular dos compostos bioativos

Os estudos de modelagem molecular dos compostos estudados neste trabalho envolveram o cálculo e otimização da estrutura química dos compostos, a determinação de propriedades físico-químicas, e a obtenção de modelos teóricos destas propriedades.

A primeira etapa da modelagem envolveu o desenho das estruturas químicas e cálculo de valores de propriedades físico-químicas que possam interferir na atividade antibacteriana dos compostos. A segunda etapa consistiu também em desenhar a estrutura química dos compostos e submeter estas a estudos de otimização de energia, cálculo de propriedades físico-químicas de caráter lipofílico, eletrônicas e estruturais de modo a apoiar a compreensão do seu mecanismo receptor de radicais e de sua reatividade molecular.

a) Estudo de Propriedades Físico-Químicas

As propriedades físico-químicas inicialmente escolhidas foram as descritas a partir do emprego da “Regra dos Cinco” de Lipinski (LIPINSKI, 2004). Esta regra foi formulada para avaliar a semelhança ou determinar se um composto químico com certa atividade biológica ou farmacológica tem propriedades que o tornam um provável fármaco a ser usado por via oral em humanos. A elaboração desta regra foi fundamentada em conjunto de fármacos absorvidos por difusão passiva no trato gastrointestinal e que apresentam lipofilicidade relativa (Lipinski, 2004). Nesta regra o coeficiente de partição não deve apresentar um valor maior que 5,0, o peso molecular não deve ultrapassar 500 Daltons, não deve ter mais que 5 grupos funcionais doadores e 10 grupos aceptores de ligação de hidrogênio. Para esta análise foi utilizado o programa computacional *Molinspiration webserver* disponível na internet (<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>). Com o uso deste programa computacional foram obtidos os valores das propriedades físico-químicas descritas por Lipinski e também de área de superfície topológica polar (TPSA), volume molecular (VM), e o número de rotações (nRot) livres de cada molécula.

Nesta etapa optou-se por incluir os compostos originalmente propostos e que se encontram em processo de purificação para fins de se obter informações que possam delinear o desenvolvimento de substâncias candidatas a novos fármacos. Os valores das propriedades físico-químicas de todos compostos estão descritas na tabela 13.

A partir dos resultados obtidos verificou-se que a apocinina, os derivados chalconas e a diapocinina desta estão em conformidade com a regra dos cinco de Lipinski. Ao observar os compostos estudados verificou-se que as chalconas derivadas da diapocinina, apresentam duas a três violações da regra em questão, a saber: coeficiente de partição, peso molecular e, para o composto 3',4',5'-trimetoxi, a propriedade que avalia o número de grupos de receptores de ligação de hidrogênio. As violações da regra dos cinco, principalmente a lipofilicidade, indicam que as chalconas derivadas da apocinina podem apresentar problemas de absorção se forem administradas via oral.

Tabela 13 - Valores de propriedades físico-químicas calculadas com o programa Molinspiration.

Compostos	Substituintes	PM* (Daltons)	nON	nOHNH	CLogP	nRot	TPSA	VM
							(Å ²)	(Å ³)
Apocinina	Original	166,18	3	1	1,18	2	46,53	153,15
	H	254,28	3	1	3,15	4	46,53	235,42
	4-OCH ₃	284,31	4	1	3,21	5	55,77	260,96
	3,4-OCH ₃	314,34	5	1	2,80	6	65,00	286,51
	3,4,5-OCH ₃	344,36	6	1	2,78	7	74,23	312,05
Diapocinina	Original	330,34	6	2	2,52	5	93,07	293,67
	H	506,55	6	2	6,47	9	93,07	458,20
	4-OCH ₃	566,61	8	2	6,59	11	111,53	509,29
	3,4-OCH ₃	626,66	10	2	5,77	13	130,00	560,38
	3,4,5-OCH ₃	686,71	12	2	5,74	15	148,47	611,47

*PM: Peso molecular; nOH: número de grupos de receptores de ligação de hidrogênio; nOHNH: doadores de ligações de hidrogênio (nON e não respectivamente), TPSA: área de superfície topológica polar, VM: volume molecular, nRot: número de rotaç

Em outro estudo, O'SHEA & MOSER (2008) estudaram as propriedades físico-químicas de diversas classes de fármacos antibacterianos como sulfonamidas, macrolídeos, β -lactâmicos, tetraciclina, fluorquinolonas, lincosamídicos, oxazolidinonas, glicopeptídeos, aminoglicosídeos, entre outros para estabelecer parâmetros estruturais comuns para atividade biológica. Os autores estabeleceram valores diferentes de propriedades físico-químicas para compostos ativos que possam atuar em bactérias Gram-negativas ou positivas. As propriedades estudadas foram peso molecular (PM), coeficiente de partição (ClogP), área de superfície polar (PSA), área de superfície polar relativa (%PSA), doadores ou aceptores de ligações de hidrogênio, e coeficiente de distribuição (CLogD_{7,4}), e os valores propostos encontram-se expressos na Tabela 14.

Tabela 14 - Média dos valores de propriedades físico-químicas de antibacterianos utilizadas como referência para o estudo de substâncias antibacterianas (O'Shea e Moser, 2008).

Propriedades Físico-Químicas	Bactérias	
	Gram-positivas	Gram-negativas

Peso Molecular (Daltons)	813	414
ClogP	2,1	-0,1
ClogD _{7.4}	-0,2	-2,8
PSA (Å ²)	243	165
%PSA (Å ²)	30	42
Doador-H	7,1	5,1
Aceptor-H	16,3	9,4

A análise das propriedades físico-químicas descritas na tabela 14 publicada por O'SHEA & MOSER (2008) verifica-se que a apocinina e as chalconas derivadas desta apresentam peso molecular próximo ao valor sugerido para substâncias Gram-negativas e longe das Gram-positivas. Entretanto, para as mesmas bactérias, o valor do coeficiente de partição obtido para as moléculas estudadas (tabela 13) é maior que o proposto para os valores de referência de O'Shea & Moser. Este raciocínio se aplica também para as propriedades de PSA, doador e aceitor de ligações de hidrogênio. Esta diferença pode indicar o porquê da ausência de atividade antibacteriana contra a cepa *Escherichia coli* estudada. Já para propriedades que são referência para Gram-positivas, observa-se que os valores do coeficiente de partição estão próximos ao proposto para antibacterianos ativos frente a estas bactérias. Os demais valores das propriedades do tipo PSA, do peso molecular e presença de grupos doadores e aceptores de hidrogênio estão muito diversos do sugerido como referência.

Para os derivados da diapocinina, verifica-se que o peso molecular determinado 506,55 – 686,71 daltons estão mais próximos do valor de referência para substâncias antibacterianas ativas contra Gram-positivas. Da mesma forma como para os derivados da apocinina, verifica-se que os valores calculados (tabela 13) estão muito distantes dos sugeridos como referência para as propriedades de do tipo PSA, do peso molecular e presença de grupos doadores e aceptores de hidrogênio, e coeficiente de partição. A partir desta análise, sugere-se que a reduzida atividade antibacteriana dos compostos elencados neste trabalho contra a cepa Gram-positiva e a ausência do efeito frente a Gram-negativa estudadas pode ser devido as estruturas químicas apresentarem valores de propriedades físico-químicas diferentes das propostas na literatura. Este fato demonstra que estes compostos podem ser submetidos estudos com a finalidade de aperfeiçoamento das propriedades físico-químicas estudadas.

b) Modelagem molecular da apocinina e da diapocinina e avaliação da relação com o efeito acceptor de radical

Cálculo de otimização de geometria estrutural

As moléculas foram desenhadas no pacote computacional *Spartan' 08 for Windows*, e as estruturas tridimensionais submetidas ao processo de otimização de geometria, empregando o método de mecânica molecular MMFF94 e o método da Teoria do Funcional de Densidade (DFT/B3LYP), e base de dados 6.31G*. Nesta etapa foram calculados os modelos de estrutura química em 3D (tubo), dos sítios de densidade local de potencial de ionização, dos descritores de propriedades físico-químicas energia de HOMO e LUMO, energia de formação ($E\Delta_f$), índice de eletrofilicidade global (ω), dureza (η), maciez (S) e potencial químico (μ), e *bandgap* (GAP) dos compostos apocinina e diapocinina. Estas propriedades foram obtidas para fins de avaliação da reatividade da estrutura química das substâncias utilizadas como material de partida para a síntese das chalconas. Os resultados das propriedades físico-químicas estão descritos na tabela 15.

Tabela 15 - Valores dos descritores de propriedades físico-químicas calculadas utilizadas para avaliação da reatividade molecular da apocinina e da diapocinina.

Propriedades Físico-Químicas	Compostos	
	Apocinina	Diapocinina
$E\Delta_f$ (au)	-574,638069	-1148,079030
E_{HOMO} (eV)	-5,91	-5,76
E_{LUMO} (eV)	-1,20	-1,11
GAP	4,71	4,65
η (eV)	-2,34	-2,32
ω (eV)	-2,69	-2,53
S (eV)	-0.21	-0.21
μ (eV)	3,55	3,43

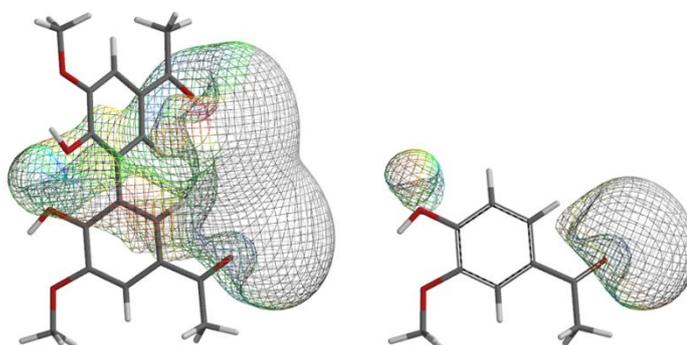
A partir dos valores das propriedades físico-químicas obtidas a partir da otimização da geometria é possível prever qual molécula, se a apocinina ou diapocinina, será mais reativa.

Geralmente, quando uma molécula apresenta valor de dureza química maior em relação a outro composto este apresentará menor reatividade (referência). Os valores das propriedades de dureza e maciez química são muito próximos entre as duas moléculas, o que não permite identificar com certeza qual a molécula mais reativa. Para as propriedades de potencial químico e o GAP, quando comparamos duas moléculas, observa-se que quanto maior estas propriedades mais estável é determinado composto. Neste contexto, verifica-se que a apocinina apresenta maiores valores de GAP e de potencial químico, e devido a estes resultados sugere-se que este composto é mais estável em relação à diapocinina. O índice de eletrofilicidade global está relacionado com a propensão de uma molécula aceitar ou doar elétrons em uma reação ou em um determinado ambiente. A apocinina apresentou valor de -2,69 eV em comparação a diapocinina, -2,53 eV, o que caracteriza que a molécula base para a produção de diapocinina é melhor nucleófilo em relação ao seu dímero.

Os modelos em 3D dos sítios de densidade local de potencial de ionização da apocinina e diapocinina em forma de tubo estão demonstrados na figura 29. A partir dos dados estruturais verifica-se que a diapocinina apresenta quebra de coplanaridade entre os dois anéis aromáticos fundidos. Os sítios de distribuição local do potencial de ionização estão localizados principalmente na carbonila e na hidroxila ligados ao anel aromático da apocinina. Para a diapocinina, observa-se a presença de sítios nos mesmos grupos da apocinina e que estes estão ligados entre si resultando em uma nuvem distribuída pela superfície dos anéis aromáticos e da união entre estes.

A apocinina apresentou capacidade aceptora de radicais DPPH e ABTS superior a diapocinina na maioria das concentrações avaliadas. Os resultados das propriedades físico-químicas indicam que a diapocinina seria mais reativa em relação à apocinina o que de fato não foi registrado neste trabalho. A partir dos sítios de distribuição local do potencial de ionização podemos sugerir que a molécula apresenta efeito de ressonância junto aos dois anéis o que pode promover a estabilização da estrutura da diapocinina. Este fato pode exercer influencia sobre o efeito eletrônico envolvido na atividade aceptora de radicais permitindo que a apocinina seja um acceptor de elétrons melhor que a diapocinina. Estes resultados serão alvo de estudos futuros a serem desenvolvidos na UNIPAMPA.

Figura 24 - Mapa dos sítios de densidade local de potencial de ionização da apocinina e da diapocinina usando Spartan' 08 for Windows e método DFT/3BLYP 6.31*G.



6. 8 Avaliação da Toxicidade *in Silico*

A análise da toxicidade *in silico*, como a genotoxicidade, mutagenicidade, efeitos irritante e sobre o sistema reprodutor, foi realizada com o emprego do programa computacional *Osiris Property Explorer* para todos os compostos propostos neste trabalho. Este estudo tem a finalidade de verificar o risco de toxicidade teórica e assim, de posse destes dados, propor qual é a melhor alternativa para direcionar a continuidade dos estudos com as moléculas propostas.

Os principais resultados estão dispostos na tabela 16, como risco baixo (1), médio (2), e alto (3) de causar os efeitos tóxicos descritos. Os compostos chalconas derivados da apocinina e da diapocinina com grupo metoxila (-OCH₃) ligado em posição *para* do anel B apresentaram alto e médio risco para o efeito irritante e para o sistema reprodutor, respectivamente. Os demais compostos estudados apresentaram baixo risco teórico de desenvolver os efeitos tóxicos estudados. A partir destes resultados sugere-se que os compostos estudados se apresentam como substâncias com relativa segurança para a continuidade dos estudos de planejamento e desenvolvimento de novos fármacos.

Tabela 15 - Risco de efeitos tóxicos calculados no programa *Osiris Property Explorer*[®] para as chalconas derivadas da apocinina e diapocinina.

Efeito*	Compostos							
	Apocininas				Diapocininas			
	H	4-OCH ₃	3,4-OCH ₃	3,4,5-OCH ₃	H	4-OCH ₃	3,4-OCH ₃	3,4,5-OCH ₃
Mutagênico	1	1	1	1	1	1	1	1
Tumorigênico	1	1	1	1	1	1	1	1
Irritante	1	3	1	1	1	3	1	1

Reprodutivo	1	2	1	1	1	2	1	1
--------------------	---	---	---	---	---	---	---	---

* Valor 1: risco baixo; 2: risco médio; 3: risco alto.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse trabalho, foi realizado o planejamento, a síntese e a determinação da atividade aceptora de radical e antibacteriana, da apocinina, diapocinina e uma série de oito derivados de chalconas. Em adição ao ensaio biológico, foi desenvolvida uma análise da relação estrutura-atividade através da determinação das propriedades físico-químicas, estereoeletrônicas e de toxicidade *in silico* dos mesmos.

Os compostos derivados de chalconas foram sintetizados através a reação de condensação aldólica de Claisen-Schmidt. A diapocinina foi sintetizada conforme a metodologia descrito por DASARI *et al.* (2008). Somente quatro compostos obtiveram sua formação comprovada, sendo que os demais compostos ainda se encontram em fase de estudo. Destes quatros compostos, seus rendimentos foram similares aos já relatados na literatura, e apresentaram dados de caracterização estrutural similares aos encontrados na literatura.

Em relação à atividade aceptora de radicais, observada a partir dos ensaios de DPPH e ABTS, os compostos apresentaram atividades superiores aos padrões utilizados, BHT e Trolox, respectivamente. No entanto, não apresentam atividades sequestrantes situadas entre 90 -100%, características para substâncias consideradas antioxidantes.

Na atividade antibacteriana, todos os compostos avaliados apresentaram atividade antibacteriana frente à cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, enquanto para *E. coli*, nenhuma atividade foi observada. Entretanto, os compostos apresentaram atividade antibacteriana inferiores comparados ao padrão cloranfenicol. Mesmo apresentando uma atividade antibacteriana baixa, estas moléculas se apresentam como substâncias protótipo para estudos de modificações estruturais com a finalidade de aumento da ação biológica, visto que algumas estão conforme os parâmetros delineados na Regra dos Cinco e, devido a isso, são promissoras a apresentar uma boa biodisponibilidade oral.

Ensaio experimentais de toxicidade devem ser realizados para confirmar os efeitos tóxicos teóricos aqui determinados, principalmente relacionados à irritabilidade e sobre o sistema reprodutor.

8. PERSPECTIVAS

- Aperfeiçoar os processos de obtenção dos compostos derivados das chalconas;
- Realizar ensaios toxicológicos experimentais nas moléculas já sintetizadas;
- Estudar substâncias análogas com a finalidade de aperfeiçoar o perfil de atividade biológica observada.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCARAZ, M. J.; VICENTE, A. M.; ARAICO, A.; DOMINGUÉZ, J. N.; TERCENIO, M. C.; FERRÁNDIZ, M. L. Role of nuclear factor- κ B and heme oxygenase-1 in the mechanism of action of an anti-inflammatory chalcone derivative in RAW 264,7 cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, p. 1191-1199, 2004.
- ALMEIDA, A.C., MARQUES, O. C., ARSLANIAN, C., CONDINO-NETO, A., XIMENES, V. F., 4-Fluor-2-methoxyphenol, an apocynin analog with enhanced inhibitory effect on leukocyte oxidant production and phagocytosis, **Eur. J. Pharmacol.** 660, 445–453, 2011.
- ALVAREZ M.; ZARELLI, E.P.; PAPPANO, N.B.; DE BATTISTA, N.B. Bacteriostatic action of synthetic polyhydroxylated chalcones against *Escherichia coli*. **Biocellular**, v. 28, p. 31-34, 2004.
- ANDERSEN, O.M.; MARKHAM, K.R. Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. 1. ed. New York: **Taylor & Francis Group**, 2006.
- ANVISA, Farmacopeia Brasileira, 5ª edição, vol 1 e 2, Brasília 2010.
- ARAÚJO, C.R.M.; LEITE FILHO, C.A.; SANTOS, V.L.A.; MAIA, G.L.A.; GONSALVES, A.A. Desenvolvimento de fármacos por hibridação molecular: uma aula prática de química medicinal usando comprimidos de paracetamol e sulfadiazina e a ferramenta virtual *SciFinder*. **Quim. Nova** v. 38(6), p. 868-873, 2015.
- ARROIO, A., HONÓRIO, K. M., SILVA, A. B. F., Propriedades Químico-quânticas empregadas em estudos das relações estrutura-atividade, **Quim. Nova**, Vol. 33, No. 3, 694-699, 2010.
- ÁVILA, H.P.; SMÂNIA, E.F.A.; MONACHE, F.D.; SMÂNIA JÚNIOR, A. Structure–activity relationship of antibacterial chalcones. **Bioorg. Med. Chem.** v. 16, p. 9790-9794, 2008.
- BABIOR, B. M. NADPH oxidase. **Curr. Opin. Immunol.** v. 16, p. 42–47, 2004.
- BACHARACH, A.L.; CUTHBERTSON, W.F.J. The Cup-Plate Method in Microbiological Assay, with Special Reference to Riboflavine and Aneurine. **Analyst** v. 73, p. 334-340, 1948.
- BAKER, D. D.; CHU, M.; OZA, U.; RAJGARHIA, V., The value of natural products to future pharmaceutical discovery, **Nat. Prod. Rep.** v. 24, p. 1225, 2007.
- BANDGAR, B.P.; GAWANDE, S.S. Synthesis and biological screening of a combinatorial library of b-chlorovinylchalcones as anticancer, anti-inflammatory and antimicrobial agents. **Bioorg. Med. Chem.** v. 18, p. 2060-2065, 2010.
- BARREIRO, E.J.; RODRIGUES, C.R.; ALBUQUERQUE, M.G.; SANT'ANNA, M.R.; ALENCASTRO, R.B. Modelagem Molecular: Uma Ferramenta Para O Planejamento Racional De Fármacos Em Química Medicinal. **Quím. Nova**, v. 20(3), p. 300-10, 1997.
- BARREIRO, E.J.; FRAGA, C. A. M., Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos, **Artmed Ed. Ltda**: Porto Alegre, 2001.

- BARREIRO, E.J. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo, **Quim. Nova**, 25, 1172-1180, 2002.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**, 2ed. Porto Alegre, RS: Artmed Editora, 2008.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V.S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos, **Quim. Nova**, v. 32, n.3, 679-688, 2009.
- BATOVSKA, D. *et al.* Study on the substituents' effects of a series of synthetic chalconas against the yeast *Candida albicans*. **Eur. J. Med. Chem.** v. 42, p. 87-92, 2007.
- BOECK, P.; LEAL, P. C.; YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. *et al.*, Antifungal activity and studies on mode of action of novel xanthoxylone-derived chalcones. **Archiv der Pharmazie**, v. 338 n. 2-3, p. 87-95, 2005.
- CASTOR, L.R.G.C.; LOCATELLI, K.A.; XIMENES, V.F. Pro-oxidant activity of apocynin radical. **Free Rad. Biol. Med.** v. 48, p. 1636-1643, 2010.
- CORREA, R. **Chalconas, imidas e derivados como moléculas bioativas: estudo da relação estrutura-atividade**. 2009. 174 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.
- CERQUEIRA, F.M.; MEDEIROS, M.H.G.; OHARA, A. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Quim Nova** v. 30(2), p. 441-449, 2007.
- COOPER, M. A.; SHALES, D. Fix the antibiotics pipeline, **Nature**, v. 472, p. 32, 2011.
- CZAKO, B., KURTI, L. Strategic applications of named reactions in organic synthesis, **Elsevier Academic Press**, 2005.
- DASARI, M.S.; RICHARDS, K.M.; ALT, M.L.; CRAWFORD, C.F.P.; SCHLEIDEN, A.; INGRAM, J.; HAMIDOU, A.Z.A.; WILLIAMS, A.; CHERNOVITZ, P.A.; LUO, R.; SUN, G. Y.; LUCHTEFED, R.; SMITH, R. E. Synthesis of diapocynin, **J. Chem. Educ.** v. 85, n. 3, p. 411-412, 2008.
- DEVIA, C.M. PAPPANO, N.B.; DE BATTISTA, N.B. Structure-biological activity relationship of synthetic trihydroxylated chalcones. **Rev. Microbiol.**, v. 29, n. 4, out/dez 1998. Doi: 10.1590/S0001-37141998000400014.
- DEVIA, A.C.; FERRETTI, F.A.; PONCE, C.A.; TOMÁ, F. Conformational equilibrium and intramolecular hydrogen bond of 4''X and 4X substituted 2''(OH) chalcones. **J. Mol. Struct. (Theochem)**, v. 493, p. 187-197, 1999.
- DE ROSA, S.; CIRILLO, P.; PAGLIA, A.; SASSO, L.; DI PALMA, V.; CHIARIELLO, M. Reactive oxygen species and antioxidants in the pathophysiology of cardiovascular disease: does the actual knowledge justify a clinical approach? **Curr. Vasc. Pharmacol.** v. 8(2), p. 259-275, 2010.
- DIMMOCK, J.R.; KANDEPU, N.M.; HETHERINGTON, M.; QUAIL, J.W. PUGAZHENTH, U, SUNDOM, A. M., CHAMANKHAH, M., ROSE, P., PASS, E., ALLEN, T. M., HALLERAN, S., SZYDLOWSKI, J., MUTUS, B., TANNOUS, M., MANAVATHU,

E. K., MYERS, T. G., De CLERCQ, E., BALZARINI J. , Cytotoxic activities of mannich bases of chalcones and related compounds. **J. Med. Chem.** v. 41(7), p. 1014-26, 1998.

DIMMOCK, J.R.; ELIAS, D. W.; BEAZELY, M. A.; KANDEPU, N. M. Bioactivities of chalcones. **Curr. Med. Chem.** v. 6, p. 1125- 1149, 1999.

DINKOVA-KOSTOVA, A.T.; MASSIAH, M.A.; BOZAK, R.E.; HICKS, R.J.; TALALAY, P. Potency of Michael reaction acceptors as inducers of enzymes that protect against carcinogenesis depends on their reactivity with sulfhydryl groups. **PNAS** v. 98(6), p. 3404–3409, 2001. doi: 10.1073ypnas.051632198.

DUARTE-ALMEIDA, J. M., SANTOS, R. J., GENOVESE, M. I., LAJOLO, F. M., Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas**, 26(2), 446-452, 2006.

FERREIRA, D. T. Sínteses e semi-sínteses de fármacos, *in*: ANDREI, C.C., FERREIRA, D. T., FACCIONE, M., FARIA, T. J, **Da química medicinal à química combinatória e modelagem molecular**. 1 ed. São Paulo: Manole, cap. 3, p. 49-63, 2003.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil**. 43(1), p. 61-68, 1997.

GO, M.L.; WU, X.; LIU, X.L. Chalcones: an update on cytotoxic and chemoprotective properties. **Curr. Med. Chem.** v. 12; p. 483-499, 2005.

GUIDO R.V.C.; ANDRICOPULO A.D.; OLIVA G. Planejamento de Fármacos, Biotecnologia e Química Medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, v. 24(70), p. 81-98, 2010.

GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.D.S.; PUPO, M. T. Importância Terapêutica e Perspectivas para a Descoberta e Desenvolvimento de Novos Agentes. **Quim. Nova**. v.33(3), p. 667-679, 2010.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol.** v. 186, p. 1-85. 1990.

HALLIWELL, B., Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. **Am J Med.** v.91 (3C), p. 14S-22S, 1991.

HALLIWELL, B. Biochemistry of Oxidative Stress. **Biochem. Soc. Transac.** v. 35(5), p. 1147-1150, 2007. doi:10.1042/BST0351147.

HANS, R.H.; GUANTAI, E.M.; LATEGAN, C.; SMITH, P.J.; WAN, B.; FRANZBLAU, S.G.; GUT, J.; ROSENTHAL, P.J.; CHIBALE, K. Synthesis, antimalarial and antitubercular activity of acetylenic chalcones. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 20, p. 942–944, 2010.

HANSCH, C.; DEUTSCH, E.W., The Structure-Activity Relationship in Penicillins, **J. Med. Chem.**, v. 8(5), p. 705–706, 1965.

HARA, H., ROYOKO, I. MASAYUKI, N., TETSURO, K., MAMORU, K., TETSUO, A., Newly synthesized ‘Hidabeni’ chalcone derivatives poently supress LPS-induced NO

production via inhibition of stat1, but not NF- κ B, JNK, and p38, Pathways in Microglia. **Biol. Pharm. Bull.** v. 37(6), p. 1042-1049, 2014.

HEUMÜLLER, S.; WIND, S.; BARBOSA, E.; SCHMIDT, H.H.H.W. BUSSE, R., SCHÖDER, K., BRANDES, R. P., Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant, **Hypertension** v. 51, p. 211-217, 2008.

HOREMANS, T.; BOULET, G.; VAN KERCKHOVEN, M.; BOGERS, J.; THYS, S. VERVAEK, A., DELPUTTE, P., MAES, L., COS, P., *In vivo* evaluation of apocynin for prevention of *Helicobacter pylori*-induced gastric carcinogenesis. **Eur J Cancer Prev.**, v. 2, 2016.

HUR, J.; LEE, P.; KIM, M.J.; KIM, Y.; CHO, Y.W. Ischemia-activated microglia induces neuronal injury via activation of gp91phox NADPH oxidase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 391, p. 1526–1530, 2010.

ISMAIL, H.H.; SCAPOZZA, L.; RUEGG, U.T.; DORCHIES, O.M. Diapocynin, a Dimer of the NADPH Oxidase Inhibitor Apocynin, Reduces ROS Production and Prevents Force Loss in Eccentrically Contracting Dystrophic Muscle. **Plos One** v. 9(10), p. 1-8, 2014.

ISHITSUKA, H., NINOMIYA, Y. T.; OHSAWA, C.; FUJII, M.; SUHARA, Y. Direct and specific inactivation of rhinovirus by chalcone Ro 09-0410. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 22 n. 4, p. 617-21, 1982.

JANAKI P., B. BHADRARAH, P. ACHARYA, N. and SUBHASHINI, N. J. P., Synthesis and Antibacterial Activity of Novel Chalcone Derivatives of Apocynin. **Lett. Drug Des. Discov.** v. 10, p. 923-927, 2013.

JOHNSON, D.K.; SCHILLINGER, K.J.; KWAIT, D.M.; HUGHES, C.V.; MCNAMARA, E.J.; ISHMAEL, F.; O'DONNELL, R.W.; CHANG, M.M.; HOGG, M.G.; DORDICK, J.S.; SANTHANAM, L.; ZIEGLER, L.M.; HOLLAND, J.A. Inhibition of NADPH oxidase activation in endothelial cells by ortho-methoxy-substituted catechols. **Endothelium** v. 9(3), p. 191-203, 2002.

KANEGAE, M.P.P.; FONSECA, L.M.; BRUNETTI, I.L.; SILVA, S.O.; XIMENES, V.F. The reactivity of ortho-methoxy-substituted catechol radicals with sulfhydryl groups: contribution for the comprehension of the mechanism of inhibition of NADPH oxidase by apocynin. **Biochem. Pharmacol.** v. 74(3), p. 457-464, 2007.

KANEGAE, M.P.P.; CONDITO-NETO, A.; PEDROSA, L.A.; ALMEIDA, A.C.; REHDER, J.; FONSECA, L.M.; XIMENES, V.F. Diapocynin versus apocynin as pretranscriptional inhibitors of NADPH oxidase and cytokine production by peripheral blood mononuclear cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 393, p. 551–554, 2010.

KIM, B.-T.; KWANG-JOONG, O.; CHUN, J.C.; HWANG, K.J. Synthesis of Dihydroxylated Chalcone Derivatives with Diverse Substitution Patterns and Their Radical Scavenging Ability toward DPPH Free Radicals. **Bull. Korean Chem. Soc.** v. 29(6), p. 1125-1130, 2008.

KOROLKOVAS, A.; FERREIRA, E. I. Planejamento Racional de Fármacos, **Quim. Nova**, 11, 320, 1988.

KROMANN, H., LARSEN, H., BOESEN, T., SCHONNING, K., NIELSEN, S. F., Synthesis of prenylated benzaldehydes and their use in the synthesis of analogues of licochalcone A, **Eur. J. Med. Chem.**, v. 39(11), p. 993-1000, 2004.

KUMARASAMY, K. K., TOLEMAN, M. A., WALSH, T. R., BAGARIA, J. *et al.*, Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study, **Lancet. Infect. Dis.** v.9, p. 597-602, 2010.

KUMAR, B.; KUMARI, B.; SINGH, N.; RAM, B.; BALRAM, B. Synthesis, characterization and antibacterial activity of some new chalcone Derivatives. **Der Pharma Chem.** v. 7(2), p. 286-291, 2015.

KURUP, A. Chlebicki MP, Ling ML, Koh TH, Tan KY, Lee LC, Howe KB Control of a hospital-wide vancomycin-resistant Enterococci outbreak. **Am. J. Infect. Control.** v. 36, n. 3, p. 206-211, 2008.

Kushwaha, K.; Kaushik, N.; Lata; Jain, S.C. Design and synthesis of novel 2H-chromen-2-one derivatives bearing 1,2,3-triazole moiety as lead antimicrobials. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** V. 24, p. 1795–1801, 2014.

LEHUÉDÉ, J.; FAUCONNEAU, L.; BARRIER, M.; OURAKOW, A.; *et al.*, Synthesis and antioxidant activity of new tetraarypyrroles, **Eur. J. Med. Chem.** v. 34, p. 991, 1999.

LI, H.; CHEN, Y.; ZHANG, B.; NIU, X.; SONG, M.; LUO, Z.; LU, G.; LIU, B.; ZHAO, X.; WANG, J.; DENG, X. Inhibition of sortase A by chalcone prevents *Listeria monocytogenes* Infection, **Biochem. Pharmacol.** v. 106, p. 19–29, 2016.

LI, M.; LIU, Z.; ZHUAN, L.; WANG, T.; GUO, S.; WANG, S.; LIU, J.; Ye, Z. Effects of apocynin on oxidative stress and expression of apoptosis-related genes in testes of diabetic rats, **Mol. Med. Rep.**, doi:10.3892/mmr.2012.1132, 2012.

LIPINSKI, C.A. Lead and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 1, p. 337-341. 2004.

LÓPEZ, S. N.; CASTELLI, M. V.; ZACCHINO, S. A.; DOMÍNGUEZ, J. N. *et al.*, In vitro antifungal evaluation and structure-activity relationships of a new series of chalcones derivatives and synthetic analogues, with inhibitory properties against polymers of the fungal cell wall. **Bioorg. Med. Chem.** v. 9, p. 1999-2013, 2001.

LUCHTEFELD, R; LUO, R.; STINE, K.; MIKAELA. A.L.; CHERNOVITZ, P.A.; SMITH, R.E. Dose formulation and analysis of diapocynin. **J. Agric. Food Chem.** v. 56(2), p. 301–306, 2008.

MACHADO, T. B., LEAL, I. C., KUSTER, R. M., AMARAL, A. C, KOKIS, V., Brazilian phytopharmaceuticals - evaluation against hospital bacteria. **Phytother. Res.** v. 19(6), p. 519-525, 2005.

MANN, J. **Murder, Magic, and Medicine**, Oxford University Press: Oxford, p. 1-16, 1992.

MATHIESEN, L.; MALTERUD, K.E.; SUND, R.B. Hydrogen bond formation as basis for radical scavenging activity: a structure-activity study of C-methylated dihydrochalcones from *Myrica gale* and structurally related acetophenones, **Free Rad. Biol. Med.** v. 22, p. 307, 1997.

- MCFARLAND, J. Nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. **J. Am. Med. Assoc.** v. 14, p. 1176-1178, 1907.
- MDEE, L. K, YEBOAH, S. O, ABEGAZ, B. M, Rhuschalcones II-VI, five new bichalcones from the root bark of *Rhus pyroides*, **J. Nat. Prod.** v. 66(5), p. 599-604, 2003.
- MENEGATTI, R.; MANSSOUR, C. A.; BARREIRO, E. J. A importância da Síntese de Fármacos, **Quim. Nova Esc.** v. 3, p. 6-22, 2001.
- MIHIGO, S.O.; MAMMO, W.; BEZABIH, M.; ANDRAE-MAROBELA, K.; ABEGAZ, B. M. Total synthesis, antiprotozoal and cytotoxicity activities of rhuschalcone VI and analogs, **Bioorg. Med. Chem.** v. 18(7), p. 2462-2473, 2010.
- MIRANDA, C.L.; STEVENS, J.F.; IVANOV, V.; MCCALL, M.; FREI, B.; DEINZER, M.L.; BUHLER, D.R. Antioxidant and Prooxidant Actions of Prenylated and Nonprenylated Chalcones and Flavanones in Vitro. **J. Agric. Food Chem.** v. 48, p. 3876-3884, 2000.
- MIRANDA, A.L.P.; FRAGA, C.A.M. Atividade seqüestradora de radical livre determinação do potencial antioxidante de substâncias bioativas, In: MONGE A.; GANELLIN, C. R. (Ed.). **Practical Studies for Medicinal Chemistry.** Genebra: IUPAC, 2006.
- MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseados em produtos naturais, **Quím. Nova**, v. 24, n.1, p. 105-111, 2001.
- MONTANARI, C. A. QUÍMICA MEDICINAL: Métodos e fundamentos em planejamento de fármacos, 1ª ed., EDUSP Editora, 720 p., São Paulo, 2010.
- NAVARINI, A. L. F.; CHIARADIA, L. D.; MASCARELLO, A.; FRITZEN, M.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Hidroxychalcones Induce Apoptosis in B16-F10 Melanoma Cells Via GSH and ATP Depletion. **E. J. Med. Chem.** v. 44, p. 1630-1637, 2009.
- NEPALI, K.; SHARMA, S.; SHARMA, M.; BEDI, P. M. S.; DHAR, K. L.; Rational approaches, design strategies, structure activity relationship and mechanistic insights for anticancer hybrids. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 77, p. 422, 2014.
- NIELSEN, S.F.; BOESEN, T., LARSEN, M., SCHONNING, K., KROMANN, H Antibacterial chalcones-bioisosteric replacement of the 4'-hydroxy group. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 12, p. 3047-3054, 2004
- NIELSEN, S. F. et al. Cationic chalcone antibiotics. Design, synthesis, and mechanism of action. **J. Med. Chem.** v. 48, p. 2667-2677, 2005.
- NOWAKAWSKA, Z. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. **Eur. J. Med. Chem.** v. 42, p. 125-137, 2007.
- NOVARETTI, M. C. Z., AQUINO, S., & PISCOPO, M. R. Controle de Vendas de Antibióticos no Brasil: Análise do efeito dos atos regulatórios no uso abusivo pelos consumidores. **Revista Acadêmica São Marcos.** v.4, n.2, p. 25-39, 2014.

- OLIVEIRA, G.A.*et al.*, Isolation in Brazil of nosocomial *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin, **Infect. Contr. Hosp. Epidem.**, v. 22, n. 7, p. 443-448, 2001.
- OPLETALOVA, V. Chalcones and their heterocyclic analogs as potential therapeutic agents in bacterial diseases. **Ceska Slov. Farm.** v. 49, n. 6, p. 276-284, 2000.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **WHO's first global report on antibiotic resistance reveals serious, worldwide threat to public health.** <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/en/#>, acessado em 03/08/2015.
- O'SHEA, R.; MOSER, H.E. Physicochemical properties of antibacterial compounds: implications for drug discovery. **J. Med. Chem.** v. 51, n. 10, p. 2871-2878, 2008.
- PANCOTE, C.G., **Planejamento, síntese e avanço biológicos de derivados pirrólicos com potencial atividade antiinflamatória**, Universidade de São Paulo, Tese (doutorado em Fármaco e Medicamentos), São Paulo, 2009.
- PATIL, A.D.; FREYER, A.J.; KILLMER, L.; OFFEN, P.; TAYLOR, P. B.; VOTTA, B. J.; JOHNSON, R. K. "A New Dimeric Dihydrochalcone and a New Prenylated Flavone from the Bud Covers of *Artocarpus altilis*: Potent Inhibitors of Cathepsin K". **J. Nat. Prod.** v. 65, p. 624-627, 2002.
- PETRÔNIO, M.S.; ZERAIK, M.L.; FONSECA, L.M.; XIMENES, V.F. Apocynin: Chemical and Biophysical Properties of a NADPH Oxidase Inhibitor. **Molecules** v. 18, p. 2821-2839, 2013. Doi:10.3390/molecules18032821.
- PELLEGRINI, N.; RE, R.; YANG, M.; EVANS, C.R. Screening of dietary Carotenoids and Carotenoid-Rich Fruit Extracts for Antioxidant Activities Applying 2,2'-Azinobis (3-ethylenebenzothiazoline-6 sulfonic acid Radical Cation Decolorization Assay. **Meth. Enzym.**, v. 299, p. 379-389, 1999.
- PRASAD, Y.R.; RAO, A.S.; RAMBABU R. Synthesis of some 4'-Amino Chalcones and their Antiinflammatory and Antimicrobial Activity. **Asian J. Chem.** v. 21(2), p. 907-914, 2009.
- PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S. **Introdução à espectroscopia**. 4ª ed., São Paulo: Cengage Learning, 2010. 716 f.
- RAO, N.S.; KISTAREDDY, C.; BHAVANI, B.; BHAVANI, R. Synthesis, Antibacterial and Antifungal Activity of Some Novel Chalcone Derivatives Derived from Apocynin. **Chem. J.** v. 03(6), p.143-148, 2013.
- RAYNER, C.; MUNCKHOF, W.J. Antibiotics currently used in the treatment of infections caused by *Staphylococcus aureus*, **Intern. Med. J.**, 2005.
- SAHU, N.K.; BALBHADRA, S.S.; CHOUDHARY, J.; KOHLIET, D.V. Exploring pharmacological significance of chalcone scaffold: a review. **Current Med. Chem.** v. 19, p. 209-225, 2012.
- SANTOS, N.Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto Contexto Enferm.** v. 13, p. 64-70, 2004. Doi: 10.1590/S0104-07072004000500007.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, Florianópolis: Editora da UFSC, 1102p, 2007.

- SHEBIS, Y.; ILUZ, D., KINEL-TAHAN, Y.; DUBINSKY, Z.; YEHOOSHUA, Y. Natural Antioxidants: Function and Sources. **Food Nutr. Sci.** v. 4, p. 643-649, 2013.
- SHIMOKORIYAMA, M. In: Flavanon es chalcones and aurones. Geissman, T. A. New York: **Mac Millan Company**, p. 286-313, 1962.
- SIVAKUMAR, P.M.; PRIYA, S.; DOBLE, M. Synthesis, Biological Evaluation, Mechanism of Action and Quantitative Structure–Activity Relationship Studies of Chalcones as Antibacterial Agents, **Chem. Biol. Drug Des.** v. 73, p. 403-415, 2009.
- SIVAKUMAR, P.M.; PRABHAKAR, P.K.; DOBLE, M. Synthesis, antioxidant evaluation and QSAR studies of chalcones. **Med. Chem. Res.** v. 20(4), p. 482-492, 2011.
- SOARES, J.R.; DINIS, T.C.; CUNHA, A.P.; ALMEIDA, L.M. Antioxidant activities of some extracts of *Thymus zygis*. **Free Radical Res.** v. 26, n.5, p. 469-478, 1997.
- STENFANSKA J., PAWLICZAK R. Apocynin: Molecular Aptitudes. **Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation**, Article ID 106507, 10 pages, 2008.
- STOLK, J.; HILTERMANN, T.J.; DIJKMAN, J.H.; VERHOEVE, A.J. Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.** v. 11, p. 95-102, 1994.
- TANG, Y.; ZHU, W.; CHEN, K.; JIANG, H. New technologies in computer-aided drug design: Toward target identification and new chemical entity discovery. **Drug Disc. Today Techn.** v. 3(3), p. 307-313. 2006.
- TUMBARELLO, M., DONATI, K.G., TACCONELLI, E., CITTON, R., *et al.*, Risk factors and predictors of mortality of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) bacteraemia in HIV-infected patients. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 50, p. 375-82, 2002.
- TSUKIYAMA, R., KATSURA, H., TOKURIKI, N., KOBAYASHI, M. Antibacterial activity of licochalcone A against spore-forming bacteria. **Antim. Agents Chemother.** v. 46(5), p. 1226-1230, 2002.
- VALLA, A.; VALLA, B.; CARTIER, D.; LE GUILLOU, R. *et al.*, New síntesis and potencial antimalarial activities of new retinoid-like chalcones. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 41, p. 142-146, 2006.
- VICTOR, V.M.; ROCHA, M.; SOLÁ, E.; BAÑULS, C.; GARCIA-MALPARTIDA, K.; HERNÁNDEZ-MIJARES, A. Oxidative stress, endothelial dysfunction and atherosclerosis. **Curr. Pharm. Des.** v. 15(26), p. 2988-3002, 2009.
- VIEGAS Jr, C.; BOLZANI, V. da S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna; **Quim. Nova**, 29, 326, 2006.
- VIEGAS, Jr. C.; SILVA, D. H. S.; PIVATTO, M.; de REZENDE, A. *et al.*, Lipoperoxidation and cyclooxygenase enzyme inhibitory piperidine alkaloids from *Cassia spectabilis* Green fruits, **J. Nat. Prod.**, 70, 2026, 2007.

VIEIRA, L. C. C. Síntese de derivados de chalconas e de 2-quinolinonas visando a busca por inibidores das enzimas cruzafina e da família BET *Bromodomain*, Universidade Federal de São Carlos, Tese de doutorado em Química, 2014.

VISIOLI, F. Antioxidants in Mediterranean diets. **World Rev. Nutr. Diet.** v. 87, p. 43-55, 2000.

VOGEL, A.I. **Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry.** 5 ed. New York : John Wiley & Sons, 1989. p.1017.

XIAOYU, L., SAINANS, W., JIE, J., Eur. J., Synthesis and biological evaluations of noel apocynin analogues, **Med. Chem.** 45, 2691-2698, 2011.

ZUANAZZI, J.A.S. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 4ª Ed., Porto Alegre/Florianópolis: Universidade UFRGS/Ed. Da UFSC, p. 499-526, 2002.

WALSH, C.; Antibiotics: Actions, Origins, Resistance, **ASM Press:** Washington, 2003.

WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistências microbiana: Uma guerra perdida? Boletim Uso Racional de Medicamentos, v. 1 (4), 2004. ANVISA: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/rede_rm/2007/2_060807/opas_1_uso_indiscriminado.pdf, acessado em 03/08/2015.

WU, J. *et al.*, Synthesis and crystal structure of chalcones as well on cytotoxicity and antibacterial properties, **Med. Chem. Res.** v. 21, p. 444-452, 2012.

WRIGHT, G. D. Antibiotics: A new hope, **Chem. Biol.**, v. 19, p. 3-9, 2012.

XIMENES, V.F.; KANEGAE, M.P.; RISSATO, S.R.; GALHIANE, M.S. The oxidation of apocynin catalyzed by myeloperoxidase: Proposal for NADPH oxidase inhibition. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 457, p. 134–141, 2007.

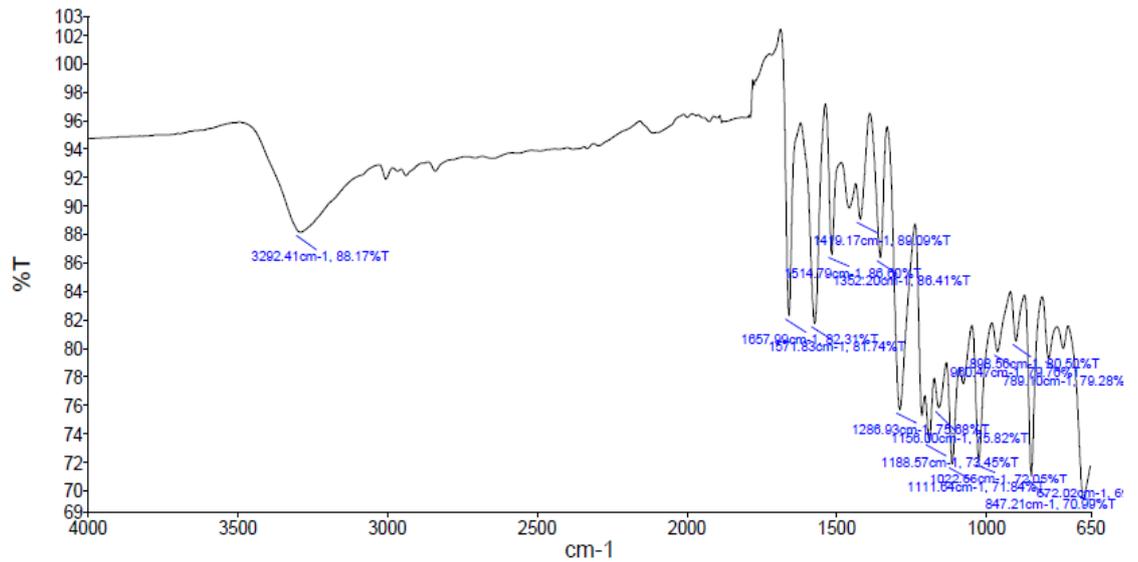
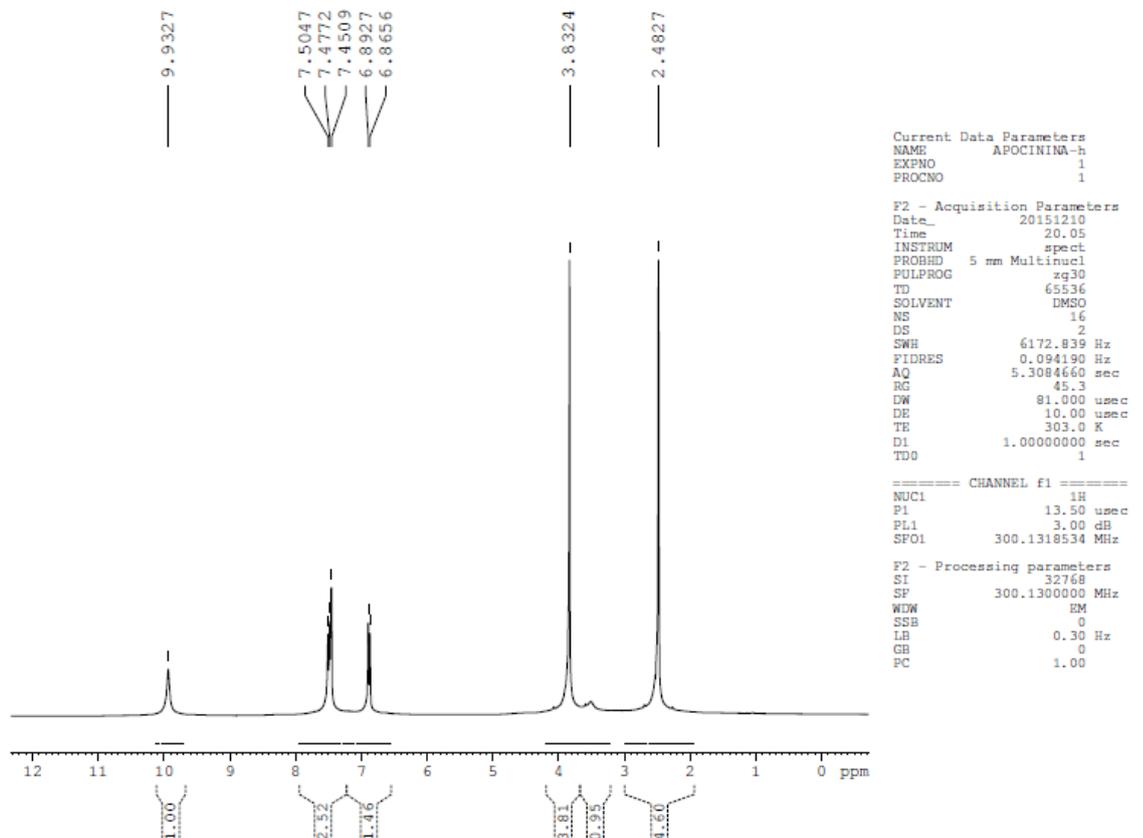
YAZDAN, S. K., SAGAR, V., SHAIK, A. B., Chemical and biological potentials of chalcones: A review, **Org. Med. Chem.** v.1, 2015.

YUNES, R. A., PEDROSA, R. C., CECHINEL, V., Fármacos e fisioterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fisioterápicos e fitofármacos no Brasil, **Quím. Nova**, v. 24, n. 1, 147-152, 2001.

ANEXO I – ESPECTROS DE INFRAVERMELHO E DE RMN

1. Apocinina (acetofenona)

Figura 25: Espectro IV da apocinina

Figura 26: Espectro de RMN ¹H da apocinina

2. *(E)*-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-phenylprop-2-en-1-one

Figura 27: Espectro de IV da *(E)*-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-phenylprop-2-en-1-one

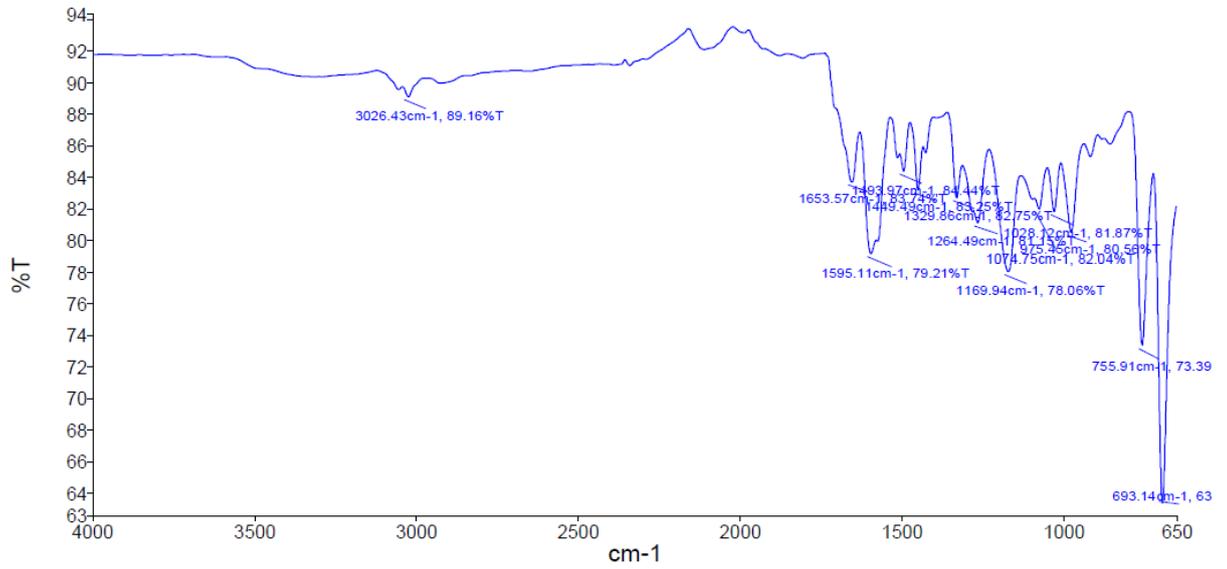
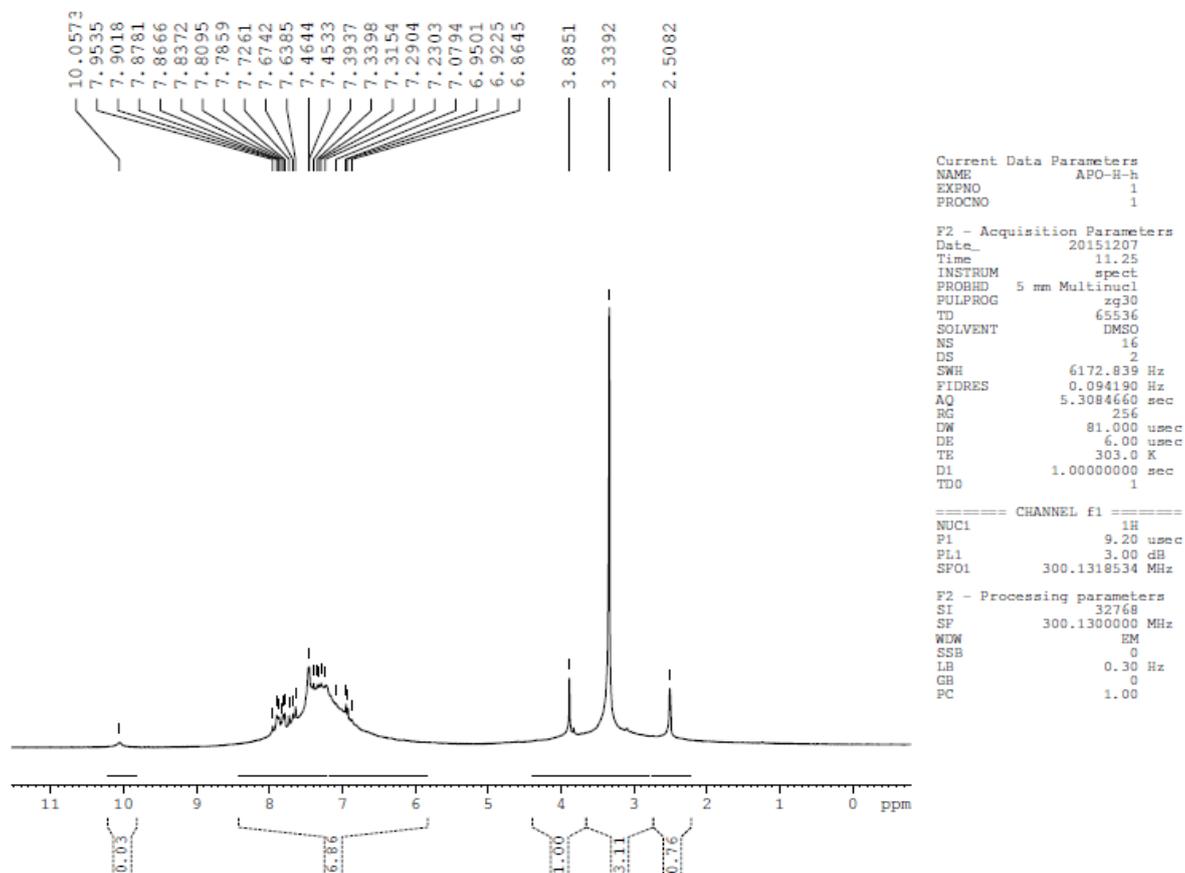


Figura 28: Espectro de RMN¹H da (*E*)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-phenylprop-2-en-1-one.



3. (*E*)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one

Figura 29: Espectro de IV da (*E*)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one.

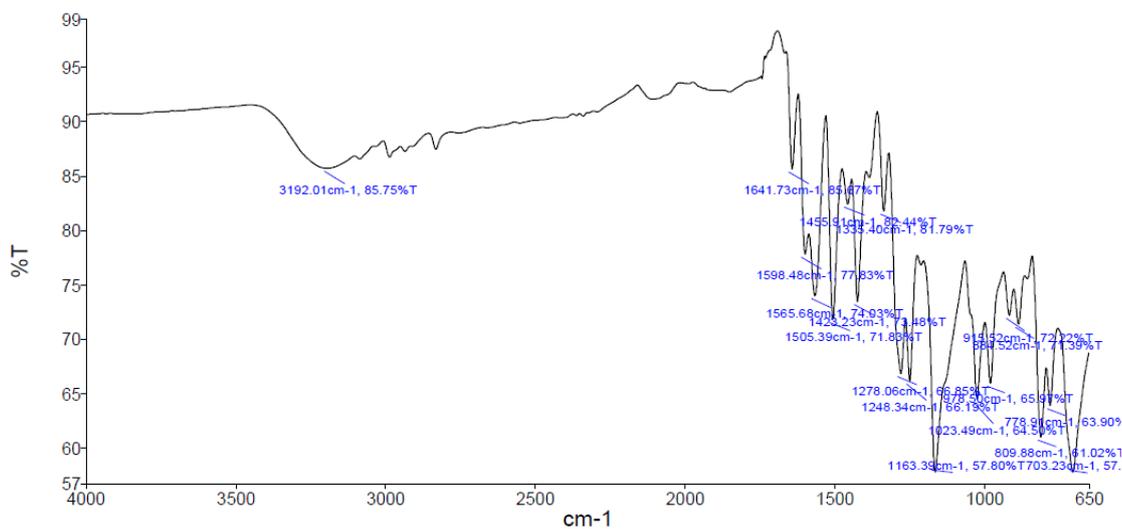
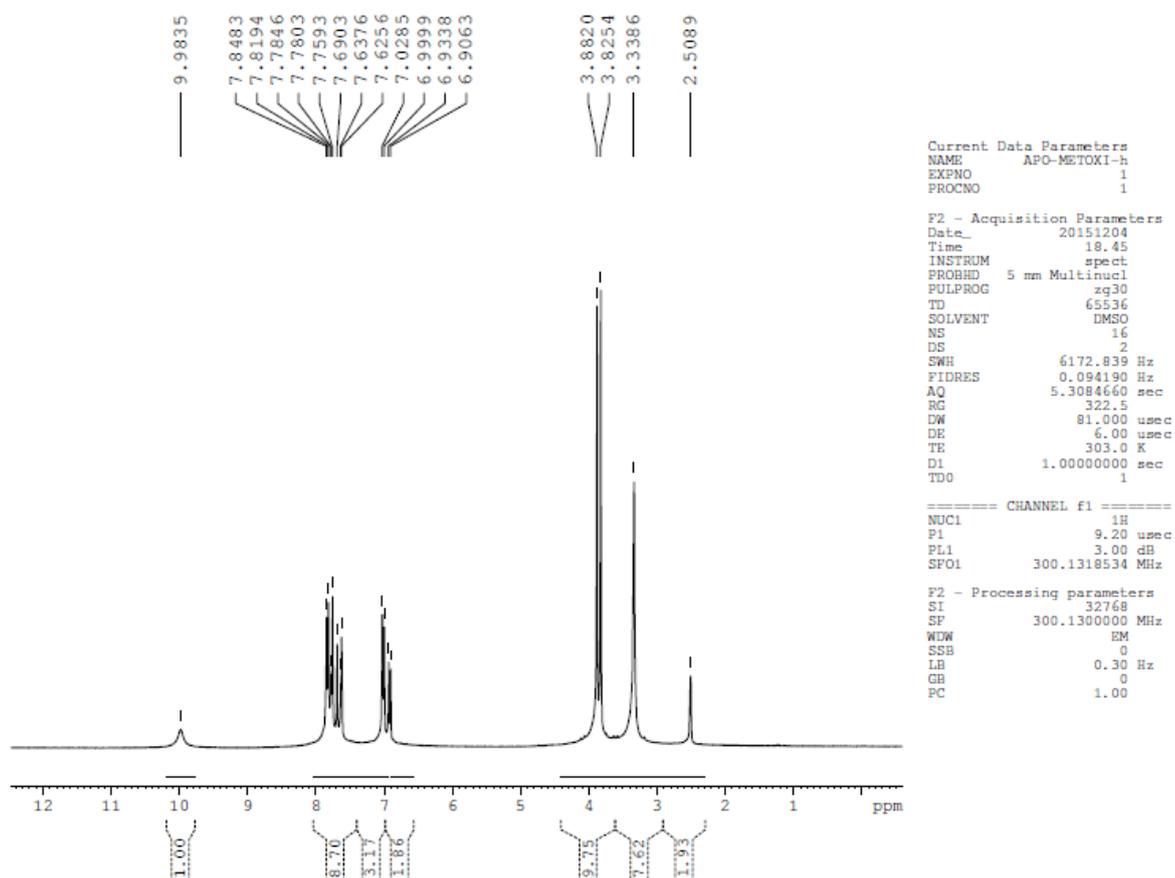


Figura 30: Espectro de RMN¹ H da *(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one*.



4. *(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one*

Figura 31: Espectro de IV da *(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one*

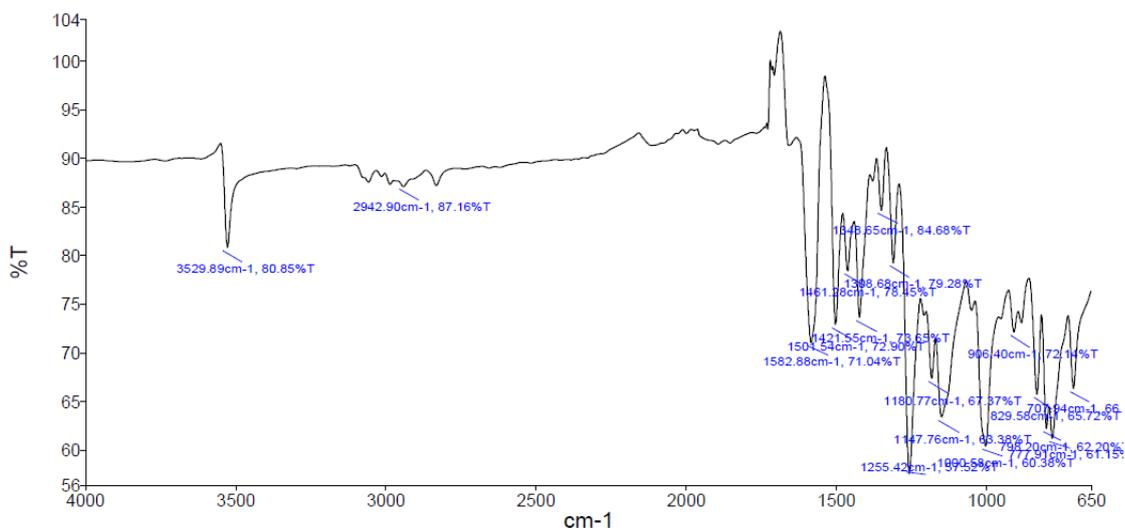
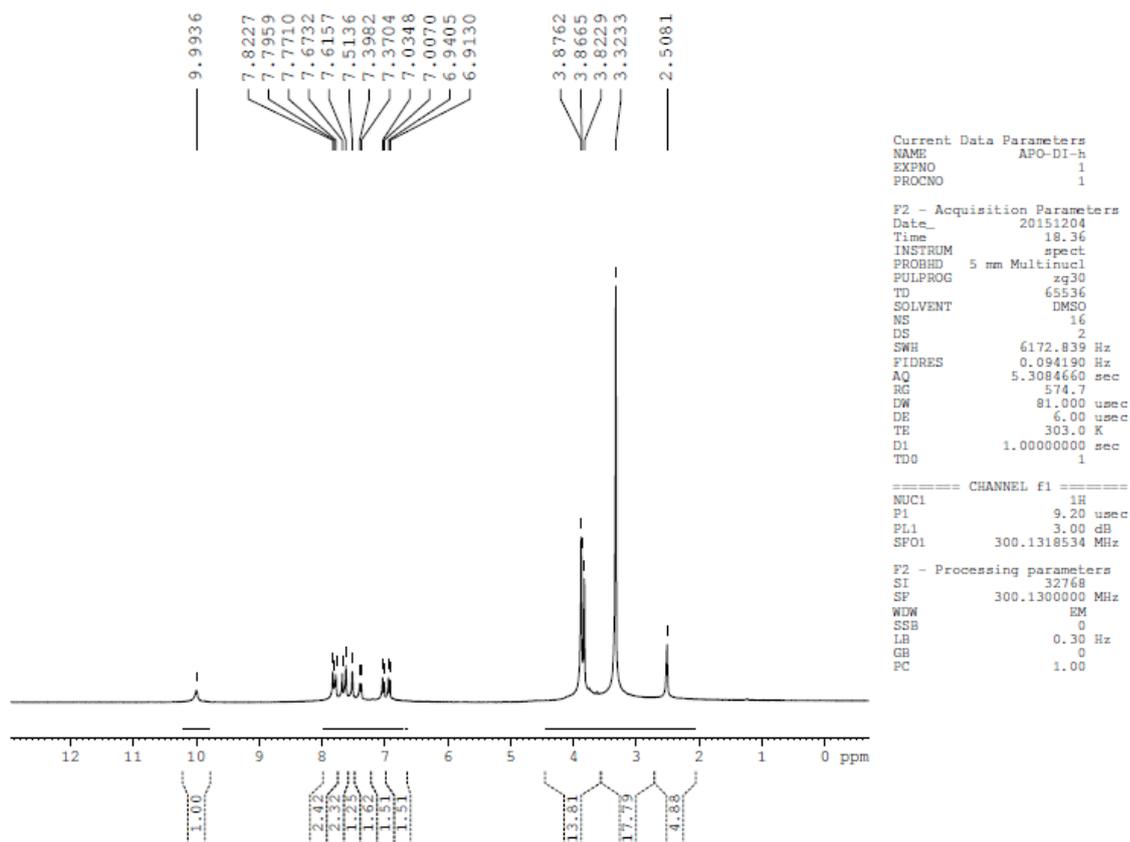


Figura 32: Espectro de RMN¹H da *(E)*-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one.



5. *Bis*-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)ethanone

Figura 33: Espectro de IV da *Bis*-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)ethanone.

Figura 35: Espectro de IV da *Bis-(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-phenylprop-2-en-1-one*.

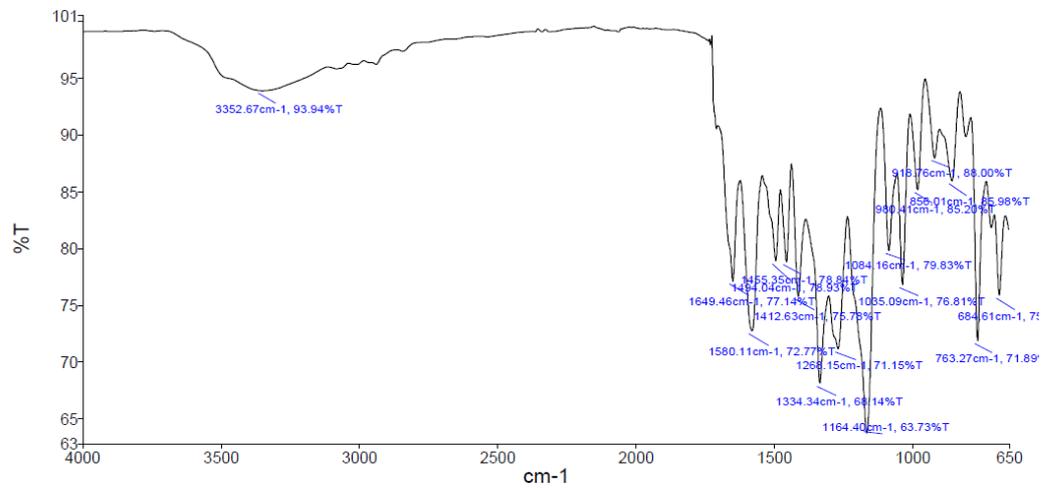
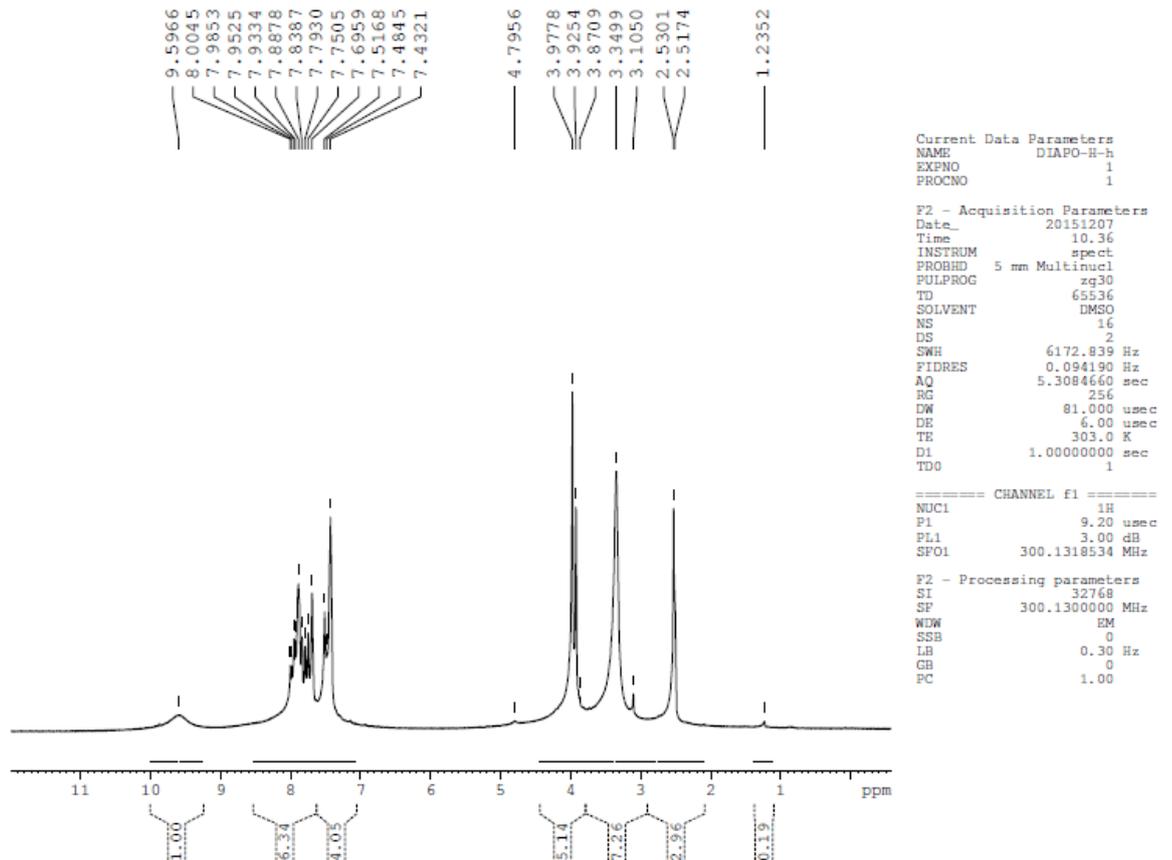


Figura 36: Espectro de RMN¹H da *Bis-(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-phenylprop-2-en-1-one*.



7. *Bis-(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one*

Figura 37: Espectro de IV da *Bis-(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one*.

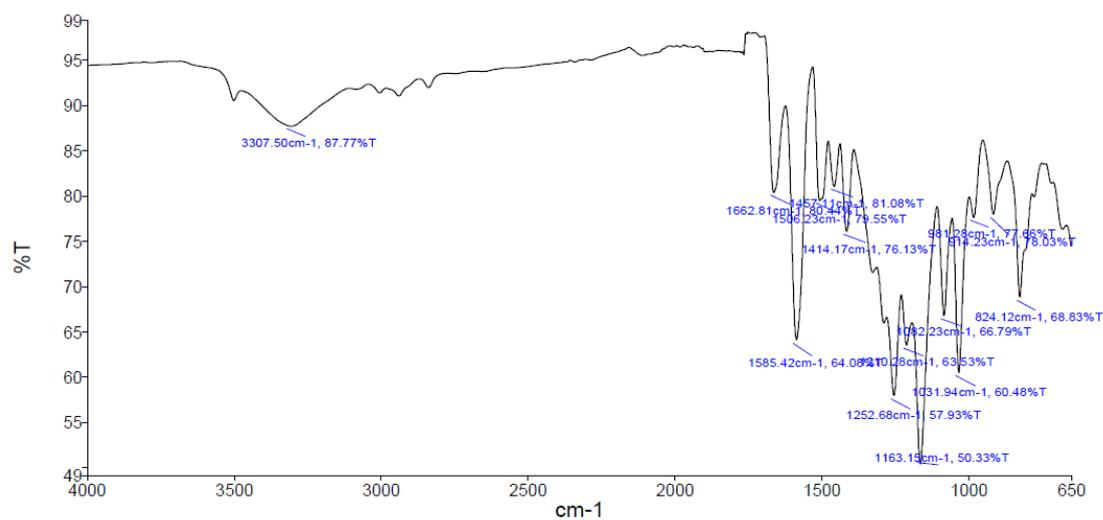
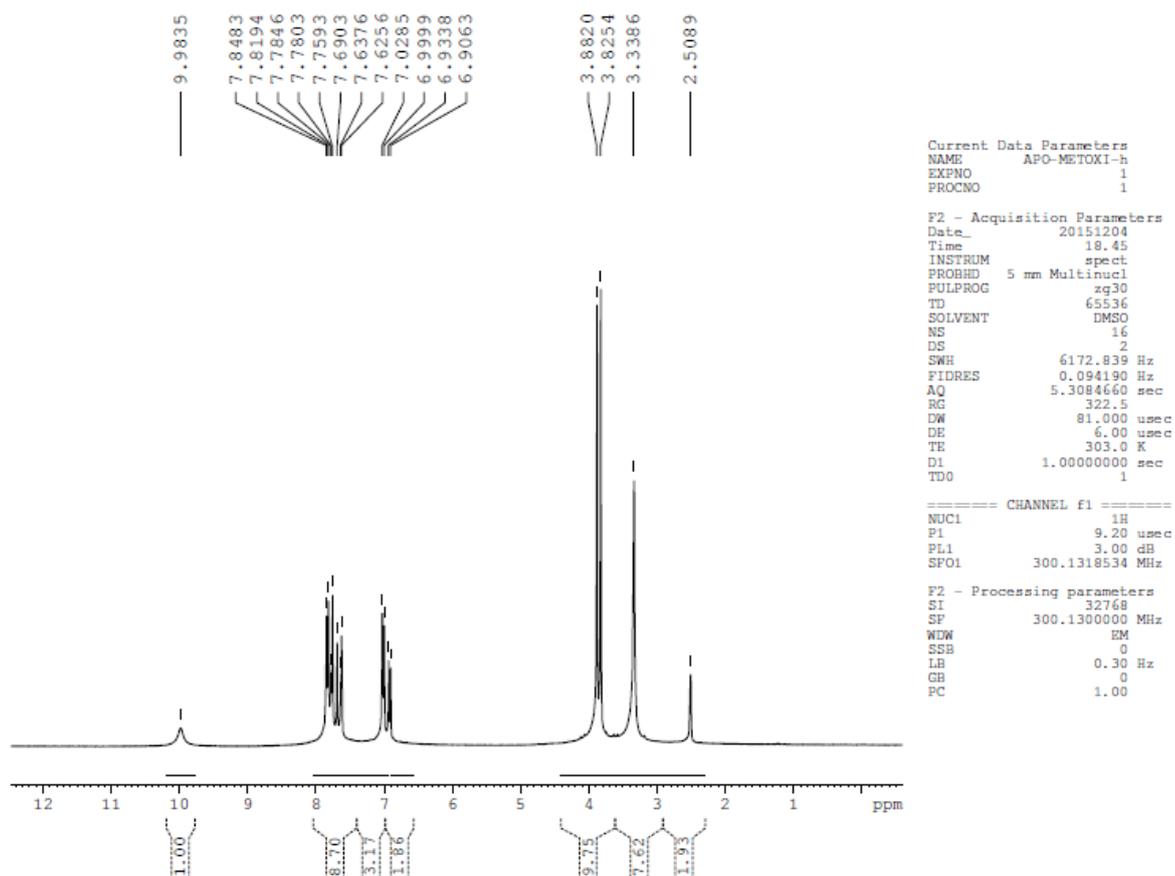
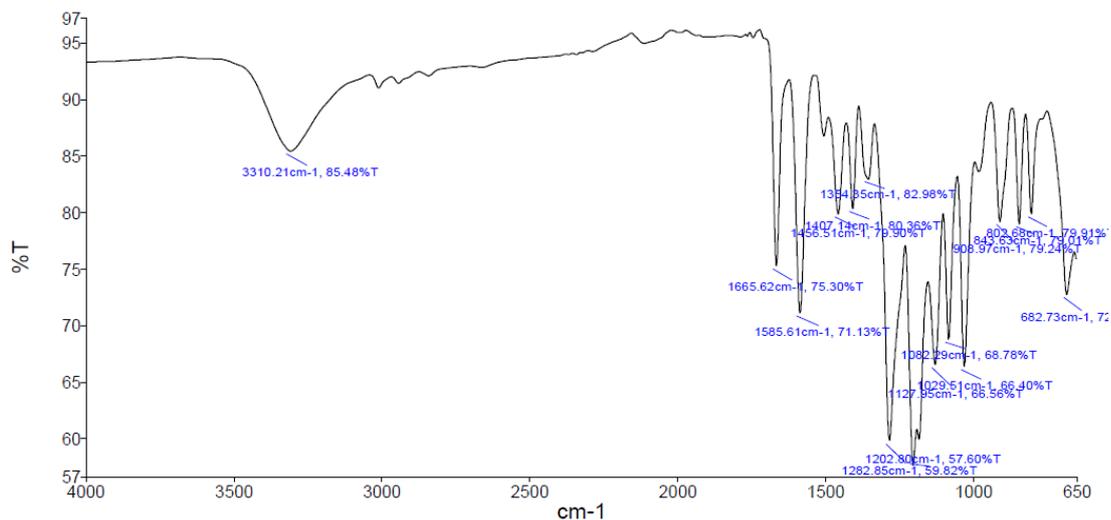
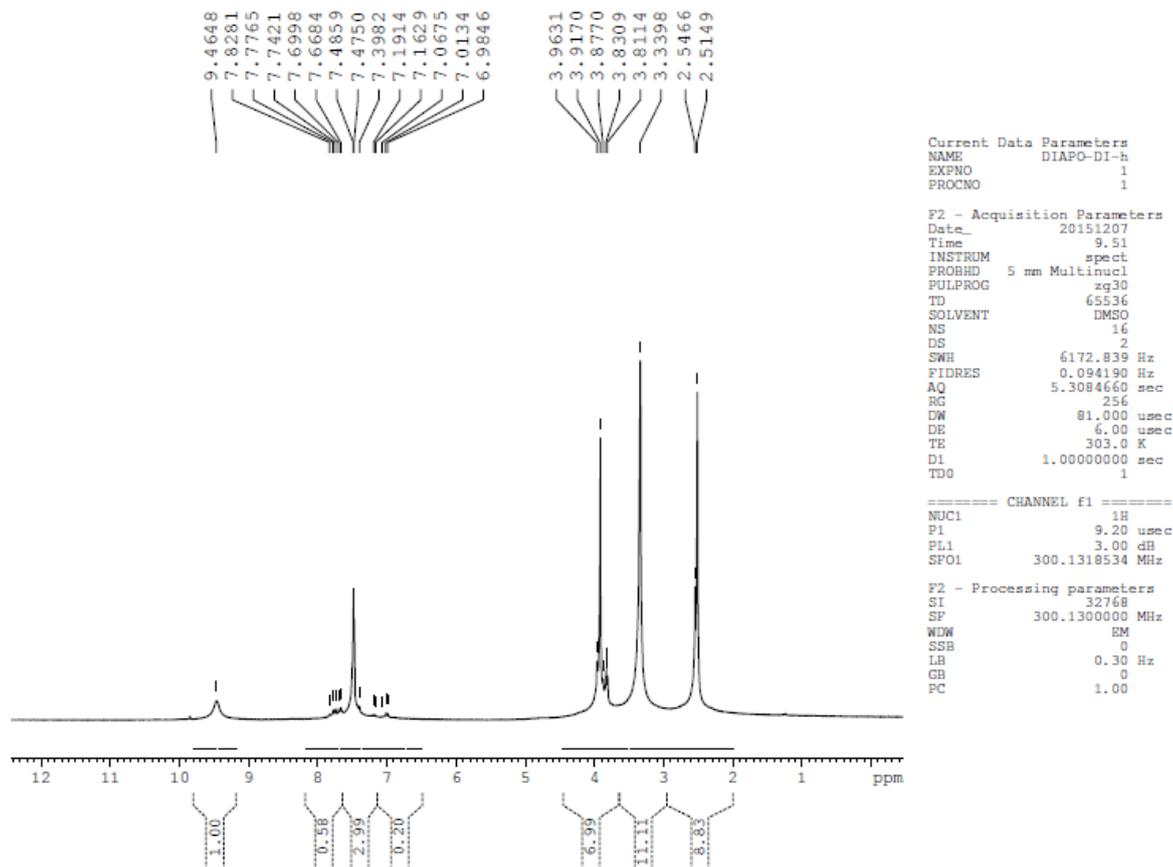


Figura 38: Espectro de RMN¹H da *Bis-(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one*.



8. *Bis-(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one***Figura 39:** Espectro de IV da *Bis-(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one*.**Figura 40:** Espectro de RMN¹H da *Bis-(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one*.

9. *Bis-(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one*

Figura 41: Espectro de IV da *Bis-(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one*.

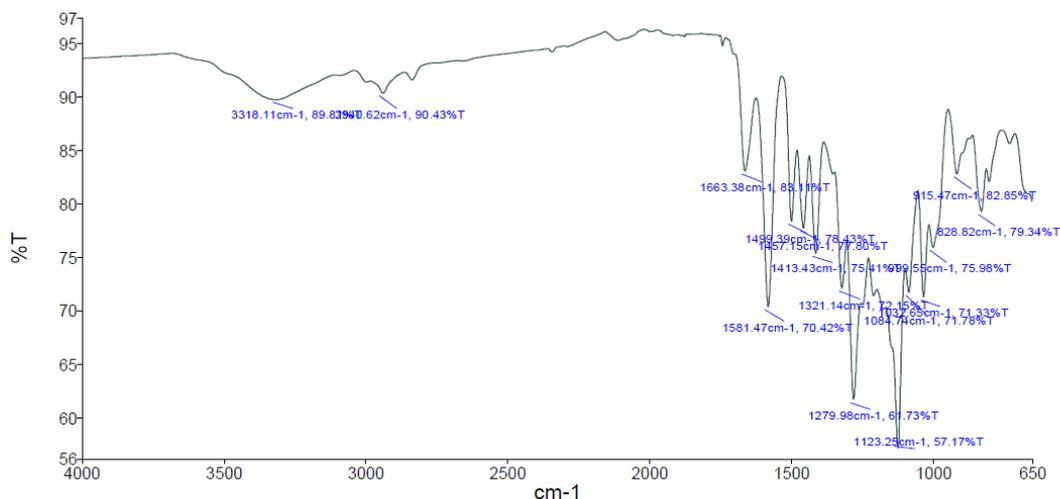
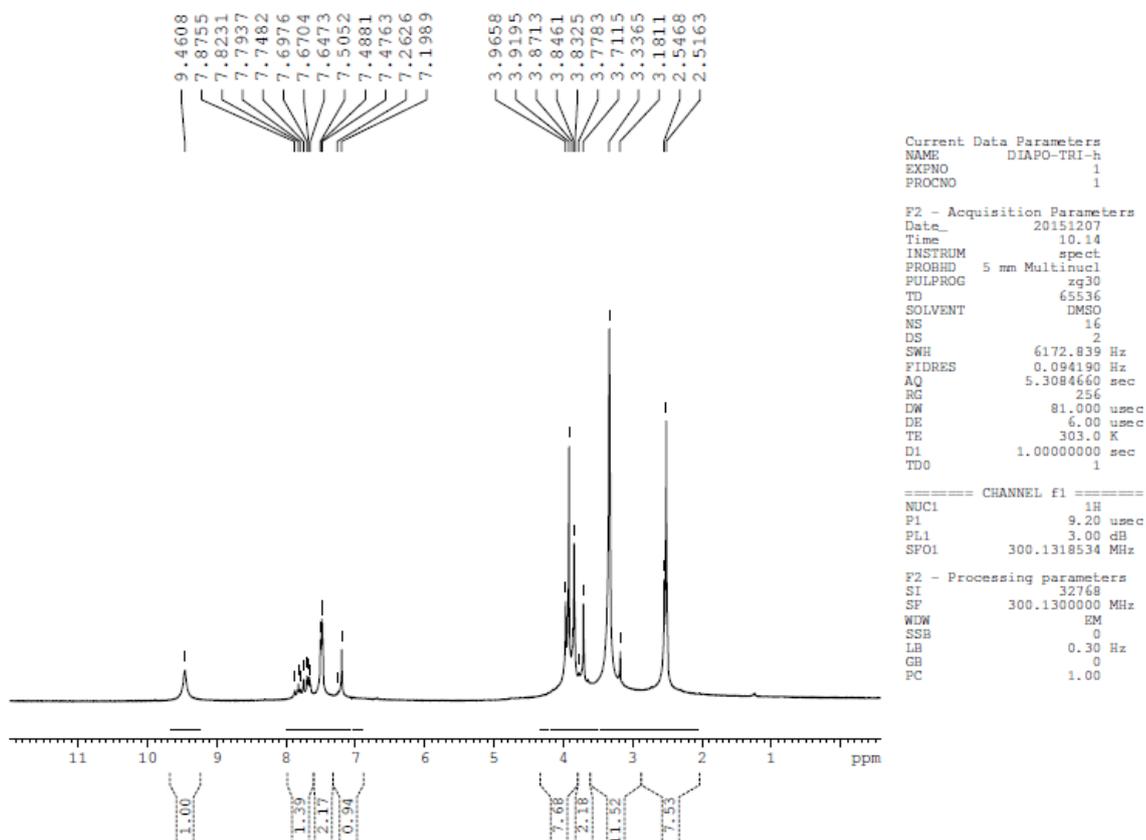


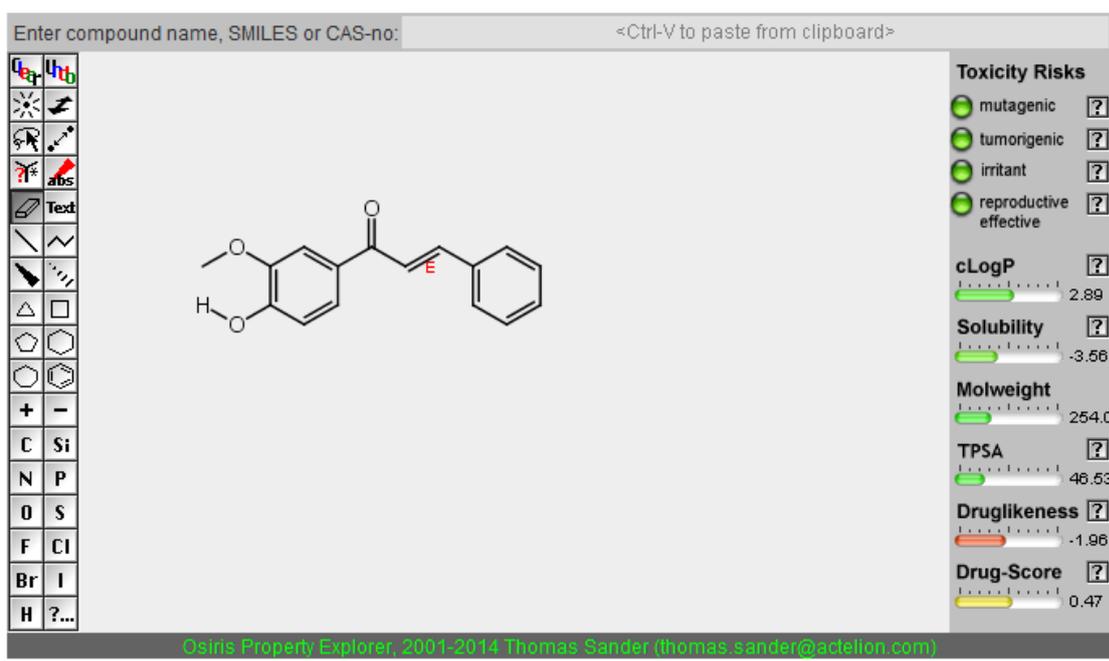
Figura 42: Espectro de RMN¹H da *Bis-(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one*.



ANEXO II – TOXICIDADE

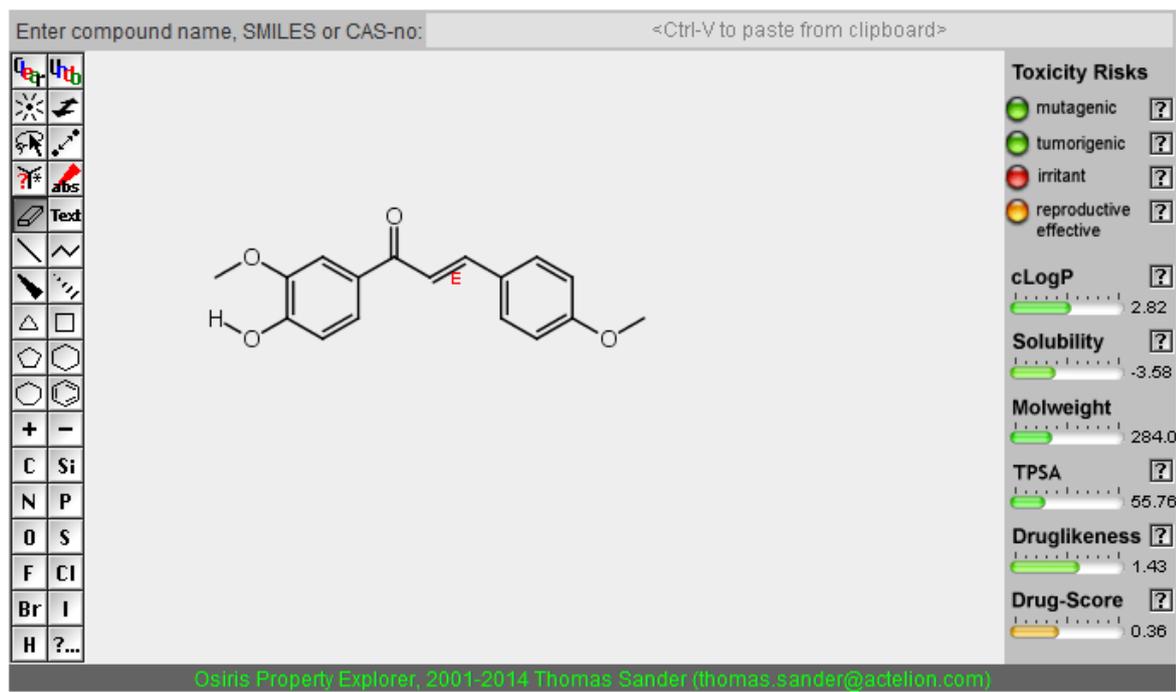
1. *(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-phenylprop-2-en-1-one*

Figura 43: Análise de toxicidade da *(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-phenylprop-2-en-1-one*.



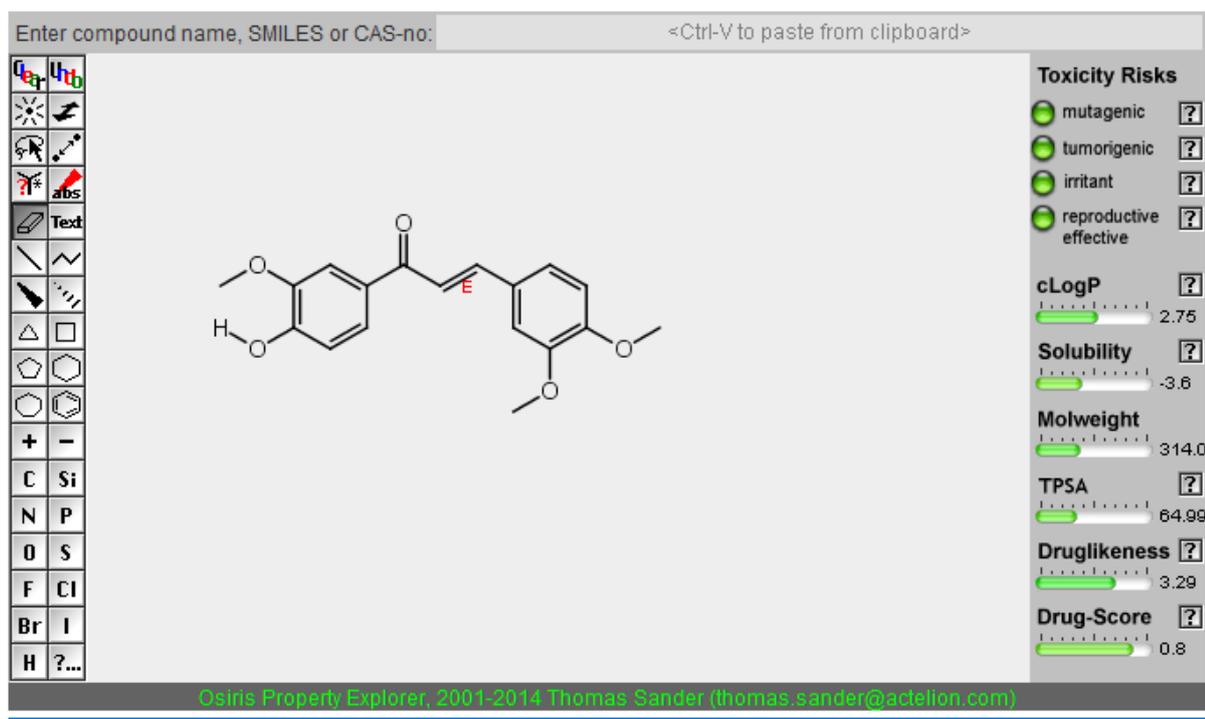
2. *(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one*.

Figura 44: Análise de toxicidade da *(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one*.



3. *(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one*

Figura 45: Análise de toxicidade da *(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one*.



4. *(E)*-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one

Figura 46: Análise de toxicidade da *(E)*-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one.

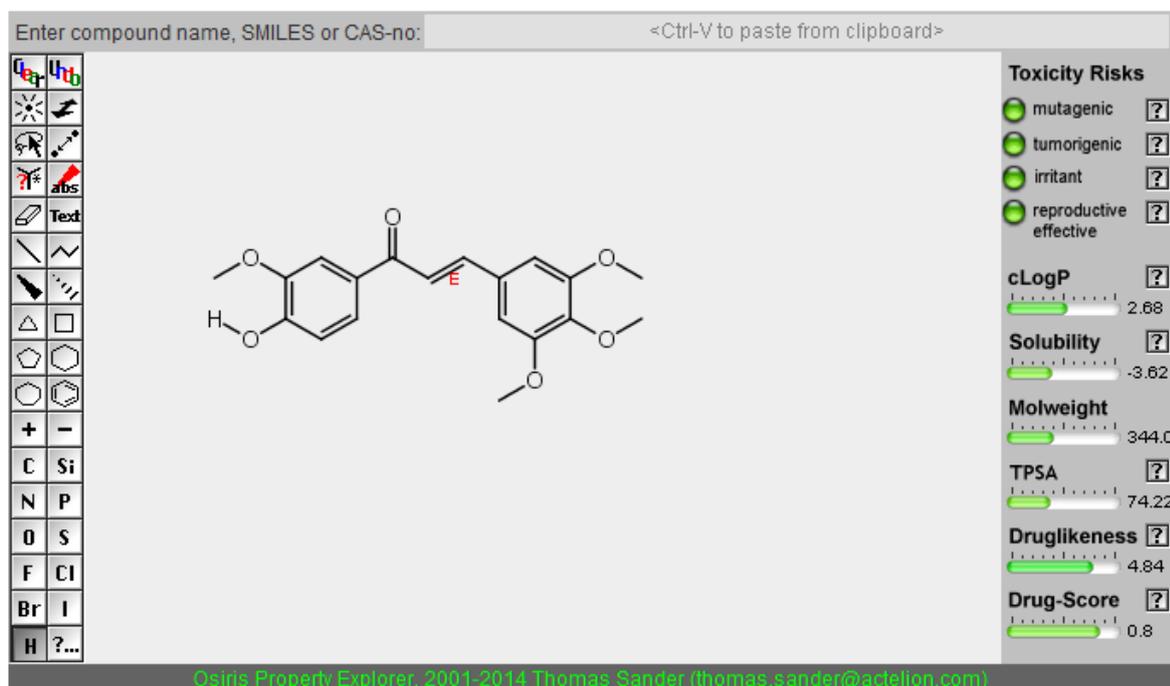
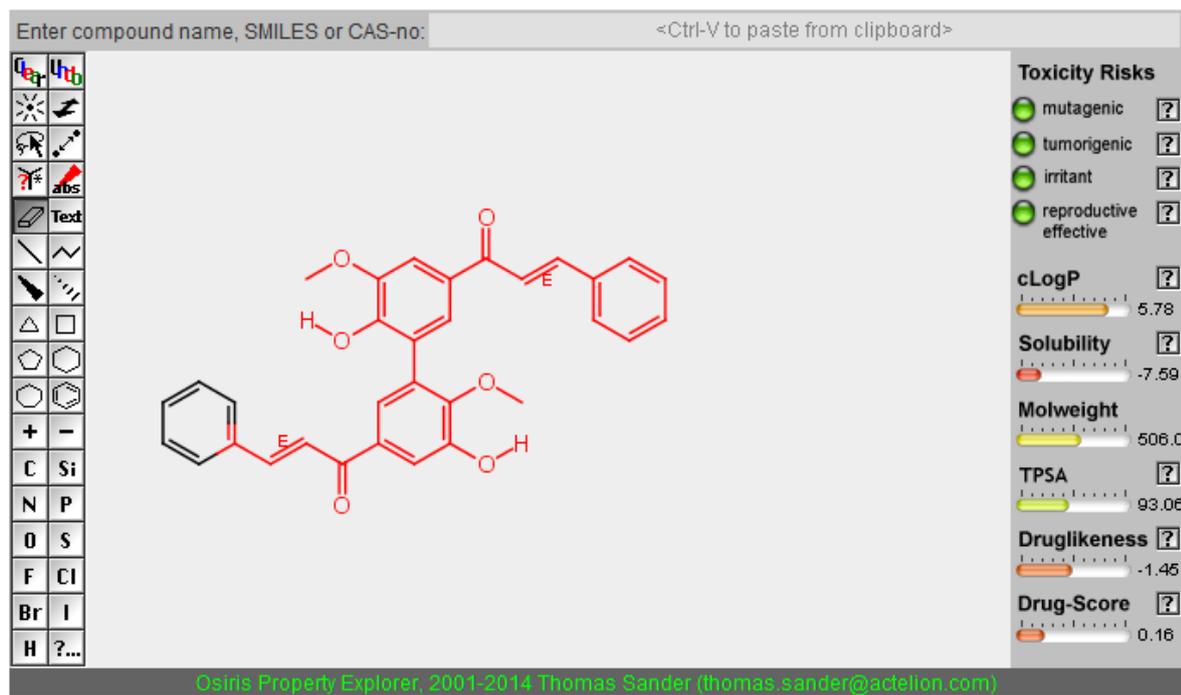
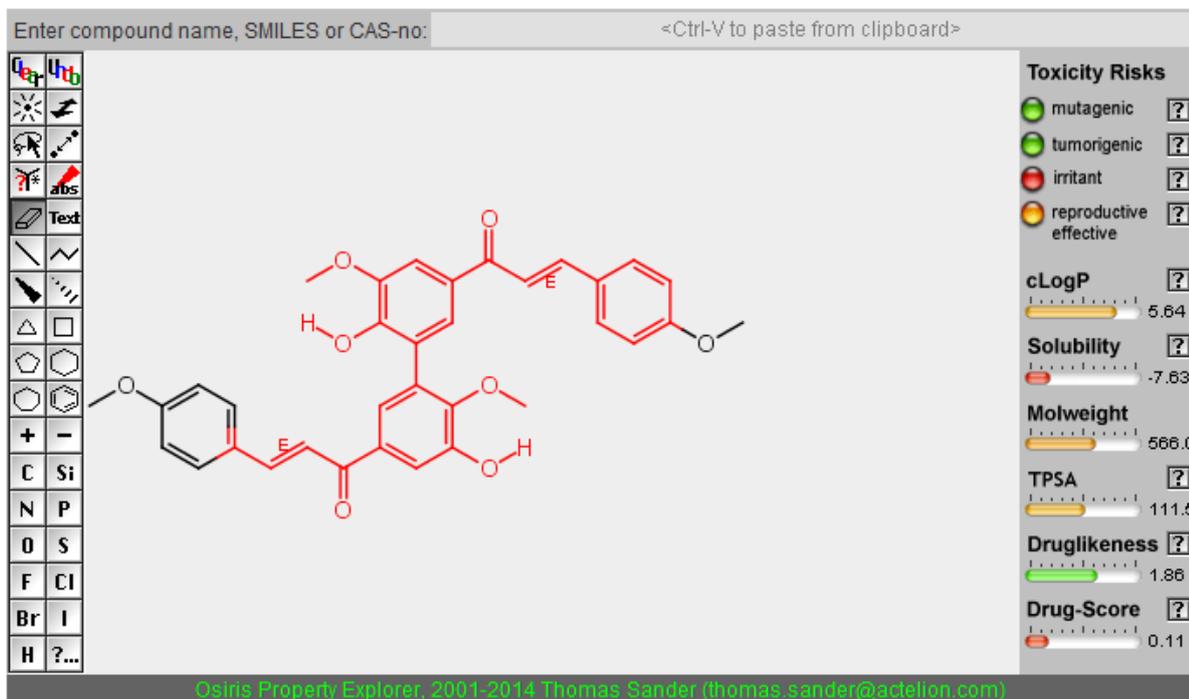
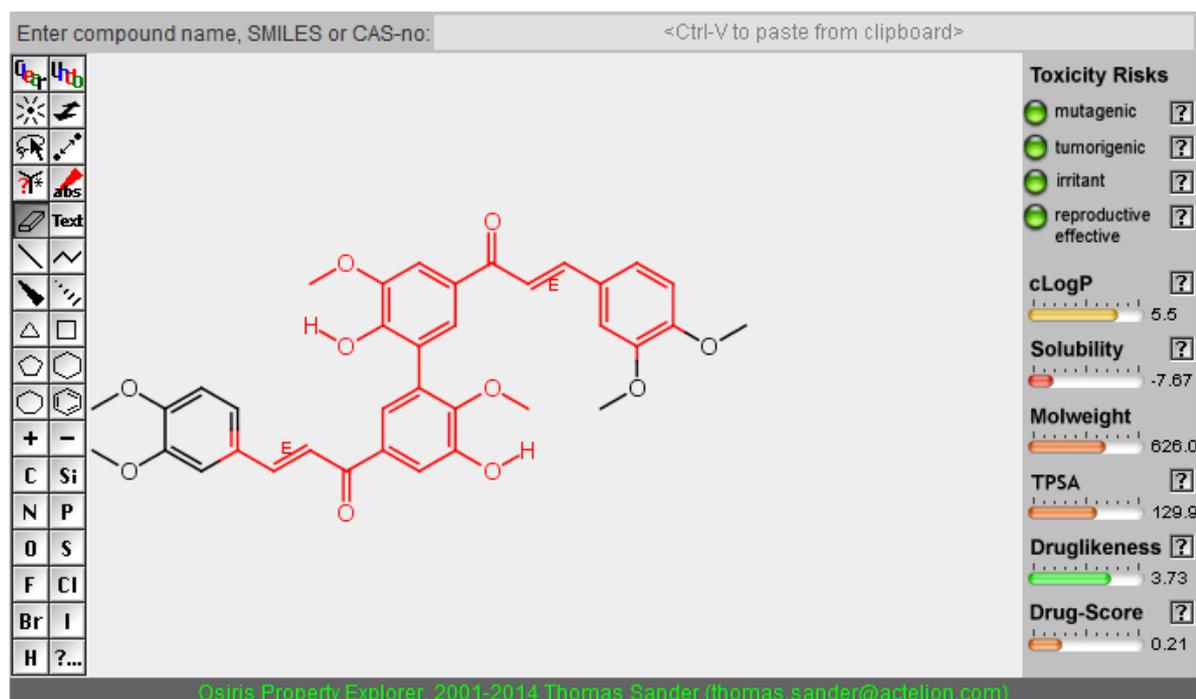
5. *Bis-(E)*-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-phenylprop-2-en-1-one

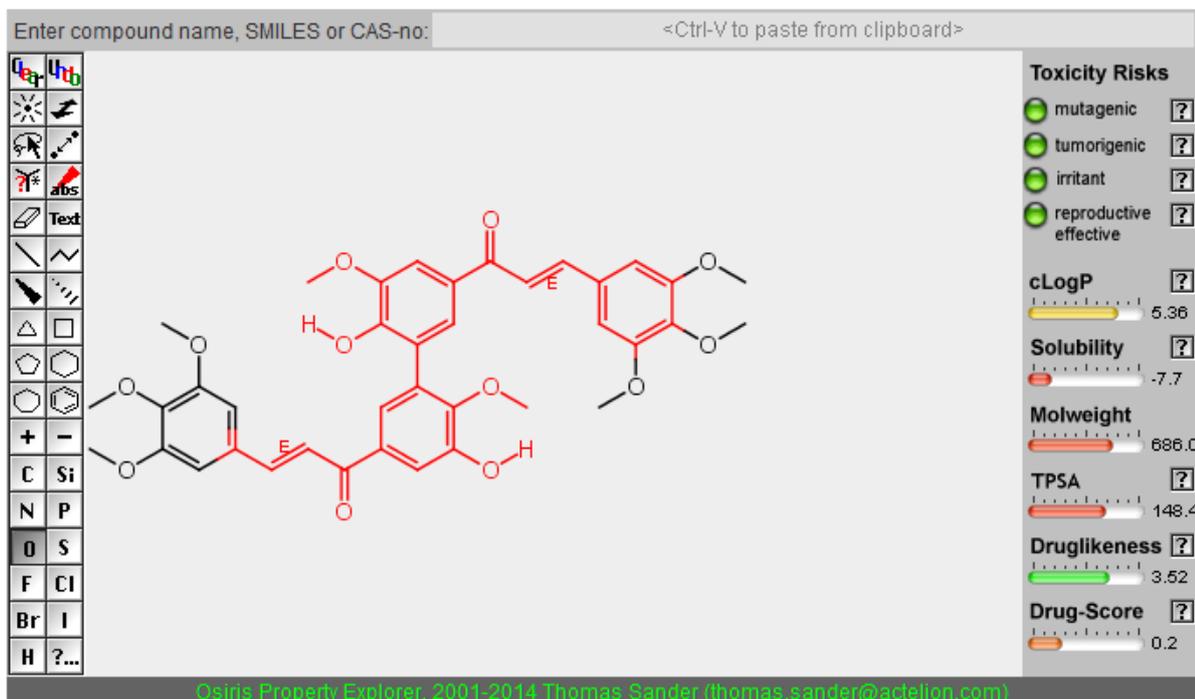
Figura 47: Análise de toxicidade da *Bis-(E)*-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-phenylprop-2-en-1-one.



6. *Bis-(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one*.**Figura 48:** Análise de toxicidade da *Bis-(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one*.7. *Bis-(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one*.**Figura 49:** Análise de toxicidade da *Bis-(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one*.

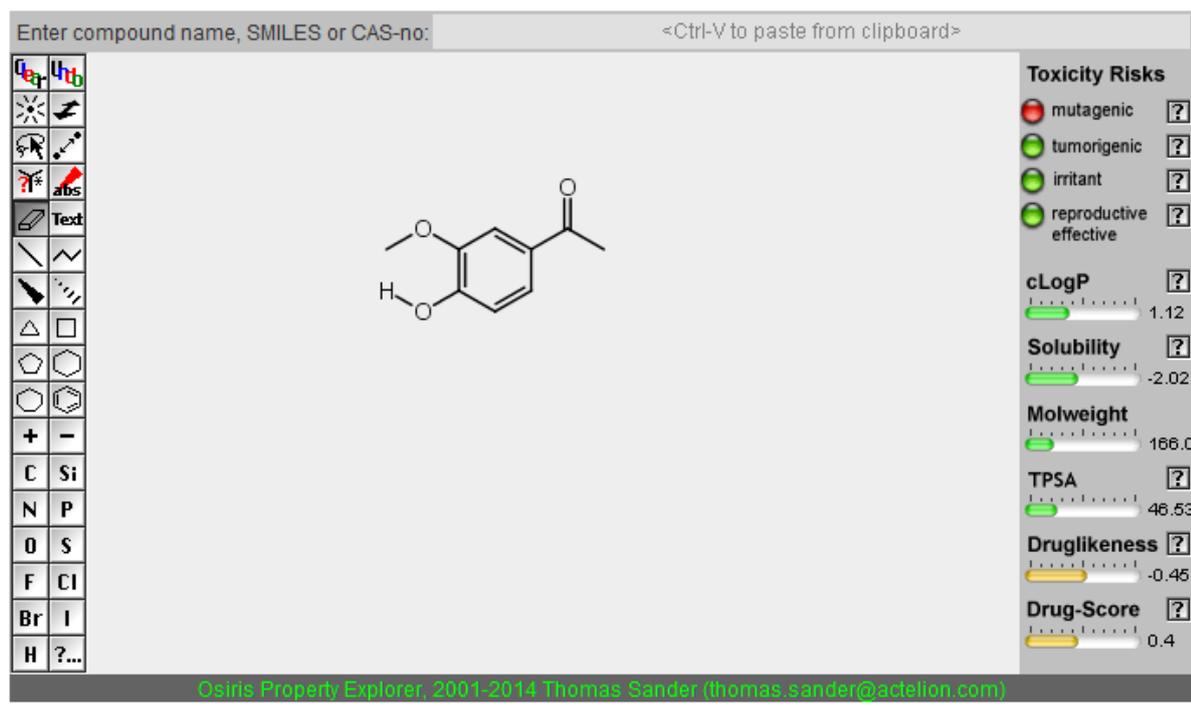
8. *Bis-(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one*.

Figura 50: Análise de toxicidade da *Bis-(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one*.



9. Apocinina

Figura 51: Análise de toxicidade da apocinina.



10. Diapocinina

Figura 52: Análise de toxicidade da diapocinina

