



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**SÍNTESE DE ANÁLOGOS A CHALCONAS VIA
CONDENSAÇÃO ALDÓLICA, CARACTERIZAÇÃO
E AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL COMO INIBIDORES DA
ENZIMA YopH de *Yersinia sp.***

Bruna Grazielle Voltolini

Florianópolis
2014

Bruna Grazielle Voltolini

**SÍNTESE DE ANÁLOGOS A CHALCONAS VIA
CONDENSAÇÃO ALDÓLICA, CARACTERIZAÇÃO
E AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL COMO INIBIDORES DA
ENZIMA YopH de *Yersinia sp.***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Química.**

Área de concentração: Química Orgânica

Orientador: Prof. Dr. Ricardo José Nunes

Co-orientadora: Dra. Louise Domeneghini Chiaradia Delatorre

Florianópolis, SC, Brasil
2014

Bruna Grazielle Voltolini

**SÍNTESE DE ANÁLOGOS A CHALCONAS VIA
CONDENSAÇÃO ALDÓLICA, CARACTERIZAÇÃO
E AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL COMO INIBIDORES DA
ENZIMA YopH de *Yersinia sp.***

Esta dissertação de mestrado foi julgada e aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Química** no **Programa de Pós-Graduação em Química** da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 22 de setembro de 2014.

Prof. Dr. Hugo A. Gallardo Olmedo
Coordenador do Programa

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Carlos Gesser (QMC-UFSC)

Profa. Dra. Michele Debiasi Alberton (FURB)

Prof. Dr. Santiago Francisco Yunes (QMC-UFSC)

Prof. Dr. Ricardo José Nunes
Orientador

Dra. Louise Domeneghini Chiaradia
Co-Orientadora

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Voltolini, Bruna Grazielle

Síntese de análogos a chalconas via condensação aldólica, caracterização e avaliação do seu potencial como inibidores da enzima YopH de *Yersinia sp.* / Bruna Grazielle Voltolini ; orientador, Ricardo José Nunes ; coorientadora, Louise Domeneghini Chiaradia Delatorre. - Florianópolis, SC, 2014. 122 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Chalconas. 3. Síntese orgânica. 4. Atividade biológica. 5. YopH. I. Nunes, Ricardo José. II. Chiaradia Delatorre, Louise Domeneghini. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

AGRADECIMENTOS

Mais uma vez digo: mais do que palavras, esta página é feita de sentimentos. E quantos sentimentos! Uma página nunca pareceu tão pouco. Poderia praticamente escrever uma página em agradecimento a cada pessoa ou grupo, mas algumas poucas páginas para todos é desafiador.

Gostaria de agradecer pela chance de poder continuar e concluir meu trabalho, minha missão, obrigada meu Deus.

Gostaria de agradecer imensamente a meus pais e "irmãs" (Tata da feita e Babum) pelo apoio durante todo o período de estudos e aprendizado, por todo o carinho e amor incondicional, pela dedicação e compreensão em todos os momentos que não pude estar por perto e também pelos em que estive perto, mas com a cabeça longe e muito angustiada.

Ao Marlon pelo tudo e pelo nada, afinal: "E a gente vive juntos, e a gente se dá bem, não desejamos mal à quase ninguém. E a gente vai à luta e conhece a dor, consideramos justa toda forma de amor." Por tudo aquilo que não precisamos falar, mas que o silêncio explica... Também pela atenção, carinho, amor e compreensão nas mais diversas situações. Como diz a letra da música: "You make it easier when life

gets hard.” e nem é só por esta parte da música, é por ela inteira, afinal, tu és a outra metade da felicidade.

A co-orientadora mais amiga que alguém poderia desejar. Lou, você não foi simplesmente uma co-orientadora, você foi a mensagem tranquilizadora quando tudo parecia desmoronar, o pedido de calma nas horas de pânico total, os sonhos da casa nova, a compreensão da energia de um coração remendado (ck,ck: um coração remendado, um pulmão bichado e um braço estabanado...), a alegria do casamento em outra cidade... Por falar em casamento, foi bem assim: na alegria e na tristeza, na saúde e na doença... Ou seja, uma irmã, que sempre me apoiou e confiou no trabalho e em mim, muito mais do que eu mesma, inclusive. Por todos os pedidos de “desculpa” e os “obrigada” (infelizmente, muito mais do primeiro do que do segundo - me desculpa! - ta vendo?). Lou por todos os conselhos, debates, doces da La Bohème, e também pelas chamadas de atenção sem as quais certamente o trabalho não teria sido concluído só posso dizer meu obrigado de coração. Este trabalho é muito seu e muito pra você. Não teria conseguido sem você!

Aos amigos e colegas do Integrar e da Kirinus/Cenarium que foram compreensivos quando me

ausentei de eventos e sociais e por todas as vezes que minha conversa foi monotemática sobre a dissertação, quero agradecer pela compreensão e por não terem me excluído.

Aos amigos mais do que especiais Jana, Bruno, Priscila, Raquel, Guto, Fran, Juliano, Bárbara, e Juninho vocês foram uma brisa de leveza e alegria cada vez que os encontrei ou conversei.

Aos doutores, em especial, Frederico e Luciane, e aos poderosos fisioterapeutas (Morgan e Zilá (A poderosa), eu continuei diariamente!) que tornaram possível seguir em frente e aguentaram quase que diariamente meu mau humor e minha ‘TPD’ (Tensão Pré Dissertação).

Aos meus colegas de laboratório, em especial ao Luiz (que fez a determinação do ponto de fusão dos compostos) e à Pati, obrigado pelas conversas, pela jornada que trilhamos juntos e por todo o suporte e auxílio para que este trabalho se concretizasse, principalmente, nesta reta final.

Ao meu orientador Ricardo, quero agradecer pela compreensão nos momentos de dificuldade (que não foram poucos...), pelo apoio no trabalho e pela confiança na realização deste projeto. Ao Rosendo que foi um exemplo a ser seguido e mais do que um “paião”, um verdadeiro vocô.

Agradeço aos membros da banca avaliadora, Prof. Dr. Santiago Francisco Yunes, Prof. Dr. José Carlos Gesser e Prof. Dra. Michele Debiasi Alberton, por terem aceito o convite e pelas contribuições ao trabalho.

A Central de Análises do Departamento de Química da UFSC pelas análises espectroscópicas das chalconas, e aos funcionários do Departamento de Química da UFSC, Grace e Jadir, pelo apoio ao longo do mestrado, meu muito obrigada.

Ao professor Hernan Terenzi e suas alunas Priscila G. A. Martins e Angela C. O. Menegatti, meu agradecimento pelo suporte e pela realização dos ensaios biológicos.

A todos aqueles que não citei, mas que de alguma forma passaram por esta jornada ao meu lado, meu muito obrigado.

*Luta é grande,
mas eu não me importo,
meu exército é forte!*

RESUMO

Em busca de compostos que possam se tornar novos medicamentos (atuando no combate às enfermidades provocadas por bactérias do gênero *Yersinia*) sintetizaram-se duas séries de vinte e um análogos a chalconas através de condensação aldólica, obtendo-se rendimentos variados, de aproximadamente 8 a 93 % para a série H e de 6 a 89 % para os compostos da série HB. A série H possui um anel heterocíclico contendo um átomo de enxofre ligado à carbonila (compostos derivados do 2-acetil-5-cloro-tiofeno), e a série HB contém um anel heterocíclico contendo um átomo de enxofre ligado à insaturação (compostos derivados do 5-cloro-2-tiofenocarbaldeído). No total, foram sintetizados 42 compostos, sendo 21 da série H e 21 da série HB, todos pela metodologia clássica. Doze compostos da série HB também foram obtidos através de reações realizadas com uma segunda metodologia em microondas. Todos os compostos foram caracterizados por ponto de fusão e ressonância magnética nuclear de hidrogênio. Além da síntese e caracterização de 42 compostos, este trabalho também teve como objetivo a avaliação da atividade biológica de todos os compostos obtidos. O potencial inibitório de todas as moléculas foi avaliado frente à enzima YopH, uma proteína tirosina fosfatase secretada por bactérias do gênero *Yersinia*. Dentre os compostos mais ativos, destacaram-se dois compostos análogos a chalconas que apresentaram ótimos valores de IC_{50} e excelentes valores de K_i frente a esta proteína, sendo respectivamente, H22 ($IC_{50} = 14,95 \mu M$ e $K_i = 9,41 \mu M$) e HB8 ($IC_{50} = 11,6 \mu M$ e $K_i = 2,03 \mu M$). Devido às diferenças estruturais entre estas duas chalconas, fica evidente que não é apenas um fator que determina a atividade dos compostos e sim, possivelmente, um conjunto complexo de interações eletrônicas e estéricas, sendo necessários estudos mais elaborados para um melhor entendimento das relações entre estrutura química e atividade biológica.

Palavras-chave: chalconas, síntese orgânica, atividade biológica, YopH.

ABSTRACT

Searching compounds that could become new drugs (acting in combating diseases caused by bacteria of the genus *Yersinia*) synthesized two sets of twenty-one analogous to chalcones through aldol condensation to give varying yields, approximately 8 to 93% for H Series and from 6 to 89% for compounds of the HB series. The H series has a heterocyclic ring containing a sulfur atom attached to the carbonyl (compounds derived from 2-acetyl-5-chlorothiophene) and HB series contains a heterocyclic ring containing a sulfur atom attached to the unsaturation (compounds derived from 5-chlorothiophene-2-carbaldehyde). In total, 42 compounds were synthesized, 21 and 21 Series H HB series, all the classical methodology. HB series twelve compounds were also obtained from reactions carried out with microwave in a second methodology. All compounds were characterized by melting point and NMR hydrogen. Besides the synthesis and characterization of 42 compounds, this study also aimed to evaluate the biological activity of all the compounds obtained. The inhibitory potential of all molecules was evaluated against the enzyme YopH a protein tyrosine phosphatase secreted by bacteria of the genus *Yersinia*. Among the most active compounds, the highlights were two similar compounds to chalcones showed that optimal values of IC₅₀ and K_i values excellent against this protein, being respectively, H22 (IC₅₀ = 14.95 μ M and K_i = 9.41 mM) and HB8 (IC₅₀ = 11.6 μ M and K_i = 2.03 mM). Due to structural differences between these two chalcones, it is evident that it is not just one factor that determines the activity of the compounds, but possibly an electronic and steric interactions complex set, more elaborate studies are needed to better understand the relationships between structure and chemical and biological activity.

Keywords: *chalcones, organic synthesis, biological activity, YopH.*

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	13
ÍNDICE DE TABELAS	14
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS	16
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVAS	18
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1 Química Medicinal e Desenvolvimento de Fármacos	20
2.2 Chalconas	22
2.2.1 Síntese de Chalconas	24
2.3 <i>Yersinia sp.</i>	28
2.3.1 Compostos Inibidores das PTPs de <i>Yersinia sp.</i>	32
3. OBJETIVOS	36
3.1 Objetivo Geral	36
3.2 Objetivos Específicos	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 Síntese dos Compostos Análogos a Chalconas da Série H	37
4.2 Síntese dos Compostos Análogos a Chalconas da Série HB .	42
4.2.1 Procedimento Geral, Conforme Descrito por Vogel (1989)	42
4.2.2 Procedimento em Microondas	47
4.3 Técnicas Gerais de Purificação e Caracterização dos Compostos Obtidos	49
4.4 Atividade Inibitória e Seletividade das Chalconas Sintetizadas Frente às Enzimas YopH de <i>Yersinia sp.</i>	51
4.4.1 YopH de <i>Yersinia sp.</i> (wildtype): Expressão e Purificação	51
4.4.2 Avaliação da Atividade Residual da YopH	52
4.4.3 Determinação dos Valores de IC ₅₀ dos Compostos Análogos a Chalconas	52
4.4.4 Ensaio Cinéticos	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1 Síntese dos Compostos Análogos a Chalconas	54
5.1.1 Série H Sintetizada em Bancada	54
5.1.2 Série HB Sintetizada em Bancada	62
5.1.3 Série HB Sintetizada via Microondas (HB _{MW})	73
5.2 Atividade Biológica	75
5.2.1 Chalconas como Inibidores da YopH de <i>Yersinia sp.</i>	75
6 CONCLUSÕES	81
7 PERSPECTIVAS	82
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
ANEXOS	95

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estruturas químicas da salicilina (1), ácido salicílico (2) e ácido acetilsalicílico (3).....	20
Figura 2.	Planta <i>Salix alba</i> da qual foi extraída a salicilina em 1829 (Wikimedia, 2014).....	21
Figura 3.	Núcleo fundamental das chalconas.....	22
Figura 4.	Compostos análogos a chalconas com estruturas tiofênicas.....	24
Figura 5.	Estrutura tiofênica análoga a chalconas.....	24
Figura 6.	Síntese de chalconas através da condensação aldólica.....	25
Figura 7.	Mecanismo da condensação de Claisen-Schmidt seguida por desidratação básica	26
Figura 8.	Síntese de chalconas pelo acoplamento cruzado de trifluorborato e cloreto de benzoila.....	27
Figura 9.	Síntese de chalconas com o uso de $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$, proposta por Narender e Reddy.....	27
Figura 10.	Síntese de chalconas pelo acoplamento de Suzuki.....	28
Figura 11	Vias de transmissão das espécies de <i>Yersinia</i> patogênicas para humanos.....	30
Figura 12	Modelo de interação das chalconas bioativas P4 (C) e P11 (C) no sítio ativo da YopH.....	34
Figura 13.	Cristais obtidos para os compostos H16, H24 e H29, respectivamente.....	50
Figura 14.	Esquema de síntese dos compostos análogos a chalconas da série H.....	54
Figura 15.	Esquema de Topliss para a otimização de substituintes aromáticos	55
Figura 16.	Espectro de RMN (400 MHz) de ^1H do análogo a chalcona H1. Deslocamento químico em relação ao TMS. Solvente CDCl_3	61
Figura 17.	Esquema de síntese dos compostos análogos a chalconas HB.....	62
Figura 18.	Espectro de RMN ^1H do composto análogo a chalcona HB4.....	73
Figura 19.	Gráficos obtidos dos estudos cinéticos com os compostos H22 (superior) e HB8 (inferior) frente à proteína YopH.....	80

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	Valores de IC ₅₀ com desvio padrão para os inibidores P4, P11, L46 e R28.....	33
Tabela 2	Condições reacionais para obtenção dos compostos da série H, peso molecular dos compostos e resultados de rendimento e ponto de fusão obtidos.....	38
Tabela 3	Condições reacionais para obtenção dos compostos da série HB, peso molecular dos compostos e resultados de rendimento e ponto de fusão obtidos.....	43
Tabela 4	Condições reacionais para obtenção dos compostos da série HB por microondas e resultados de rendimento e ponto de fusão obtidos.....	48
Tabela 5	Relação de publicações na literatura e número de CAS dos compostos análogos a chalconas da série H.....	56
Tabela 6	Rendimento das reações, massa molar e ponto de fusão dos compostos obtidos.....	60
Tabela 7	Resultados das reações de obtenção dos compostos da série HB.....	63
Tabela 8	Caracterização por RMN ¹ H dos compostos HB1, HB2 e HB3	65
Tabela 9	Caracterização por RMN ¹ H dos compostos HB4, HB5 e HB6	66
Tabela 10	Caracterização por RMN ¹ H dos compostos HB7, HB8 e HB9.....	67
Tabela 11	Caracterização por RMN ¹ H dos compostos HB11, HB12 e HB13.....	68
Tabela 12	Caracterização por RMN ¹ H dos compostos HB14, HB15 e HB17.....	69
Tabela 13	Caracterização por RMN ¹ H dos compostos HB24, HB25 e HB32.....	70
Tabela 14	Caracterização por RMN ¹ H dos compostos HB36, HB37 e HB40.....	71
Tabela 15	Tempo reacional e rendimentos da obtenção de alguns compostos análogos a chalconas da série HB pela metodologia convencional e da série HBMW por microondas.....	74
Tabela 16	Resultados da atividade dos compostos análogos a chalconas da série H como inibidores da proteína YopH de <i>Yersinia sp</i>	76

Tabela 17 Resultados da atividade dos compostos análogos a chalconas da série HB como inibidores da proteína YopH de <i>Yersinia pestis</i>	77
Tabela 18 Valores de IC ₅₀ para os compostos que apresentaram inibição da YopH superior a 30% no ensaio inicial.....	78

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

µg – Micrograma

µL – Microlitro

µM – Micromolar

AcOEt – Acetato de Etila

ADMET – Administração, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicidade

BF₃ – Et₂O – Borotrifluoreterato

CC₅₀ – Concentração Citotóxica para 50% da Amostra

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CDCl₃ – Clorofórmio Deuterado

cm – Centímetro

col. – Colaboradores

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido Desóxiribonucleico

DTT – _{DI}-ditiotreitól

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

EtOH – Etanol

HCl – Ácido Clorídrico

Hex – Hexano

Hz – Hertz

IC₅₀ – Concentração Inibitória de 50%

IPTG – Isopropil β-D-1-Tiogalactopiranosídeo

IS – Índice de Seletividade

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry

IV – Infravermelho

J – Constante de Acoplamento

K_i – Constante de Inibição

LEAT – Laboratório Estrutura e Atividade

m/m – Massa/Massa

mg – Miligrama

MHz – Mega Hertz

mL – Mililitro

mM – Milimolar

M.M. – Massa Molar

mmol – Milimol

MS – Ministério da Saúde

N – Concentração Normal

NaCl – Cloreto de Sódio

ng – Nanograma
nm – Nanômetro
nM – Nanomolar
p.f. – Ponto de Fusão
P.M. – Peso Molecular
PMSF – Fluoreto de Metil Fenilsulfonila
p-NPP – Fosfato de p-Nitrofenila
ppm – Parte por Milhão
PTPs – Proteínas Tirosina Fosfatases
q.s.p – Quantidade Suficiente Para
REA – Relação Estrutura e Atividade
RMN ¹³C - Ressonância Magnética Nuclear de ¹³C
RMN ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de ¹H
rpm – Rotações por Minuto
SOCl₂ – Cloreto de Tionila
TMS – Tetrametilsilano
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
YopH – Proteína Tirosina Fosfatase de *Yersinia sp.*

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVAS

Muitas são as doenças que afligem a população mundial desde os tempos mais remotos até os mais atuais e que foram responsáveis por índices de mortalidade altíssimos e surtos ou epidemias que espalharam pânico generalizado. Entre as mais recentes, temos o caso da epidemia do vírus ebola. Entre as mais antigas, e com um histórico assombroso de mortalidade, está a Peste Negra, responsável por dizimar, segundo estimativas mais “otimistas”, um quarto da população da Europa na Idade Média (DOUGNAHISTORIA, 2009).

Estas e muitas outras doenças costumavam ser tratadas de maneira bastante empírica nos primórdios, seguindo costumes e tradições de seus povos e orientações de curandeiros, até que um avanço nesta área começou durante a Idade Média, momento em que começaram a surgir hospitais e cursos de Medicina nas primeiras universidades. Somente no início do século XVIII a farmácia foi reconhecida como uma ciência, baseada nos resultados da medicina tradicional, e a partir deste momento começou-se a avaliar a ação dos extratos e poções existentes na época para compreender os seus efeitos (CHAST, 2008). Seguindo esta linha, iniciou-se também o estudo de substâncias isoladas que proporcionavam ações (benéficas ou não) ao organismo, desenvolvendo então a ciência hoje conhecida por química medicinal. A química medicinal, por definição da IUPAC, é uma disciplina baseada na química, envolvendo aspectos das ciências biológicas, médica e farmacêutica, cuja missão é o planejamento, descoberta, invenção, identificação e preparação de compostos biologicamente ativos (protótipos), além do estudo do metabolismo, interpretação do mecanismo de ação a nível molecular e a construção das relações entre a estrutura química e a atividade farmacológica (REA) (WERMUTH, 2008).

Uma das vertentes mais fortes da química medicinal é a busca por novos fármacos. Investigadores trabalhando em grupos de pesquisas em universidades (entre eles o LEAT – Laboratório Estrutura e Atividade do Departamento de Química da UFSC), em indústrias farmacêuticas e em institutos de pesquisa de todo o mundo realizam sínteses orgânicas (além da procura em fontes naturais já existentes) e testes biológicos, na busca por protótipos de novos fármacos, moléculas que, muitas vezes, são extremamente simples, mas que apresentam potencial ação farmacológica e que podem ser empregadas no tratamento de alguma

enfermidade ou que podem ser modificadas e otimizadas para preparação de fármacos.

Entre essas moléculas tão desejadas, que podem ser amplamente exploradas como protótipos de novos fármacos, estão as chalconas, que são relatadas na literatura por apresentarem atividade biológica frente a uma série de doenças.

Neste trabalho, as chalconas aparecem como moléculas com potencial atividade inibitória da enzima YopH, uma proteína tirosina fosfatase que é um dos fatores de virulência da bactéria *Yersinia pestis* (causadora da peste, uma doença de ordem infecciosa). O gênero *Yersinia* compreende dez espécies, sendo três destas patogênicas para o homem: *Yersinia pestis*, *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica* (TRABULSI; MARTINEZ, 2005).

Apesar de muitos cientistas considerarem a peste uma doença do passado, ela mantém-se em vários focos naturais na África, Ásia e Américas e atualmente é considerada uma doença reemergente pela Organização Mundial da Saúde, constituindo um problema de Saúde Pública (ALMEIDA *e col.*, 2007). Uma vez que a erradicação da peste ainda não é possível devido à sua complexidade (ALMEIDA *e col.*, 2007), buscam-se, cada vez mais, assim como neste trabalho, novas moléculas que possuam atividade biológica frente à bactéria causadora da doença, e que possam tornar-se protótipos de novos fármacos para sua cura.

Com base neste panorama, este trabalho se justifica pela busca de moléculas com atividade inibitória da enzima YopH, compreendendo, neste caso, a primeira etapa da busca por novos agentes para o tratamento desta enfermidade (WERMUTH, 2008). A escolha da classe de compostos para este estudo é justificável pelo fato das chalconas serem estruturas químicas amplamente conhecidas por sua diversidade de atividades biológicas (DIMMOCK *e col.*, 1999; NI *e col.*, 2004), entre elas antibacteriana (NOWAKOWSKA *e col.*, 2007).

Um objetivo, um grupo de pesquisa, uma doença, moléculas com atividade importante que possam auxiliar no seu tratamento, discussões acerca das relações estrutura-atividade e boas ideias, são a mistura essencial para a realização da química medicinal, na qual esta pesquisa encontra-se inserida.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Química Medicinal e Desenvolvimento de Fármacos

Por muito tempo a procura por fármacos resumiu-se na busca de novos compostos extraídos de produtos naturais, identificando-se as substâncias ativas presentes nas plantas medicinais, mesmo que muitos deles não tenham sua eficácia cientificamente comprovada até hoje (NOGUEIRA *e col.*, 2009). Entretanto, estes produtos geralmente apresentam grande complexidade estrutural, sendo caracterizados como “sujos” pelas grandes indústrias, pois muitas vezes os resultados dos ensaios biológicos são difíceis de interpretar devido às impurezas (YUNES e CECHINEL-FILHO, 2007).

A fim de se aprimorar e, de certa forma até simplificar esse desenvolvimento de fármacos, com o passar do tempo, começou-se a sintetizar em laboratório algumas moléculas semelhantes às extraídas das plantas, para se produzir candidatos sintéticos a fármacos, mimetizando as estruturas naturais de efeitos e propriedades já conhecidas (NOGUEIRA *e col.*, 2009). Derivações dessas moléculas originais também foram produzidas e passou-se a dar destaque aos fármacos sintéticos, pois estes são obtidos, na maioria dos casos dependendo da complexidade estrutural, mais facilmente que seus análogos naturais, com maior grau de pureza e com custos inferiores de produção.

Um medicamento que todos conhecem e que serve como um bom exemplo desta evolução é a Aspirina®, um dos medicamentos mais vendidos no mundo. Sua substância ativa, o ácido acetilsalicílico (estrutura 3 da Figura 1), foi obtido em 1897 após mudanças estruturais no ácido salicílico (estrutura 2 da Figura 1) que, por sua vez, havia sido obtido através de mudanças estruturais da salicilina (estrutura 1 da Figura 1) (analgésico e antitérmico), obtida, em 1829, a partir da planta *Salix alba* (Figura 2) (CALIXTO e JÚNIOR, 2008).

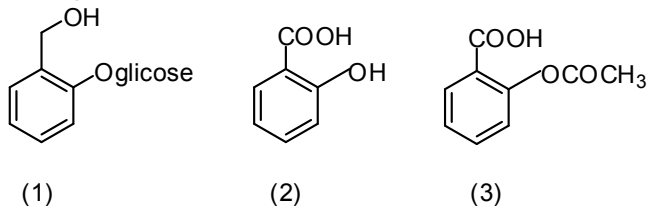


Figura 1. Estruturas químicas da salicilina (1), ácido salicílico (2) e ácido acetilsalicílico (3).



Figura 2. Planta *Salix alba* da qual foi extraída a salicilina em 1829 (Wikimedia, 2014).

O aumento da potência, bem como a diminuição de efeitos adversos e a facilidade relativa de obtenção perante aos produtos naturais, fez com que os produtos sintéticos tomassem conta do mercado farmacêutico mundial. Dados de 2006 afirmam que 6% dos fármacos são derivados de produtos naturais não modificados, 28% de produtos naturais modificados, e 66% de origem sintética (desses, 37% são baseados em estruturas naturais) (NEWMAN *et al.*, 2008).

De modo geral, o processo de descoberta de um novo fármaco obedece a várias etapas, que incluem: a descoberta de alvos terapêuticos (onde são escolhidos os alvos terapêuticos e realizadas as avaliações da atividade biológica das novas moléculas), o desenho e seleção da molécula líder para o alvo pretendido, a otimização da molécula líder, e a etapa de desenvolvimento (na qual se busca aperfeiçoar ainda mais os parâmetros ADMET (Administração, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicidade) de um candidato a fármaco, bem como suas características farmacêuticas como sabor, odor e solubilidade, para que seja possível o seu uso clínico). São realizados os estudos de formulações, os ensaios clínicos, até, finalmente, ser considerada um medicamento (CALIXTO e JÚNIOR, 2008). Todo este processo é necessário, mas requer tempo e altos investimentos em inovação. Petsko

publicou em 1996 que, nos Estados Unidos, para cada fármaco aprovado, uma média de 6300 compostos eram sintetizados e, destes, somente 21 chegavam aos testes de toxicologia subaguda. Dos 21 compostos selecionados, 6 chegavam aos testes em humanos e apenas 2 passavam para os testes clínicos finais, para finalmente um deles ser registrado como fármaco. Todo este processo consome aproximadamente 12,5 anos, representando um custo de US\$ 350 milhões de dólares (PETSKO, 1996).

Compostos que tem sido objeto de estudo como protótipos de novos fármacos são as chalconas e seus análogos, que são normalmente moléculas pequenas e de fácil obtenção por síntese química (YUNES e CECHINEL-FILHO, 2007; CALIXTO e JÚNIOR, 2008), que parte de reagentes puros e conhecidos e geralmente envolve apenas uma etapa e resulta em produtos com relativa facilidade de purificação.

2.2 Chalconas

As chalconas podem ser definidas como cetonas α - β -insaturadas, onde tanto a carbonila quanto a porção olefínica estão ligadas a grupamentos aromáticos (Figura 3). São moléculas de cadeia aberta que contêm dois anéis aromáticos ligados por um fragmento enona de três carbonos, ou seja, são cetonas α , β -insaturadas que apresentam o núcleo 1,3-diarilprop-2-en-1-ona (AVILA *e col.*, 2008) (Figura 3) e o esqueleto C₆-C₃-C₆, considerado privilegiado no desenho de fármacos (POLINSKY *e col.*, 2008), o que vem lhes conferindo uma grande atenção na química medicinal (ANSARI *e col.*, 2005). Essa grande atenção, lugar de destaque dado a estes compostos não se restringe apenas a sua estrutura química considerada simples, mas também é resultado da diversidade de atividades farmacológicas que apresentam (DIMMOCK *e col.*, 1999; NI *e col.*, 2004; NOWAKOWSKA *e col.*, 2007).

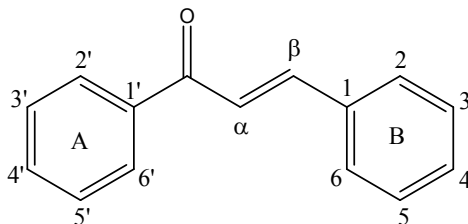


Figura 3. Núcleo fundamental das chalconas.

Muitas atividades biológicas desse grupo de compostos são descritas na literatura, e variam de acordo com os dois anéis aromáticos e seus substituintes (BATOVSKA *e col.*, 2009), (ÁVILA *e col.*, 2008), obtendo-se, assim, uma vasta gama de atividades, devido às inúmeras possibilidades de substituições em seus anéis aromáticos. Há relatos de atividade antibacteriana (DIMMOCK *e col.*, 1999; NIELSEN *e col.*, 2004; NOWAKOWSKA *e col.*, 2007), antiviral (NINOMIYA *e col.*, 1990), antifúngica (BOECK *e col.*, 2005; OPLETALOVA e SEDIVY, 1999; LOPEZ *e col.*, 2001; LOPEZ *e col.*, 2003), antimalárica (LI *e col.*, 1995; RAM *e col.*, 2000; DOMINGUEZ *e col.*, 2001; LIU *e col.*, 2001; DOMINGUEZ *e col.*, 2005; LIU *e col.*, 2003), tripanossomicida (BORCHHARDT, D. M. *e col.*, 2010), anti-leishmania (NIELSEN *e col.*, 1998; KAYSER & KIDERLEN, 2001; BOECK *e col.*, 2006; BERGMANN *e col.*, 2004), hipoglicemiante (DAMAZIO, R. G. *e col.*, 2010), antioxidante (GACCHE *e col.*, 2008), citotóxica (LAWRENCE *e col.*, 2006; SALUM *e col.*, 2013), antitumoral (NAM *e col.*, 2003), antileucêmica (PEDRINI *e col.*, 2010), anti-inflamatória (ALCARAZ *e col.*, 2004), inibidora das proteínas tirosina fosfatase A e B de *Mycobacterium tuberculosis* (CHIARADIA *e col.*, 2008; MASCARELLO *e col.*, 2010; CHIARADIA *e col.*, 2012), sequestradora de radicais livres (LEBEAU *e col.*, 2000), anti-mitótico (CHEN *e col.*, 2001; HERENCIA *e col.*, 1998), bem como a propriedade de mediação da glicoproteína P na resistência a múltiplas drogas (DUCKI *e col.*, 1998). Ainda, recentemente algumas chalconas demonstraram atividade inibitória da proteína YopH de *Yersinia sp.* (MARTINS *e col.*, 2013). Para as chalconas, são possíveis dois estereoisômeros, Z e E, sendo o estereoisômero E normalmente o mais ativo.

Além das chalconas, os compostos análogos a chalconas (estruturas muito semelhantes às chalconas, mas que não apresentam pelo menos um dos anéis aromáticos, que é substituído por um anel heterocíclico (Figura 4)) também têm apresentado diversas atividades biológicas, como potente citotoxicidade frente a várias células cancerosas, atividade potente na inibição de danos oxidativos do DNA, e potentes atividades anti-inflamatória e anti-oxidante (CHENG *e col.*, 2008). Também são citadas como inibidoras da enzima ciclo-oxigenase (MONDOL 2006).

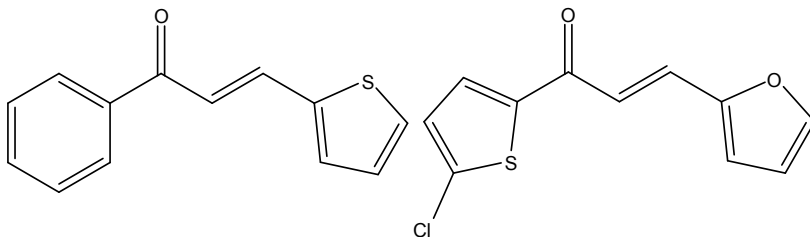


Figura 4. Compostos análogos a chalconas com estruturas tiofênicas.

Estruturas análogas a chalconas que contenham esse mesmo anel (Figura 5), têm demonstrado em geral bom efeito citotóxico frente a células de leucemia linfoblástica aguda (L1210), carcinoma mamário murino (FM3A), linfoblastos T humanos (Molt/4 e CEM) e carcinoma de colo humano (HeLa) (ROMAGNOLI *et al.*, 2008).

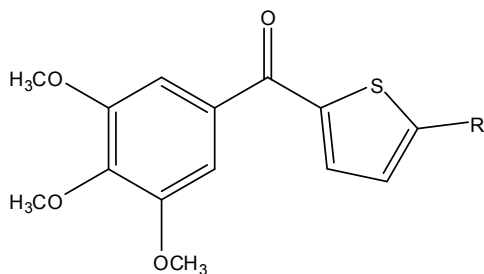


Figura 5. Estrutura tiofênica análoga a chalconas.

Em função desses relatos da literatura que destacam a importância das chalconas e dos compostos análogos a elas e também pelos compostos heterocíclicos contendo enxofre estarem presentes em muitos medicamentos já existentes, neste trabalho foram sintetizados compostos análogos a chalconas heterocíclicas contendo o átomo de enxofre, as quais tiveram sua atividade biológica avaliada frente a um tipo específico de proteína tirosina fosfatase, a YopH.

2.2.1 Síntese de Chalconas

Várias metodologias são propostas para a síntese das chalconas, e também dos compostos análogos a chalconas, entretanto, a mais simples e mais utilizada é através da condensação de Claisen-Schmidt

(condensação aldólica) (CALVINO *e col.*, 2006), em que se reage, realizando-se a condensação, um derivado escolhido da acetofenona com os aldeídos aromáticos apropriados, usando um solvente polar como metanol ou etanol e hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio, uma base, como catalisador (Figura 6) (Vogel, 1989). Essa metodologia é considerada bastante versátil e conveniente, permitindo a obtenção de uma grande variedade de compostos, uma vez que existem inúmeros benzaldeídos e acetofenonas comerciais que podem ser combinados, fornecendo a variedade estrutural pretendida (DUCKI *e col.*, 1998), embora, em alguns casos, possa resultar em baixos rendimentos (GO *e col.*, 2005). Essa variedade estrutural proporciona a variação também das atividades biológicas.

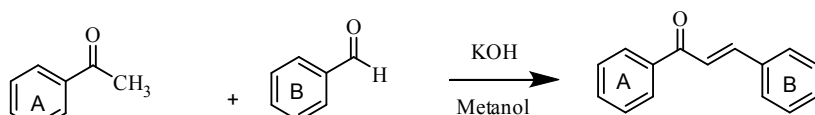


Figura 6. Síntese de chalconas através da condensação aldólica.

A reação de formação das chalconas se inicia com a condensação aldólica, que é seguida pela desidratação básica (Vogel, 1989). O mecanismo está detalhado na Figura 7. Observa-se que a primeira etapa da reação é a desprotonação da cetona, em que o catalisador básico remove o hidrogênio alfa ácido da molécula para formar um carbânion que é estabilizado por ressonância. A reação continua através de um ataque nucleofílico, o carbânion ataca o carbono carbonílico do aldeído, formando um íon alcóxido (intermediário tetraédrico). Esse íon alcóxido, ao ser protonado por um dos hidrogênios da água, gera o produto da condensação e regenera o catalisador básico. Em seguida, o produto de condensação sofre desidratação básica formando a enona conjugada. Nesse caso, em condições básicas, um hidrogênio ácido é abstraído da posição alfa para resultar em um íon enolato, que, por equilíbrio, elimina o grupo de saída -OH, formando a chalcona.

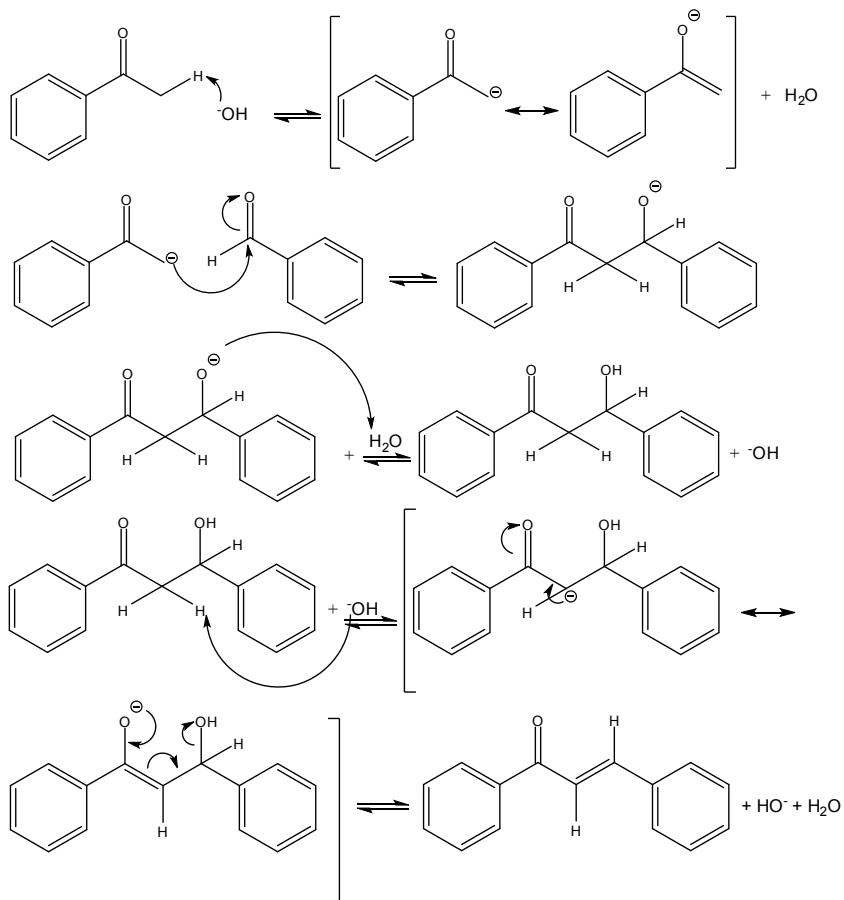


Figura 7. Mecanismo da condensação de Claisen-Schmidt seguida por desidratação básica.

Esta reação de condensação é amplamente citada na literatura como método para obtenção de chalconas (CHIARADIA, 2010; CHENG *e col.*, 2008; CALVINO *e col.*, 2006; BATOVSKA *e col.*, 2009). Variações dessa metodologia clássica também têm sido descritas, como por exemplo, com a utilização de ultrassom para acelerar a reação e melhorar os rendimentos (GO *e col.*, 2005; CHENG *e col.*, 2008) e também com a substituição do tradicional catalisador básico, por um catalisador sólido, resultante da mistura de fosfato inorgânico e nitrato de sódio, aquecidos a altas

temperaturas (900°C) (SEBTI *et al.*, 2001). Segundo os autores, essa reação conferiu aumentos expressivos nos rendimentos das reações (SEBTI *et al.*, 2001). Outros catalisadores que são reportados na literatura são óxidos básicos, como óxido de alumínio-magnésio (CLIMENT *et al.*, 2004) e $\text{SOCl}_2/\text{EtOH}$ que produz HCl *in situ* e portanto promove a síntese pela via ácida (PETROV *et al.*, 2008), além do uso de outros catalisadores sólidos como sílica funcionalizada (ROMANELLI *et al.*, 2011).

Entre essas variações da metodologia, e seguindo os princípios da química verde, Srivastava *et al.*, (2008) propuseram uma metodologia de síntese de chalconas com o uso de irradiação por microondas, usando carbonato de potássio e irradiação com tempos variando de 3-5 minutos. Posteriormente, o meio reacional foi dissolvido em etanol e filtrado, e os rendimentos observados variaram entre 80 e 90% (SRIVASTAVA *et al.*, 2008).

Diversos outros métodos têm sido estudados por grupos de pesquisas ao redor do mundo para a síntese de chalconas, dentre os quais a obtenção desta classe de compostos através da reação de acoplamento entre um cloreto de benzoíla e estiriltrifluorborato de potássio com o uso de cloreto de paládio como catalisador e aquecimento em microondas (AL-MASUM *et al.*, 2011) (Figura 8).

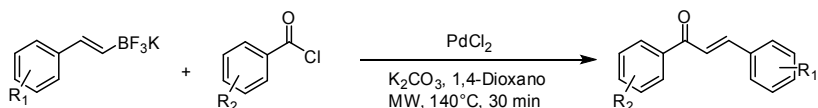


Figura 8. Síntese de chalconas pelo acoplamento cruzado de trifluorborato e cloreto de benzoíla.

Narender e Reddy (2007) também propuseram a síntese de chalconas através do uso de borotrifluoreterato ($\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$) como catalisador. Nestas reações o tempo foi menor em relação à condensação aldólica, e não foram observadas reações paralelas (NARENDER *et al.*, 2007) (Figura 9).

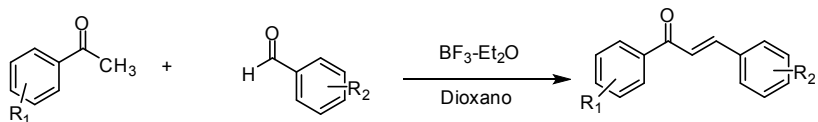


Figura 9. Síntese de chalconas com o uso de $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$, proposta por Narender e Reddy.

Outra metodologia para a obtenção das chalconas baseia-se no acoplamento de Suzuki, onde são empregados cloreto de benzoíla e um ácido fenilvinilborônico, tolueno anidro como solvente, trifenilfosfina de paládio como catalisador e carbonato de céσιο como base. Nesta proposta reacional os rendimentos observados pelos pesquisadores variaram entre 41 e 93%, indicando ser uma metodologia viável para a síntese de chalconas (Figura 10) (EDDARIR *et al.*, 2003).

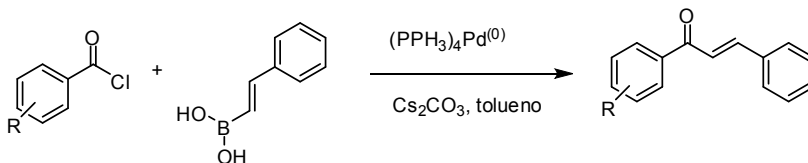


Figura 10. Síntese de chalconas pelo acoplamento de Suzuki.

2.3. *Yersinia sp.*

Conforme já mencionado anteriormente neste trabalho, o gênero *Yersinia* compreende dez espécies, sendo três destas patogênicas para o homem: *Yersinia pestis*, *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica* (TRABULSI; MARTINEZ, 2005).

As espécies *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* são duas espécies patogênicas do gênero *Yersinia*, causadoras da Yersiniose, nome atribuído a uma gastroenterite veiculada por alimentos que se caracteriza por diarreia aguda, febre (principalmente em crianças jovens) e dor abdominal, entre outros sintomas. Diarreia sanguinolenta pode ocorrer em 10 a 30% das crianças infectadas por *Y. enterocolitica*. A diarreia pode durar de um dia a alguns meses. Em alguns casos pode surgir vermelhidão pelo corpo. Raramente essas bactérias podem atingir outros órgãos como as meninges, o fígado e os pulmões. Artrite reacional não é rara. Algumas vezes pode haver infecção sem sintomas. A bactéria pode causar também infecções em outros locais como feridas, juntas e trato urinário. O exato mecanismo de contaminação ainda é desconhecido, mas sabe-se que o modo de transmissão é fecal-oral através da água e alimentos contaminados (por isso a necessidade de se cozinhar bem carnes armazenadas em embalagens plásticas a vácuo), ou por contato com pessoas ou animais infectados. Transmissão hospitalar também tem sido relatada, assim como, transmissão transfusional devido a sangue de doadores assintomáticos ou que tiveram gastroenterite leve (CVE SAÚDE, 2003), mas pode acontecer também

de pessoa a pessoa, inclusive da mãe contaminada para os recém-nascidos ou pela inoculação direta através da pele.

A ocorrência é de distribuição mundial, mais comum no Norte da Europa, Escandinávia e Japão, porém, não muito frequente. Estimativas apontam para a ocorrência de cerca de 17 mil casos, anualmente, nos Estados Unidos. No Brasil, não há dados concretos (CVE SAÚDE, 2003). Em vários estudos baseados em exames de fezes diarreicas provocadas por bactérias, as *Yersinias* apareceram em quarto lugar, sendo ultrapassadas somente pelas *Salmonellas*, pelo *Campylobacter* e pela *Shigella*.

A terceira espécie patogênica é *Y. pestis*, agente causal da "peste" e geneticamente similar à *Y. pseudotuberculosis*, é observada principalmente em roedores silvestres, mas pode afetar seres humanos por outras vias que não o alimento (CVE SAÚDE), normalmente, ao ser transmitida pela picada de pulgas contaminadas (MEDICINANET, 2010). Esta espécie de *Yersinia* causa a peste bubônica que eventualmente pode progredir para a peste pneumônica. Neste caso a transmissão dá-se por gotículas respiratórias de humano para humano. Nas outras duas espécies, *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*, a transmissão ocorre por via oral. Estas bactérias penetram através das células M do intestino delgado, atingem os nódulos linfáticos onde podem causar infecção localizada ou, em casos mais raros, infecção sistêmica. Adaptado de (Wren, 2003) (Figura 11)

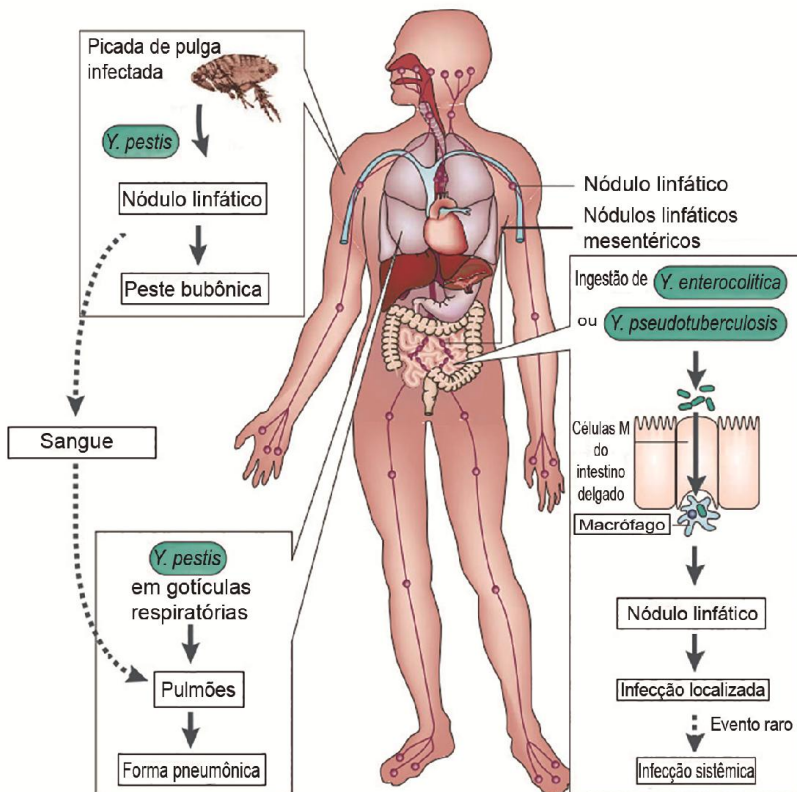


Figura 11. Vias de transmissão das espécies de *Yersinia* patogênicas para humanos.

A Peste é uma doença infecciosa aguda que se manifesta sob três formas clínicas principais:

Peste Bubônica – As pessoas infectadas por essa bactéria, após um período de 3 a 7 dias de incubação, começam a demonstrar sintomas que se assemelham aos de uma gripe (aparecimento súbito de febre alta, calafrios, dor de cabeça intensa, dores generalizadas e fraqueza). Falta de apetite, confusão mental, olhos avermelhados, pulso rápido e irregular, pressão arterial baixa, prostração e mal-estar geral também costumam ocorrer (BVSMS SAÚDE, 2005). Após 2 ou 3 dias, aparece inchaço (tumefação) nos linfonodos superficiais. Depois deste período “inicial”, evoluem para sonolência, intolerância à luz, apatia, vômitos e

náuseas. Entretanto, muitos casos, especialmente da forma bubônica, não apresentam toda essa riqueza de sintomatologia, podendo haver casos leves (BVSMS SAÚDE, 2005).

Peste Septicêmica – Boa parte dos sintomas relatados para a peste bubônica repetem-se aqui: febre alta, calafrios, dor de cabeça intensa, dores generalizadas, falta de apetite, náuseas, vômitos, confusão mental, olhos avermelhados, pulso rápido, hipotensão arterial, prostração, dispnéia, estado geral grave, dificuldade na fala, hemorragias, necrose dos membros, coma e morte (BVSMS SAÚDE, 2005).

Peste Pneumônica – (transmitida por gotículas bronco-pulmonares expelidas pela tosse) (BVSMS SAÚDE, 2005). Além dos sintomas comuns às outras duas formas clínicas, o paciente ainda apresenta dor no tórax, respiração curta e rápida, cianose, expectoração sanguinolenta, delírio, coma e morte (BVSMS SAÚDE, 2005). Ocasionalmente, a forma bubônica pode progredir para a forma pneumônica, que é transmitida diretamente entre humanos pela via respiratória (MARTINS, 2011).

Apesar de estarem disponíveis diversos tratamentos como vacinas e antibióticos, estes não são muito efetivos especialmente contra a forma pneumônica (DE LA PUERTA *et al.*, 2009).

O tratamento mais eficiente para a infecção por *Yersinia pestis* é a prevenção. Mas caso ocorra o contágio, o tratamento deve ser iniciado imediatamente com altas doses de antibióticos (estreptomicina ou tetraciclina) durante os cinco primeiros dias da infecção, para diminuir as chances de complicações que possam levar a pessoa à morte. Sem o tratamento com antibióticos, 50 a 60% das infecções bubônicas são letais (MARTINS, 2011).

Os antibióticos (com exceção da penicilina) são os medicamentos mais utilizados juntamente com terapia de suporte para rehidratação do doente, monitoramento da pressão arterial e da função cardíaca (BVSMS SAÚDE, 2005).

Estes microrganismos são sensíveis a vários antibióticos, mas são resistentes geralmente à penicilina e seus derivados. Hidratação oral ou endovenosa pode ser necessária para os sintomas da gastroenterite. Antibióticos estão definitivamente indicados nas septicemias e outras doenças invasivas. Os aminoglicosídeos são os antibióticos de escolha (somente para a septicemia), bem como, a associação sulfametoxazol/trimetoprim (Ciprofloxacino e tetraciclina também se mostram eficazes). Os antibióticos de escolha são: estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol e canamicina. As sulfas conferem bons

resultados, quando administradas nos casos menos graves (BVSMS SAÚDE, 2005).

No Brasil, ainda há focos naturais de peste, porém ela está mais restrita a algumas áreas serranas ou de planaltos, principalmente na região Nordeste, sendo geralmente associada ao cultivo e armazenagem de grãos. Após 5 anos sem casos humanos confirmados em todo o Brasil (o “último” havia sido registrado na Bahia, no ano de 2000), o estado do Ceará notificou em março de 2005 um caso positivo (BVSMS SAÚDE, 2005). A vigilância permanente, com monitoramento da peste animal, com busca ativa e instrução à população de risco, tem proporcionado o controle da doença, que, na maioria dos casos, se apresenta na forma bubônica.

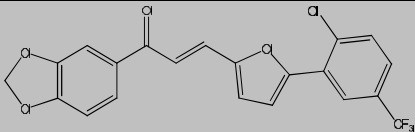
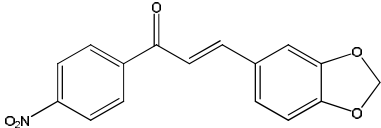
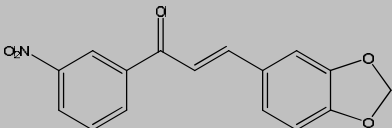
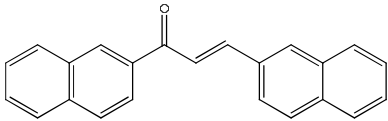
2.3.1. Compostos Inibidores das PTPs de *Yersinia sp.*

As proteínas tirosina fosfatases (PTPs) são uma grande família de enzimas (mais de 100) responsáveis pela hidrólise do fosfato ligado a resíduos de tirosina em proteínas. Elas são estruturalmente diversas e controlam variados processos celulares (AOYAMA *e col.*, 2003). Estudos com bactérias patogênicas revelaram que a ação de fosfatases, em particular PTPs, tem um papel importante na determinação da sua patogenicidade, interferindo na sinalização celular do macrófago (KOUL *e col.*, 2000), (COZZONE *e col.*, 2004), (BAKAL; DAVIES, 2000). A patogenicidade das espécies de *Yersinia* é dependente da atividade de uma proteína tirosina fosfatase (PTP), a YopH, que interrompe o processo de sinalização do hospedeiro. A YopH é secretada pela bactéria no meio extracelular e seu alvo são os macrófagos, onde desfosforila proteínas responsáveis pela ação bactericida (BLACK e BLISKA, 1997).

Vários autores tem descrito a atividade de diferentes classes de compostos como inibidores da YopH de *Yersinia sp.*, como ácidos α -cetocarboxílicos (CHEN e SETO, 2002), tripeptídeos (LEE *e col.*, 2003; LEE *e col.*, 2005), derivados do ácido oxálico (HUANG *e col.*, 2010), derivados fosfonatos de calixareno (VOVK *e col.*, 2010) e oximas (LIU *e col.*, 2010 ; BAHTA *e col.*, 2011). Em 2013, nosso grupo de pesquisas publicou um trabalho com o estudo de 283 compostos sintéticos como possíveis inibidores da YopH (MARTINS *e col.*, 2013). Dentre os compostos avaliados, quatro se mostraram mais ativos, com valores de IC50 inferiores a 50 μ M (Tabela 1). Estes compostos (L46, P4, P11 e

R28) são chalconas e atuam como inibidores competitivos da YopH com K_i de 11,01 μM (L46); 3,13 μM (P4); 2,41 μM (P11) e 14,93 μM (R28).

Tabela 1. Valores de IC_{50} com desvio padrão para os inibidores P4, P11, L46 e R28. Experimento com incubação inicial de cada composto com a YopH por 10 minutos.

Inibidor	Estrutura química	$\text{IC}_{50} \pm$ desvio padrão
L46		38,55 \pm 0,6 μM
P4		15,08 \pm 1,12 μM
P11		9,92 \pm 2,19 μM
R28		20,29 \pm 1,11 μM

Analisando a estrutura química dos quatro compostos mais ativos (Tabela 1), observa-se que as estruturas dos mesmos diferem entre si, exceto P4 e P11 que possuem o mesmo anel base e diferem apenas pela posição do grupo nitro. Dessa forma, não foi possível estabelecer uma relação estrutura-atividade dos compostos identificados como inibidores competitivos da proteína YopH, sendo possível a realização de estudos de *docking* molecular (Figura 12) (MARTINS *et al.*, 2013).

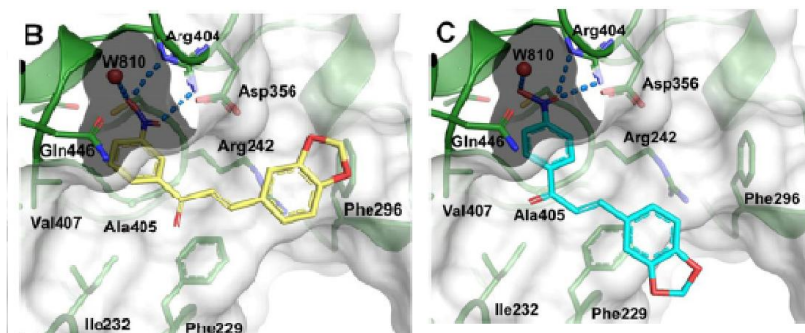


Figura 12. Modelo de interação das chalconas bioativas P4 (C) e P11 (B) no sítio ativo da YopH. Estrutura da proteína destacando a cadeia principal dos resíduos de aminoácidos (MARTINS *et al.*, 2013).

Devido à sua importância (a capacidade de modular a resposta inflamatória à bactéria através de processos que envolvem a quebra de adesões focais, liberação de fator de necrose tumoral, inibição da fagocitose, além de impedir a função dos linfócitos B e T prevenindo a resposta imune adaptativa) (MARTINS, 2011), a YopH emerge como um potencial alvo terapêutico, despontando no âmbito do desenvolvimento de fármacos como um alvo promissor.

Por essa relação direta entre a atividade das PTPs e algumas patologias, é crescente o interesse em desenvolver inibidores destas proteínas, uma vez que ligando um composto diferente do substrato natural ao sítio ativo da enzima, ou mesmo a um sítio alostérico, estaria estabelecida uma relação de inibição, impedindo a formação do complexo enzima-substrato, e assim bloqueando o desenvolvimento das doenças.

Nesta pesquisa, buscou-se obter compostos análogos a chalconas com atividade inibitória da proteína YopH. Vale salientar que entre os fármacos comercializados atualmente, cerca de 62% são derivados heterocíclicos e que destes, 28% possuem um átomo de enxofre (NEWMAN *et al.*, 2008). Dessa forma, os compostos análogos a chalconas contendo um átomo de enxofre são considerados promissores, e recebem atenção especial neste trabalho. A versatilidade, atividade e seletividade desta classe de compostos sugere que as chalconas podem ser estruturas promissoras para o desenvolvimento de compostos líderes na busca por novos agentes para o tratamento de infecções provocadas por

bactérias do gênero *Yersinia*. Deste modo a idealização das séries H (derivada do 2-acetil-5-cloro-tiofeno) e HB (derivada do 5-cloro-2-tiofenocarbaldeído) vai de encontro com o que foi apresentado, uma vez que a busca pela versatilidade é um dos objetivos destas séries.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo geral a síntese e caracterização de duas séries de compostos análogos a chalconas, contendo pelo menos um heterociclo com enxofre, uma série derivada do 2-acetil-5-cloro-tiofeno (série H) e outra derivada do 5-cloro-2-tiofenocarbaldeído (série HB), através de condensação aldólica, para posterior avaliação da atividade biológica dos compostos sintetizados frente à enzima YopH.

3.2 Objetivos Específicos

- Obtenção e purificação de compostos análogos a chalconas derivadas do 2-acetil-5-cloro-tiofeno, série H.
- Obtenção e purificação de compostos análogos a chalconas derivadas do 5-cloro-2-tiofenocarbaldeído série HB.
- Caracterização química de todos os compostos obtidos por determinação do ponto de fusão e espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H .
- Avaliação da atividade inibitória da proteína tirosina fosfatase YopH de *Yersinia pestis* pelas duas séries de compostos sintetizados.

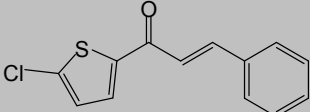
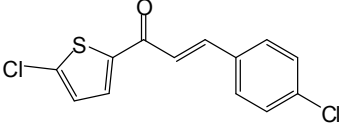
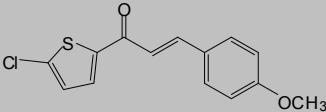
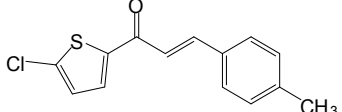
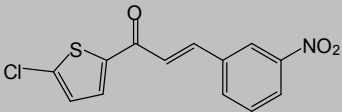
4 MATERIAIS E MÉTODOS

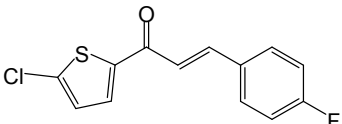
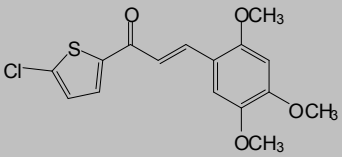
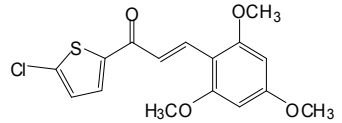
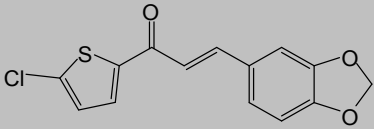
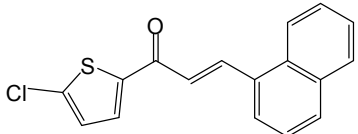
4.1 Síntese dos Compostos Análogos a Chalconas da Série H

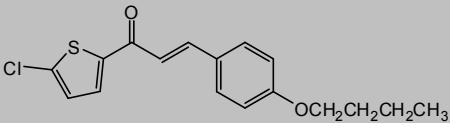
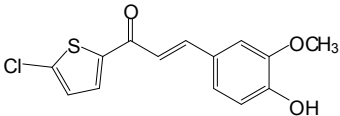
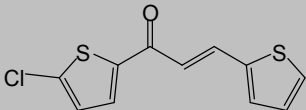
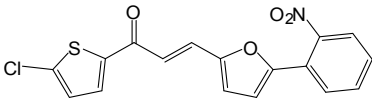
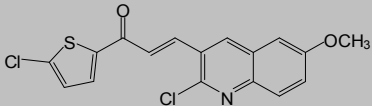
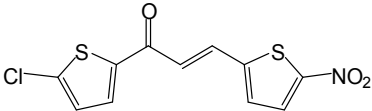
Foram propostos 21 compostos análogos a chalconas derivadas do 2-acetil-5-cloro-tiofeno (Tabela 2), das quais foram obtidos 20 (VOLTOLINI, 2010), através de condensação aldólica (Vogel, 1989). Em um balão de reação de 50 mL, colocou-se 0,5 mmol do 2-acetil-5-cloro-tiofeno e 0,5 mmol do aldeído correspondente e metanol (10 mL). Adicionou-se, inicialmente, 5 gotas de KOH, lentamente (solução aquosa 50% m/m) após os reagentes estarem dissolvidos, a mistura foi mantida sob agitação magnética a temperatura ambiente. O tempo reacional e a quantidade total de KOH adicionados em cada reação estão apresentados na Tabela 2. Por se tratar de uma cetona com grupo que pode ser fotossensível (cloro), o balão de reação foi envolvido com papel alumínio em todas as reações e durante todos os processos.

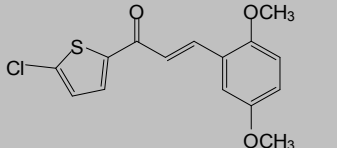
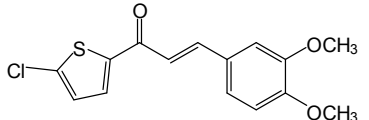
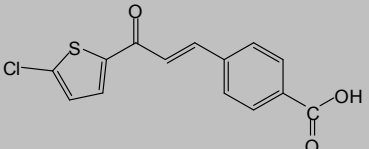
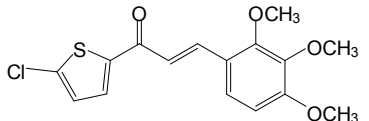
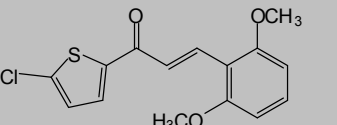
Após o término da reação, o conteúdo do balão foi vertido em água destilada, e adicionou-se ácido clorídrico 10% até obter pH levemente ácido. Os compostos obtidos foram filtrados a vácuo e avaliados por CCD. As condições reacionais, rendimentos e ponto de fusão dos compostos obtidos e a estrutura do composto não obtido (H23), estão relacionados na Tabela 2. A nomenclatura dos compostos obtidos nesta série pode ser vista no Anexo I.

Tabela 2. Condições reacionais para obtenção dos compostos da série H, peso molecular dos compostos e resultados de rendimento e ponto de fusão obtidos.

Código	Estrutura	PM (g.mol ⁻¹)	KOH 50% (gotas)	Tempo de reação	Rendimento (%)	p.f. (°C)
H1		248,73	5	30 minutos	37,3	94,6-96,0
H2		283,17	10	8-12 horas	45,7	155,5-156,6
H3		278,75	10	8-12 horas	27,0	114,5-115,7
H4		262,75	10	8-12 horas	49,5	130,2-131,5
H6		293,73	10	30 minutos	10,9	144,4-145,3

H7		266,72	10	8-12 horas	51,1	123,8-124,4
H11		338,81	15	30 horas	52,6	81,9-83,2
H12		338,81	10	8-12 horas	39,7	155,6-157,4
H14		292,74	10	8-12 horas	42,4	155,9-156,9
H15		298,79	10	8-12 horas	71,6	130,7-132,5

H16		320,83	10	24 horas	23,6	126,9-127,5
H17		294,75	10	20 horas	8,1	148,1-149,8
H19		254,76	20	72 horas	59,2	82,7-83,3
H21		359,78	10	8-12 horas	93,4	116,2-117,7
H22		364,25	10	6 horas	86,8	182,3-184,0
H23		299,75	30	3 semanas	-	Composto não obtido

H24		308,78	30	5 dias	31,1	79,0-80,4
H25		308,78	15	24 horas	22,9	116,7-117,8
H28		292,74	10	8-12 horas	13,0	>300
H29		338,81	10	48 horas	23,7	97,3-98,4
H30		308,78	20	48 horas	81,9	145,0-146,1

p.f. = ponto de fusão

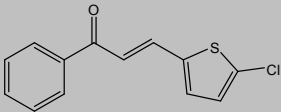
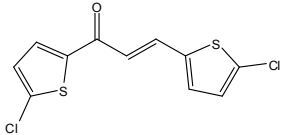
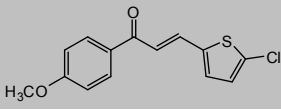
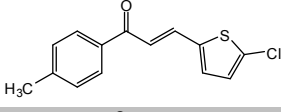
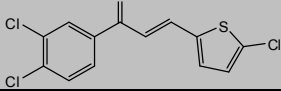
4.2 Síntese dos Compostos Análogos a Chalconas da Série HB

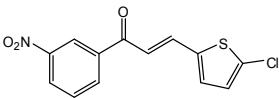
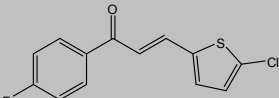
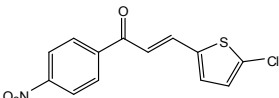
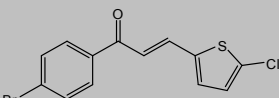
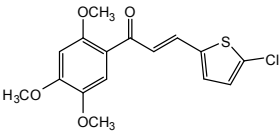
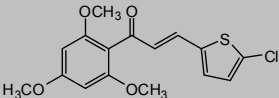
4.2.1 Procedimento Geral, Conforme Descrito por Vogel (1989)

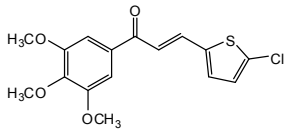
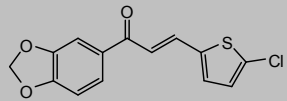
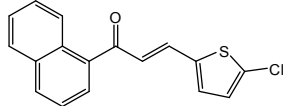
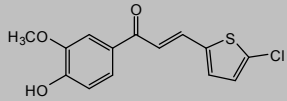
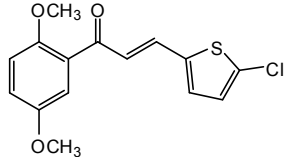
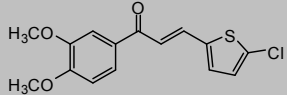
Foram propostos 21 compostos análogos a chalconas derivados do 5-cloro-2-tiofenocarbaldeído, das quais foram obtidos 21 (Tabela 3), através de condensação aldólica (Vogel, 1989). Em um balão de reação de 50 mL, colocou-se 1,0 mmol do 5-cloro-2-tiofenocarbaldeído, 1,0 mmol da cetona correspondente e metanol (10 mL). Adicionou-se lentamente 10 gotas de KOH (solução aquosa 50% m/m) após os reagentes estarem dissolvidos, e a mistura foi mantida sob agitação magnética a temperatura ambiente. Da mesma forma que para a obtenção das chalconas da série H, devido ao aldeído conter um grupo que pode ser fotossensível (cloro), o balão de reação foi envolvido com papel alumínio em todas as reações e durante todos os processos.

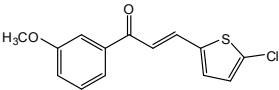
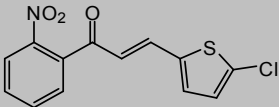
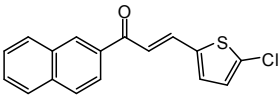
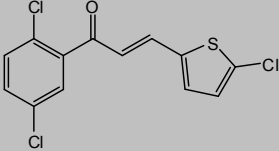
Após o término da reação, o conteúdo do balão foi vertido em água destilada, e a reação tratada com ácido clorídrico 10% até pH levemente ácido. Os compostos obtidos foram filtrados em funil de Büchner e avaliados por CCD. As condições reacionais, peso molecular, rendimentos e ponto de fusão dos compostos obtidos, estão relacionados na Tabela 3. A nomenclatura dos compostos obtidos nesta série pode ser vista no Anexo I.

Tabela 3 Condições reacionais para obtenção dos compostos da série HB, peso molecular dos compostos e resultados de rendimento e ponto de fusão obtidos.

Código	Estrutura	PM (g.mol ⁻¹)	KOH 50% (gotas)	Tempo de reação	Rendimento (%)	p.f. (°C)
HB1		248,73	10	25 horas	71,16	77,0 – 78,0
HB2		289,2	10	2 horas e 30 minutos	77,39	107,4 – 108,2
HB3		278,75	10	55 minutos	31,38	128,6 – 130,0
HB4		262,75	10	22 horas	55,91	90,4 – 91,4
HB5		317,62	10	30 minutos	67,36	152,4 – 154,4

HB6		293,73	10	1 hora e 15 minutos	86,86	167,7 – 169,7
HB7		266,72	10	4 horas e 35 minutos	77,07	99,4 – 99,8
HB8		293,73	10	1 hora e 20 minutos	75,54	163,2 – 163,7
HB9		327,62	10	21 horas	88,13	144,5 – 145,3
HB11		338,81	10	7 horas	48,57	131,7 – 132,7
HB12		338,81	10	1 hora e 50 minutos	70,16	102,0 – 102,8

HB13		338,81	10	17 horas e 30 minutos	89,99	99,3 – 100,0
HB14		292,74	10	2 horas e 30 minutos	38,30	130 – 130,7
HB15		298,79	10	3 horas e 15 minutos	73,18	103,4 – 104,4
HB17		294,75	10	96 horas	18,09	109,5 – 110,7
HB24		308,78	10	2 horas e 40 minutos	54,48	100,1 – 101,5
HB25		308,78	10	3 horas e 20 minutos	47,21	109,5 – 110,4

HB32		278,75	10	27 horas	33,62	77,4 – 78,7
HB36		293,73	10	3 horas	7,06	91,8 – 92,4
HB37		298,79	10	4 horas	44,47	99,7 – 100,8
HB40		317,62	10	1 hora e 20 minutos	23,61	133,6 – 135,2

4.2.2 Procedimento em Microondas

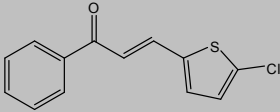
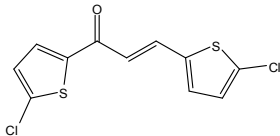
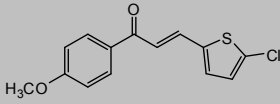
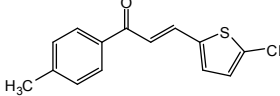
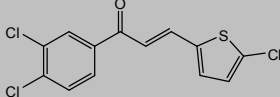
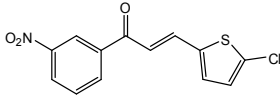
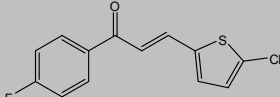
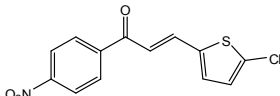
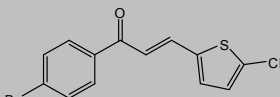
Para comparação das metodologias, procedeu-se a síntese de 14 compostos análogos a chalconas derivadas do 5-cloro-2-tiofenocarbaldeído das quais foram obtidos 12 (exceto HB_{6MW} e HB_{8MW}), através da condensação aldólica, em microondas modelo Star Synth da MILESTONE, disponível no laboratório do grupo Estrutura e Atividade (Laboratório 309) no Departamento de Química do Campus da UFSC.

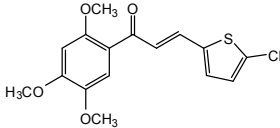
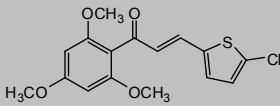
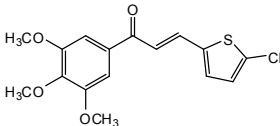
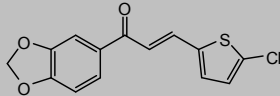
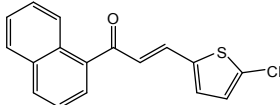
Em um balão de reação, colocou-se 1,0 mmol do 5-cloro-2-tiofenocarbaldeído, 1,0 mmol da respectiva acetofenona e 20 mL de etanol. Após os reagentes estarem dissolvidos por uma breve agitação mecânica manual, adicionou-se hidróxido de potássio (50%_{m/m}), e o balão foi colocado no microondas. O tempo reacional foi padronizado para as reações, e consistiu em 30 segundos de aquecimento para atingir a temperatura de 60 °C, 5 minutos a 60 °C sob agitação constante, e 5 minutos de ventilação para resfriamento. A agitação e a potência do microondas foram mantidas, respectivamente em 60% e 1000 W, para todas as reações.

Particularmente, o composto denominado de **HB9** apresentou os dois reagentes na análise por CCD após a realização deste procedimento padrão de reação em microondas. Em função disto, a reação foi submetida a uma nova programação, que consistiu em mais 3 minutos a 60°C, após os 30 segundos de aquecimento para atingir esta temperatura, finalizando com os 5 minutos de ventilação para resfriamento.

Após o término de cada período reacional, o conteúdo do balão foi vertido em água destilada, e a reação tratada com ácido clorídrico 10% até pH levemente ácido. Os compostos obtidos foram filtrados e avaliados por CCD. As condições reacionais, rendimentos e ponto de fusão dos compostos obtidos, estão relacionados na Tabela 4. As chalconas obtidas foram caracterizadas por ponto de fusão e RMN de ¹H e comparadas com as da Tabela 2.

Tabela 4. Condições reacionais para obtenção dos compostos da série HB por microondas e resultados de rendimento e ponto de fusão obtidos.

Código	Estrutura	KOH 50% (gotas)	Rendimento (%)	p.f.(°C)
HB1 _{MW}		10	80,41	81,7 – 82,7
HB2 _{MW}		10	77,84	107,8 – 108,6
HB3 _{MW}		10	13,76	129,2 – 129,9
HB4 _{MW}		10	56,07	90,2 – 90,7
HB5 _{MW}		10	24,92	82,5 – 83,4
HB6 _{MW}		3		Não obtido
HB7 _{MW}		10	82,98	99,0 – 99,8
HB8 _{MW}		2		Não obtido
HB9 _{MW}		5	84,54	144,0 - 145,0

HB11 _{MW}		10	52,63	130,0 – 131,8
HB12 _{MW}		10	6,14	102,0 – 103,8
HB13 _{MW}		10	73,43	99,5 – 100,2
HB14 _{MW}		10	69,64	129,9 – 130,1
HB15 _{MW}		10	77,80	98,6 – 100,6

4.3 Técnicas Gerais de Purificação e Caracterização dos Compostos Obtidos

Os reagentes e solventes utilizados neste trabalho apresentam padrão analítico, sendo das marcas comerciais Sigma-Aldrich, Merck, Fluka e Vetec.

As reações, bem como a pureza dos compostos sintetizados, foram monitoradas por cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando como comparação os reagentes de partida, em placas de alumínio com sílica gel 60 GF 254 da Merck. Foi utilizado o sistema de polaridade de solvente hexano/acetato de etila (3:1) para as todas as reações da série H e para as reações HB14, HB15, HB24, HB32 e HB37, e o sistema de polaridade de solvente hexano/THF (4:1) para as demais reações da série HB. As placas de CCD foram visualizadas com o auxílio de luz ultravioleta ($\lambda = 254$ e 366 nm). Através desta verificação e por comparação com os reagentes de partida pode-se observar a pureza dos produtos obtidos.

Quando impuros (presença de um dos reagentes mesmo após todo o processo de tratamento da reação), os compostos da série H (H1, H2, H6, H16, H24, H25 e H29) foram recristalizados em etanol a quente.

Entre as chalconas purificadas por recristalização, destacam-se a H16, H24 e H29, que foram obtidas na forma de cristais (Figura 13).



Figura 13. Cristais obtidos para os compostos H16, H24 e H29, respectivamente.

Para os compostos impuros da série HB (HB5, HB14 e HB37 – todos apresentaram resquícios de acetofenona) obtidos pelo procedimento tradicional, a purificação foi realizada através da lavagem com hexano. Todas as reações realizadas em microondas resultaram em produtos puros.

As chalconas foram caracterizadas por ponto de fusão e por ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H . O ponto de fusão não corrigido dos compostos foi determinado em aparelho digital de ponto de fusão, MGAPF-301, Microquímica Equipamento Ltda (Tabelas 2, 3 e 4). As análises de RMN foram realizadas na Central de Análises do Departamento de Química da UFSC, em equipamento BRUKER AC-200F (200 MHz) ou VARIAN OXFORD AS-400 (400 MHz para a série H e 200 MHz para a série HB), em clorofórmio deuterado (CDCl_3), tendo como referência interna o tetrametilsilano (TMS) ou o próprio solvente.

4.4 Atividade Inibitória e Seletividade das Chalconas Sintetizadas Frente às Enzimas YopH de *Yersinia* sp.

Os experimentos de avaliação da inibição da atividade das enzimas tirosina-fosfatase YopH de *Yersinia* sp. pelas chalconas sintetizadas, foram desenvolvidos pelas alunas Priscila Graziela Alves Martins e Angela Camila Orbem Menegatti, no Centro de Biologia Molecular Estrutural da Universidade Federal de Santa Catarina, sob coordenação do Prof. Dr. Hernán Terenzi, bem como a expressão e purificação da enzima recombinante.

4.4.1 YopH de *Yersinia* sp. (wildtype): Expressão e Purificação

O vetor p7-7Yop51* Δ 162 (fornecido pelo professor Tiago A. S. Brandão da Universidade Federal de Minas Gerais) codifica a proteína YopH de *Yersinia enterocolitica*. Na transformação, 50 ng dos plasmídeos foram adicionados separadamente, à 150 μ L de BL21(DE3)pLysS competentes. Estas células foram mantidas em banho de gelo por 20 minutos, e em seguida foram colocadas à temperatura de 42 °C por dois minutos, seguido de 2 minutos novamente em gelo. Após esse período, 500 μ L de meio LB foram adicionados às células, que em seguida foram mantidas à 37 °C por 1 hora. As bactérias foram então semeadas em meio ágar contendo ampicilina (100 μ g/mL) e mantidas à temperatura de 37 °C por 16 horas. Para expressar a fosfatase YopH, as bactérias transformadas foram cultivadas à 37 °C em meio LB contendo ampicilina (100 μ g/mL), até que se atingisse a densidade óptica de 0,8 a 600 nm. Posteriormente, a indução foi feita acrescentando IPTG até a concentração final de 0,4 mM. O cultivo foi mantido a 25 °C durante 16 horas, posteriormente foi centrifugado, e o precipitado foi guardado a -20 °C. O precipitado obtido após o cultivo foi homogeneizado em 3mL do tampão Y (Acetato de sódio 100 mM pH 5,7; NaCl 100 mM; EDTA 1 mM e DTT 1 mM) contendo PMSF (fluoreto de metil fenilsulfonila) na concentração final de 40 μ g/mL. Em seguida as células foram rompidas por sonicação em 7 ciclos de 20 segundos em gelo. O conteúdo obtido após a sonicação foi centrifugado a 4°C por 40 minutos a 16000 rpm. O sobrenadante obtido após a centrifugação foi então injetado no sistema ÄKTA(GE Healthcare), ao qual estava conectada uma coluna HiTrap™ SP HP (AmershamBiosciences) de 5 mL. Os tampões utilizados na purificação foram os tampões Y e Y⁺ (Acetato de sódio 100 mM pH 5,7;

NaCl 500 mM; EDTA 1 mM e DTT 1 mM). A purificação da proteína Yop51*Δ162 foi realizada pelo método de cromatografia de troca iônica. A coluna HiTrap™ SP HP é uma coluna trocadora de cátions, carregada com radicais $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$. No pH dos tampões de purificação a YopH se encontra com cargas positivas (pH abaixo do ponto isoelétrico) e é atraída pelos radicais $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$ presentes na coluna, as demais proteínas são então eluídas com o tampão. Com o acréscimo de cargas positivas devido ao aumento da concentração de NaCl do tampão Y^+ a proteína de interesse é liberada da coluna. Depois da purificação, a YopH foi quantificada pelo método de Bradford (1976), separada em frações e mantida a -80°C .

4.4.2 Avaliação da Atividade Residual da YopH

Os testes de avaliação da inibição enzimática pelas chalconas foram realizados em placas de 96 poços, contendo $5\ \mu\text{L}$ do composto diluído a $1,0 \times 10^{-3}\ \text{M}$ (concentração final de $25\ \mu\text{M}$), $20\ \mu\text{L}$ de imidazol $200\ \text{mM}$ $\text{pH}=7,0$ (concentração final de $20\ \text{mM}$), água MilliQ.s.p $198\ \mu\text{L}$ em cada poço, e $2\ \mu\text{L}$ de proteína recombinante diluída ($0,085\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$ por poço). A placa foi mantida por 10 minutos em estufa a 37°C , sendo adicionado em seguida $10\ \mu\text{L}$ de *p*-nitrofenilfosfato [pNPP] $400\ \text{mM}$ (concentração final de $40\ \text{mM}$) a cada poço, para início da reação. As enzimas clivam o substrato (pNPP), liberando *p*-nitrofenol, de cor amarela. A absorbância do *p*-nitrofenol foi medida em espectrofotômetro UV-VIS para placas de ELISA (TECAN Infinite M200), por 10 minutos a 37°C (a $410\ \text{nm}$ com leituras a cada 1 minuto). Controles negativos foram feitos na ausência de enzima ou de compostos, e controles positivos na presença de enzima e DMSO 100% no lugar do composto. O percentual de atividade residual foi calculado pela diferença de Absorbância entre os tempos 7 minutos e 2 minutos, obtido pela média de dois experimentos feitos em triplicata.

4.4.3 Determinação dos Valores de IC_{50} dos Compostos Análogos a Chalconas

A inibição dos compostos foi determinada por cálculos de IC_{50} (concentração necessária para um composto inibir 50% a atividade da enzima original). Os valores de IC_{50} foram determinados usando concentrações crescentes de inibidor (1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 80

e 100 μM) *versus* % de inibição, obtidos pela mesma metodologia do item anterior.

A atividade enzimática foi expressa em valores de percentual de atividade residual comparada ao controle sem inibidor. Os dados experimentais foram analisados com o programa Microsoft Office Excel 7.0 e os valores de IC_{50} determinados graficamente através da regressão linear de melhor ajuste.

4.4.4 Ensaios Cinéticos

Os valores de K_m , K_i e V_{max} , e o mecanismo de inibição dos compostos, foram determinados utilizando concentrações crescentes do substrato p-NPP (variáveis entre 0,1 e 30 mM) para cada concentração de composto (ao menos 3 concentrações, variáveis entre 1 e 60 μM , dependendo do valor de IC_{50} de cada composto). Para a construção do gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk foram plotados o inverso do valor da velocidade (determinada pela diferença entre a absorbância dos tempos 7 e 2 minutos) *versus* os valores correspondentes ao inverso da concentração de p-NPP. A absorvidade molar calculada experimentalmente do *p*-nitrofenol de $3062 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ será utilizada para efetuar os cálculos. Os dados experimentais foram analisados com o programa Microsoft Office Excel 7.0 e as constantes cinéticas determinadas através do método de regressão linear de melhor ajuste.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese dos Compostos Análogos a Chalconas

5.1.1 Série H Sintetizada em Bancada

O esquema geral para as sínteses realizadas está apresentado na Figura 14. Esta reação ocorre através de uma condensação de Claisen-Schmidt, seguida por desidratação em meio básico (conforme mecanismo apresentado na Figura 7).

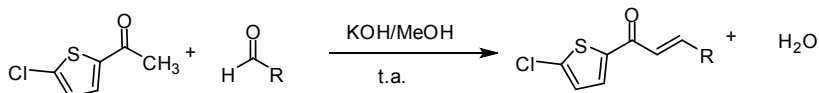


Figura 14. Esquema de síntese dos compostos análogos a chalconas da série H.

As reações foram realizadas mantendo-se fixa a cetona (2-acetil-5-cloro-tiofeno) e variando-se os aldeídos, que foram escolhidos com base na Árvore de Decisão de Topliss (Figura 15).

No método proposto por Topliss, a série deve iniciar-se, obrigatoriamente, com a síntese do derivado do aldeído fenílico não substituído, seguido pelo derivado 4-cloro da molécula anterior. Posteriormente à obtenção destes dois produtos, a escolha de cada aldeído seguinte é feita pela comparação da atividade biológica das duas moléculas sintetizadas anteriormente.

Entretanto, como nesta pesquisa os resultados das atividades biológicas não foram obtidos imediatamente após uma síntese e antes da subsequente, os aldeídos utilizados não foram escolhidos respeitando-se as ordens estabelecidas pelo método de Topliss em função dos resultados biológicos, e sim, utilizando-se os substituintes básicos propostos pelo método, além de variações estruturais, de acordo com a disponibilidade de reagentes existentes no laboratório.

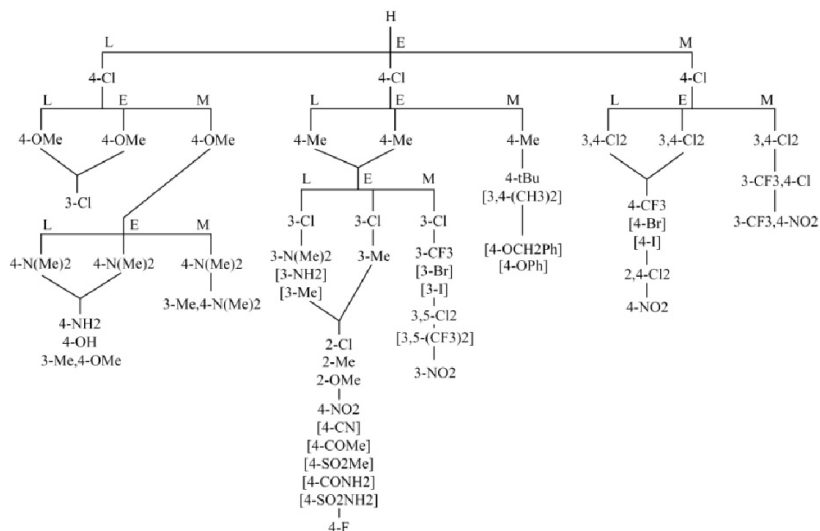
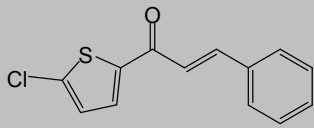
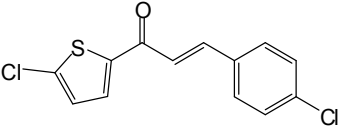
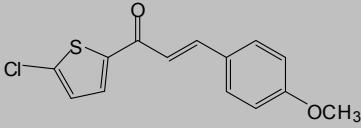
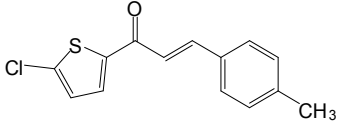
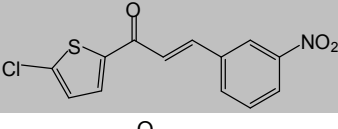
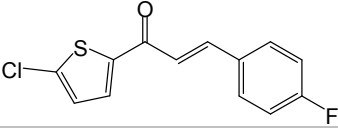
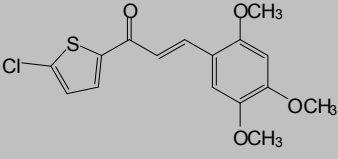
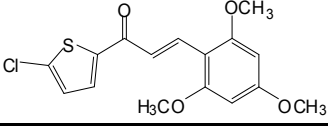
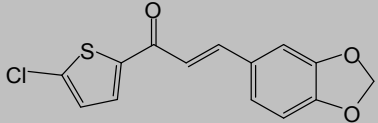
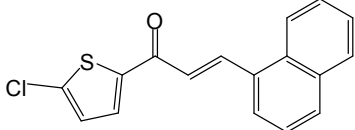
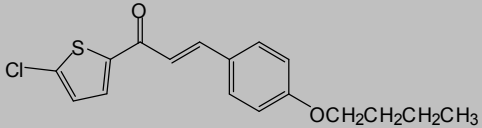
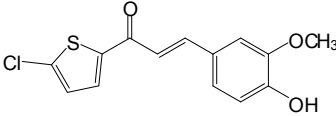
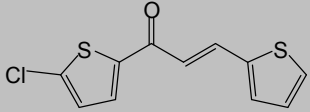
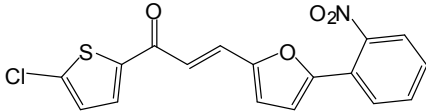
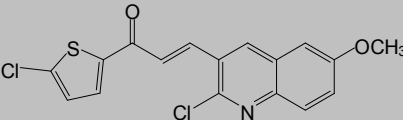
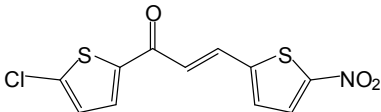


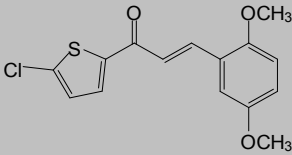
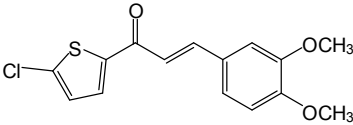
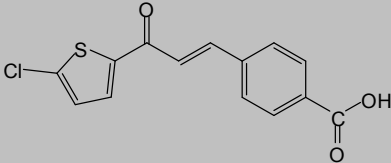
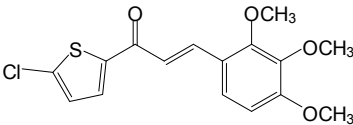
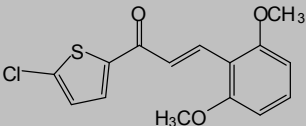
Figura 15. Esquema de Topliss para a otimização de substituintes aromáticos: M, é mais ativo; E, é igualmente ativo; L, é menos ativo que o composto anterior da chave. Os grupos entre colchetes ([]) representam substituintes alternativos. As linhas descendentes indicam substituições sequenciais (Adaptado de Topliss, 1972).

Utilizando-se desses artificios, foi proposta a síntese de 21 compostos análogos a chalconas da série H, sendo 7 deles inéditos, 6 apenas com registro de CAS (considerados também inéditos por não haver nenhum artigo publicado com estas estruturas) e 8 já descritos na literatura (Tabela 5).

Tabela 5. Relação de publicações na literatura e número de CAS dos compostos análogos a chalconas da série H

Sigla	Composto	Artigos	CAS
H1		1	286956-04-5
H2		2	286956-06-7
H3		1	180298-07-1
H4		0	1001964-80-2
H6		0	879732-57-7*
H7		1*	2069-49-0*
H11		0	1001964-89-1
H12		0	Inédito

H14		0	875868-58-9*
H15		1	101439-40-1*
H16		0	Inédito
H17		0	Inédito
H19		2*	103988-73-4*
H21		0	Inédito
H22		1	1253278-27-1
H23		0	Inédita

H24		0	Inédita
H25		1	180298-08-2
H28		0	801248-00-0
H29		0	Inédita
H30		0	258518-36-4*

* Estereoquímica não definida.

Dentre as reações realizadas, obteve-se produto (devidamente caracterizado) em 19 reações e um produto (H2) não caracterizado completamente, sendo a reação de formação da H23 a única que não se processou da maneira desejada. Este fato é contrário ao esperado, uma vez que o substituinte do anel B é um grupo retirador de elétrons (NO_2), o que deixa o carbono carbonílico do aldeído mais suscetível ao ataque nucleofílico, e que deveria, portanto, facilitar a reação em termos eletrônicos. Comparando as estruturas de H23 (não obtida) e H19 (composto obtido, que possui o anel B semelhante ao da H23) e sabendo-se que o impedimento para a reação não é de caráter eletrônico (pois o grupo nitro ativa o aldeído), pode-se então supor que o grupo

NO₂ na posição 3 do anel tiofeno provoque algum impedimento estérico impossibilitando que a reação se processe.

Nas demais reações o produto esperado foi obtido, sendo que 12 destes compostos precipitaram de forma pura ao longo da reação (H3, H4, H7, H11, H12, H14, H15, H17, H19, H21, H22, H28 e H30) e 7 passaram por processo de purificação (H1, H2, H6, H16, H24, H25 e H29) após o tratamento da reação. Como método de purificação dos compostos, foi utilizada a técnica da recristalização em etanol a quente.

Entre as chalconas purificadas por recristalização, destacam-se a H16, H24 e H29, que foram obtidas na forma de cristais (Figura 13).

O rendimento das reações foi variado, de aproximadamente 8 até 93%, como mostra a Tabela 6. Maiores rendimentos (acima de 85%) parecem ser favorecidos com substituintes volumosos no anel B, como observado para as chalconas que possuem 2 anéis aromáticos nesta posição (H21 e H22).

Entre os compostos obtidos com os menores rendimentos estão a H17 e a H28, que podem ter seus rendimentos justificados através do mecanismo da reação, pois para termos a formação do produto de condensação é necessário que o H alfa à carbonila da cetona seja abstraído, para que então ocorra o ataque nucleofílico na carbonila do aldeído. No caso da H17 e H28, isso pode estar acontecendo em menor proporção, pois parte da base pode estar abstraindo o hidrogênio da hidroxila do aldeído da H17 e o hidrogênio da carboxila do aldeído usado na reação da H28, o que resultaria em uma diminuição da reatividade dos aldeídos frente a um ataque nucleofílico. O baixo rendimento da H6 pode ser devido a perdas durante o processo, devido à recristalização.

O ponto de fusão das moléculas puras foi determinado e também encontra-se na Tabela 6, juntamente com o ponto de fusão reportado na literatura.

Tabela 6. Rendimento das reações, massa molar e ponto de fusão dos compostos obtidos.

Sigla	M.M. (g/mol)	Rendimento (%)	p.f. (°C)	p.f. da literatura (°C)
H1	248,73	37,3	94,6-96,0	Não reportado
H2	283,18	45,7	155,5-156,6	156,0 ^α
H3	278,76	27,0	114,5-115,7	Não reportado
H4	262,76	49,5	130,2-131,5	Não reportado
H6	293,73	10,9	144,4-145,3	Não reportado
H7	266,72	51,1	123,8-124,4	128,0 ^β
H11	338,81	52,6	81,9-83,2	Não reportado
H12	338,81	39,7	155,6-157,4	Não reportado
H14	292,74	42,4	155,9-156,9	Não reportado
H15	298,79	71,6	130,7-132,5	Não reportado
H16	320,84	23,6	126,9-127,5	Não reportado
H17	294,76	8,1	148,1-149,8	Não reportado
H19	254,76	59,2	82,7-83,3	100,0-104,0 ^β
H21	359,79	93,4	116,2-117,7	Não reportado
H22	364,25	86,8	182,3-184,0	180,0 ^γ
H24	308,79	31,1	79,0-80,4	Não reportado
H25	308,79	22,9	116,7-117,8	Não reportado
H28	292,74	13,0	>300	Não reportado
H29	338,81	23,7	97,3-98,4	Não reportado
H30	308,79	81,9	145,0-146,1	Não reportado

^α (RYABUKHIN *e col.*, 2007) ^β (BUU-HOI *e col.*, 1956) ^γ (RIZVI *e col.*, 2010).

Como pode ser observado na Tabela 6, apenas 4 compostos têm seu ponto de fusão relatado na literatura, sendo que em 3 destes (H2, H7 e H22) o valor obtido experimentalmente é condizente com o já descrito na literatura, indicando a pureza destes compostos. Para H19, entretanto, o ponto de fusão obtido apresenta grande diferença do reportado, porém, através do espectro de RMN de ¹H, comprovou-se tratar do produto desejado. As demais chalconas não apresentam relato de seu ponto de fusão na literatura, mas como possuem intervalo de fusão menor que 2°C tem-se, também, um indicativo de sua pureza.

Para confirmar a obtenção dos produtos desejados e sua pureza, fez-se análise dos compostos por RMN de ^1H . A Figura 16 apresenta o espectro de RMN de ^1H obtido para a H1, cuja discussão segue abaixo e serviu de base para as demais caracterizações.

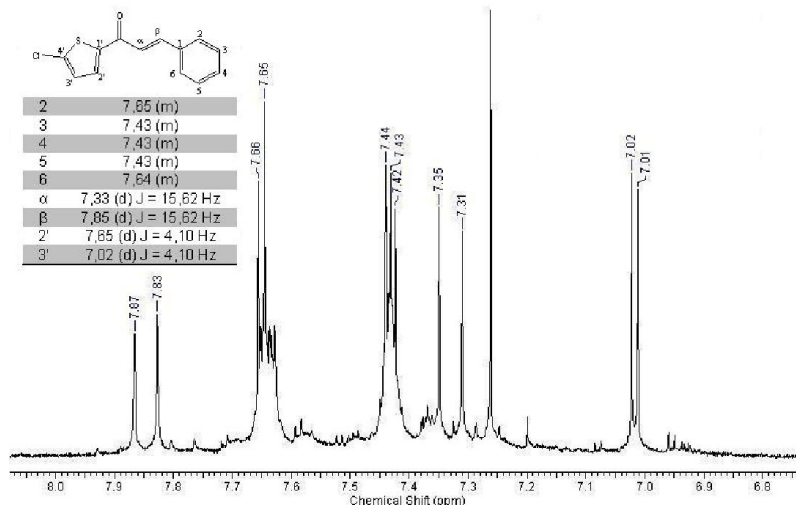


Figura 16 Espectro de RMN (400 MHz) de ^1H do análogo a chalcona H1. Deslocamento químico em relação ao TMS. Solvente CDCl_3

Neste espectro podemos observar o sinal do hidrogênio α na forma de um duplete que aparece em, aproximadamente, 7,33 ppm. Já o hidrogênio β aparece um pouco mais deslocado, em 7,85 ppm, também como duplete. Ambos, hidrogênio α e β , aparecem acoplados com J igual a 15,62 Hz, valor esperado para o isômero *E* da chalcona (produto desejado). Outros dois sinais bem característicos desta série de chalconas são os dos hidrogênios 2' e 3' do anel A, que aparecem, respectivamente, em 7,65 ppm e 7,02 ppm, com constante de acoplamento de 4,10 Hz. Os demais sinais presentes no espectro podem ser atribuídos aos hidrogênios do anel B; os cinco hidrogênios apareceram como dois multipletes distintos, tendo deslocamentos de 7,43 (hidrogênios 3, 4 e 5) e 7,65 ppm (hidrogênios 2 e 6).

Estando a chalcona H1 devidamente caracterizada, pôde-se partir para a análise do RMN dos demais compostos.

Analisando os espectros referentes às outras chalconas, observa-se que estes padrões de deslocamento dos sinais se mantêm. De maneira geral, nos espectros de RMN de ^1H obtidos buscou-se identificar, principalmente, os sinais dos hidrogênios α e β , cujo deslocamento variou de 7,11 a 8,00 ppm para o $\text{H}\alpha$ e de 7,76 a 8,30 ppm para o $\text{H}\beta$, que apresentam-se de forma bem característica, como dois dubletes acoplados entre si com constante de acoplamento em torno de 16 Hz, o que caracteriza o produto obtido em configuração *E*.

Os hidrogênios do anel tiofênico (anel A da chalcona) apresentam valores entre 6,97 e 8,31 ppm e *J* em torno de 4,10 Hz, o que os diferencia facilmente dos hidrogênios do anel B, que possuem constante de acoplamento de aproximadamente 8 Hz. Entre os hidrogênios tiofênicos, $\text{H}3'$ é sempre o menos deslocado e $\text{H}2'$ o que apresenta o maior deslocamento químico, conforme se observa nos espectros desta série.

A quantidade de sinais e o deslocamento químico dos hidrogênios do anel B das chalconas variaram de acordo com os substituintes, por vezes sendo mais complicada a atribuição destes hidrogênios em relação aos do anel A.

Em relação ao composto designado pela sigla H2, como seu ponto de fusão experimental não divergiu do da literatura, considera-se, assim que o análogo a chalcona H2 tenha sido obtida, apesar de ainda não possuir espectro de RMN de ^1H que o confirme.

5.1.2 Série HB Sintetizada em Bancada

O esquema geral para as sínteses realizadas está apresentado na Figura 17. Esta reação ocorre através de uma condensação aldólica, seguida por desidratação em meio básico (conforme mecanismo apresentado na Figura 7).

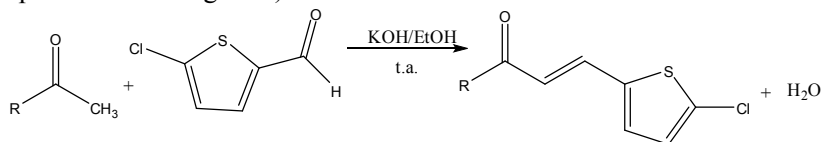


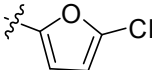
Figura 17. Esquema de síntese dos compostos análogos a chalconas HB.

As estruturas propostas nesta série foram baseadas na estrutura dos compostos análogos a chalconas da série H previamente sintetizada.

Foi proposta a inversão dos anéis A e B, passando-se a utilizar o aldeído fixo para todos os compostos da série HB, ao invés da acetofenona fixa utilizada para a obtenção da série H. As cetonas, por sua vez, foram escolhidas conforme os aldeídos utilizados para a síntese da série H (de acordo com a disponibilidade de reagentes no laboratório).

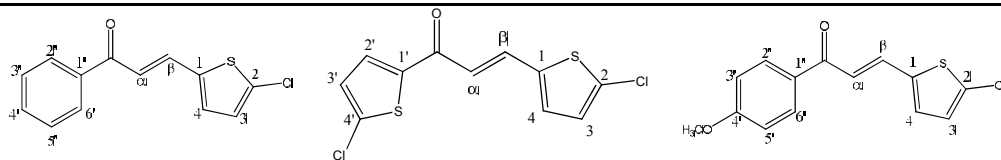
Foram realizadas 21 reações na tentativa de obtenção dos compostos análogos a chalconas propostos para esta série (HB), obtendo-se todos os compostos previamente planejados. Os resultados podem ser observados na Tabela 7. Os 21 compostos análogos a chalconas obtidos são inéditos.

Tabela 7. Resultados das reações de obtenção dos compostos da série HB.

Chalcona	Anel A	PM (g.mol ⁻¹)	Rendimento (%)	p.f. (°C)
HB1	fenil	248,73	71,16	77,0 – 78,0
HB2		289,2	77,39	107,4 – 108,2
HB3	4-OCH ₃ -fenil	278,75	31,38	128,6 – 130,0
HB4	4-CH ₃ -fenil	262,75	55,91	90,4 – 91,4
HB5	3,4-Cl ₂ -fenil	317,62	67,36	152,4 – 154,4
HB6	3-NO ₂ -fenil	293,73	86,86	167,7 – 169,7
HB7	4-F-fenil	266,72	77,07	99,4 – 99,8
HB8	4-NO ₂ -fenil	293,73	75,54	163,2 – 163,7
HB9	4-Br-fenil	327,62	88,13	144,5 – 145,3
HB11	2,4,5-OCH ₃ -fenil	338,81	48,57	131,7 – 132,7
HB12	2,4,6-OCH ₃ -fenil	338,81	70,16	102,0 – 102,8
HB13	3,4,5-OCH ₃ -fenil	338,81	89,99	99,3 – 100,0
HB14	3,4-OCH ₂ O-fenil	292,74	38,30	130 – 130,7
HB15	1-naftil	298,88	73,18	103,4 – 104,4
HB17	3-OCH ₃ -4-OH-fenil	294,75	18,09	109,5 – 110,7
HB24	2,5-OCH ₃ -fenil	308,78	54,48	100,1 – 101,5
HB25	3,4-OCH ₃ -fenil	308,78	47,21	109,5 – 110
HB32	3-OCH ₃ -fenil	278,75	33,62	77,4 – 78,7
HB36	2-NO ₂ -fenil	293,73	7,06	91,8 – 92,4
HB37	2-naftil	298,79	44,47	99,7 – 100,8
HB40	2,5-Cl ₂ -fenil	317,62	23,61	133,6 – 135,2

Os 21 compostos análogos a chalconas obtidos foram caracterizados por RMN de ^1H , além da determinação do ponto de fusão. Os espectros de RMN ^1H dos compostos inéditos encontram-se no Anexo II. As Tabelas 8 a 14 apresentam as atribuições dos sinais dos espectros de RMN para todos os compostos desta série.

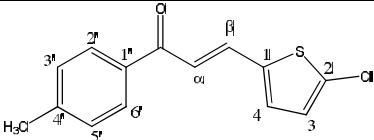
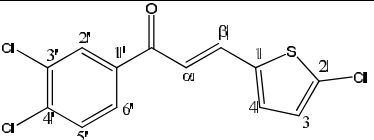
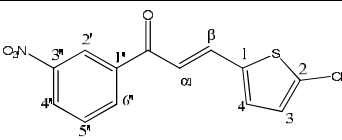
Tabela 8. Caracterização por RMN ^1H dos compostos HB1, HB2 e HB3.



^1H	HB1	HB2	HB3
3	6,91 <i>d</i> (3,79)	6,92 <i>d</i> (3,79)	6,91 <i>d</i> (4,04)
4	7,25 <i>d</i> 4,29 <i>z</i>	7,14 <i>d</i> (3,79)	7,12 <i>d</i> (3,79)
α	7,53 <i>m</i>	6,96 <i>d</i> (14,91)	7,21 <i>d</i> (15,41)
β	7,79 <i>d</i> (15,42)	7,79 <i>d</i> (14,91)	7,78 <i>dd</i> (15,16/0,51)
2'	7,99 <i>dd</i> (6,56 / 2,02)	7,59 <i>d</i> (4,04)	7,78 <i>d</i> (15,16)
3'	7,53 <i>m</i>	7,00 <i>d</i> (4,04)	6,99 <i>d</i> (8,84)
4'	7,14 <i>t</i> (3,79)	-	-
5'	7,53 <i>m</i>	-	6,99 <i>d</i> (8,84)
6'	7,99 <i>dd</i> (6,56 / 2,02)	-	8,00 <i>d</i> (8,84)
4-OCH₃	-	-	3,89 <i>s</i>

δ ppm em relação ao TMS, *Multiplicidade* (J em Hz). Solvente CDCl_3 .

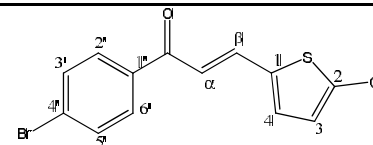
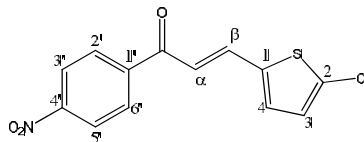
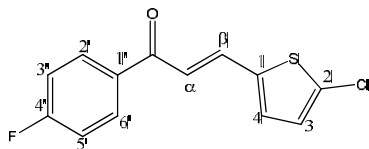
Tabela 9. Caracterização por RMN ^1H dos compostos HB4, HB5 e HB6.

1H	HB4	HB5	HB6
3	6,91 <i>d</i> (3,79)	6,92 <i>d</i> (3,79)	6,95 <i>d</i> (3,79)
4	7,13 <i>d</i> (3,79)	7,18 <i>d</i> (3,79)	7,21 <i>d</i> (3,79)
α	7,21 <i>d</i> (15,41)	7,10 <i>d</i> (15,41)	7,18 <i>d</i> (15,16)
β	7,79 <i>d</i> (15,41)	7,82 <i>d</i> (15,41)	7,89 <i>d</i> (15,16)
2'	7,90 <i>d</i> (8,34)	8,92 <i>d</i> (2,02)	8,80 <i>m</i>
3'	7,31 <i>d</i> (7,84)	-	-
4'	-	-	8,32 <i>dd</i> (7,84 / 2,52)
5'	7,31 <i>d</i> (7,84)	7,58 <i>d</i> (8,34)	7,72 <i>t</i> (8,08/7,84)
6'	7,90 <i>d</i> (8,34)	7,82 <i>dd</i> (8,34 / 2,02)	8,45 <i>dd</i> (8,08 / 2,28)
4-CH ₃	2,44 <i>s</i>	-	-

δ ppm em relação ao TMS, *Multiplicidade* (J em Hz). Solvente CDCl₃.

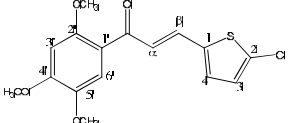
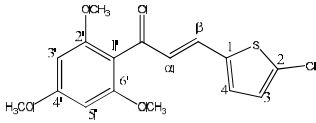
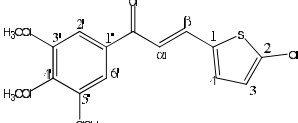
Tabela 10. Caracterização por RMN ^1H dos compostos HB7, HB8 e HB9.



^1H	HB7	HB8	HB9
3	6,92 d (4,04)	6,95 d (3,79)	6,92 d (4,04)
4	7,17 d (4,04)	7,2 d (4,02)	7,15 d (4,04)
α	7,18 d (15,41)	7,14 d (15,41)	7,13 d (15,41)
β	7,80 d (15,41)	7,85 d (15,15)	7,80 d (15,41)
2'	8,02 dd (8,84 / 5,30)	8,12 d (8,85)	7,64 d (8,59)
3'	7,14-7,20 m	8,35 dt (8,84)	7,85 d (8,59)
5'	7,14-7,20 m	8,35 d (8,84)	7,85 d (8,59)
6'	8,02 dd (8,84 / 5,30)	8,12 d (8,85)	7,64 d (8,59)

δ ppm em relação ao TMS, *Multiplicidade* (J em Hz). Solvente CDCl_3 .

Tabela 11. Caracterização por RMN ^1H dos compostos HB11, HB12 e HB13.

^1H	HB11	HB12	HB13
3	6,89 <i>d</i> (4,05)	6,85 <i>d</i> (4,04)	6,93 <i>d</i> (4,05)
4	7,07 <i>d</i> (3,78)	7,00 <i>d</i> (4,04)	7,15 <i>d</i> (4,05)
α	7,35 <i>d</i> (14,66)	6,64 <i>d</i> (15,41)	7,15 <i>d</i> (15,41)
β	7,71 <i>d</i> (14,66)	7,35 <i>d</i> (15,41)	7,81 <i>d</i> (15,41)
3'	7,39 <i>s</i>	6,15 <i>s</i>	7,24 <i>s</i>
5'	-	6,15 <i>s</i>	7,24 <i>s</i>
6'	6,53 <i>s</i>	-	-
<i>o</i> -OCH ₃	3,97 <i>s</i>	3,85 <i>s</i>	-
<i>m</i> -OCH ₃	3,89 <i>s</i>	-	3,96 <i>s</i>
<i>p</i> -OCH ₃	3,94 <i>s</i>	3,77 <i>s</i>	3,94 <i>s</i>

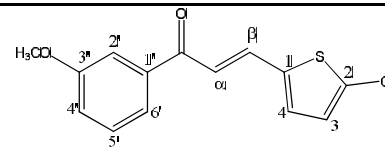
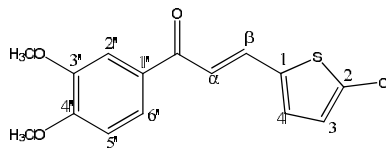
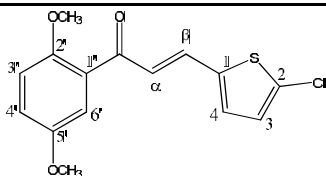
δ ppm em relação ao TMS, *Multiplicidade* (J em Hz). Solvente CDCl₃.

Tabela 12. Caracterização por RMN ^1H dos compostos HB14, HB15 e HB17.

^1H	HB14	HB15	HB17
3	6,91 <i>d</i> (4,04)	6,90 <i>d</i> (4,04)	6,93 <i>d</i> (4,04)
4	7,12 <i>d</i> (4,04)	7,07 <i>d</i> (4,04)	7,12 <i>d</i> (4,04)
α	7,15 <i>d</i> (15,16)	6,98 <i>d</i> (15,91)	7,15 <i>d</i> (15,16)
β	7,88 <i>d</i> (15,16)	7,60 <i>d</i> (15,91)	7,79 <i>d</i> (15,16)
2'	7,49 <i>d</i> (1,51)	-	7,33 s
3'	-	8,00 <i>d</i> (8,34)	-
4'	-	7,75 <i>dd</i> (7,08 / 1,26)	-
5'	7,60 <i>dd</i> (8,08 / 1,76)	7,91 <i>m</i>	7,0 <i>d</i> (8,59)
6'	6,90 <i>d</i> (8,08)	7,50 -7,61 <i>m</i>	7,59 <i>dd</i> (8,34 / 2,03)
8'	-	8,31 <i>m</i>	-
9'	-	7,50 -7,61 <i>m</i>	-
10'	-	7,50 -7,61 <i>m</i>	-
<i>m</i> -OCH ₃	-	-	3,99 s
<i>p</i> -OH	-	-	6,08 s

δ ppm em relação ao TMS, *Multiplicidade* (J em Hz). Solvente CDCl₃.

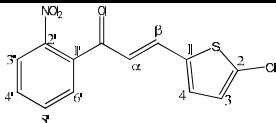
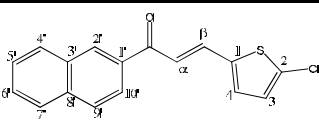
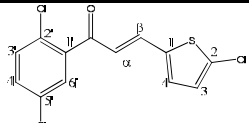
Tabela 13. Caracterização por RMN ^1H dos compostos HB24, HB25 e HB32.



^1H	HB24	HB25	HB32
3	6,89 <i>d</i> (4,04)	6,91 <i>d</i> (4,04)	6,92 <i>d</i> (4,04)
4	7,20 <i>d</i> (3,84)	7,13 <i>d</i> (4,04)	7,14 <i>d</i> (4,04)
α	7,14 <i>d</i> (15,67)	7,22 <i>d</i> (15,06)	7,18 <i>d</i> (15,41)
β	7,64 <i>d</i> (15,67)	7,79 <i>d</i> (15,06)	7,80 <i>d</i> (15,41)
2'	-	6,04 <i>d</i> (6,32)	7,50 - 7,52 <i>m</i>
3'	6,93 <i>d</i> (9,01)	-	-
4'	7,05 <i>dd</i> (9,01 / 3,54)	-	7,10 - 7,16 <i>m</i>
5'	-	7,60 <i>d</i> (2,02)	7,41 <i>t</i> (8,09 / 7,58)
6'	7,08 <i>d</i> (3,54)	7,64 <i>dd</i> (6,32 / 2,02)	7,56 <i>dt</i> (7,58 / 1,27 / 1,27)
<i>o</i> -OCH ₃	3,87 <i>s</i>	-	-
<i>m</i> -OCH ₃	3,81 <i>s</i>	3,97 <i>s</i>	3,88 <i>s</i>
<i>p</i> -OCH ₃	-	3,97 <i>s</i>	-

δ ppm em relação ao TMS, *Multiplidade* (J em Hz). Solvente DMSO- d_6 .

Tabela 14. Caracterização por RMN ¹H dos compostos HB36, HB37 e HB40.

			
1H	HB36	HB37	HB40
3	6,89 <i>d</i> (4,04)	6,95 <i>d</i> (3,79)	6,92 <i>d</i> (4,04)
4	7,04 <i>d</i> (4,04)	7,18 <i>d</i> (3,79)	7,12 <i>d</i> (4,04)
α	6,65 <i>d</i> (15,41)	7,38 <i>d</i> (15,41)	6,76 <i>d</i> (15,87)
β	7,28 <i>d</i> (15,41)	7,88 <i>d</i> (15,36)	7,47 <i>d</i> (15,67)
2'	-	8,51 <i>s</i>	-
3'	8,17 <i>dd</i> (7,83 / 1,27)	-	7,44 <i>d</i> (1,51)
4'	7,70 <i>m</i>	7,89 - 8,11 <i>m</i>	7,39 <i>d</i> (1,51)
5'	7,49 <i>dd</i> (7,33 / 1,53)	7,57-7,67 <i>m</i>	-
6'	7,70 <i>m</i>	7,57-7,67 <i>m</i>	7,39 <i>s</i>
7'	-	7,89 - 8,11 <i>m</i>	-
9'	-	7,89 - 8,11 <i>m</i>	-
10'	-	7,89 - 8,11 <i>m</i>	-

δ ppm em relação ao TMS, *Multiplicidade* (J em Hz). Solvente CDCl₃.

Observando-se as tabelas de caracterização (tabela 10 a 14) é possível verificar que, de modo geral, os espectros apresentam semelhança em relação aos deslocamentos químicos, com pequenas variações apenas em função dos substituintes e de suas posições.

Optou-se, portanto, por discutir detalhadamente a caracterização química de apenas um composto, HB4, produto da condensação do 5-cloro-2-tiofenocarboxialdeído com a 4-metil-acetofenona. O espectro de RMN de ^1H da chalcona HB4 pode ser observado na Figura 18, bem como os valores de atribuição dos hidrogênios.

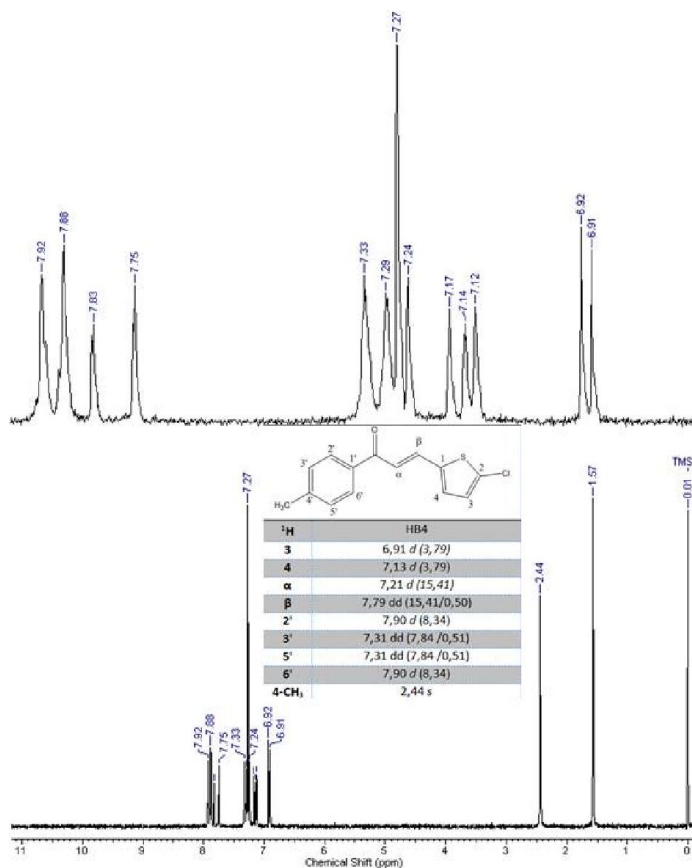


Figura 18. Espectro de RMN ^1H (200 MHz) do composto análogo a chalcona HB4. Deslocamento químico em relação ao TMS, solvente utilizado: CDCl_3 , () = J (constante de acoplamento, em Hertz).

Conforme esperado, o espectro de RMN de ^1H do composto HB4 (Figura 18) apresenta um singlete proveniente dos átomos de hidrogênio da metila ligada ao carbono 4' da cetofenona em 2,44 ppm; este deslocamento está próximo ao esperado (2,34 em previsão realizada para esta molécula através do programa ChemBio Draw Ultra 12.0). Os hidrogênios 2' e 6' do anel A são observados como um duplete em 7,90 ppm com constante de acoplamento de 8,34 Hz, e os hidrogênios 3' e 5' são observados como um duplo duplete em 7,31 ppm com constantes de acoplamento de 7,84 e 0,513 Hz. Assim podemos elucidar o anel A deste composto análogo a chalcona, uma vez que os átomos de carbono representados por 1' e 4' estão substituídos nesta molécula e, portanto, não apresentam átomos de hidrogênio ligados a eles, não gerando sinais no espectro de ressonância magnética de ^1H .

Os hidrogênios α e β da dupla ligação aparecem como dubleto e duplo duplete, respectivamente, em 7,215 ppm e 7,79 ppm, com constante de acoplamento de 15,41 Hz, caracterizando a configuração *E* da dupla ligação. Os hidrogênios do anel tiofênico (posições designadas por 3 e 4) apareceram como dubletos com sinais, respectivamente, em 6,915 e 7,13 ppm, com constante de acoplamento de 3,79 Hz.

Observando os valores de ponto de fusão obtidos experimentalmente para os compostos da série HB, todos apresentaram faixa de variação menor do que 2°C, o que pode servir como indicativo da pureza dos compostos (Tabela 7).

O rendimento das reações foi variado, de aproximadamente 7 até quase 90%, como mostra a Tabela 7.

5.1.3 Série H_B Sintetizada Via Microondas (HB_{MW})

A escolha em sintetizar esta série de chalconas via microondas foi visando a necessidade da utilização de uma química mais verde. Foram realizadas 14 tentativas de reações para obtenção das chalconas propostas desta série, sendo obtidas 12 chalconas (HB1_{MW}, HB2_{MW}, HB3_{MW}, HB4_{MW}, HB5_{MW}, HB7_{MW}, HB9_{MW}, HB11_{MW}, HB12_{MW}, HB13_{MW}, HB14_{MW} e HB15_{MW})

Os resultados experimentais da obtenção das chalconas da série HB_{MW} por microondas foram comparados aos resultados da obtenção dos compostos da série HB pela metodologia convencional anteriormente descrita. A tabela 15 mostra os tempos reacionais e os rendimentos de ambas as metodologias.

Tabela 15. Tempo reacional e rendimentos da obtenção de alguns compostos análogos a chalconas da série HB pela metodologia convencional e da série HBMW por microondas.

Chalcona	Tempo reacional	Rendimento (%)	Chalcona	Tempo reacional	Rendimento (%)	
HB1	25 horas	71,16	HB1_{MW}	10min e 30 s.	80,41	
HB2	2 horas e 30 minutos	77,39	HB2_{MW}		77,84	
HB3	55 minutos	31,38	HB3_{MW}		13,76	
HB4	22 horas	55,91	HB4_{MW}		56,07	
HB5	30 minutos	67,36	HB5_{MW}		24,92	
HB6	1 hora e 15 minutos	86,86	HB6_{MW}		Composto não obtido	
HB7	4 horas e 35 minutos	77,07	HB7_{MW}		82,98	
HB8	1 hora e 20 minutos	75,54	HB8_{MW}		Composto não obtido	
HB9	321 horas e 5 minutos	88,13	HB9_{MW}		19 minutos	84,54
HB11	7 horas	48,57	HB11_{MW}		52,63	
HB12	1 hora e 50 minutos	70,16	HB12_{MW}		6,14	
HB13	17 horas e 30 minutos	89,99	HB13_{MW}		10min e 30 s.	73,43
HB14	2 horas e 30 minutos	38,30	HB14_{MW}		69,64	
HB15	3 horas e 15 minutos	73,18	HB15_{MW}		80,41	

Todos os compostos da série HB_{MW} obtidos foram submetidos à análise do ponto de fusão, os quais foram muito semelhantes aos compostos correspondentes da série HB, confirmando as estruturas previstas. Alguns dos compostos da série HB_{MW} também foram confirmados por espectros de RMN de ¹H, porém, optou-se por não apresentá-los nesta dissertação, para não tornar os dados repetitivos.

Analisando-se os dados da Tabela 15 percebe-se que em cinco casos o maior rendimento foi obtido na síntese realizada em bancada (HB3, HB5, HB9, HB12 e HB13), em outros cinco, o resultado foi o oposto, obtendo-se maior rendimento nas sínteses realizadas no microondas (HB1_{MW}, HB7_{MW}, HB11_{MW}, HB14_{MW} e HB15_{MW}). Nos dois

casos restantes (HB2/ HB2_{MW} e HB4/ HB4_{MW}), os rendimentos foram equivalentes.

Seguindo-se a linha de pensamento que tem se difundido cada vez mais a fim de tornar a química aliada ao meio ambiente (Química Verde), a síntese realizada no microondas utiliza um solvente menos tóxico (etanol ao invés do metanol) do que o método empregado no procedimento geral, conforme descrito por Vogel (1989). As sínteses realizadas em microndas envolvem um menor tempo de reação e, em boa parte dos casos, uma menor quantidade de catalisador. Assim, pode-se dizer que, apesar de os rendimentos não terem sido melhores em microndas, este método sintético foi, neste caso, mais eficiente que o método clássico.

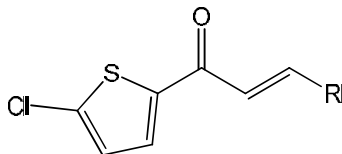
5.2 Atividade Biológica

5.2.1 Chalconas como Inibidores da YopH de *Yersinia sp.*

Inicialmente, foi realizado um *screening* em triplicada, com uma única concentração de todos os compostos das séries H e HB (25 µM) para determinar a atividade residual da proteína YopH. Os compostos análogos a chalconas foram incubadas com as proteínas e solução tampão por 10 minutos a 37°C. Após este período, adicionou-se o substrato (*p*-NPP) e realizaram-se leituras de absorbância a cada 1 minuto, durante 10 minutos, a 37°C.

Os resultados obtidos para as duas séries de compostos sintetizados podem ser observados nas Tabelas 16 e 17, na qual estão apresentados os valores da atividade residual (%) da proteína tirosina fosfatase YopH, bem como o erro associado aos experimentos.

Tabela 16. Resultados da atividade dos compostos análogos a chalconas da série H como inibidores da proteína YopH de *Yersinia sp*



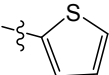
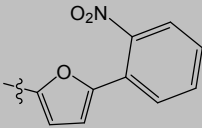
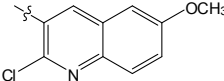
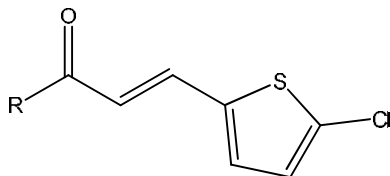
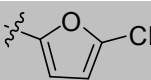
Chalcona	Substituínte (R=)	% atividade residual YopH(% ± erro)
H1	fenil	93,75 ± 3,22
H2	4-Cl-fenil	55,23 ± 1,40
H3	4-OCH ₃ -fenil	>100
H4	4-CH ₃ -fenil	>100
H6	3-NO ₂ -fenil	12,72 ± 2,32
H7	4-F-fenil	77,48 ± 3,05
H11	2,4,5-triOCH ₃ -fenil	129,77 ± 0,89
H12	2,4,6-triOCH ₃ -fenil	77,34 ± 3,68
H14	3,4-OCH ₂ O-fenil	65,52 ± 6,14
H15	1-naftil	70,32 ± 1,35
H16	4-OBu-fenil	>100
H17	3-OCH ₃ -4-OH-fenil	>100
H19		68,64 ± 5,60
H21		>100
H22		14,54 ± 3,45
H24	2,5-diOCH ₃ -fenil	>100
H25	3,4-diOCH ₃ -fenil	>100
H26		54,92 ± 2,54
H28	4-COOH	>100
H29	2,3,4-OCH ₃	86,69 ± 4,97
H30	2,6-OCH ₃	>100

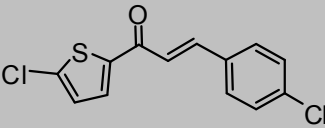
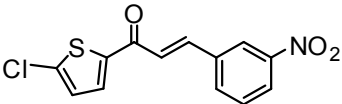
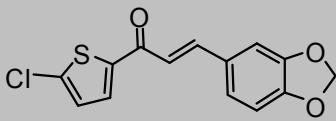
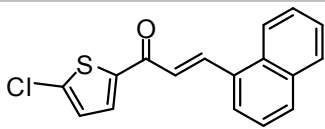
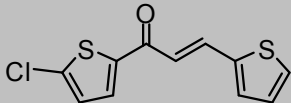
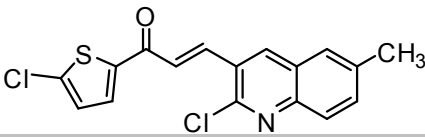
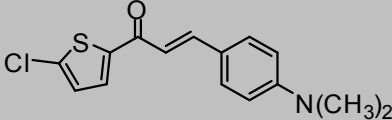
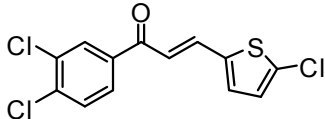
Tabela 17. Resultados da atividade dos compostos análogos a chalconas da série HB como inibidores da proteína YopH de *Yersinia sp.*

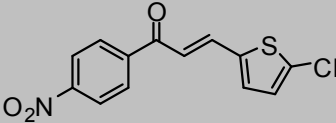
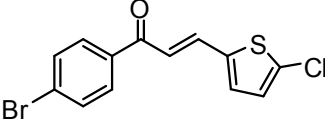
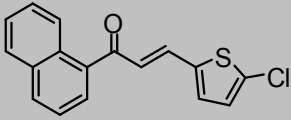
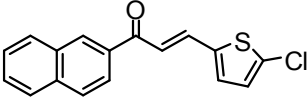


Chalcona	Anel A	% atividade residual YopH(% ± erro)
HB1	fenil	84,71 ± 2,35
HB2		92,22 ± 8,52
HB3	4-OCH ₃ -fenil	86,93 ± 9,85
HB4	4-CH ₃ -fenil	80,12 ± 5,22
HB5	3,4-Cl ₂ -fenil	65,49 ± 1,86
HB6	3-NO ₂ -fenil	80,11 ± 6,59
HB7	4-F-fenil	72,45 ± 2,01
HB8	4-NO ₂ -fenil	5,44 ± 1,02
HB9	4-Br-fenil	50,93 ± 7,82
HB11	2,4,5-OCH ₃ -fenil	86,82 ± 7,18
HB12	2,4,6-OCH ₃ -fenil	82,42 ± 1,58
HB13	3,4,5-OCH ₃ -fenil	71,80 ± 5,08
HB14	3,4-OCH ₂ O-fenil	73,80 ± 0,90
HB15	1-naftil	70,10 ± 1,98
HB17	3-OCH ₃ -4-OH-fenil	78,37 ± 4,84
HB24	2,5-OCH ₃ -fenil	81,23 ± 6,36
HB25	3,4-OCH ₃ -fenil	101,30 ± 0,88
HB32	3- OCH ₃ -fenil	77,19 ± 6,38
HB36	2-NO ₂ -fenil	71,06 ± 0,57
HB37	2-naftil	66,20 ± 7,34
HB40	2,5-Cl ₂ -fenil	76,95 ± 5,90

Os compostos que apresentaram atividade inibitória da YopH superior a 30% (grifados em negrito nas tabelas 16 e 17), foram escolhidos para determinação de sua IC₅₀ (Tabela 18).

Tabela 18. Valores de IC₅₀ para os compostos que apresentaram inibição da YopH superior a 30% no ensaio inicial.

Chalcona	Estrutura	IC ₅₀ (μM) YopH
H2		34,10 ± 2,20
H6		46,97 ± 7,50
H14		>100
H15		>100
H19		64,14 ± 2,48
H22		14,95 ± 1,27
H26		>100
HB5		25,85 ± 7,23

HB8		11,61 ± 0,91
HB9		33,93 ± 6,47
HB15		46,57 ± 4,53
HB37		31,12 ± 1,70

A análise dos resultados permite observar que os melhores inibidores da YopH foram os compostos H22 e HB8. O composto H22 apresenta como grupo substituinte um anel quinoxalina substituído por um átomo de cloro na posição 2 e um grupo metóxi na posição 6, ou seja, um grupo volumoso, com um substituinte eletronegativo (retirador de elétrons por efeito indutivo) e outro grupo doador de elétrons, além de ser um substituinte bastante volumoso. O composto HB8 por sua vez apresenta o anel B substituído por um grupo nitro na posição 4 do anel, portanto é um composto com um grupo retirador de elétrons no anel B. Devido às diferenças estruturais entre estas duas chalconas, fica evidente que não é apenas um fator que determina a atividade dos compostos e sim, possivelmente, um conjunto complexo de interações eletrônicas e estéricas, sendo necessários estudos mais elaborados para um melhor entendimento das relações entre estrutura química e atividade biológica.

Os dois melhores compostos (H22 e HB8) foram escolhidos para a realização de estudos cinéticos, nos quais foi possível determinar o mecanismo de inibição da YopH conferido por estes dois compostos análogos a chalconas, sendo este não-competitivo, como pode ser observado na Figura 19.

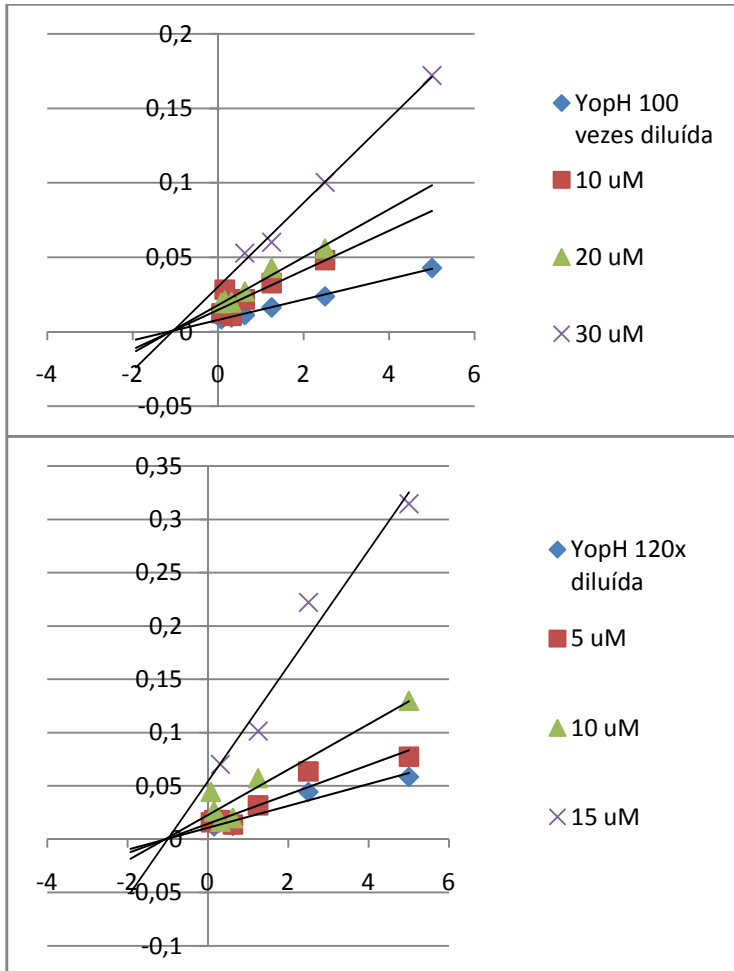


Figura 19 - Gráficos obtidos dos estudos cinéticos com os compostos H22 (superior) e HB8 (inferior) frente à proteína YopH. YopH 120x diluída é a concentração 0 (zero) de inibidor.

Os valores de K_i (constante de afinidade) determinados para estes compostos através dos gráficos foram, respectivamente, $9,41 \mu\text{M}$ para H22 e $2,03 \mu\text{M}$ para HB8, indicando uma alta afinidade destes composto pela YopH, e assim, eles podem ser considerados ótimos inibidores desta proteína.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho foram obtidos 53 compostos dos 56 inicialmente propostos, divididos em duas séries (série H e HB).

Todos os compostos das duas séries foram identificadas e caracterizadas através do ponto de fusão e do RMN de ^1H .

Obteve-se rendimentos variados de aproximadamente 8 a 93% para a série H (compostos derivados do 2-acetil-5-cloro-tiofeno) e de 6 a quase 90% para os compostos da série HB (compostos derivados do 2-acetil-5-cloro-tiofeno).

A avaliação biológica dos compostos apontou dois compostos análogos a chalconas, uma pertencente a cada série, com promissora atividade inibitória da proteína YopH de *Yersinia sp.* para os quais foram determinados os valores de IC_{50} : H22 ($\text{IC}_{50} = 14,95 \mu\text{M}$ e $\text{Ki} = 9,41 \mu\text{M}$) e HB8 ($\text{IC}_{50} = 11,6 \mu\text{M}$ e $\text{Ki} = 2,03 \mu\text{M}$).

7 PERSPECTIVAS

Como perspectivas futuras deste trabalho, podemos relacionar:

- Completar a caracterização dos compostos com os dados de RMN ^{13}C e espectrometria de massas.
- Realizar a avaliação de testes de seletividade dos compostos ativos em PTPs humanas.
- Planejar e sintetizar novos compostos derivados de H22 e HB8, na busca pela otimização estrutural.
- Utilizar novas metodologias para a síntese dos compostos que não foram obtidos pela condensação aldólica usual, e também para obter melhores resultados para os compostos obtidos com baixos rendimentos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A. M. P. de; SOUZA, G. T. de; SANTOS, S.; SILVA, S. C.; PETRIBÚ, M. M. V.; HAVER, P. O.; ARAGÃO, A. I.; TAVARES, C. **Contribuição para o diagnóstico de peste.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 40 (1), Uberaba. Jan./Feb. 2007.

A.I. Vovk, L.A. Kononets, V.Y. Tanchuk, S.O. Cherenok, A.B. Drapailo, V.I. Kalchenko, V.P. Kukhar, **Inhibition of Yersinia protein tyrosine phosphatase by phosphonate derivatives of calixarenes,** *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20 (2010).

AL-MASUM M ; NG. E.; WAI M. C. **Palladium-catalyzed direct cross-coupling of potassium styryltrifluoroborates and benzoyl chlorides: a one step method for chalcone synthesis.** *Tetrahedron Letters*, 52, 1008-1010, 2011.

ANSARI F. L.; NAZIR S.; NOUREEN H.; MIRZA B. **Combinatorial Synthesis and Antibacterial Evaluation of an Indexed Chalcone Library** *Chemistry & Biodiversity*, 2, 1652 , 2005

AOYAMA, H.; SILVA, T. M. A.; MIRANDA, M. A.; FERREIRA, C. V. **Proteínas tirosina fosfatases: Propriedades e funções biológicas.** *Química Nova*, 26 (6), 896-900, 2003.

ÁVILA, H.P.; SMÂNIA, E. F.; MONACHE, F.D.; JÚNIOR, A.S.; **Structure-activity relationship of antibacterial chalcones.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16, 9790-9794, 2008.

BAKAL, C. J.; DAVIES, J. E. **No longer an exclusive club: eukaryotic signalling domains in bacteria.** *Trends in Cell Biology*, 10, 32-38, 2000.

BATOVSKA, D.; PARUSHEV, S.; STAMBOLIYSKA, B.; TSVETKOVA, I.; NINOVA, M.; NAJDENSKI, H. **Examination of growth inhibitory properties of synthetic chalcones for which antibacterial activity was predicted.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44, 2211-2218, 2009.

BERGMANN, B. R.; TORRES-SANTOS, E. C.; YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V.; BOECK, P. **Preparation of chalcones for the treatment of parasitic diseases.** *Brazil PI 0204079-4*, 2004.

BLACK, D. S.; BLISKA, J. B. **Identification of p130^{Cas} as a substrate of Yersinia YopH (Yop51), a bacterial protein tyrosine phosphatase that translocates into mammalian cells and targets focal adhesions.** *EMBO Journal*, 16(10), 2730-2744, 1997.

BOECK, P.; LEAL, P. C.; YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V.; LÓPEZ, S.; SORTINO, M.; ESCALANTE, A.; FURLÁN, R. L. E.; ZACCHINO, S. **Antifungal Activity and Studies on Mode of Action of Novel Xanthoxylone-Derived Chalcones.** *Archiv der Pharmazie Chem. Life Sci.*, v. 338, p. 87-95, 2005.

BOECK, P.; FALCÃO, C. A. B.; LEAL, P. C.; YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V.; TORRESSANTOS, E. C.; BERGMANN, B. R. **Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity.** *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 14(5), 1538-1545, 2006.

BORCHHARDT, D. M.; CHIARADIA, L. D.; NUNES, R. J.; OLIVA, G.; YUNES, R. A.; ANDRICOPULO, A. D. **Biochemical Evaluation of a Series of Synthetic Chalcone and Hydrazone Derivatives as Novel Inhibitors of Cruzain from Trypanosomacruzi.** *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21, 142-150, 2010.

BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding.** *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BUU-HOI, NG.PH.; XUONG, Ng. Dat.; SY, M. **Chalcone derivatives of thiophene and their thiosemicarbazones.** *Bulletin de la Societe Chimique de France*, 1646-50, 1956.

BVMS 2006. *Síntese Epidemiológica da Peste no Brasil, em 2005*. Disponível em: <http://bvsm.sau.de.gov.br/bvs/publicacoes/peste.pdf>. Acesso em: 26 agosto 2014.

CALIXTO, J.B.; JÚNIOR, J.M.S. **Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: desafios.** *Gazeta Médica da Bahia*, 78 (Suplemento 1), 98-106, 2008.

CALVINO, V.; PICALLO, M.; LÓPEZ-PEINADO, A. J.; MARTÍN-ARANDA, R. M.; DURÁN-VALLE, C. J. **Ultrasound accelerated Claisen-Schmidt condensation: a green route to chalcones.** *Applied Surface Science*, 252, 6071-6074, 2006.

CHAST, F. **A History of Drug Discovery.** In: Wermuth, C. G. (org.). *The Practice of Medicinal Chemistry*. 3 ed. Illkirch, France: Elsevier, 2008. Cap. 1. p.3 -62.

CHIARADIA, L. D.; MARTINS, P. G. A.; CORDEIRO, M. N. S.; GUIDO, R. V. C.; ECCO, G.; ANDRICOPULO, A. D.; YUNES, R. A.; VERNAL, J.; NUNES, R. J.; TERENCEZI, H. **Synthesis, Biological Evaluation, And Molecular Modeling of Chalcone Derivatives As Potent Inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* Protein Tyrosine Phosphatases (PtpA and PtpB).** *Journal of Medicinal Chemistry*, 55, 390-402, 2012.

CHIARADIA, L. D.; MASCARELLO, A.; PURIFICACAO, M.; VERNAL, J.; CORDEIRO, M. N. S.; ZENTENO, M. E.; VILLARINO, A.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A.; TERENCEZI, H. **Synthetic chalcones as efficient inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase PtpA.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (Print), v. 18, p. 6227-6230, 2008.

CHIARADIA, L. D.; SANTOS, R. dos; VITOR, C. E.; VIEIRA, A. A.; LEAL, P. C.; NUNES, R. J.; CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. **Synthesis and pharmacological activity of chalcones derived from 2,4,6-trimethoxyacetophenone in RAW 264.7 cells stimulated by LPS: Quantitative structure-activity relationships.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16, 658-667, 2008.

CHIARADIA, L. D. **Síntese, Caracterização e REA de Chalconas e de Compostos Heterocíclicos Biologicamente Ativos em Doenças Negligenciadas, Hiperglicemia e Leucemia.** 2010. 536 f. Tese

(Doutorado em Química)–Programa de Pós-Graduação em Química, UFSC. Florianópolis, 2010.

CHEN, M.; ZHAI, L.; CHRISTENSEN, S. B.; THEANDER, T. G.; KHARAZMI, A. **Inhibition of fumarate reductase in *Leishmania major* and *L. donovani* by chalcones.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(7), 2023-2029, 2001.

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

CLIMENT, M.; CORMA, A.; IBORRA, S.; VELTY, A. **Activated hydrotalcites as catalysts for the synthesis of chalcones of pharmaceutical interest.** *Journal of Catalysis*, 221(2), 474-482, 2004.

COZZONE, A. J.; GRANGEASSE, C.; DOUBLET, P.; DUCLOS, B. **Protein phosphorylation on tyrosine in bacteria.** *Arch Microbiol*, 181, 171-181, 2004.

CVE SAÚDE 2003. *Manual das Doenças Transmitidas por Alimentos e Água*. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/yersi_entero.htm. Acesso em: 25 agosto 2014.

DAMAZIO, R. G.; ZANATTA, A. P.; CAZAROLLI, L. H.; CHIARADIA, L. D.; MASCARELLO, A.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A.; BARRETO SILVA, F. R. M. **Antihyperglycemic activity of naphthylchalcones.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45, 1332-1337, 2010.

DE LA PUERTA, M. L. et al. **Characterization of new substrates targeted by *Yersinia* tyrosine phosphatase YopH.** *PLoS ONE*, v. 4, n. 2, 2009.

DIMMOCK J R; ELIAS D W; BEAZELY M A; KANDEPU N M. **Bioactivities of chalcones.** *Current Medicinal Mhemistry*, 6(12), 1125-49, 1999.

DOMÍNGUEZ, J. N.; CHARRIS, J. E.; LOBO, G.; DOMÍNGUEZ, N. G. de; MORENO, M. M.; RIGGIONE, F.; SANCHEZ, E.; OLSON, J., ROSENTHAL, P. J. **Synthesis of quinolinyl chalcones and evaluation of their antimalarial activity.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, 36(6), 555-560, 2001.

DOMÍNGUEZ, J. N.; LEÓN, C.; RODRIGUES, J.; DOMÍNGUEZ, N. G. de; GUT, J.; ROSENTHAL, P. J. **Synthesis and antimalarial activity of sulfonamide chalcone derivatives.** *Il Farmaco*, 60, 307-311, 2005.

DUCKI, S.; FORREST, R.; HADFIELD, J. A.; KENDALL, A.; LAWRENCE, N. J.; McGROWN, A. T.; RENNISON, D. **Potent antimitotic and cell growth inhibitory properties of substituted chalcones.** *Bioorganic & Medicinal Chemical Letters*, 8, 1051-1056, 1998.

EDDARIR, S.; COTELLE, N.; BAKKOUR, Y.; ROLANDO, C. **An efficient synthesis of chalcones based on the Suzuki reaction.** *Tetrahedron Letters*, 44, 5359-5363, 2003.

F. Liu, R.M. Hakami, B. Dyas, M. Bahta, G.T. Lountos, D.S. Waugh, R.G. Ulrich, T.F. Burke Jr., **A rapid oxime linker-based library approach to identification of bivalent inhibitors of the Yersinia pestis protein-tyrosine phosphatase, YopH,** *Bioorg. Med. Chem.* 20 (2010).

Disponível em:

<http://www.medicinanet.com.br/conteudos/biblioteca/1815/peste.htm>.
Acesso em 15/11/2010

Disponível em:

<http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=6&infolid=303>.
Acesso em 15/10/2010.

GACCHE, R. N.; DHOLE, N. A.; KAMBLE, S. G.; BANDGAR, B. P. **In vitro evaluation of selected chalcones for antioxidant activity.**

Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 23(1), 28-31, 2008.

GO, M. L.; WU, X.; LIU, X. L. **Chalcones: an update on cytotoxic and chemoprotective properties.** *Current Medicinal Chemistry*, 12, 483-499, 2005.

HERENCIA, F.; FERRÁNDIZ, M.L.; UBEDA, A.; DOMÍNGUEZ, J.N.; CHARRIS, J.E.; LOBO, G.M.; ALCARAZ, M.J.; **Synthesis and anti-inflammatory activity of chalcone derivatives.** *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, 8(10), 1169-74, 1998.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A. F. ***In vitro* leishmanicidal activity of naturally occurring chalcones.** *Phytother Research*, 15(2): 148-52, 2001.

K. Lee, Y. Gao, Z.J. Yao, J. Phan, L. Wu, J. Liang, D.S. Waugh, Z.Y. Zhang, T.R. Burke Jr., **Tripeptide inhibitors of Yersinia protein-tyrosine phosphatase**, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13 (2003)

K. Lee, S.K. Boovanahalli, K.Y. Nam, S.U. Kang, M. Lee, J. Phan, L. Wu, D.S. Waugh, Z.Y. Zhang, K.T. No, J.J. Lee, T.R. Burke Jr., **Synthesis of tripeptides as potent Yersinia protein tyrosine phosphatase inhibitors**, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15 (2005).

KOUL, A.; CHOIDAS A.; TREDER, M.; TYAGI, A. K.; DRLICA, K.; SINGH, Y.; ULLRICH A. **Cloning and characterization of secretory tyrosine phosphatases of *Mycobacterium tuberculosis*.** *Journal of Bacteriology*, 182, 5425–5432, 2000.

LAWRENCE, N. J.; PATTERSON, R. P.; OOI, L. L.; COOK, D.; DUCKI, S. **Effects of \square -substitutions on structure and biological activity of anticancer chalcones.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16, 5844-5848, 2006.

LEBEAU, J.; FURMAN, C.; BERNIER, J.; DURIEZ, P.; TEISSIER, E.; COTELLE, N. **Antioxidant properties of di-tert-butylhydroxylated flavonoids.** *Free Radical Biology Medicine*, 29(9): 900-12, 2000.

LOPEZ, S. N.; CASTELLI, M. V.; ZACCHINO, S. A.; DOMINGUEZ, J. N.; LOBO, G.; CHARRIS-CHARRIS, J.; CORTES, J. C. G.; RIBAS, J. C.; DEVIA, C.; RODRIGUEZ, A. M.; ENRIZ, R. D. ***In vitro* antifungal evaluation and structure-activity relationships of a new series of chalcone derivatives and synthetic analogues, with inhibitory properties against polymers of the fungal cell wall.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 9, 1999-2013, 2001.

LOPEZ, S. N.; SORTINO, M.; ESCALANTE, A.; DE CAMPOS, F.; CORREA, R.; CECHINELFILHO, V.; NUNES, R. J.; ZACCHINO, S. A. **Antifungal properties of novel *N*- and *alfa,beta*-substituted succinimides against dermatophytes.** *Arzneimittel-Forschung*, 53 (4), 280-288, 2003.

LI, R.; KENYON, G. L.; COHEN, F. E.; CHEN, X.; GONG, B.; DOMINGUEZ, J.; DAVIDSON, E.; KURZBAN, G.; MILLER, R. E.; NUZUM, E. O.; ROSENTHAL, P.; McKERROW, J. H. ***In vitro* antimalarial activity of chalcones and their derivatives.** *Journal of Medicinal Chemistry*, 38, 5031-5037, 1995.

LIU, M.; WILAIRAT, P.; GO, M. L. **Antimalarial alkoxyated and hydroxylated chalcones: structure-activity relationship analysis.** *Journal of Medicinal Chemistry*, 44, 4443-4452, 2001.

LIU, M.; WILAIRAT, P.; CROFT, S. L.; TAN, A. L. C.; GO, M. L. **Structure-Activity Relationships of Antileishmanial and Antimalarial Chalcones.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 11, 2729-2738, 2003.

M. Bahta, G.T. Lountos, B. Dyas, S.E. Kim, R.G. Ulrich, D.S. Waugh, T.R. Burke Jr., **Utilization of nitrophenylphosphates and oxime-based ligation for the development of nanomolar affinity inhibitors of the *Yersinia pestis* outer protein H (YopH) phosphatase,** *J. Med. Chem.* 54 (2011).

MARTINS, P.G.A.; MENEGATTI, A. C. O.; CHIARADIA, L.D.; NOVAKOSKI, K. O.; GUIDO, R.V.C.; ANDRICOPULO, A.D.; VERNAL, J.; YUNES, R.A.; NUNES, R.J.; TERENZI, H. **Synthetic chalcones and sulfonamides as new classes of *Yersinia enterocolitica***

YopH tyrosine phosphatase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* 64 (2013) 35e41, 2013.

MARTINS, P.G.A. **Caracterização de uma Arsenato Redutase de *Trypanossoma cruzi* e Inibição de uma Fosfatotirosina Fosfatase de *Yersinia enterocolitica* por Chalconas Sintéticas.** 2011. 99f.
Dissertação (Mestrado em Bioquímica)- Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, UFSC. Florianópolis, 2011.

MASCARELLO, A.; CHIARADIA, L. D. ; VERNAL, J.; VILLARINO, A.; GUIDO, R.V.C. ; PERIZZOLO, P. ; POIRIER, V.; WONG, D.; MARTINS, P. G. A.; NUNES, R. J. ; YUNES, R. A.; ANDRICOPULO, A. D.; AV-GAY, Y.; TERENZI, H. **Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* tyrosine phosphatase PtpA by synthetic chalcones: kinetics, molecular modeling, toxicity and effect on growth.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*,18,3783-3789, 2010.

MEDICINANET 2011. *Doenças Infeciosas e Parasitárias – Guia de Bolso - 8ª edição revista.* Disponível em:
<<http://www.medicinanet.com.br/conteudos/biblioteca/1815/peste.htm>>.
Acesso em: 26 agosto 2014.

MONDOL, M.A.M. **Antiangiogenic study of two nonsteroidal antiinflammatory compounds using chick chorioallantoic membrane assay.** *Journal Medicinal Science*, 6, 609-614, 2006.

MUNDO EDUCAÇÃO . *Impetigo, leptospirose, meningite e peste bubônica.* Disponível em:<
<http://www.mundoeducacao.com/biologia/doencas-bacterianas-2.htm>>.
Acesso em:28 agosto 2014.

NAM, N. H., KIM, Y. *et al.* **Cytotoxic 2',5'-dihydroxychalcones with unexpected antiangiogenic activity.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, 38(2), 179-87, 2003.

NARENDER, T. & REDDY K. P., **A simple and highly efficient method for the synthesis of chalcones by using borontrifluoride-etherate,** *Tetrahedron Letters*, 48, 18, 3177-3180, 2007.

NEWMAN, D. J.; GRAGG, G. M.; KINGSTON, D. G. I. **Natural products as pharmaceuticals and sources for lead structures.** In: WERMUTH, C. G. (org.). *The Practice of Medicinal Chemistry*. 3 ed. Illkirch, France: Elsevier, 2008. Cap. 8, p. 159-186.

NI, L.; MENG, C.Q.; SIKORSKI, J.A. **Recent advances in therapeutic chalcones.** *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 14 (12), 1669-1691, 2004.

NIELSEN, S. F.; CHRISTENSEN, S. B.; CRUCIANI, G.; KHARAZMI, A.; LILJEFORS, T. **Antileishmanial chalcones: statistical design, synthesis and three-dimensional Quantitative Structure-Activity relationship analysis.** *Journal of Medicinal Chemistry*, 41, p. 4819-4832, 1998.

NIELSEN, S. F.; BOESEN, T.; LARSEN, M.; SCHONNING, K.; KROMANN, H. **Antibacterial chalcones – biososteric replacement of the 4'-hydroxy group.** *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 12, p. 3047-3054, 2004.

NINOMIYA, Y.; SHIMMA, N.; ISHITSUKA, H. **Comparative studies on the antirhinovirus activity and the mode of action of the rhinovirus capsid binding agents, chalcone amides.** *Antiviral Research*, 13(2), 61-74, 1990.

NOGUEIRA, L. J.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. **Histórico da evolução da química medicinal e a importância da lipofilia: de Hipócrates e Galeno a Paracelsus e as contribuições de Overton e de Hansch.** *Revista Virtual de Química*, 1(3), 227-240, 2009.

NOWAKOWSKA, Z. **A reiew of anti-inflammatory chalcones.** *European Journal of Chemistry*, 42, 125-137, 2007.

OPLETALOVA, V. & SEDIVY, D. **Chalcones and their heterocyclic analogs as potential antifungal chemotherapeutic agents.** *Ceska Slov Farm*, 48(6), 252-5, 1999.

PEDRINI, F. S.; CHIARADIA, L. D.; LICINIO, M. A.; MORAES, A. C. R.; CURTA, J. C.; COSTA, A.; MASCARELLO, A.;

CRECZYNSKI-PASA, T. B.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A.; SILVA, M. C. S. da . **Induction of apoptosis and cell cycle arrest in L-1210 murine lymphoblastic leukemia cells by (2E)-3-(2-naphthyl)-1-(3-methoxy-4-hydroxy-phenyl)-2-propen-1-one.** *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 62, 1128-1136, 2010.

PETROV, O.; IVANOVA, Y.; GEROVA, M. **SOCl₂/EtOH: Catalytic system for synthesis of chalcones.** *Catalysis Communications.*, 9(2), 315-316, 2008.

PETSKO, G. A. **For medicinal purposes.** *Nature*, 384, 6604,suppl.7-9,1996.

POLINSKY, A. **Lead-likeness and drug-likeness.** In: WERMUTH, C. G. (org.). *The Practice of Medicinal Chemistry*. 3 ed. Illkirch, France: Elsevier, 2008. Cap. 12, p. 244-254.

QMCVERDE, disponível em:

<http://www.brasilecola.com/quimica/principios-quimica-verde.htm>
acesso em 14 de junho de 2014.

RAM, V. J., SAXENA, A. S. *et al.* **Oxygenated chalcones and bischalcones as potential antimalarial agents.** *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, 10(19): 2159-61, 2000.

ROMAGNOLI, R.; BARALDI, P.G.; CARRION, M.D.; CARA, C.L.; CRUSLOPEZ, O.; PRETI, D.; TOLOMEO, M.; GRIMAUDDO, S.; Di CRISTINA, A.; ZONTA, N.; BALZARINI, J.; BRANCALE, A.; SARKAR, T.; HAMEL, E. **Desing, synthesis, and biological evaluation of thiophene analogues of chalcones.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16, 5367-5376, 2008.

ROMANELLI, G.; PASQUALE, G.; SATHICQ, Á.; THOMAS, H.; AUTINO, J.; VÁZQUEZ, P. **Synthesis of chalcones catalyzed by aminopropylated silica sol-gel under solvent-free conditions.** *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 340(1-2), 24-32, 2011.

RIZVI, S.U.F.; SIDDIQUI, H.L.; PARVEZ, M.; AHAMAD, M.; SIDDIQUI, W. A.; YASINZAI, M.M. **Antimicrobial and**

Antileishmanial Studies of Novel (2E)-3-(2-Chloro-6-methyl/methoxyquinolin-3-yl)-1-(Aryl)prop-2-en-1-ones. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 58(3), 301—306, 2010.

RYABUKHIN, S. V.; PLASKON, A. S.; DMITRIY, M.; PIPKO, S. E.; SHIVANYUK, A. N. **Combinatorial Knoevenagel Reactions.** *Journal of Combinatorial Chemistry*, 9(6), 1073-1078, 2007.

SALUM, L. B.; ALTEI, W. F.; CHIARADIA, L. D.; CORDEIRO, M. N. S.; CANEVAROLO, R. R.; MELO, C. P. S.; WINTER, E.; MATTEI, B.; DAGHESTANI, H. N.; SANTOS-SILVA, MARIA CLÁUDIA; CRECZYNSKI-PASA, Tânia Beatriz; YUNES, R. A.; YUNES, J. A.; ANDRICOPULO, A. D.; DAY, B. W.; NUNES, R. J.; VOGT, A. **Cytotoxic 3,4,5-trimethoxychalcones as mitotic arresters and cell migration inhibitors.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, 501-510, 2013.

SEBTI, S.; SOLHY, A.; TAHIR, R.; BOULAAJAJ, S.; MAYORAL, J. A.; FRAILE, J. M.; KOSSIR, A.; OUMIMOUN, H. **Calcinated sodium nitrate/natural phosphate: an extremely active catalyst for the easy synthesis of chalcones in heterogeneous media.** *Tetrahedron Letters*, 42, 7953-7955, 2001.

SRIVASTAVA, Y. K. **Ecofriendly Microwave Assisted Synthesis of Some Chalcones.** *Journal of Chemical Research.*, 1(4), 884-886, 2008.

TOPLISS, J. G. **Utilization of operational schemes for analog synthesis in drug design.** *Journal of Medicinal Chemistry*, 15, 1006, 1972.

TRABULSI, L. R.; MARTINEZ, M. B. **Microbiologia.** ed. 4, São Paulo: Editora Atheneu. p. 329-335. 2005.

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

Voltolini, B.G., **Obtenção de Chalconas Heterocíclicas via Condensação de Claisen-Schmidt e Avaliação do seu potencial como inibidores da enzima YopH.** 68f. Relatório apresentado ao

Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial da disciplina de Estágio Supervisionado II (QMC 5512))- Programa de Graduação em Química, UFSC. Florianópolis, 2010.

Y.T. Chen, C.T. Seto, **Divalent and trivalent alpha-ketocarboxylic acids as inhibitors of protein tyrosine phosphatases**, J. Med. Chem. 45 (2002)

YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V. **Novas perspectivas dos produtos naturais na química medicinal moderna**. In: YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V. (orgs.). *Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia*. 1 ed. Itajaí: Editora UNIVALI, 2007.

WERMUTH, C.; **The practice of Medicinal Chemistry** - 3ªEd, Ilkirch - França, 2008.

WREN, B. W. **The yersiniae--a model genus to study the rapid evolution of bacterial pathogens**. *Nature reviews. Microbiology*, v. 1, n. 1, p. 55-64, 2003.

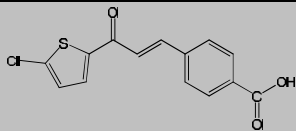
Z. Huang, Y. He, X. Zhang, A. Gunawan, L. Wu, Z.Y. Zhang, C.F. Wong, **Derivatives of salicylic acid as inhibitors of YopH in Yersinia pestis**, Chem. Biol. Drug Des. 76 (2010).

**Anexo I -
Estruturas Obtidas e
Respectivos Nomes
Químicos**

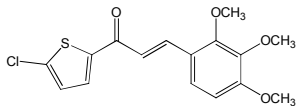
Compostos análogos a chalconas derivadas do 2-acetil-5-cloro-tiofeno, série H.

Código	Estrutura	Nome Químico
H1		<i>(E)</i> -1-(5-clorotiofen-2-il)-3-fenilprop-2-en-1-ona.
H2		<i>(E)</i> -3-(4-clorofenil)-1-(5-clorotiofen-2-il)prop-2-en-1-ona
H3		<i>(E)</i> -1-(5-clorotiofen-2-il)-3-(4-metoxifenil)prop-2-en-1-ona.
H4		<i>(E)</i> -1-(5-clorotiofen-2-il)-3-(<i>p</i> -toluil)prop-2-en-1-ona.
H6		<i>(E)</i> -1-(5-clorotiofen-2-il)-3-(3-nitrofenil)prop-2-en-1-ona.
H7		<i>(E)</i> -1-(5-clorotiofen-2-il)-3-(4-fluorfenil)prop-2-en-1-ona.
H11		<i>(E)</i> -1-(5-clorotiofen-2-il)-3-(2,4,5-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona.
H12		<i>(E)</i> -1-(5-clorotiofen-2-il)-3-(2,4,6-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona.

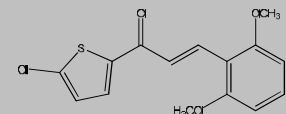
H14		<p>(<i>E</i>)-3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-(5-clorotiofen-2-il)prop-2-en-1-ona</p>
H15		<p>(<i>E</i>)-1-(5-clorotiofen-2-il)-3-(naftalen-1-il)prop-2-en-1-ona.</p>
H16		<p>(<i>E</i>)-3-(4-butoxifenil)-1-(5-clorotiofen-2-il)prop-2-en-1-ona</p>
H17		<p>(<i>E</i>)-1-(5-clorotiofen-2-il)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)prop-2-em-1-ona.</p>
H19		<p>(<i>E</i>)-1-(5-clorotiofen-2-il)-3-(tiofen-2-il)prop-2-en-1-ona.</p>
H21		<p>(<i>E</i>)-1-(5-clorotiofen-2-il)-3-(5-(2-nitrofenil)furan-2-il)prop-2-en-1-ona.</p>
H22		<p>(<i>E</i>)-3-(5-cloro-6-metoxiquinolin-3-il)-1-(5-clorotiofen-2-il)prop-2-em-1-ona.</p>
H24		<p>(<i>E</i>)-1-(5-clorotiofen-2-il)-3-(2,5-dimetoxifenil)prop-2-en-1-ona.</p>
H25		<p>(<i>E</i>)-1-(5-clorotiofen-2-il)-3-(3,4-dimetoxifenil)prop-2-en-1-ona.</p>

H28

(*E*)-4-(3-(5-clorotiofen-2-il)-3-oxoprop-1-en-1-il)-ácido benzóico

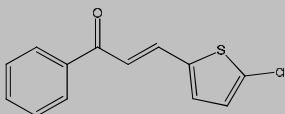
H29

(*E*)-1-(5-clorotiofen-2-il)-3-(2,3,4-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona.

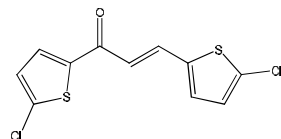
H30

(*E*)-1-(5-clorotiofen-2-il)-3-(2,6-dimetoxifenil)prop-2-en-1-ona.

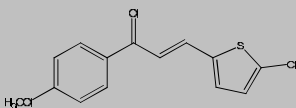
Compostos análogos a chalconas derivadas do 5-cloro-2-tiofenocarbaldeído, série HB.

Código**Estrutura****Nome Químico****HB1**

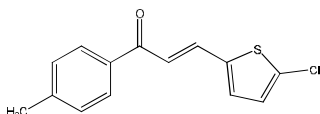
(*E*)-3-(5-clorotiofen-2-il)-1-fenilprop-2-en-1-ona.

HB2

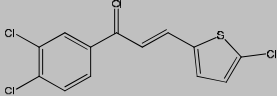
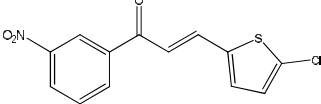
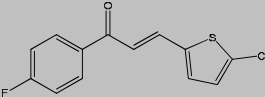
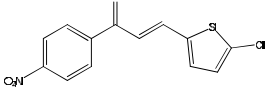
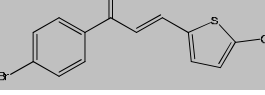
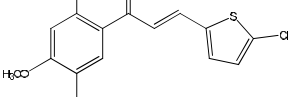
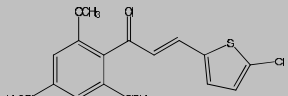
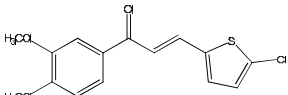
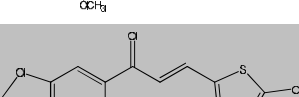
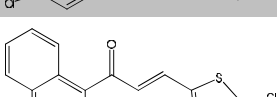
(*E*)-1,3-bis(5-clorotiofen-2-il)prop-2-en-1-ona

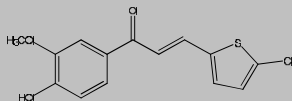
HB3

(*E*)-3-(5-clorotiofen-2-il)-1-fenilprop-2-en-1-ona

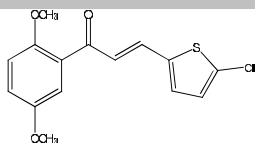
HB4

(*E*)-3-(5-clorotiofen-2-il)-1-(p-toluil)prop-2-en-1-ona

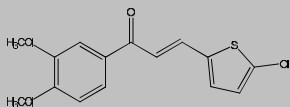
HB5		<i>(E)</i> -3-(5-clorotiofen-2-il)-1-(3,4-diclorofenil)prop-2-en-1-ona
HB6		<i>(E)</i> -3-(5-clorotiofen-2-il)-1-(3-nitrofenil)prop-2-en-1-ona
HB7		<i>(E)</i> -3-(5-clorotiofen-2-il)-1-(4-fluorfenil)prop-2-en-1-ona
HB8		<i>(E)</i> -3-(5-clorotiofen-2-il)-1-(4-nitrofenil)prop-2-en-1-ona
HB9		<i>(E)</i> -1-(4-bromofenil)-3-(5-clorotiofen-2-il)prop-2-en-1-ona
HB11		<i>(E)</i> -3-(5-clorotiofen-2-il)-1-(2,4,5-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona
HB12		<i>(E)</i> -3-(5-clorotiofen-2-il)-1-(2,4,6-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona
HB13		<i>(E)</i> -3-(5-clorotiofen-2-il)-1-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona
HB14		<i>(E)</i> -1-(1,3-benzodioxol-5-il)-3-(5-clorotiofen-2-il)prop-2-en-1-ona
HB15		<i>(E)</i> -3-(5-clorotiofen-2-il)-1-(naftalen-1-il)prop-2-en-1-ona

HB17

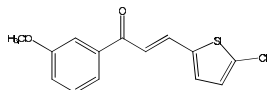
(*E*)-3-(5-clorotiofen-2-il)-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)prop-2-en-1-ona

HB24

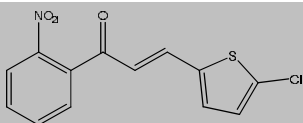
(*E*)-3-(5-clorotiofen-2-il)-1-(2,5-dimetoxifenil)prop-2-en-1-ona

HB25

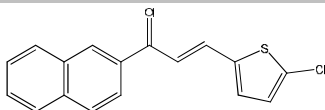
(*E*)-3-(5-clorotiofen-2-il)-1-(3,4-dimetoxifenil)prop-2-en-1-ona

HB32

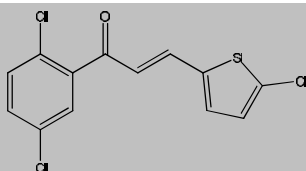
(*E*)-3-(5-clorotiofen-2-il)-1-(3-metoxifenil)prop-2-en-1-ona

HB36

(*E*)-3-(5-clorotiofen-2-il)-1-(2-nitrofenil)prop-2-en-1-ona

HB37

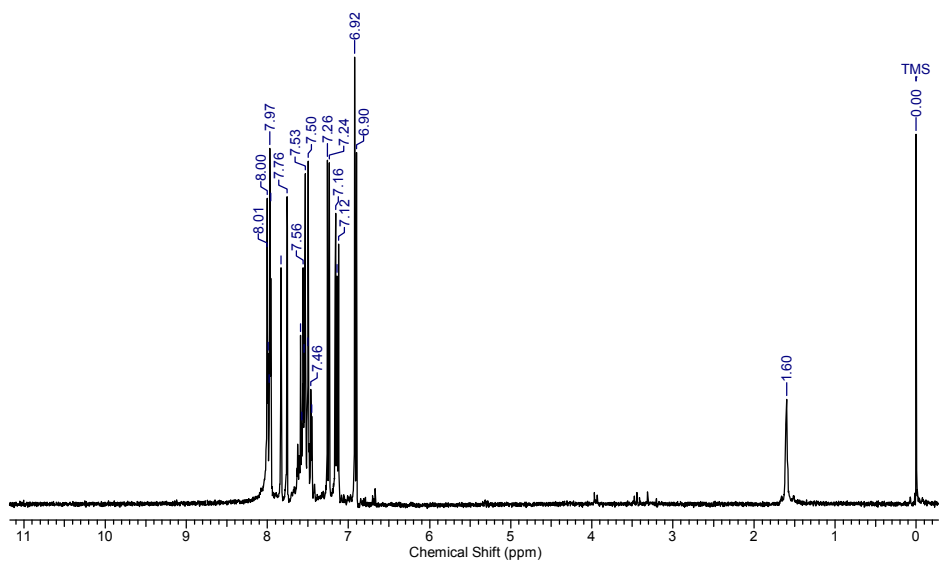
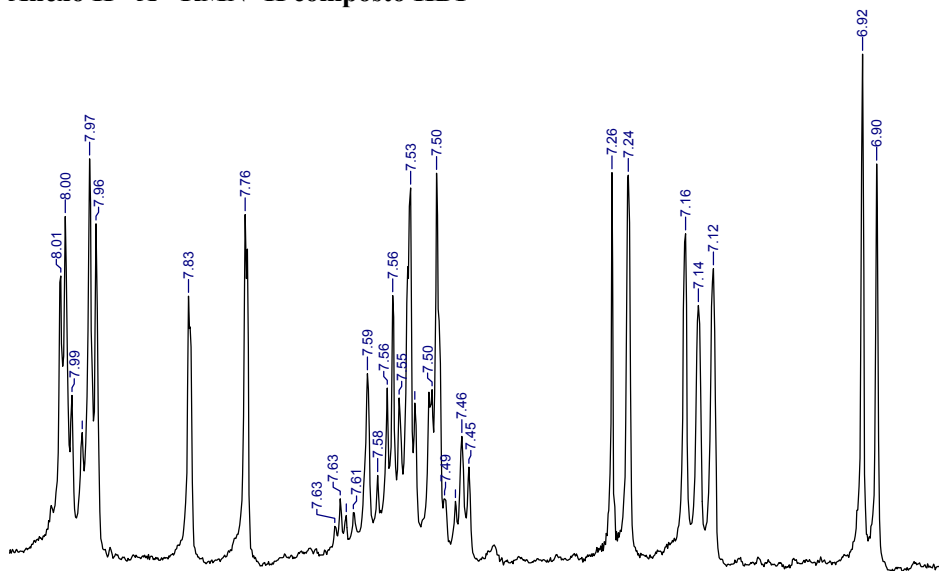
(*E*)-3-(5-clorotiofen-2-il)-1-(naftalen-2-il)prop-2-en-1-ona

HB40

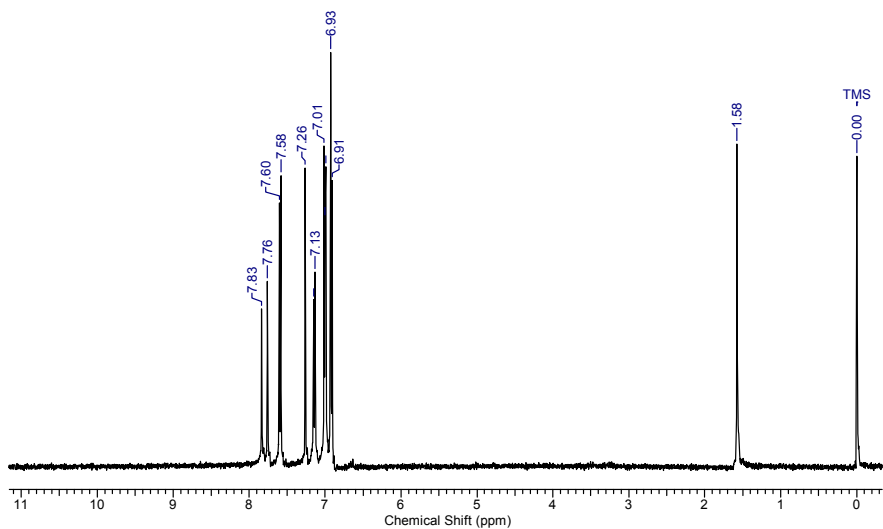
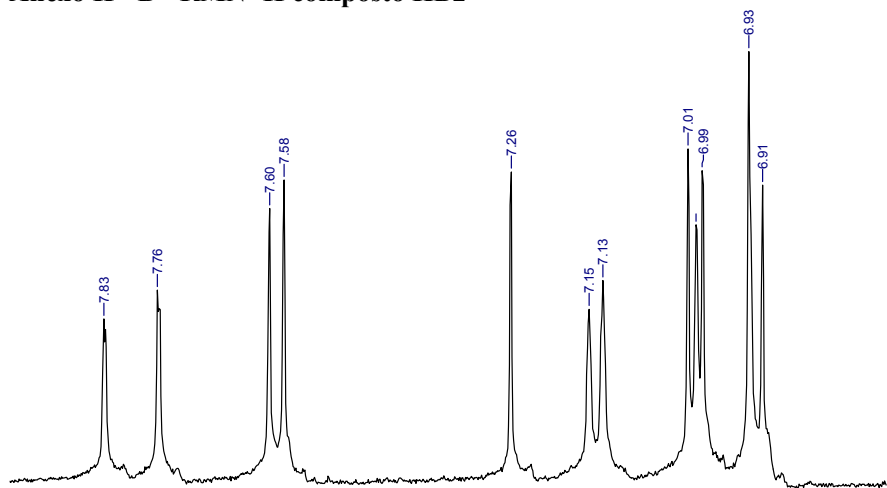
(*E*)-3-(5-clorotiofen-2-il)-1-(2,5-clorotiofenil)prop-2-en-1-ona

**Anexo II -
RMN de ^1H dos
Compostos Inéditos**

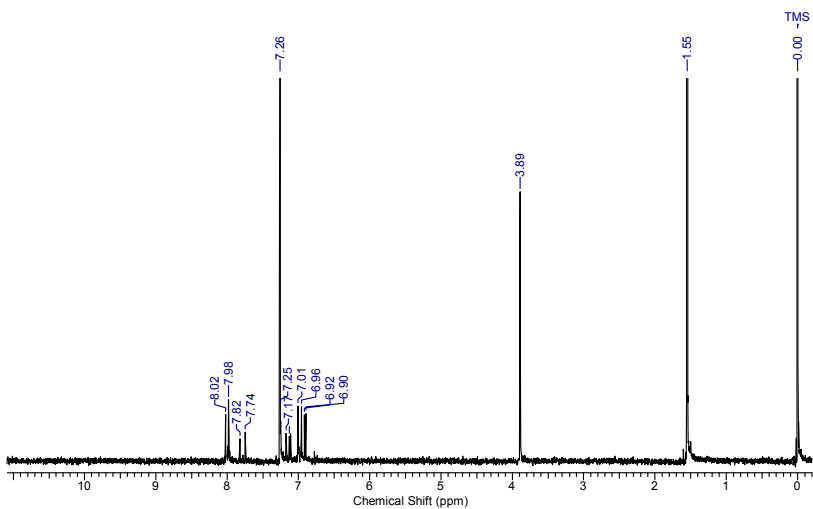
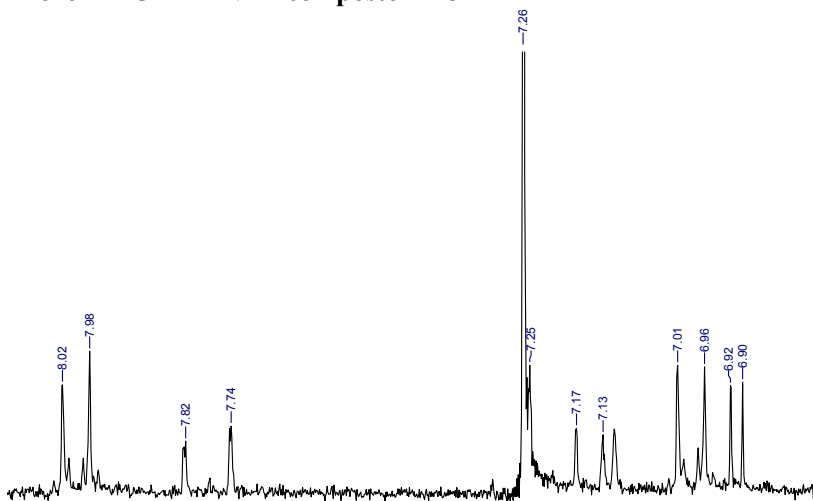
Anexo II - A - RMN ¹H composto HB1



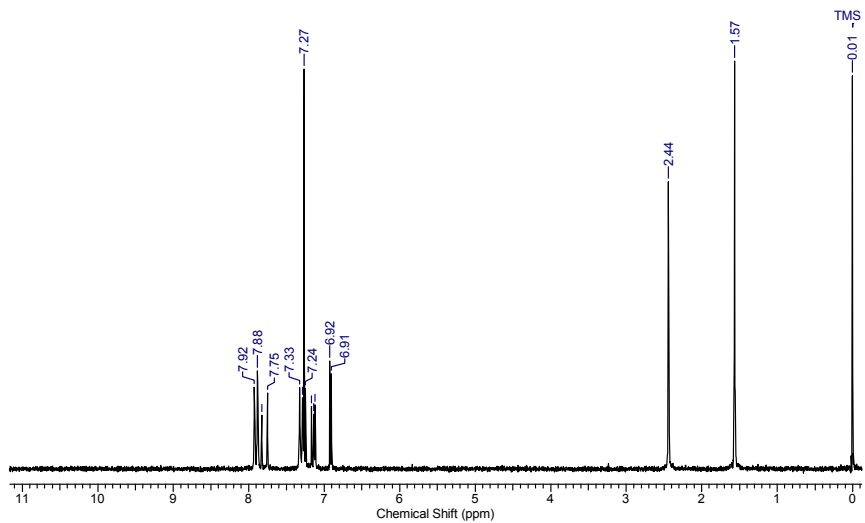
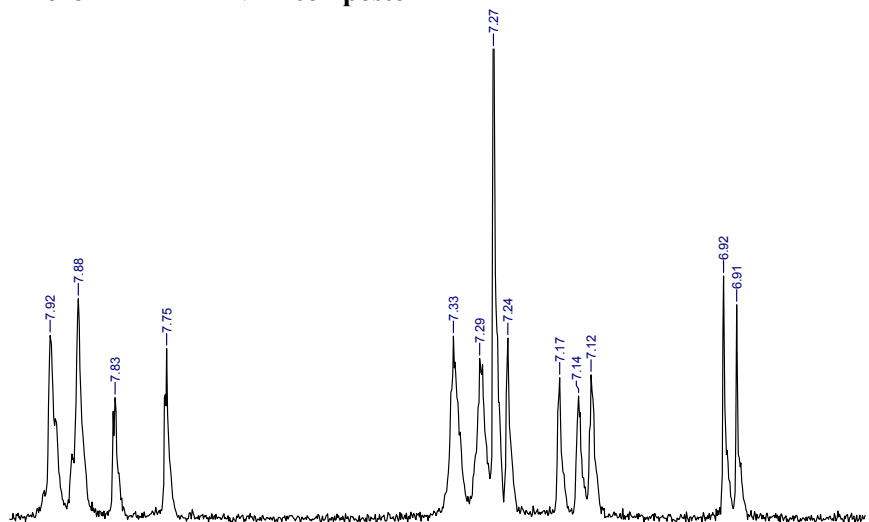
Anexo II - B - RMN ¹H composto HB2



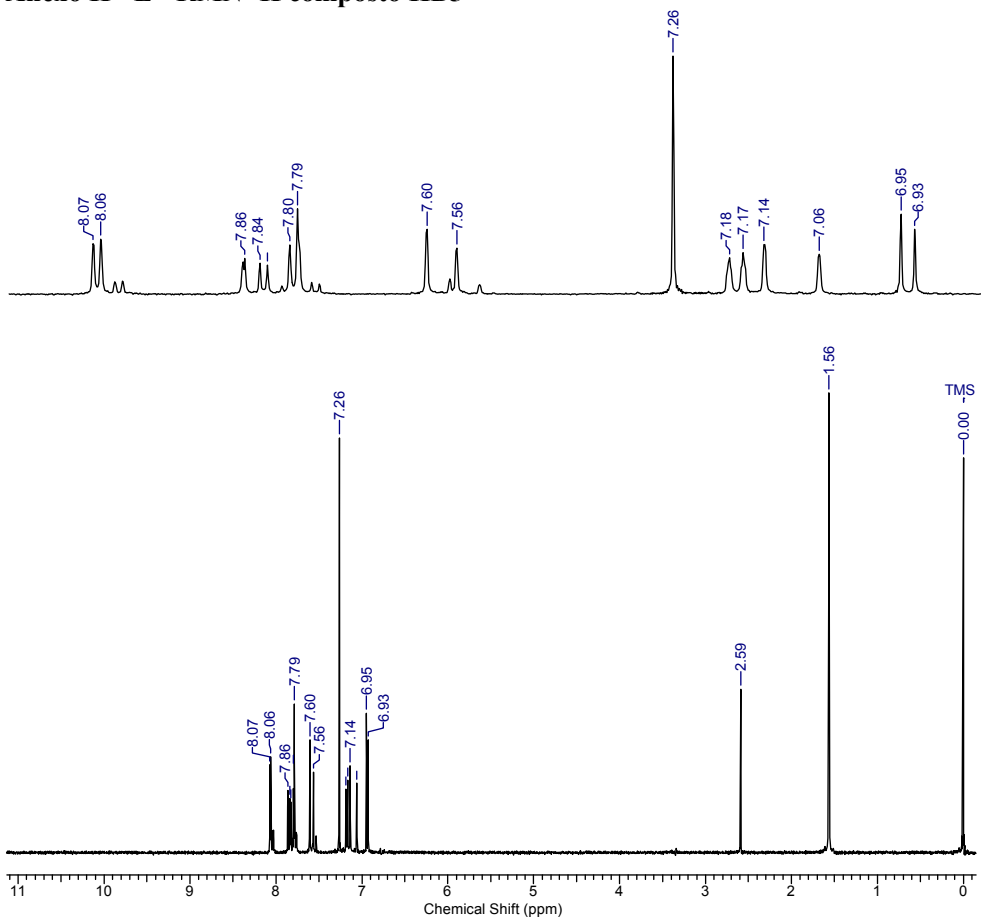
Anexo II - C - RMN ¹H composto HB3



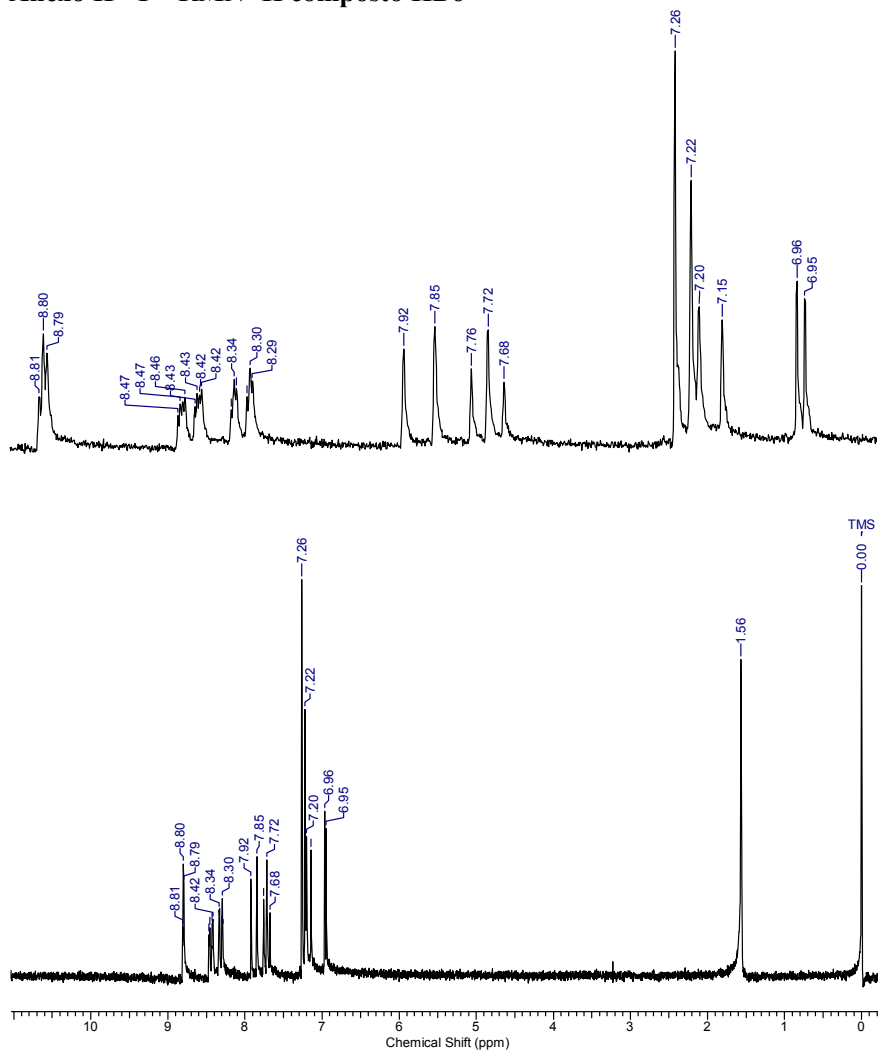
Anexo II - D - RMN ¹H composto HB4



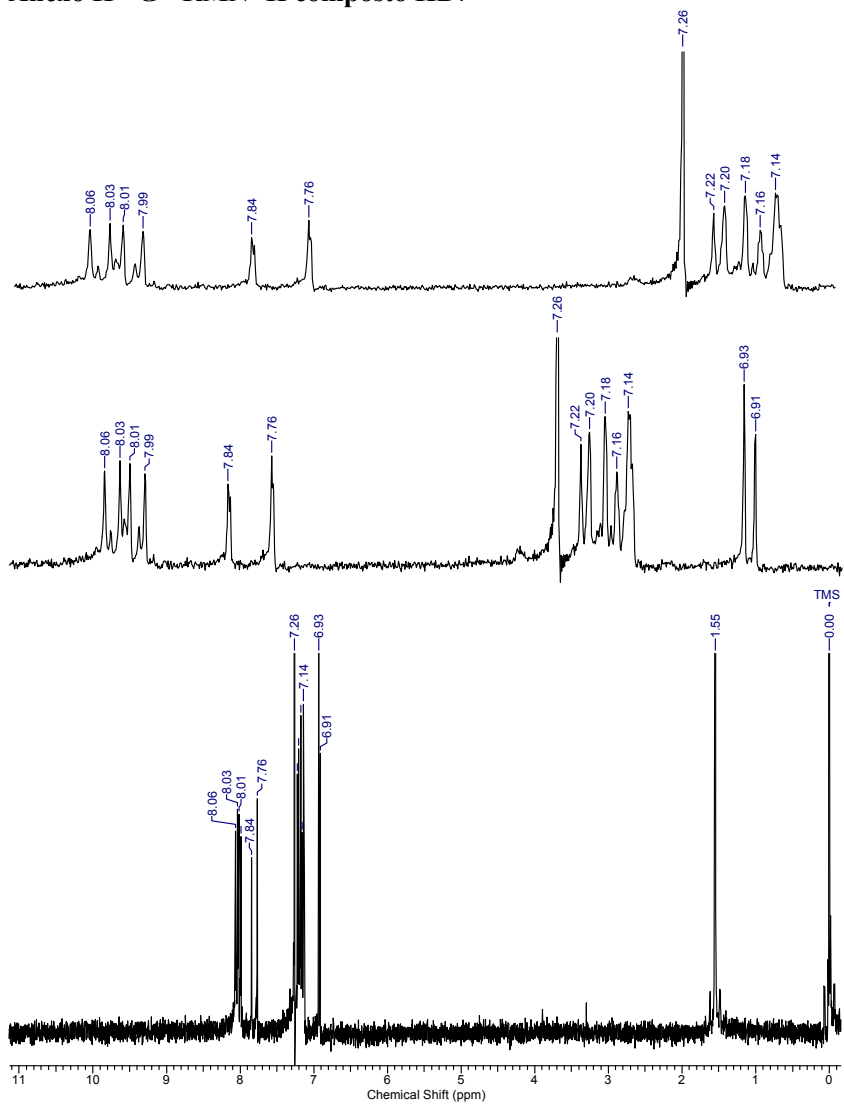
Anexo II - E - RMN ¹H composto HB5



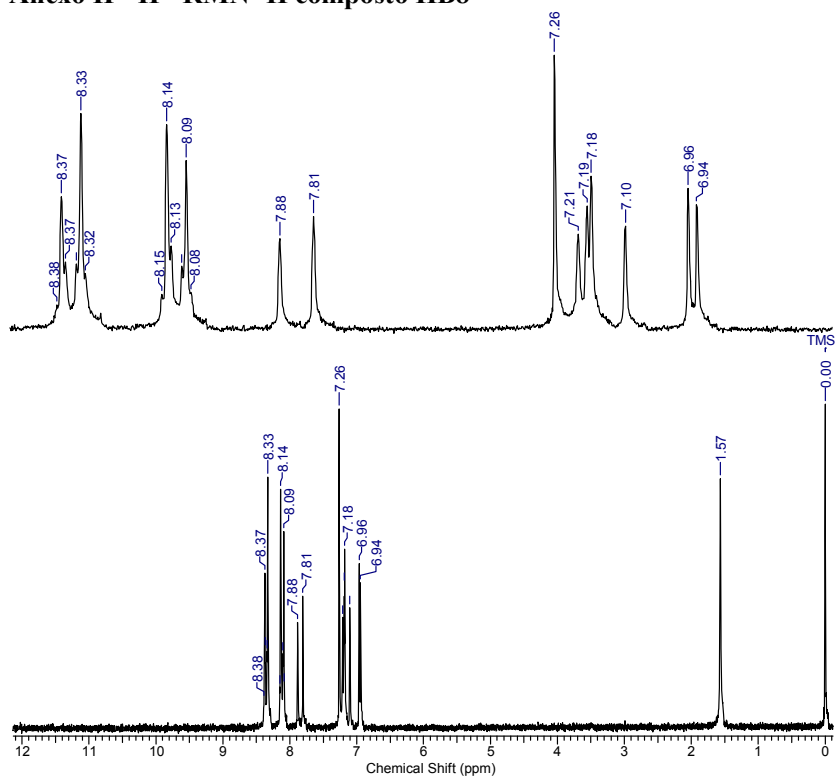
Anexo II - F - RMN ^1H composto HB6



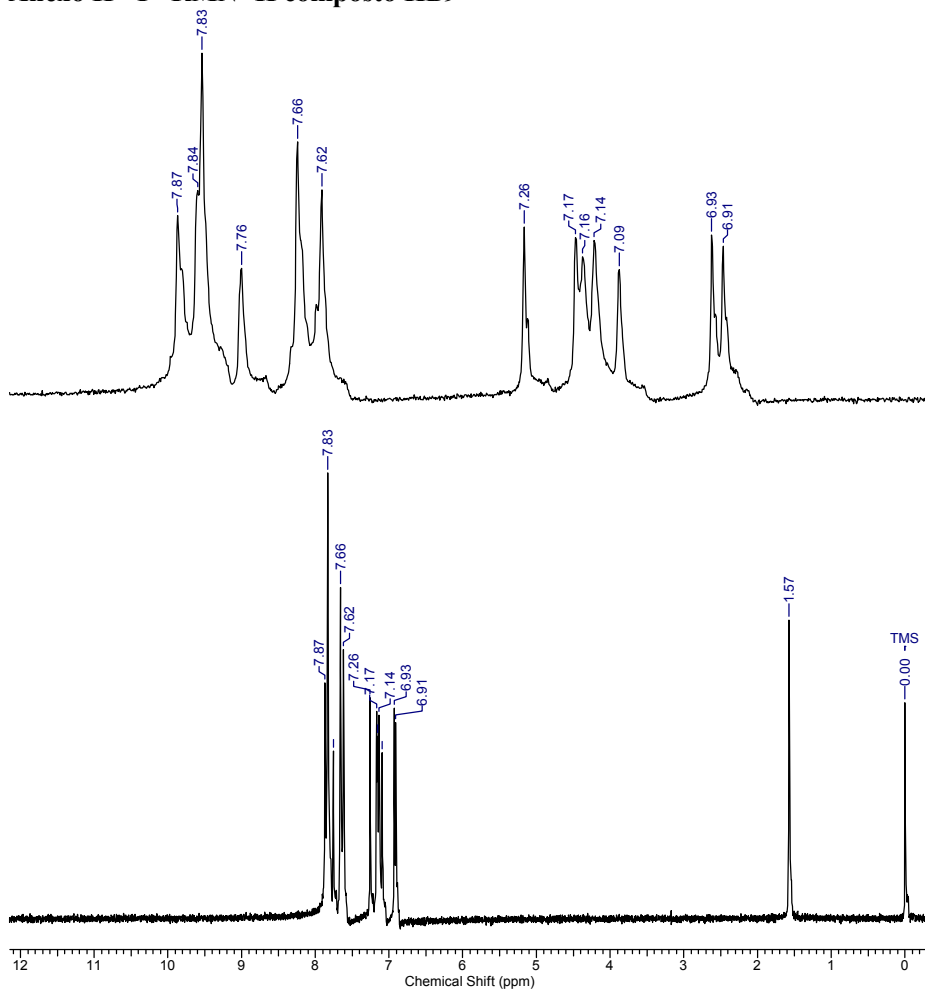
Anexo II - G - RMN ¹H composto HB7



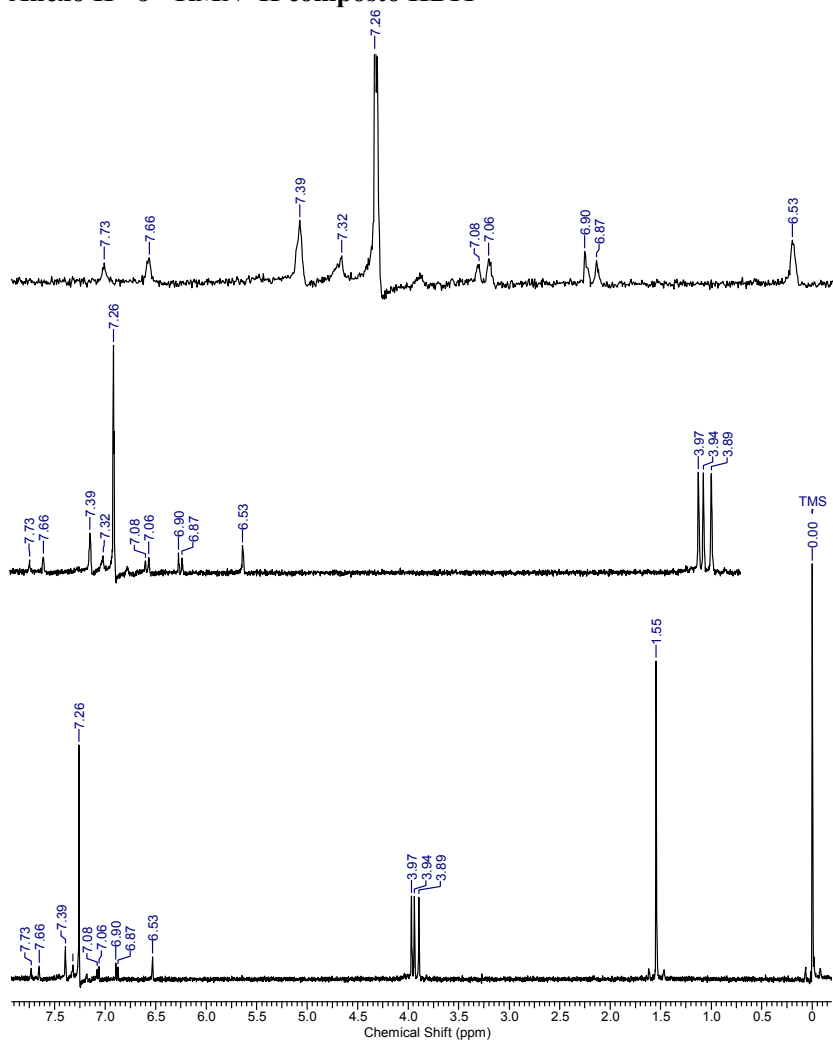
Anexo II - H - RMN ¹H composto HB8



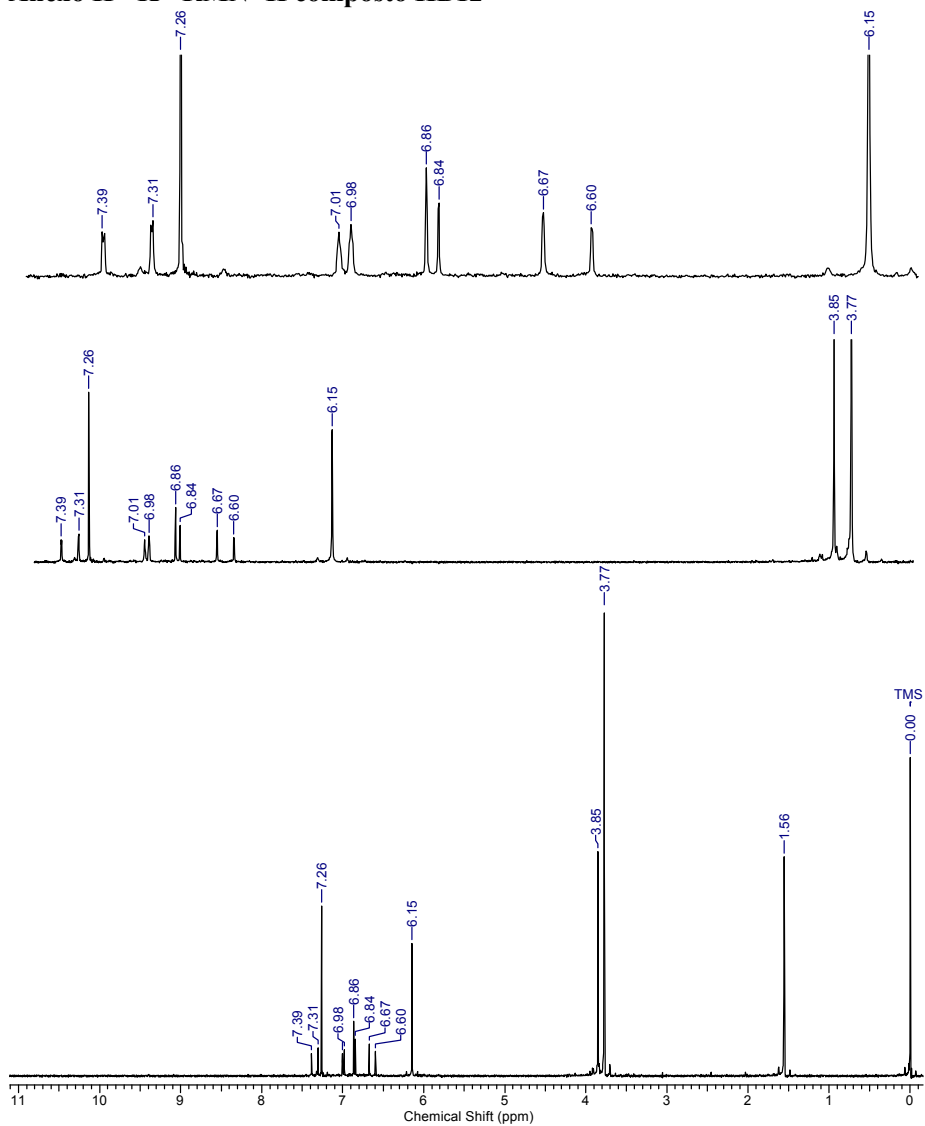
Anexo II - I - RMN ¹H composto HB9



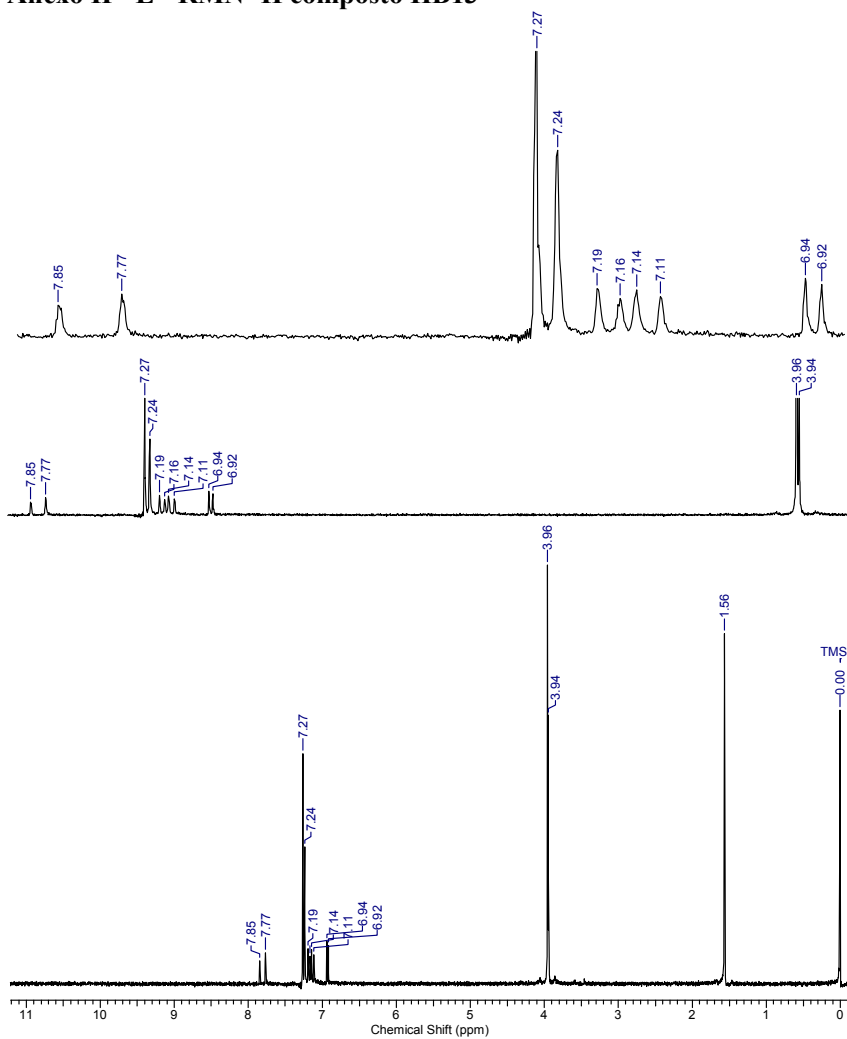
Anexo II - J - RMN ¹H composto HB11



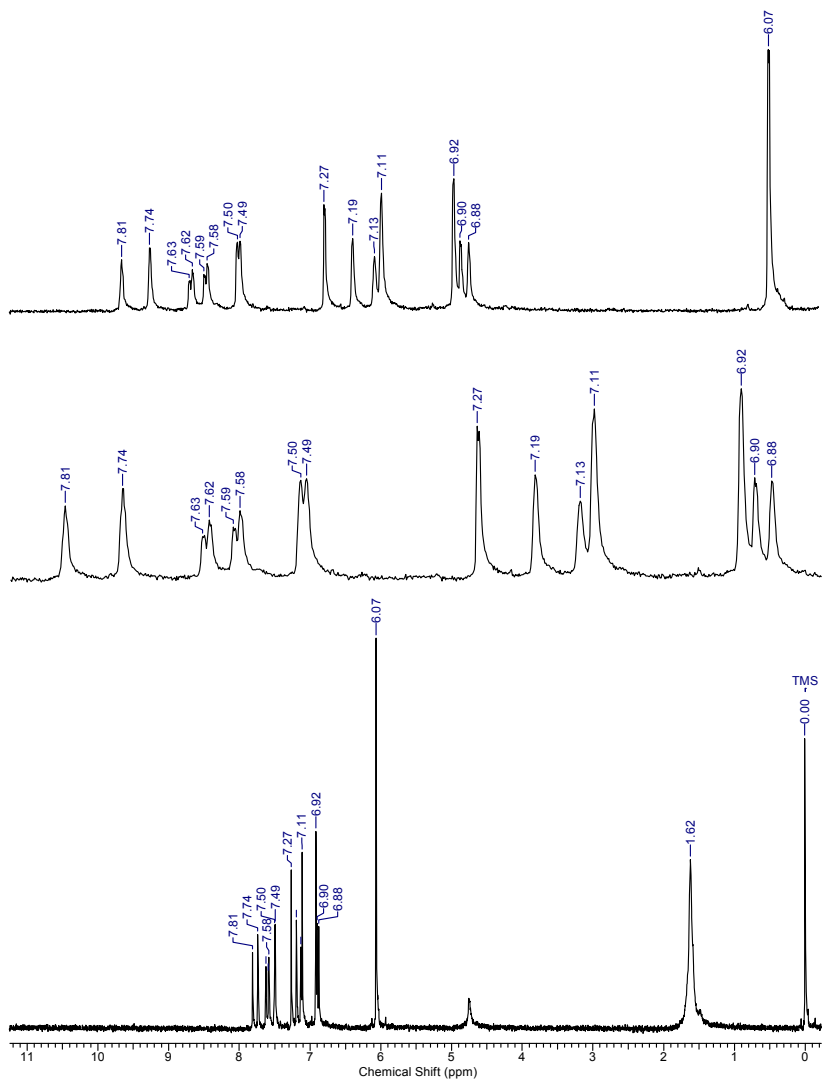
Anexo II - K - RMN ^1H composto HB12



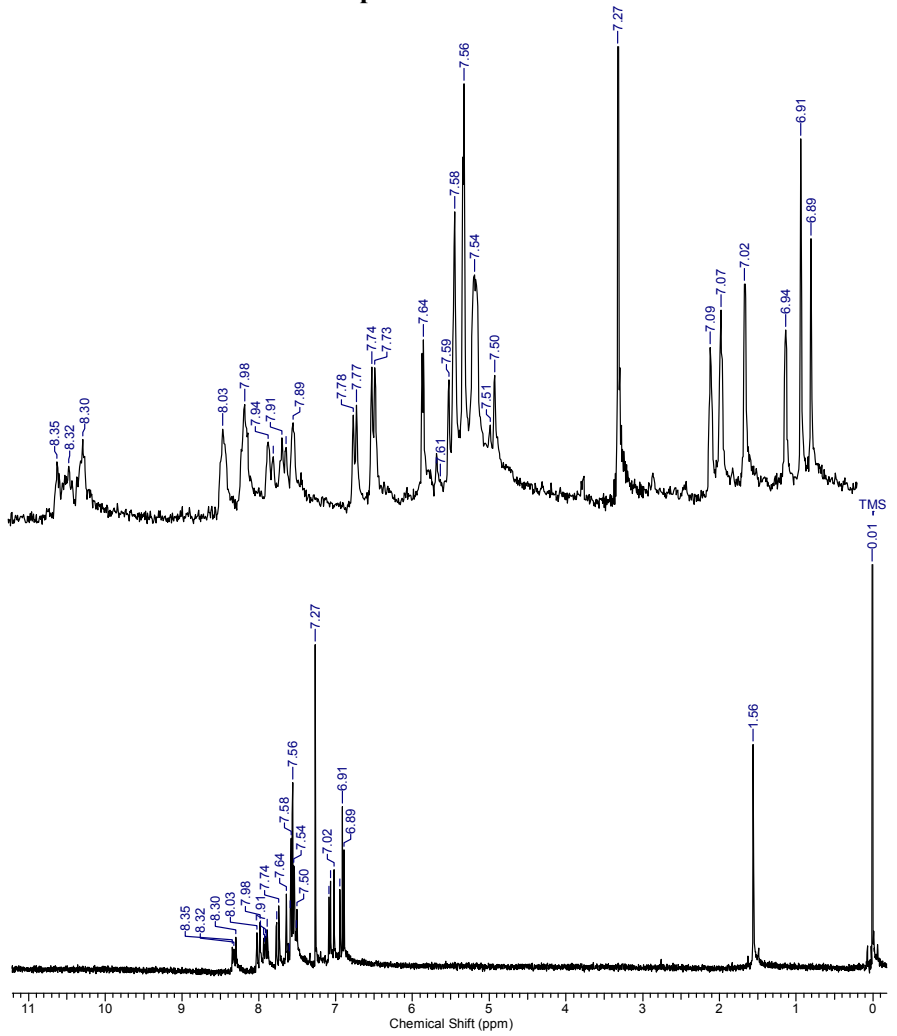
Anexo II - L - RMN ¹H composto HB13



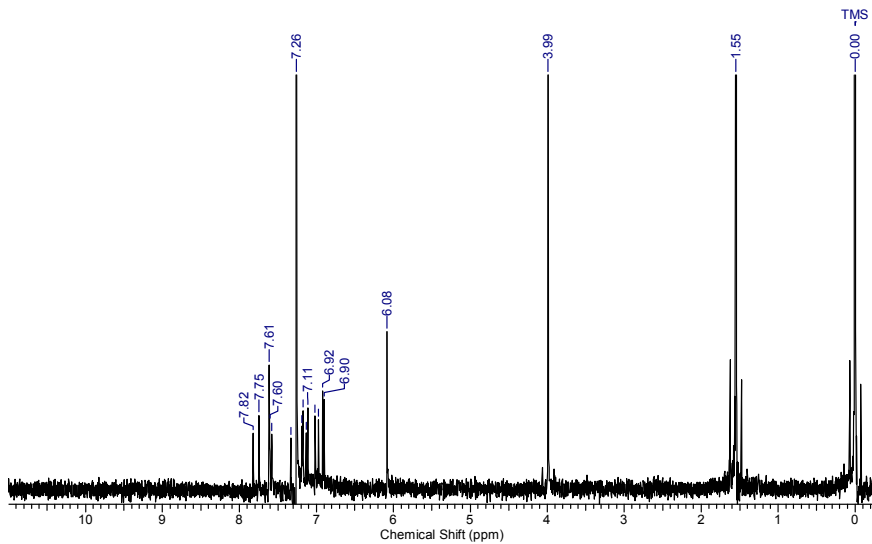
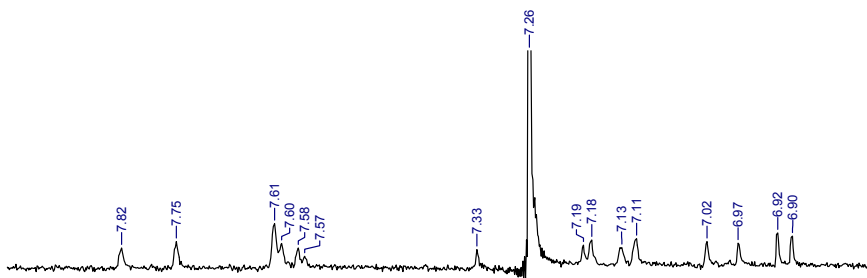
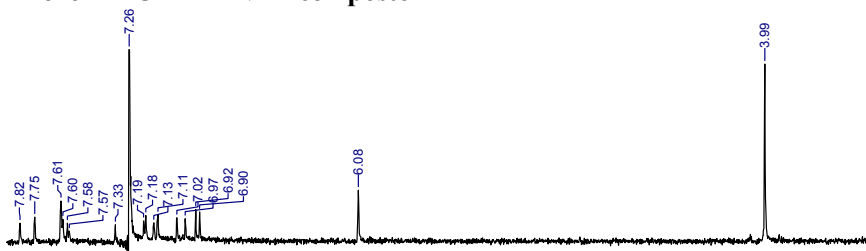
Anexo II - M - RMN ¹H composto HB14



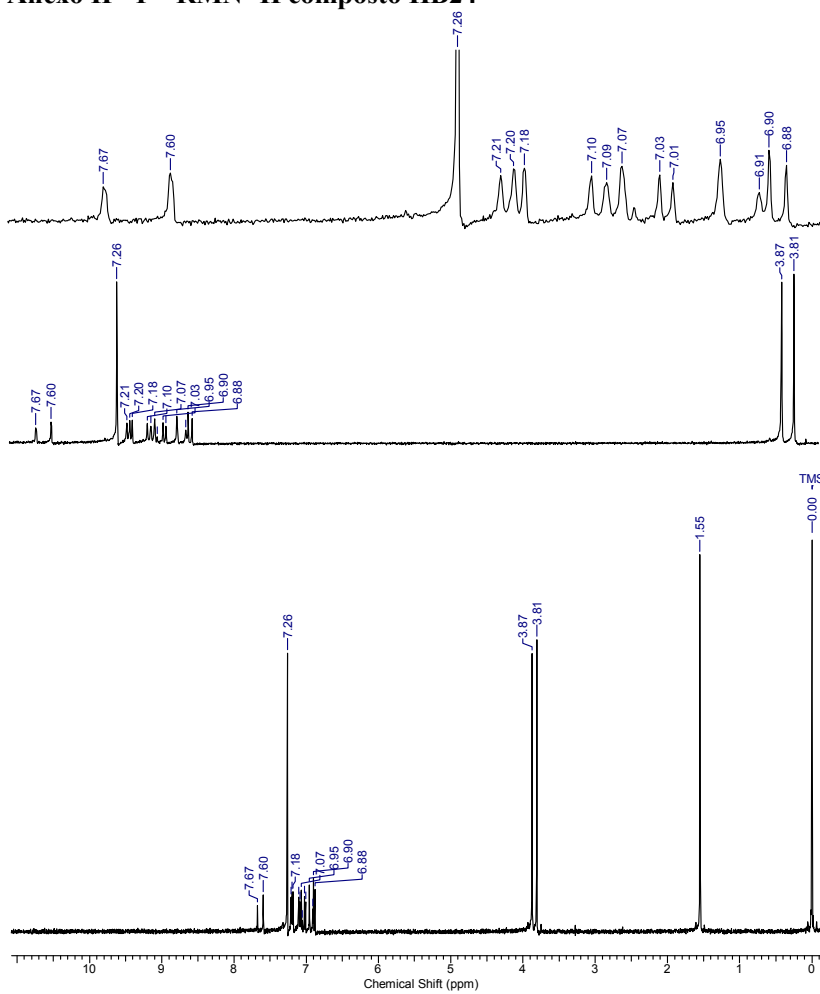
Anexo II - N - RMN ¹H composto HB15



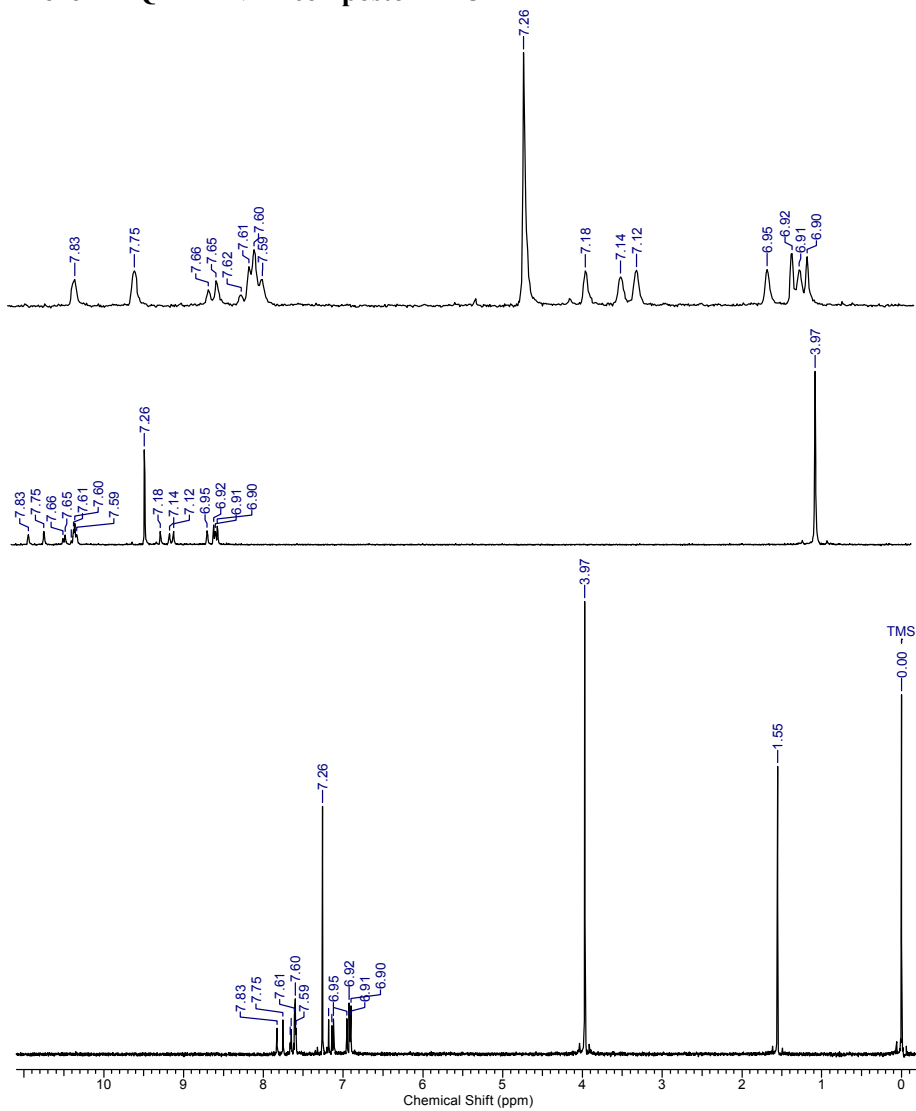
Anexo II - O - RMN ^1H composto HB17



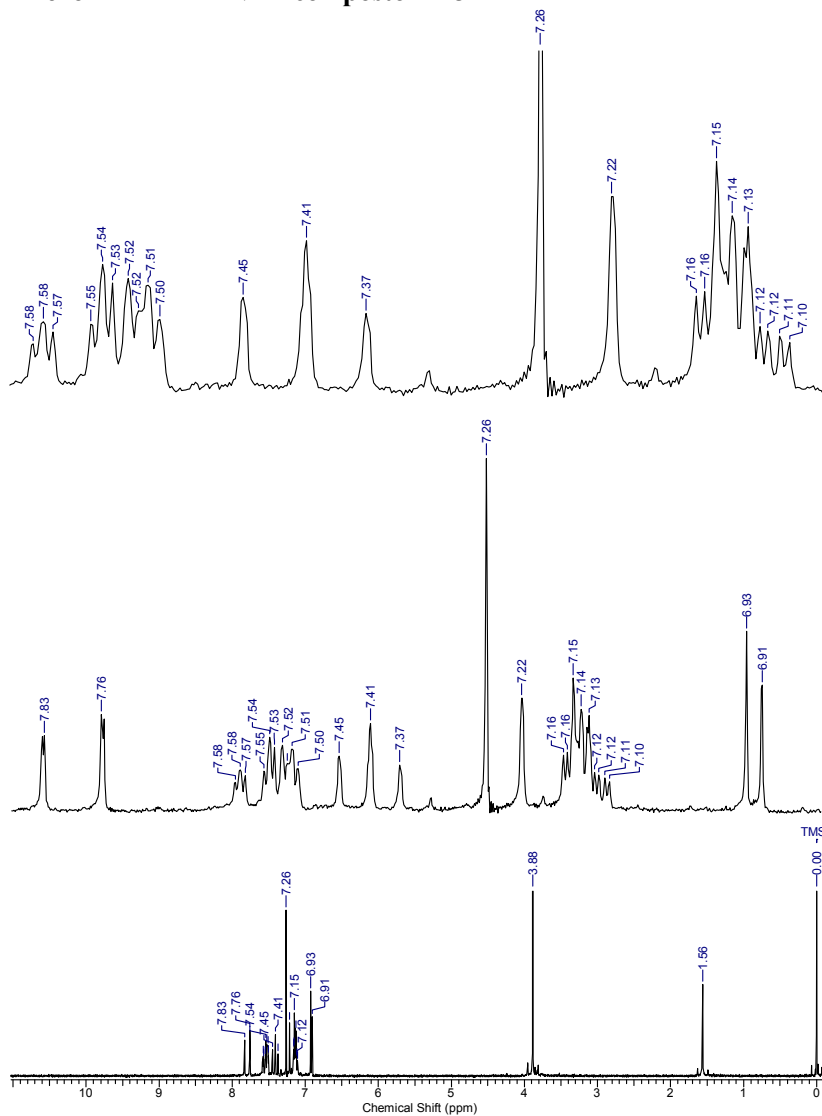
Anexo II - P - RMN ¹H composto HB24



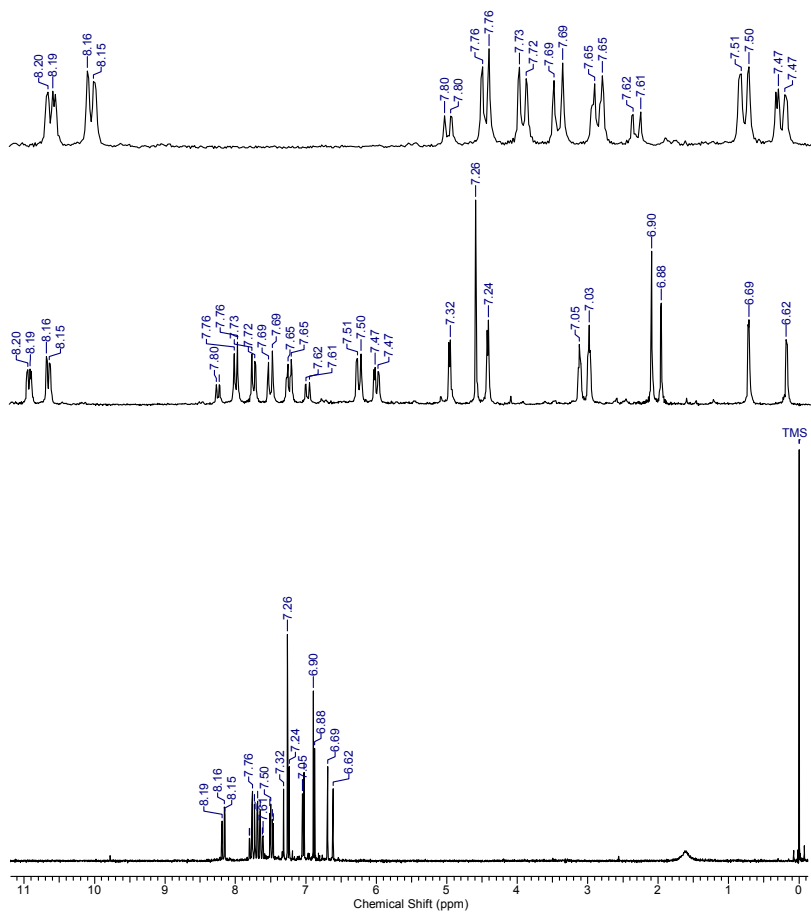
Anexo II - Q - RMN ¹H composto HB25



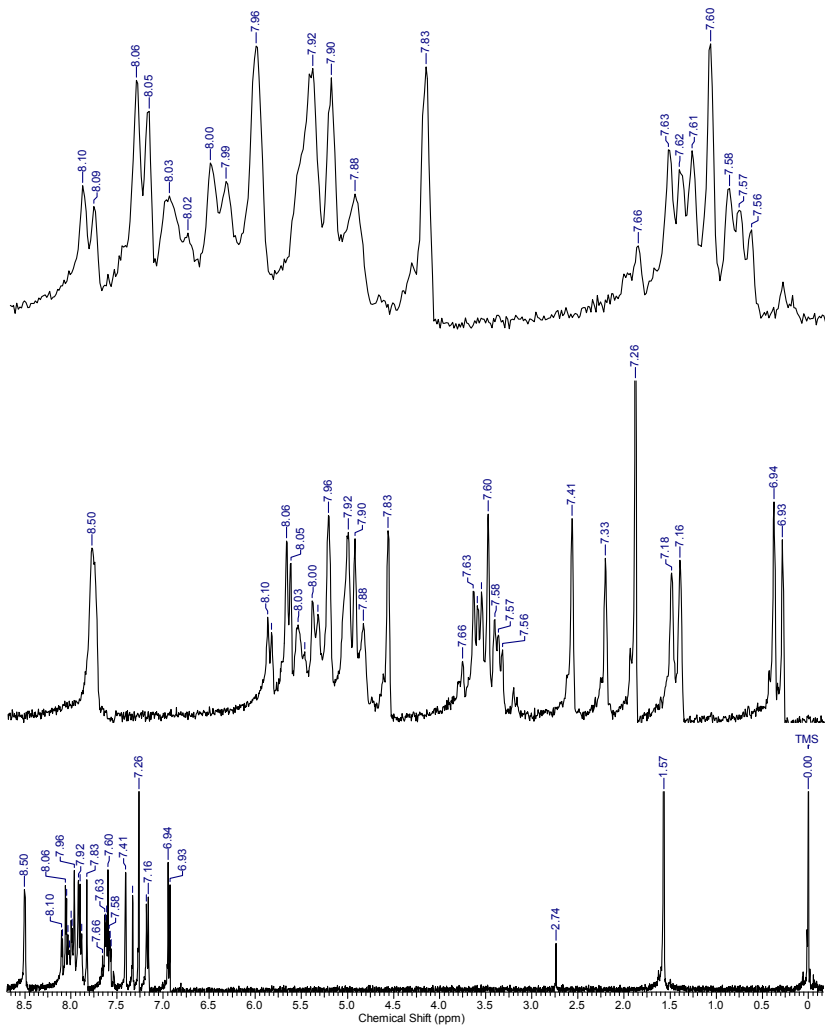
Anexo II - R - RMN ¹H composto HB32



Anexo II - S - RMN ¹H composto HB36



Anexo II - T - RMN ¹H composto HB37



Anexo II - U - RMN ¹H composto HB40

