

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

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

Patrícia Albano Mariño

Orientador: Prof. Dr. Fávero Reisdorfer Paula

URUGUAIANA
2014

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

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

Patrícia Albano Mariño

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

Orientador: Prof. Dr. Fávero Reisdorfer Paula

URUGUAIANA
2014

Patrícia Albano Mariño

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

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Fávero Reisdorfer Paula
Orientador

Profa. Dra. Priscila Arruda Trindade
Universidade Federal de Santa Maria

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

Uruguaiana, 21 de julho de 2014.

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por permitir que mais esta etapa da minha vida fosse cumprida, mesmo com todas as dificuldades, tenho certeza que sempre estive ao meu lado em todos os momentos, incluindo os " intermináveis" quilômetros que separam a universidade de minha casa.

Ao meu marido e minha filha, por toda a paciência, pelo carinho, apoio e pela compreensão da minha ausência. Ao meu bebê, Pedro, que me acompanhou durante 8 meses de aulas, experimentos e viagens, sempre quietinho, esperando a hora certa para nascer.

Aos meus pais e irmão, que apesar da distância sempre acompanharam tudo passo a passo e torceram por mim.

Meu agradecimento especial ao professor Fávero Residorfer Paula, meu orientador, que com muita paciência e atenção, dedicou seu valioso tempo para me orientar em cada passo deste trabalho.

As professoras Débora Faoro, Priscila Trindade e Cheila e aos alunos de iniciação científica, Gustavo Santi e Danillo Baptista Pereira que, juntamente conosco, abraçaram esta pesquisa e sempre estiveram dispostos a nos ajudar.

Aos demais professores do PPGF que colaboraram para meu crescimento intelectual e, principalmente a elas, minhas queridas colegas e amigas nesta caminhada, que me ajudaram muito a enfrentar a distância, sempre com sorrisos nos rostos.

Obrigada também pelo apoio e incentivo de todos os demais amigos que se fizeram presentes neste período e que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse concretizado.

RESUMO

As chalconas são compostos de origem vegetal e apresentam estrutura química simples que é amplamente utilizada como molécula protótipo para a obtenção de novos compostos bioativos através de modificações estruturais nos seus anéis aromáticos. Este fato é importante uma vez que a Sociedade Americana de Doenças Infecciosas lançou a iniciativa “10 x 20”, ou seja, o rápido desenvolvimento de 10 novos antibióticos até o ano de 2020. O objetivo deste estudo é a obtenção e determinação das propriedades físico-químicas e biológicas de chalconas com atividade antibacteriana potencial. As moléculas foram planejadas utilizando-se a metodologia de bioisosterismo clássico de valência, propondo a alteração da hidroxila presente na posição 4 do anel A da Licochalcona pelo grupo amino; no anel B houve a introdução de grupos nas posições *para* e *meta*, com graus variáveis de efeito eletrônico, de acordo com o emprego do Diagrama de Craig. As aminochalconas substituídas foram sintetizadas pela reação de *Claisen-Schmidt*, com quantidades equimolares de 4-aminoacetofenona e benzaldeídos variados e purificadas via cromatografia em coluna ou recristalização para posterior caracterização por espectroscopia de infravermelho e ressonância magnética nuclear. A avaliação da atividade antibacteriana e sinérgica foi realizada através do método de microdiluição em caldo descrito pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* e Teste de checkerboard frente a cepas referências de bactérias gram-positivas e gram-negativas (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Escherichia coli* ATCC 25922), além de uma cepa *S. aureus* resistente à metilina (N315). Foi utilizado o programa computacional *Spartan'08 for Windows* para determinação da estrutura química em 3D e cálculo dos valores das energias de HOMO e LUMO. O estudo teórico das propriedades físico-químicas foi realizado pelos programas *Chem3D Ultra*, *Molinspiration* e *MarvinSketch 6.2*. Para o estudo teórico da toxicidade e dos perfis de *druglikeness* e *drugscore* empregou-se o programa *Osiris Property Explorer*. Os compostos **1**, **3** e **7** apresentaram os menores valores de CIM quando ensaiados frente a ambas cepas de *S. aureus*, o que sugere que o mecanismo de resistência bacteriana não afeta a atividade desempenhada pelas 4-aminochalconas. Os compostos **5** e **8** foram os mais ativos frente a cepas *E. coli*. Não houve interação significativa entre as 4-aminochalconas e os antibióticos testados (oxacilina e cloranfenicol). Através da avaliação das relações estrutura-atividade, verificou-se que o composto **8** apresentou vários parâmetros que podem justificar sua ação frente a bactérias gram-negativas, como peso molecular elevado e menores valores de cLogP e LogD_{7.4}. Resultados superiores à levofloxacina foram também evidenciados quando calculado seu potencial de *druglikeness* e de *drugscore*. Todos os compostos apresentaram alto risco teórico para o efeito mutagênico e baixo perfil toxicológico para o efeito irritante. Em relação aos efeitos no sistema reprodutor, apenas o composto **1** apresentou um risco médio, e para os compostos **2** e **3** foi descrito alto risco para o efeito tumorogênico. Mesmo apresentando uma atividade antibacteriana baixa, estas moléculas podem vir a delinear modificações estruturais com o intuito de aumento da ação biológica, visto que todas enquadram-se dentro dos parâmetros delineados na Regra dos Cinco e, devido a isso, são promissoras a apresentar uma boa biodisponibilidade oral.

Palavras-chave: 4-aminochalconas, Antibacterianos, ADMET *in silico*.

ABSTRACT

Chalcones are vegetal origin compounds and they present a simple chemical structure which is widely used as a molecule prototype in order to obtain new bioactive compounds by structural changes in their aromatic rings. Such fact is important as the American Society of Infectious Diseases has released the “10 x 20” initiative, meaning the fast development of 10 new antibiotics up to 2020. This study aims to obtain and establish chalcone’s physical-chemical and biological properties with potential antibacterial activity. The molecules were designed by the classic bioisosterismo classic methodology, proposing the modification of the hydroxyl existent in licochalcone’s position 4 of ring A in the amino group, in ring B groups were introduced in *para* and *meta* positions, with variable degrees of electronical effects, according to the usage of Craig’s Diagram. The replaced aminochalcones were synthesized by the *Claisen-Schmidt* reaction with equimolar quantities of 4-aminoacetophenone and varied benzaldehydes and purified by column chromatography or recrystallization for further characterization by infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance. The evaluation of the antibacterial and synergic activity was made through Microdilution Methods described by the *Clinical and Laboratory Standards Institute* and checkerboard test against reference strains of gram-positive and gram-negative (Staphylococcus aureus ATCC 29213 and Escherichia coli ATCC 25922), plus S. aureus meticillin resistant (N315). Spartan’08 for Windows was the computational program used to establish the 3D chemical structure and the HOMO’s and LUMO’s energy amount figures. The theoretical study of Physical-chemical properties was accomplished by *Chem3D Ultra*, *Molinspiration* and *MarvinSketch 6.2* programs. In order to theoretically study both toxicity and profile of *druglikeness and drugscore*, *Osiris Property Explorer* program was used. The compounds 1, 3 and 7 showed the smallest CIM values when against both *S. aureus* strains, which suggests that the bacterial resistance mechanism doesn’t affect the 4-aminochalcones activity. Compounds 5 and 8 were more actives against strains *E. coli*. There was no significant interaction among the 4-aminochalcones and the antibiotics tested (oxacilin and chloramphenicol). Throughout the structural-activity relation evaluation, it was verified that compound 8 presented several parameters that may justify its action facing Gram-negative bacteria, such as the growth of its molecular weight and decreased values of *cLogP* and *LogD7,4*. Levofloxacin superior results were also certified when its potential of *druglikeness and drugscore* were figured. All the compounds have presented a high theoretical risk to the mutagenic effect and low toxicological profile to the irritant effect. Relating to the effects in the reproductive system, only compound 1 has presented a mid-risk and compound 2 and 3 high risk to tumorigenic effect. Even though these molecules have showed low antibacterial activity, they might outline changes in their structure aiming the biological action growth as they all fit the Rule of Five parameters and as a result, they tend toward a good oral bioavailability.

Key-words: 4-aminochalcones, antibacterial, *in silico* ADMET

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura química dos primeiros agentes antibacterianos descobertos.....	17
Figura 2.	História da descoberta dos antibióticos concomitantemente ao desenvolvimento da resistência bacteriana.....	18
Figura 3.	Estrutura química de alguns antibióticos mais recentemente introduzidos no mercado farmacêutico.....	19
Figura 4.	Bioisosterismo Clássico (A) e Não-Clássico (B) e suas respectivas tabelas.....	26
Figura 5.	Estrutura geral de uma chalcona, com a numeração da cadeia carbônica e indicações dos anéis A e B e os respectivos estereoisômeros.....	30
Figura 6.	Esquema geral da reação de condensação de Claisen-Schmidt utilizada para obtenção do núcleo chalcônico.....	31
Figura 7.	Estrutura das retrochalconas que apresentaram atividade antibacteriana: (1) Licochalcona A; (2) Licochalcona B; (3) Licochalcona C; (4) Licochalcona D.....	32
Figura 8.	Padrão de substituição bioisostérica do grupo monovalente hidroxila do composto licochalcona A para a obtenção da série das 4-aminochalconas.....	34
Figura 9.	Diagrama da intercorrelação σ versus π na substituição no anel B.....	35
Figura 10.	Passos do Ensaio de Microdiluição executado no Laboratório de Microbiologia (UNIPAMPA/Campus Uruguaiana) de acordo com a metodologia CLSI (2009) para <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	43
Figura 11.	Esquema de preparo do Painel 1 (A) e Painel 2 (B) nos ensaios de <i>checkerboard</i>	45
Figura 12.	Concentrações das soluções do antibiótico (em azul) e da chalcona testada (em laranja).....	46
Figura 13.	Fórmulas matemáticas utilizadas para cálculo de resultados da atividade sinérgica.....	47
Figura 14.	Mecanismo de condensação de Claisen-Schmidt.....	50
Figura 15.	Espectro de infravermelho com composto (<i>E</i>)-1-(4-aminofenil)-3-(4-nitrofenil)prop-2-en-1-ona) (2).....	54
Figura 16.	Espectro de RMN ¹ H da (<i>E</i>)-1-(4-aminofenil)-3-(4-nitrofenil)prop-2-en-1-ona) (2) (DMSO, 300MHz).....	58
Figura 17.	Espectro de RMN ¹³ C da (<i>E</i>)-1-(4-aminofenil)-3-(4-nitrofenil)prop-2-en-1-ona) (2) (DMSO, 75MHz).....	59
Figura 18.	Modelo molecular do composto 7 em tubo e bolas obtido a partir do programa <i>Spartan'08 for Windows</i> (átomos de carbono: cinza; hidrogênio: branco, nitrogênio: azul; oxigênio: vermelho e cloro: laranja).....	67
Figura 19.	Estrutura química das 4-aminochalconas estudadas em modelos 2 e 3D (<i>Space Filling</i>).....	68

Figura 20.	Resultados e representação do composto 4 calculado no programa <i>Molinspiration</i>	71
Figura 21.	Interface gráfica e resultados obtidos para o composto 7 no programa Osiris com os respectivos perfis toxicológicos (vermelho), propriedades físico-químicas (verde) e <i>Druglikeness</i> e <i>Drugscore</i> (azul).....	74
Figura 22.	Escala do perfil <i>Drugscore</i>	75
Figura 23.	Comparação do potencial <i>Druglikeness</i> das 4-aminochalconas frente a fármacos antibacterianos.....	76
Figura 24.	Perfil <i>Drugscore</i> das aminochalconas e fármacos antibacterianos.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Estrutura dos derivados das aminochalconas planejados e sintetizados	35
Tabela 2.	Dados da síntese das aminochalconas.....	52
Tabela 3.	Faixa de fusão (°C) dos compostos sintetizados.....	53
Tabela 4.	Frequências características de grupos funcionais encontrados nas aminochalconas.....	53
Tabela 5.	Dados da espectrometria de Infravermelho.....	56
Tabela 6.	Dados espectroscópicos de RMN ¹ H.....	57
Tabela 7.	Dados espectroscópicos de RMN ¹³ C.....	60
Tabela 8.	Dados espectroscópicos de RMN ¹³ C <i>versus</i> estimativa <i>ChemDraw Ultra 8.0</i>	61
Tabela 9.	Concentração Inibitória Mínima (CIM) das 4-aminochalconas.....	63
Tabela 10.	Valores de CIM e do Somatório dos Índices de Concentração Inibitória Fracional (Σ FIC) dos compostos mais ativos.....	66
Tabela 11.	Propriedades eletrônicas teóricas das 4-aminochalconas.....	70
Tabela 12.	Propriedades físico-químicas dos compostos propostos.....	72
Tabela 13.	Toxicidade teórica das 4-aminochalconas.....	78

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	11
2	OBJETIVOS.....	13
2.1	OBJETIVO GERAL.....	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3	JUSTIFICATIVA.....	14
4	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
4.1	AGENTES ANTIBACTERIANOS.....	16
4.2	RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	20
4.3	PLANEJAMENTO E DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS.....	22
4.3.1	Modificação molecular.....	25
4.3.2	Estudos da relação estrutura-atividade.....	26
4.3.3	Modelagem molecular.....	27
4.3.4	Estudo de parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos <i>in silico</i>.....	28
4.4	CHALCONAS.....	29
4.4.1	Propriedades antibacterianas das chalconas.....	31
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
5.1	PLANEJAMENTO DOS COMPOSTOS.....	34
5.1.1	Substituição no Anel A.....	34
5.1.2	Substituição no Anel B.....	34
5.2	REAGENTES UTILIZADOS.....	36
5.3	EQUIPAMENTOS UTILIZADOS.....	36
5.4	SÍNTESE E PURIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS.....	36
5.5	CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS.....	40
5.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	40
5.6.1	Cepas bacterianas utilizadas.....	40
5.6.2	Preparo do meio de cultura para o ensaio de Microdiluição.....	41
5.6.3	Preparo da suspensão bacteriana.....	41
5.6.4	Preparo da solução estoque.....	41
5.6.5	Método de Microdiluição em caldo.....	42
5.6.5.1	Leitura das CIMs e Interpretação dos resultados.....	43
5.6.6	Análise estatística.....	43

5.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SINÉRGICA.....	44
5.7.1	Procedimento.....	44
5.7.1.1	Preparo dos painéis 1 e 2	44
5.7.1.2	Inoculação e incubação do painel <i>checkerboard</i>	46
5.7.2	Cálculo e Interpretação dos resultados.....	46
5.8	MODELAGEM MOLECULAR.....	47
5.9	DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES DE TOXICIDADE <i>IN SILICO</i>	48
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
6.1	PLANEJAMENTO DOS COMPOSTOS.....	49
6.2	SÍNTESE, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS.....	50
6.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	61
6.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBCTERIANA SINÉRGICA.....	65
6.5	MODELAGEM MOLECULAR.....	67
6.5.1	Avaliação da estrutura química das 4-aminochalconas.....	67
6.5.2	Obtenção de valores de propriedades físico-químicas.....	68
6.5.3	Análise dos perfis <i>Druglikeness</i> e <i>Drugscore</i>.....	74
6.6	DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES TOXICOLÓGICAS.....	77
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	79
	PERSPECTIVAS.....	80
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
	ANEXOS.....	86

RESUMO

As chalconas são compostos de origem vegetal e apresentam estrutura química simples que é amplamente utilizada como molécula protótipo para a obtenção de novos compostos bioativos através de modificações estruturais nos seus anéis aromáticos. Este fato é importante uma vez que a Sociedade Americana de Doenças Infecciosas lançou a iniciativa “10 x 20”, ou seja, o rápido desenvolvimento de 10 novos antibióticos até o ano de 2020. O objetivo deste estudo é a obtenção e determinação das propriedades físico-químicas e biológicas de chalconas com atividade antibacteriana potencial. As moléculas foram planejadas utilizando-se a metodologia de bioisosterismo clássico de valência, propondo a alteração da hidroxila presente na posição 4 do anel A da Licochalcona pelo grupo amino; no anel B houve a introdução de grupos nas posições *para* e *meta*, com graus variáveis de efeito eletrônico, de acordo com o emprego do Diagrama de Craig. As aminochalconas substituídas foram sintetizadas pela reação de *Claisen-Schmidt*, com quantidades equimolares de 4-aminoacetofenona e benzaldeídos variados e purificadas via cromatografia em coluna ou recristalização para posterior caracterização por espectroscopia de infravermelho e ressonância magnética nuclear. A avaliação da atividade antibacteriana e sinérgica foi realizada através do método de microdiluição em caldo descrito pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* e Teste de checkerboard frente a cepas referências de bactérias gram-positivas e gram-negativas (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Escherichia coli* ATCC 25922), além de uma cepa *S. aureus* resistente à meticilina (N315). Foi utilizado o programa computacional *Spartan'08 for Windows* para determinação da estrutura química em 3D e cálculo dos valores das energias de HOMO e LUMO. O estudo teórico das propriedades físico-químicas foi realizado pelos programas *Chem3D Ultra*, *Molinspiration* e *MarvinSketch 6.2*. Para o estudo teórico da toxicidade e dos perfis de *druglikeness* e *drugscore* empregou-se o programa *Osiris Property Explorer*. Os compostos **1**, **3** e **7** apresentaram os menores valores de CIM quando ensaiados frente a ambas cepas de *S. aureus*, o que sugere que o mecanismo de resistência bacteriana não afeta a atividade desempenhada pelas 4-aminochalconas. Os compostos **5** e **8** foram os mais ativos frente a cepas *E. coli*. Não houve interação significativa entre as 4-aminochalconas e os antibióticos testados (oxacilina e cloranfenicol). Através da avaliação das relações estrutura-atividade, verificou-se que o composto **8** apresentou vários parâmetros que podem justificar sua ação frente a bactérias gram-negativas, como peso molecular elevado e menores valores de cLogP e LogD_{7.4}. Resultados superiores à levofloxacina foram também evidenciados quando calculado seu potencial de *druglikeness* e de *drugscore*. Todos os compostos apresentaram alto risco teórico para o efeito mutagênico e baixo perfil toxicológico para o efeito irritante. Em relação aos efeitos no sistema reprodutor, apenas o composto **1** apresentou um risco médio, e para os compostos **2** e **3** foi descrito alto risco para o efeito tumorogênico. Mesmo apresentando uma atividade antibacteriana baixa, estas moléculas podem vir a delinear modificações estruturais com o intuito de aumento da ação biológica, visto que todas enquadram-se dentro dos parâmetros delineados na Regra dos Cinco e, devido a isso, são promissoras a apresentar uma boa biodisponibilidade oral.

Palavras-chave: 4-aminochalconas, Antibacterianos, ADMET *in silico*.

ABSTRACT

Chalcones are vegetal origin compounds and they present a simple chemical structure which is widely used as a molecule prototype in order to obtain new bioactive compounds by structural changes in their aromatic rings. Such fact is important as the American Society of Infectious Diseases has released the “10 x 20” initiative, meaning the fast development of 10 new antibiotics up to 2020. This study aims to obtain and establish chalcone’s physical-chemical and biological properties with potential antibacterial activity. The molecules were designed by the classic bioisosterism methodology, proposing the modification of the hydroxyl existent in licochalcone’s position 4 of ring A in the amino group, in ring B groups were introduced in *para* and *meta* positions, with variable degrees of electronic effects, according to the usage of Craig’s Diagram. The replaced aminochalcones were synthesized by the *Claisen-Schmidt* reaction with equimolar quantities of 4-aminoacetophenone and varied benzaldehydes and purified by column chromatography or recrystallization for further characterization by infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance. The evaluation of the antibacterial and synergic activity was made through Microdilution Methods described by the *Clinical and Laboratory Standards Institute* and checkerboard test against reference strains of gram-positive and gram-negative (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Escherichia coli* ATCC 25922), plus *S. aureus* methicillin resistant (N315). Spartan’08 for Windows was the computational program used to establish the 3D chemical structure and the HOMO’s and LUMO’s energy amount figures. The theoretical study of Physical-chemical properties was accomplished by *Chem3D Ultra*, *Molinspiration* and *MarvinSketch 6.2* programs. In order to theoretically study both toxicity and profile of *druglikeness* and *drugscore*, *Osiris Property Explorer* program was used. The compounds 1, 3 and 7 showed the smallest CIM values when against both *S. aureus* strains, which suggests that the bacterial resistance mechanism doesn’t affect the 4-aminochalcones activity. Compounds 5 and 8 were more active against strains *E. coli*. There was no significant interaction among the 4-aminochalcones and the antibiotics tested (oxacilin and chloramphenicol). Throughout the structural-activity relation evaluation, it was verified that compound 8 presented several parameters that may justify its action facing Gram-negative bacteria, such as the growth of its molecular weight and decreased values of *cLogP* and *LogD7,4*. Levofloxacin superior results were also certified when its potential of *druglikeness* and *drugscore* were figured. All the compounds have presented a high theoretical risk to the mutagenic effect and low toxicological profile to the irritant effect. Relating to the effects in the reproductive system, only compound 1 has presented a mid-risk and compound 2 and 3 high risk to tumorigenic effect. Even though these molecules have showed low antibacterial activity, they might outline changes in their structure aiming the biological action growth as they all fit the Rule of Five parameters and as a result, they tend toward a good oral bioavailability.

Key-words: 4-aminochalcones, antibacterial, *in silico* ADMET

INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da civilização, a procura pelo tratamento das principais doenças que acometem a humanidade tem sido uma preocupação constante da população (CALIXTO e SIQUEIRA, 2008). A descoberta de agentes antimicrobianos eficazes foi um dos maiores avanços em relação ao cuidado com a saúde, auxiliando na redução da morbidade e da mortalidade associadas a diversas doenças infecciosas anteriormente fatais (RICE, 2008; OSÓRIO *et al.*, 2012).

A utilização de antibióticos pela população proporcionou o tratamento de enfermidades causadas por bactérias e fungos patogênicos. Entretanto, seu emprego indiscriminado está relacionado a uma redução no sucesso do tratamento, devido ao surgimento de resistência bacteriana à terapêutica disponível (RICE, 2008; TRAN *et al.*, 2012; WRIGHT, 2012) que, anteriormente ao século XXI, ocorria predominantemente em ambientes hospitalares (GUIMARÃES, MOMESSO e PUPO, 2010).

Mais recentemente, um grupo de bactérias patogênicas antibiótico-resistentes denominado *ESKAPE*, composto por *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp.* tornou-se alvo de estudos para o desenvolvimento de novos antibacterianos (RICE, 2008; WRIGHT, 2012), fazendo com que a Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (IDSA) sustentasse a iniciativa “10 x 20”, ou seja, o rápido desenvolvimento de 10 novos antibióticos até o ano de 2020 (ISDA, 2010).

De acordo com Cushine e Lamb (2005), a cada dois milhões de pessoas que adquirem infecções bacterianas hospitalares nos Estados Unidos, 70% delas estão contaminadas com bactérias resistentes a pelo menos um antibiótico. No Brasil, Oliveira *et al.* (2001) isolaram cepas de *Staphylococcus aureus* com resistência intermediária à vancomicina em hospitais do Estado de São Paulo. Estas cepas mostraram-se resistentes a dezenove tipos de antibióticos. Recentemente, Neves *et al.* (2011) descreveram os principais mecanismos relacionados aos fenótipos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos e aminoglicosídeos também em hospitais brasileiros. As principais consequências da resistência bacteriana são o aumento no custo e tempo de tratamento, a necessidade de maior período de hospitalização e de isolamento do paciente, o aumento da frequência e da gravidade de infecções hospitalares e até mesmo o óbito.

A descoberta de novos fármacos antibacterianos é um grande desafio para a indústria farmacêutica moderna. Os modelos tradicionais de desenvolvimento de fármacos, baseados principalmente em química e biologia básica, estão sendo progressivamente substituídos pela integração de especialidades que atuam em caráter multidisciplinar (MODA, 2007). Assim, os estudos interdisciplinares que aliam interação entre a química e a farmacologia, como a avaliação das relações estrutura-atividade (*Structure-Activity Relationship* - SAR) e das interações entre compostos bioativos e receptor, combinados à realização de estudos farmacocinéticos e toxicológicos, experimentais e *in silico* (via computacional), se apresentam como ferramentas úteis que favorecem a obtenção de novos compostos a partir de estruturas químicas protótipo (ARROIO, HONÓRIO e SILVA, 2010).

O interesse por fármacos derivados de plantas tem aumentado expressivamente em todo o mundo. Do ponto de vista histórico, os produtos naturais sempre desempenharam um papel importante no processo de desenvolvimento de fármacos uma vez que a maioria dos medicamentos comercializados atualmente é de origem natural ou de produtos sintéticos inspirados em produtos naturais (SIMÕES, 2010). Calixto e Siqueira (2008) reforçam esta afirmação ao relatarem que cerca de 30% dos medicamentos disponíveis na terapêutica são derivados direta ou indiretamente de produtos naturais.

Nos últimos 10 anos, compostos bioativos obtidos de fontes naturais têm chamado atenção por apresentarem estruturas químicas complexas importantes para interações específicas e reconhecimento por alvos macromoleculares em bactérias patogênicas. Os programas de descoberta de antibióticos de fontes naturais têm sido retomados em algumas indústrias farmacêuticas, levando à aprovação do lipopeptídeo natural daptomicina pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em 2003 e o derivado semi-sintético glicopeptídeo dalbavancina que encontra-se em fase III de triagens clínicas pelo FDA (GUIMARÃES, MOMESSO e PUPO, 2010).

As chalconas são compostos de origem vegetal precursores da via de biossíntese de flavonoides e possuem atividades antibacteriana, anti-inflamatória, antioxidante, anticancerígena e antiviral (DEVIA *et al.*, 1998; HASSAN, 2011). Sua estrutura química relativamente simples, permite variadas modificações estruturais com a finalidade de otimizar o perfil farmacológico observado ou direcioná-las especificamente para uma entre as diferentes atividades biológicas já registradas. Estudos anteriores demonstraram que modificações estruturais nos anéis aromáticos apresentam-se como alternativas viáveis ao desenvolvimento de agentes antibacterianos (DEVIA *et al.*, 1998; NIELSEN *et al.*, 2005;

AVILA *et al.*, 2008;), inclusive contra bactérias patogênicas pertencentes ao grupo *ESKAPE*. Esta classe de compostos mostra-se como alvo importante para a aplicação de métodos utilizados em planejamento de fármacos e é, portanto, o objeto deste estudo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho apresentou como objetivo geral o estudo da obtenção e da determinação das propriedades físico-químicas e biológicas de chalconas com atividade antibacteriana potencial.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aplicação da ferramenta de bioisosterismo clássico na hidroxila presente no anel A da estrutura das chalconas - licochalcona A;
- Síntese, purificação e caracterização estrutural dos compostos amino derivados propostos;
- Avaliação da atividade antibacteriana frente cepas Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Eschericia coli*), bem como avaliação da atividade sinérgica das moléculas sintetizadas;
- Determinação de propriedades físico-químicas, estereoeletrônicas e de lipofilicidade via modelagem molecular dos compostos e posterior avaliação das relações estrutura-atividade (SAR) dos compostos estudados;
- Avaliação dos perfis *Druglikeness* e *Drugscore* e da toxicidade *in silico* das moléculas estudadas.

3 JUSTIFICATIVA

A necessidade de novas substâncias terapêuticas mais eficazes, com baixa toxicidade e maior especificidade tem levado a indústria farmacêutica e pesquisadores a intensificar os estudos para a descoberta de novos fármacos (BARREIRO, 2009). Esse processo começa a ser aplicado aos antibacterianos devido ao desenvolvimento de resistência a muitos antibióticos comumente utilizados, tornando urgente o desenvolvimento de novos fármacos desta classe farmacêutica. Este fato é agravado visto que, desde a descoberta da linezolida e sua entrada no mercado farmacêutico em 2000, a grande maioria dos antibióticos introduzidos neste período são oriundos de modificações moleculares de compostos já existentes (NIELSEN *et al.*, 2004), o que favorece o desenvolvimento de resistência bacteriana.

Dentre os métodos de obtenção de novos fármacos, a modificação molecular, utilizando principalmente o conceito do bioisosterismo, associada a estudos das relações estrutura-atividade (SAR), modelagem molecular e estudos dos parâmetros farmacocinéticos *in silico* são ferramentas amplamente utilizadas para obtenção de moléculas bioativas. Sua aplicação pode resultar na redução de tempo e dos custos em comparação aos métodos clássicos de estudo de compostos bioativos e fármacos (SANT'ANNA, 2009).

As chalconas são também conhecidas como flavonóides de cadeia aberta com estrutura química caracterizada pela presença da porção propenona central que liga dois anéis aromáticos substituídos, denominados A e B. São substâncias muito atraentes para a química medicinal, pois são de fácil obtenção e permitem a realização de diversas modificações estruturais nos dois anéis aromáticos, de acordo com a propriedade físico-química desejada (PRASSAD e RAO, 2011).

Sahu *et al.* (2012) atribuem à algumas chalconas ações antioxidante, citostática, anti-inflamatória, antifúngica, antiviral, antimalárica, antileishmaniose, hipoglicemiante e atuando como inibidoras de tirosinase. Além destas propriedades, a atividade antibacteriana das chalconas está sendo cada vez mais documentada e pode exibir diferentes espectros de atividade, dependendo de substituições nos dois anéis aromáticos (ÁVILA *et al.*, 2008).

Neste contexto, a modificação estrutural de compostos com ação antibacteriana potencial, como as chalconas, combinada à aplicação dos métodos de planejamento de fármacos apresentam-se como alternativas viáveis na busca de novos agentes bioativos.

Baseados em estudos relevantes já realizados, sugere-se uma modificação estrutural da hidroxila de derivados da licochalcona A ligados ao anel A e, também, a inserção de grupos

substituintes do anel B da molécula das chalconas, apresentando-se assim, como substâncias protótipos para o desenvolvimento de novos antibacterianos.

4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.1 AGENTES ANTIBACTERIANOS

A quimioterapia é o termo originalmente usado para descrever o uso de fármacos que são tóxicos para os microorganismos invasores e que também apresentam efeitos mínimos ao hospedeiro (BRUNTON, CHABNER e KNOLLMANN, 2012).

Os antimicrobianos classificam-se em antibacterianos, antifúngicos, antiprotozoários, anti-helmínticos e antivirais. Os antibacterianos são divididos em antibióticos - quando produzidos em parte ou totalmente por processo biológico - e quimioterápicos, quando produzidos por síntese laboratorial (FUCHS, WANNMACHER e FERREIRA, 2006). Entretanto, a denominação de antibióticos prevalece na prática clínica diária, independentemente da origem natural ou sintética.

Os antibióticos são capazes de impedir o crescimento ou eliminar seletivamente outros microorganismos. O componente mais crítico dessa definição é a “seletividade” ou a “toxicidade seletiva” o que exprime um cenário onde o composto deve inibir ou matar o microorganismo sem prejudicar o hospedeiro (BRUNTON, CHABNER e KNOLLMANN, 2012).

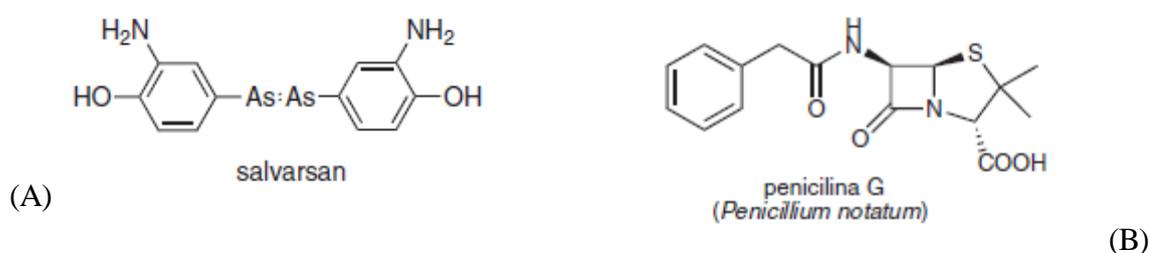
Os agentes antibacterianos podem apresentar formas variadas de classificação para fins de estudo e aplicação na terapêutica. As principais envolvem sua origem, efeito sobre as bactérias, a estrutura química, o mecanismo de ação e o espectro de ação antibacteriana. A classificação segundo sua origem agrupa os antibióticos em compostos de origem natural, sintéticos ou semi-sintéticos. De acordo com o espectro de ação são separados em três categorias: amplo espectro, espectro intermediário e espectro reduzido. Quanto aos efeitos básicos nas bactérias, são bacteriostáticos, atuando através da inibição do crescimento bacteriano e, bactericidas, quando provocam a morte das bactérias (BRUNTON, CHABNER e KNOLLMANN, 2012). A ação bacteriostática ou bactericida de um antimicrobiano está relacionada com o alvo onde o mesmo atua na célula bacteriana. No entanto, este conceito está na dependência da concentração atingida pelo fármaco no meio onde se situa o microorganismo e da sensibilidade deste à ação do princípio ativo (FUCHS, WANNMACHER e FERREIRA, 2006). As bactérias podem ser classificadas em sensíveis e resistentes aos antimicrobianos. Em geral, classificam-se como resistentes as bactérias que crescem, *in vitro* na presença do antibacteriano nas mesmas concentrações utilizadas clinicamente em humanos e são consideradas sensíveis quando não crescem nestas concentrações.

Segundo Brunton, Chabner e Knollmann (2012), a classificação dos antibióticos usualmente utilizada baseia-se na estrutura química e em seu mecanismo de ação. Os principais antibióticos são classificados como agentes que inibem a síntese da parede celular bacteriana (por exemplo, as penicilinas), que atuam na membrana citoplasmática (daptomicina), inibem ou alteram a síntese proteica ou de ácidos nucleicos (tetraciclina) e ainda, que atuam como análogos estruturais de nutrientes (sulfonamidas).

O primeiro agente antibacteriano, o salvarsan (Figura 1A), foi descoberto em 1910 por Paul Ehrlich para o tratamento de sífilis (GUIMARÃES, MOMESSO e PUPO, 2010). Somente em 1934 houve a introdução de um novo agente, a proflavina, amplamente utilizada durante a Segunda Guerra Mundial para tratamento de infecções de feridas profundas. Entretanto, foi com a descoberta das sulfonamidas em 1937, que se obteve a primeira classe de agentes efetivos contra infecções sistêmicas (DAVIES e DAVIES, 2010).

Apesar destes avanços, o grande marco no tratamento das infecções bacterianas ocorreu com a descoberta da penicilina (Figura 1B) por Alexander Fleming em 1928 e introduzida como agente terapêutico em 1940 (GUIMARÃES, MOMESSO e PUPO, 2010; OSÓRIO *et al.*, 2012).

Figura 1 - Estrutura química dos primeiros agentes antibacterianos descobertos.



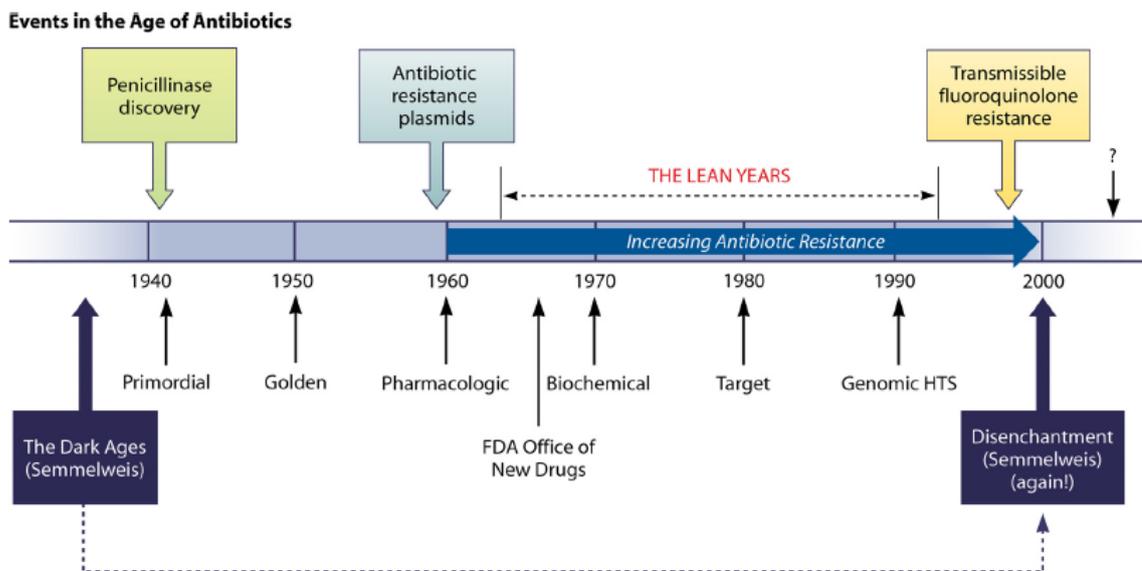
Fonte: Guimarães, Momesso e Pupo, 2010, p. 668.

De acordo com Davies e Davies (2010), entre os anos 1940-1960 a maioria das famílias de antibióticos foram identificadas durante o período chamado de “Era de Ouro”, através de triagens de produtos naturais microbianos, sendo a maioria deles eficazes para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-positivas. Fármacos eficazes para o tratamento de patógenos Gram-negativos foram introduzidos entre os anos de 1960-1980 (GUIMARÃES, MOMESSO e PUPO, 2010), concomitantemente ao período onde os estudos sobre dosagens, utilização e administração de antibacterianos foram aprofundados. A partir da década de 80, as principais ferramentas utilizadas para a busca de novos antibióticos foram a

genômica e as triagens de coleções de compostos, tanto para a projeção de novos fármacos, quanto para o entendimento do mecanismo de resistência bacteriana.

Entretanto, no início do século XXI, devido ao fracasso dos investimentos nos métodos baseados no genoma várias indústrias interromperam o estudo e o desenvolvimento de compostos candidatos a novos antibacterianos. Neste período, em especial o ocorrido entre as décadas de 70 a 90, verificou-se a redução da descoberta e lançamento na terapêutica desta classe de fármacos em comparação às décadas anteriores. A Figura 2 ilustra a história do descobrimento e desenvolvimento dos antibióticos concomitantemente ao surgimento da resistência bacteriana.

Figura 2 – História da descoberta dos antibióticos concomitantemente ao desenvolvimento da resistência bacteriana.



Fonte: Davies e Davies, 2010, p. 419.

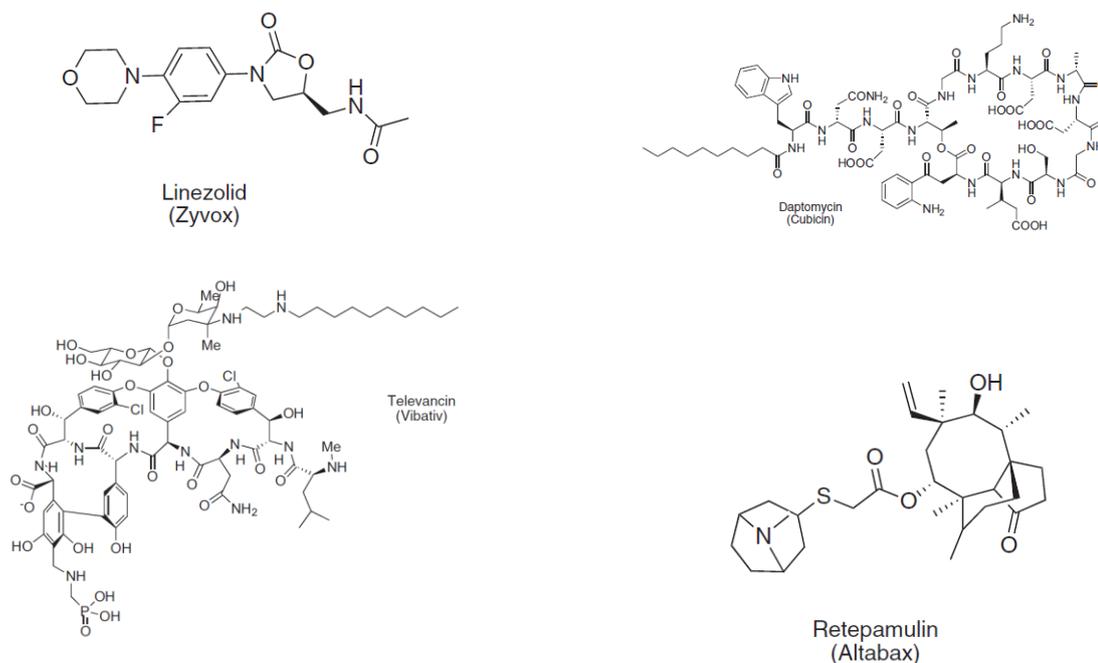
Alguns autores como Nielsen *et al.* (2004), Coates e Hu (2008) e Wright (2012) confirmam a afirmação anteriormente citada, ao relatarem que durante 37 anos (desde a introdução do ácido nalidíxico em 1962, até o ano de 2000), somente foram introduzidos antibacterianos provenientes de modificações de moléculas já existentes, principalmente de β -lactâmicos e fluorquinolonas. Em 2001, apenas um antibiótico de origem sintética da classe das oxazolidinonas foi introduzido no mercado farmacêutico, a linezolida (NIELSEN *et al.*, 2004, GUIMARÃES, MOMESSO e PUPO, 2010), demonstrada na Figura 3.

Em 2003, a daptomicina (Figura 3) foi aprovada para uso parenteral pela agência reguladora de alimentos e medicamentos americana *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos. Ela é membro de uma nova classe de antibióticos bactericidas – Lipopeptídeos – que demonstrou ação *in vitro* contra bactérias Gram positivas via mecanismo de ação distinto de outros fármacos disponíveis no mercado (DAVIES e DAVIES, 2010)

Segundo Brito e Cordeiro (2012), os quatro únicos antibióticos classificados como novas entidades químicas pelo FDA a serem aprovados nos últimos anos foram a tigeciclina (Tygacil®; Pfizer), tetraciclina de última geração aprovada em 2005; a retapamulina (Figura 3) sob o nome comercial Altabax® da GlaxoSmithKline, aprovado em 2008; telavancina (Figura 3), um glicopeptídeo aprovado em 2009 sob nome comercial Vibativ® da Theravance/Astellas e a ceftarolina (Teflaro®; Cerexa), uma cefalosporina aprovada em 2010.

Guimarães, Momesso e Pupo (2010) ressaltam que, atualmente, há apenas três compostos antibióticos com novos mecanismos de ação em estudos pré-clínicos Fase I, sendo que estes são de amplo espectro para microrganismos Gram positivos ou para infecções do trato respiratório.

Figura 3 - Estrutura química de alguns antibióticos mais recentemente introduzidos no mercado farmacêutico.



Fonte: Wright, 2012, p. 05.

4.2 RESISTÊNCIA BACTERIANA

A resistência bacteriana pode ser considerada um fenômeno biológico natural que ocorre como resposta da bactéria frente ao amplo uso de antibióticos e sua presença no meio ambiente (WANNMACHER, 2004; GUIMARÃES, MOMESSO e PUPO, 2010). As taxas de resistência variam de acordo com a região onde a mesma foi detectada e sua incidência depende do consumo local de antibacterianos (WANNMACHER, 2004; BRITO e CORDEIRO, 2012). O uso extensivo e descontrolado desses medicamentos, associados às más condições de higiene, fluxo contínuo de viajantes, aumento de pacientes imunocomprometidos e a demora no diagnóstico das infecções bacterianas têm favorecido o aumento da resistência (DAVES e DAVES, 2010; GUIMARÃES, MOMESSO e PUPO, 2010; LISBOA e NAGEL, 2011).

Existem dois tipos de resistência bacteriana, a natural e a adquirida. A resistência natural ou intrínseca é inerente a uma determinada espécie bacteriana e compõe a herança genética cromossômica do microrganismo. A resistência natural é um caráter hereditário, transmitido verticalmente aos seus descendentes, comandado por genes, que determinam a ausência de receptores para a ação de antibióticos ou a existência de estruturas e mecanismos que impedem a ação do fármaco. Pode-se citar, por exemplo, microorganismos desprovidos de parede celular, como *Mycoplasma pneumoniae*, os quais os antibióticos β -lactâmicos (que atuam inibindo a síntese da mesma) são ineficazes (FUCHS, WANNMACHER e FERREIRA, 2006).

A resistência adquirida decorre do desenvolvimento de novos mecanismos de defesa frente à exposição continuada aos fármacos antibacterianos. Pode gerar-se através de mutações (material genético próprio da bactéria) ou pela aquisição de material genético exógeno, sob a forma de plasmídeo ou transposons (BRUNTON, CHABNER e KNOLLMANN, 2012).

Até o século XX a resistência bacteriana ocorria predominantemente em ambientes hospitalares. Atualmente, a mesma está associada a diversos ambientes e, inclusive, pode atingir indivíduos saudáveis. Estas razões fizeram com que a Organização Mundial da Saúde (OMS) a identificasse como uma das três grandes ameaças à saúde humana neste século (BOUCHER *et al.*, 2009; IDSA, 2010). De acordo com Wannmacher (2004), a resistência bacteriana pode ser controlada por medidas diversas como fixar limites para o uso destes medicamentos ou através do emprego de medidas de saúde pública, como vacinação,

saneamento e cuidados com a água de uso. Outro ponto relevante é a necessidade do desenvolvimento de novos medicamentos antibacterianos eficazes e seguros.

No Brasil, a recente aprovação da Resolução RDC 44/2010 que controla a dispensação de antimicrobianos vem contribuindo para a redução do consumo indiscriminado desses medicamentos (BRASIL, 2010). Da mesma forma, a pesquisa contínua de novos agentes anti-infecciosos permanece indispensável, uma vez que novas classes de antibióticos agindo sobre alvos moleculares completamente diferentes dos atuais não têm sido desenvolvidas há mais de 10 anos (DAVIES e DAVIES, 2010).

A Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (IDSA) lançou a iniciativa “The 10 x 20”, em alusão a um compromisso global para o desenvolvimento de 10 novos fármacos antibacterianos até o ano de 2020 (IDSA, 2010; WRIGHT, 2012). Dois relatórios apresentados em 2009, um pela IDSA e outro pelo Centro Europeu de Controle e Prevenção de Doenças demonstraram que há poucos fármacos capazes de tratar infecções provocadas pelos patógenos *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp*, conhecidos pela comunidade científica mundial como *ESKAPE* (RICE, 2008; LISBOA e NAGEL, 2011; WRIGHT, 2012). Esta ocorrência é agravada pelo fato de que há poucas substâncias com ação antibacteriana em desenvolvimento pelas indústrias farmacêuticas (RICE, 2008; LISBOA e NAGEL, 2011; WRIGHT, 2012).

Apesar de não compartilharem os mesmos mecanismos de resistência, todas as cepas bacterianas citadas são responsáveis por infecções com elevada morbidade e mortalidade em indivíduos infectados em ambientes hospitalares (WRIGHT, 2012). Atualmente, o uso de vancomicina está se tornando alternativa padrão na escolha de agentes terapêuticos, principalmente por falta de opções para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-positivas resistentes. No entanto, verificou-se que em diversos locais do mundo cepas de *Enterococcus* vancomicina-resistentes e *Staphylococcus aureus* vancomicina - parcial resistentes já foram isoladas, o que impede o uso deste fármaco (KURUP *et al.*, 2008). No Brasil, Oliveira *et al.* (2001) isolaram cepas de *Staphylococcus aureus* vancomicina-parcial resistente em hospitais do estado de São Paulo. Estas cepas mostraram-se resistentes a dezenove tipos de antibióticos. Recentemente, Neves *et al.* (2011) descreveram os principais mecanismos relacionados aos fenótipos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos e aminoglicosídeos em hospitais brasileiros.

Além disso, os riscos da resistência bacteriana refletem-se principalmente sobre pacientes imunocomprometidos, como aqueles em tratamento quimioterápico para câncer, transplantados e com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida - AIDS (OSÓRIO, 2012).

Assim, Wannmacher (2004) e Wright (2012) descrevem a resistência bacteriana como uma das mais significantes mudanças no cuidado à saúde no século XXI, visto que as principais consequências do surgimento deste processo são o aumento no custo e tempo de tratamento, a necessidade de maior período de hospitalização e de isolamento do paciente e o aumento da frequência e da gravidade de infecções hospitalares.

Diante destes fatos, evidencia-se a necessidade do lançamento de novos fármacos e novas classes de antibacterianos, tanto para infecções adquiridas em hospitais quanto na comunidade, visto que o fenômeno da resistência impõe sérias restrições às opções disponíveis para o tratamento clínico de muitas infecções bacterianas (BRITO e CORDEIRO, 2012).

4.3 PLANEJAMENTO E DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS

O marco histórico no processo de desenvolvimento da indústria farmacêutica mundial foi a descoberta da salicina (analgésico e antitérmico) por Rafaele Piria em 1829, obtida da planta *Salix alba*. A partir da salicina foi realizada a primeira modificação estrutural, originando o ácido salicílico em 1839 e, em 1897, Felix Hoffman utilizou este material para sintetizar a aspirina (ácido acetil salicílico), o fármaco de maior sucesso na história da medicina. A partir deste evento, nasceu a indústria farmacêutica na Alemanha juntamente com a primeira patente de medicamentos (CALIXTO e SIQUEIRA, 2008). Desde então diversos fármacos foram descobertos e lançados na terapêutica, sendo o processo de seu desenvolvimento realizado através de diferentes técnicas como a triagem empírica, a extração de fontes naturais, modificações moleculares e, por último o planejamento racional (CORRÊA, 2009).

Barreiro e Fraga (2008) exemplificam as descobertas de fármacos ao acaso quando descrevem os antibióticos β -lactâmicos (mais especificamente a Penicilina), os benzodiazepínicos (clordiazepóxido) e, mais recentemente, a nefiprestona (conhecida como a “pílula do dia seguinte”) e o sildenafil, ambos na década de 80. Já a triagem empírica consiste em submeter às substâncias disponíveis a diversos bioensaios de forma aleatória. Como exemplo de triagem empírica racionalmente dirigida pode-se citar o isolamento e

identificação de produtos do metabolismo de medicamentos, como ocorrido com o paracetamol (CORRÊA, 2009).

A extração de fontes naturais refere-se a indicações etnofarmacológicas advindas da medicina popular. Friedrich Serturmer em 1806 foi o pioneiro ao isolar o alcalóide morfina da papoula, fato que marcou uma busca constante por outros compostos bioativos a partir de plantas (CALIXTO e SIQUEIRA, 2008) e que é utilizada até os dias atuais.

O processo de desenvolvimento e planejamento (P&D) de novos fármacos, nos dias atuais, segue um planejamento prévio das etapas de desenvolvimento de compostos candidatos a novos fármacos, no qual a interdisciplinaridade permite a construção de protótipos de fármacos de maneira mais direta, sem que haja a experimentação aleatória (ARROIO, HONÓRIO e SILVA, 2010).

Entre as etapas ou metodologias envolvidas podem-se citar as modificações moleculares, guiadas a partir do conhecimento das propriedades físico-químicas importantes para a atividade biológica desejada, os estudos qualitativos e quantitativos das relações estrutura-atividade (SAR e QSAR), e os estudos *in silico* (via computacional) como a modelagem molecular das estruturas químicas e dos parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos. O desenvolvimento destas tecnologias ou métodos utilizados no planejamento de novos compostos bioativos e fármacos resultaram em significativo aumento dos investimentos em P&D por parte da indústria farmacêutica.

De modo amplo, Lima (2007), Barreiro e Fraga (2008) e Guido *et al.* (2010) descrevem que o processo de descoberta e desenvolvimento de um novo fármaco obedece etapas já bem estabelecidas, estando dividido em três grandes fases: (a) descoberta, que envolve a escolha do alvo terapêutico, identificação e produção de moléculas líderes (*lead compounds*), (b) otimização (melhoramento da estrutura do protótipo simultaneamente aos estudos de ADMET – absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade), e (c) desenvolvimento (aprimoramento da formulação galênica e estudos clínicos).

Na fase de descoberta, uma etapa inicial de extrema relevância é a seleção do alvo molecular ou biomacromoléculas, que engloba diversos fatores, como o entendimento da fisiopatologia da doença em questão, o detalhamento da via bioquímica envolvida, a seleção de uma ou mais proteínas alvo e a validação e o estudo do envolvimento do alvo no tratamento ou cura da disfunção ou doença humana (BARREIRO e FRAGA, 2008). O alvo biológico (ou biorreceptor) selecionado (por exemplo, proteínas, enzimas, receptores) pode ter a sua estrutura tridimensional (3D) conhecida ou não. Porém, os grandes avanços da

genômica e proteômica, aliados à evolução das técnicas de cristalografia de raios-X e ressonância magnética nuclear (RMN) proporcionam um aumento significativo no número de alvos moleculares com estruturas 3D disponíveis no Banco de Dados de Proteínas (FERREIRA, OLIVA e ANDRICOPULO, 2011). O conhecimento da topografia molecular tridimensional do biorreceptor permite o desenho de um novo composto bioligante com propriedades estruturais adequadas ao reconhecimento biomolecular do mesmo, designado de planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor (SBDD, do inglês *structure-based drug design*) (GUIDO *et al.*, 2010). Todavia, nem sempre este bioligante (também conhecido como *Hit*) identificado em ensaios *in vitro* apresentará um perfil de biodisponibilidade adequado, sendo necessário, na maioria das vezes, sua modificação molecular a fim de ajustar propriedades farmacocinéticas e/ou farmacodinâmicas (BARREIRO e FRAGA, 2008).

Em contraste, quando a estrutura do biorreceptor não é conhecida, métodos de planejamento de fármacos baseado na estrutura do ligante (LBDD, do inglês *ligand-based drug design*) podem ser utilizados, explorando propriedades e características de séries de ligantes bioativos, objetivando-se, assim, a identificação de um análogo-ativo. Após a comprovação da atividade farmacológica desejada *in vivo* deste análogo, obtém-se o composto protótipo (GUIDO *et al.*, 2010; FERREIRA, OLIVA e ANDRICOPULO, 2011).

Após a descoberta e otimização deste protótipo ele deverá ter seu perfil de toxicidade avaliado para que possa então ser reconhecido como um candidato a novo fármaco (NCE) (LIMA, 2007; BARREIRO e FRAGA, 2008).

A partir de então, uma Nova Entidade Química (NCE) é identificada no estágio de desenvolvimento pré-clínico dos programas de descoberta de fármacos. Após sua comprovação nas três fases de ensaios clínicos, uma solicitação de nova aplicação de fármaco (NDA - *New Drug Application*) é realizada e após aprovação pelas agências regulatórias, o fármaco entrará no mercado (LIMA, 2007).

Neste cenário, mesmo com a aplicação de métodos modernos de estudo, planejamento e obtenção de compostos bioativos, verifica-se um significativo declínio na descoberta de Novas Entidades Químicas (NCE - *new chemical entities*) nas últimas décadas (LIMA, 2007).

De acordo com Calixto e Siqueira (2008), de cada 30.000 moléculas sintetizadas, 20.000 (66,7%) entram na fase de estudos pré-clínicos, 200 (0,67%) entram na fase I de estudos clínicos; 40 (0,13%) passam para a fase II, 12 (0,04%) entram na fase III e somente 9 (0,027%) são aprovados pelos órgãos regulatórios. Além destes dados, é importante

mencionar que apenas 1 medicamento aprovado (0,003%) satisfaz o mercado, e em função disso, traz retorno para a indústria que o desenvolveu.

4.3.1 Modificação Molecular

A modificação molecular de estruturas químicas de compostos bioativos e fármacos com ação farmacológica reconhecida constitui uma das ferramentas mais utilizadas pela indústria farmacêutica recentemente. Esta metodologia leva à identificação de novos compostos que podem atuar pelos mesmos mecanismos de ação de um protótipo, sendo conhecidos como análogos. Uma destas estratégias de modificação estrutural é o bioisosterismo, que tem sido base para o desenvolvimento de diversos fármacos de uso na terapêutica. Esta metodologia utilizada no desenvolvimento de fármacos é a responsável pela obtenção de agentes terapêuticos intitulados como “*me-too*”, ou seja, compostos estruturalmente muito similares a um fármaco de referência que apresentam reduzidas diferenças no perfil farmacoterapêutico em comparação ao composto original (BARREIRO e FRAGA, 2005).

Esta estratégia é fundamentada na troca de determinados fragmentos moleculares ou grupamentos funcionais por outros similares ou ainda que contenham propriedades físico-químicas semelhantes entre si. Sua aplicação é responsável pela obtenção de diversas inovações parciais e, como exemplos, pode-se citar a ranitidina e o pindolol, ambas modificações da cimetidina e do propranolol, respectivamente (CARVALHO *et al.*, 2003).

As motivações para aplicação do bioisosterismo estão relacionadas às fases farmacocinéticas (através da modulação das propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e excreção) e às fases farmacodinâmicas de um composto bioativo, visando seu aperfeiçoamento (BARREIRO e FRAGA, 2008).

Em 1970, Alfred Burger classificou e subdividiu o bioisosterismo em duas classes: clássico e não clássico (Figura 4 A e B). O bioisosterismo clássico é amparado pela Regra do Hidreto de Grimm, formulada em 1925 e posteriormente ampliada por Erlenmeyer e Hinsberg fundamentando-se na observação da valência dos átomos ou grupamentos, podendo estar incluído também os anéis aromáticos equivalentes ou não. O bioisosterismo não clássico compreende alterações entre grupos funcionais que não atendem as regras eletrônicas e de efeito estérico, porém, podem produzir atividade biológica similar (BARREIRO e FRAGA, 2008).

Figura 4 – Bioisosterismo Clássico (A) e Não-Clássico (B) e suas respectivas tabelas.

(A) Bioisoterismo Clássico:

Monovalentes	Divalentes	Trivalentes	Tertravalentes
F, OH, NH ₂ , CH ₃ , OR	-CH ₂ -	CH-	=C=
Cl, SH, PH ₂ , Si ₃ , SR	-O-	=N-	=Si=
Br	-S-	=P-	=N ⁺ =
I	-Se-	=As-	=P ⁺ =
	-Te-	=Sb-	=As ⁺ =
			=Sb ⁺ =

(B) Bioisoterismo Não-Clássico:

-CO-	-COOH	-SO ₂ NH ₂	-H	-CONH-	-COOR-	-CONH ₂
-CO ₂ -	-SO ₃ H	-PO(OH)NH ₂	-F	-NHCO-	-ROCO-	-CSNH ₂
-SO ₂ -	-tetrazole					
-SO ₂ NR-	-SO ₂ NHR		-OH			
	-SO ₂ NH ₂		-CH ₂ OH		-catechol	
-CON-	-3-hydroxyisoxazole					-benzimidazole
-CH(CN)-	-2-hydroxychromones		-NHCONH ₂			-C ₄ H ₄ S
R-S-R'			-NH-CS-NH ₂			-C ₅ H ₄ N
(R-O-R')	=N-					-C ₆ H ₅
R-N(CN)-	-C(CN)=R'		-NH-C(=CHNO ₂)-NH ₂			-C ₄ H ₄ NH
			-NH-C(=CHCN)-NH ₂			
	-halides					
	-CF ₃					
	-CN					
	-N(CN) ₂					
	-C(CN) ₃					

Fonte: Adaptado Barreiro e Fraga, 2008, p. 274.

Embora o emprego do bioisosterismo envolva grupamentos considerados isósteros, a atividade dos compostos resultantes pode ser modificada drasticamente. Entretanto, quando aliado aos estudos da relação estrutura-atividade (SAR) e à modelagem molecular pode-se ampliar a margem de sucesso no planejamento de compostos candidatos a novos fármacos e delinear a síntese de novas substâncias bioativas (LIMA, 2007).

4.3.2 Estudos da relação estrutura-atividade

Em química medicinal, o termo Relação Estrutura-Atividade (SAR) compreende o estudo dos efeitos que a estrutura química de um composto (ligante) e suas alterações podem causar sobre a atividade biológica. Seu principal objetivo é investigar como a variação da estrutura química afeta a potência biológica ou a afinidade de ligação pelo receptor alvo. Para

Guido *et al.* (2010), as relações estrutura-atividade geralmente são determinadas a partir de alterações na molécula protótipo e a avaliação de sua atividade biológica subsequente.

4.3.3 Modelagem Molecular

A modelagem molecular consiste em um conjunto de ferramentas para a construção, edição e visualização, análise e armazenamento das estruturas de moléculas orgânicas ou de macromoléculas complexas *in silico*, para fins de estudo no desenvolvimento de compostos bioativos (BARREIRO e FRAGA, 2008).

Estas técnicas, disponíveis em uma variedade de programas computacionais específicos, têm sido utilizadas como uma estratégia para a manipulação da estrutura de forma, tamanho e propriedades de candidatos a novos agentes terapêuticos (BARREIRO e RODRIGUES, 1997; CORREA, 2009).

De forma mais específica, Carvalho *et al.* (2003), comentam que a modelagem molecular é a investigação das estruturas e das propriedades moleculares pelo uso de química computacional e técnicas de visualização gráfica, visando fornecer uma representação tridimensional, que auxilia na investigação das interações químicas de um ligante com seu receptor e exploração dos fatores estruturais relacionados ao efeito biológico. Sua utilização permite que as propriedades desejáveis sejam ressaltadas, mediante a retirada, substituição ou introdução de grupos químicos cuja participação na atividade biológica é determinante, ou que possam auxiliar na interação com o receptor (GUIDO *et al.*, 2010). Esta complementaridade permite o estabelecimento de interações relativamente específicas (como por exemplo, interações dipolo-dipolo, íon-íon, ligações de hidrogênio e forças de London), que podem ser obtidas através do uso da modelagem molecular (SANT'ANNA, 2009).

Os dois métodos de cálculos utilizados nos estudos da modelagem molecular são a Mecânica Molecular e a Mecânica Quântica, que são escolhidos de acordo com as propriedades a serem avaliadas e a capacidade computacional disponível para realização dos cálculos (SANT'ANNA, 2009). Na mecânica molecular, as moléculas são descritas como um conjunto de átomos conectados sem considerar os elétrons das moléculas. Na mecânica quântica, consideram-se os núcleos dos átomos e o comportamento ondulatório dos elétrons para o cálculo de energia do sistema. Através disto, a modelagem molecular permite a identificação e quantificação de valores numéricos das propriedades físico-químicas, estruturais e estereo-eletrônicas das moléculas. Neste ponto, as propriedades físico-químicas

passam a ser chamadas de Descritores Moleculares e servem para comparar uma determinada molécula com outra similar a esta. Na literatura são descritos milhares de descritores moleculares, como por exemplo, calores de formação, energias eletrônicas, ordens de ligação, momento de Dipolo, energias de HOMO – *Highest Occupied Molecular Orbital* - e LUMO - *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*, e são importantes no estudo da relação da estrutura química e atividade biológica (BARREIRO e RODRIGUES, 1997).

A energia de HOMO está relacionada ao potencial de ionização do composto e caracteriza a capacidade da molécula em realizar ataques nucleofílicos (doar elétrons) em uma reação química ou interação com outras moléculas, como biorreceptores biológicos. Da mesma forma, a energia de LUMO é relacionada à afinidade eletrônica, caracterizada pela maior propensão do composto em aceitar elétrons em reações ou interações moleculares (BARREIRO e RODRIGUES, 1997).

4.3.4 Estudos de parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos *in silico*

Os estudos das propriedades farmacocinéticas e do efeito tóxico apresentado pelos compostos bioativos têm sido uma abordagem utilizada nos dias atuais no desenvolvimento de fármacos (CARVALHO *et al.*, 2003). Muitas substâncias ativas apresentam alta potência frente a diferentes agentes infecciosos e são promissores a se tornarem agentes terapêuticos, porém seu efeito farmacológico é suplantado pelos efeitos tóxicos, inviabilizando assim, seu uso na terapêutica.

Devido a isso, os estudos de Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicidade (ADMET) são importantes para verificar a viabilidade de um determinado composto bioativo. Estes estudos podem ser realizados experimentalmente ou *in silico*, o que permite a obtenção de resultados que promovem a redução dos custos e do tempo para da realização de procedimentos experimentais por indústrias farmacêuticas. Estes ensaios fornecem informações sobre a toxicidade de maneira anterior aos obtidos por ensaios experimentais, reduzindo a probabilidade de serem descartados na fase clínica (ARROIO, HONÓRIO e SILVA, 2010).

Sabendo-se que os efeitos adversos e tóxicos dos compostos estão diretamente relacionados à sua estrutura química, estes dados são lançados em modelos computacionais, realizando um monitoramento virtual, correlacionando as características estruturais com as

propriedades físico-químicas, a partir de banco de dados fornecidos pelas próprias indústrias farmacêuticas (LIMA, 2007).

Ainda dentro deste contexto, cabe ressaltar uma abordagem teórica dos parâmetros farmacocinéticos, conhecida como A Regra dos Cinco ou, do inglês, *Rules of Five*, iniciada em 1997, quando Lipinski e colaboradores da indústria farmacêutica Pfizer identificaram as propriedades físico-químicas e seus descritores dos compostos que levam a problemas de absorção e permeabilidade de membranas celulares. O estudo foi fundamentado nas propriedades de aproximadamente 2500 fármacos orais comercialmente ativos do banco de dados do *World Drug Index* (WDI) aprovados para a Fase II dos ensaios clínicos (O'SHEA e MOSER, 2008). Com isso, foi possível identificar que uma boa absorção e permeação sejam mais comuns quando o número de grupos aceptores de ligação hidrogênio é menor ou igual a 10 (expresso pela soma de átomos de N e O); o número de grupos doadores de ligação hidrogênio é menor ou igual a 5 (soma de OH e NH na molécula), a massa molecular do composto estudado seja menor ou igual a 500 Da (Daltons) e o cLog P (indicador que expressa a lipofilicidade) menor ou igual a 5 (LIPINSKI, 2004; O'SHEA e MOSER, 2008).

Uma extensão da “Regra dos Cinco” foi formulada após o estudo de uma série de compostos ensaiados em ratos. Com isso, evidenciou-se que compostos com o número de ligações rotáveis menor do que dez (10) e área de superfície polar (PSA) menor ou igual a 140 Å² (ou a soma do número de aceptores e de doadores de ligação hidrogênio menor do que 12) apresentaram melhor biodisponibilidade oral em ratos. Também foi observado que uma reduzida PSA correlaciona-se melhor com o aumento da velocidade de permeação do que a lipofilicidade (cLogP) e que um aumento no número de ligações rotáveis possui um efeito deletério na velocidade de permeação (LIPINSKI, 2004).

Entretanto, algumas classes terapêuticas com boa biodisponibilidade oral constituem exceção a esta regra: antibióticos, antifúngicos, vitaminas e glicosídeos cardiotônicos. De acordo com Lipinski (2004), uma possível explicação para estas substâncias que “violam” sua regra seria que membros destas classes terapêuticas apresentam características estruturais que permitem ao fármaco atuar como substrato para transportadores que ocorrem naturalmente.

4.4 CHALCONAS

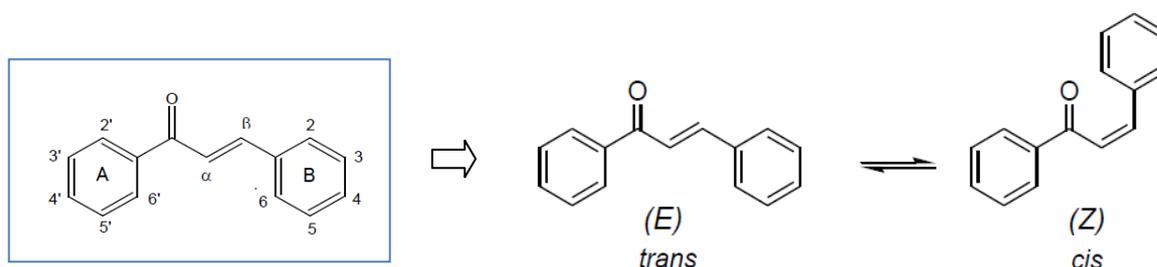
Existem várias classes de compostos orgânicos de origem natural que servem como protótipos para a produção de novos fármacos, como alcaloides, terpenóides, flavonoides,

esteroides, entre outros. A classe dos flavonoides constitui-se de importantes moléculas com potencial farmacológico, destacando-se as chalconas como substâncias de interesse medicinal (CUSHNIE e LAMB, 2005; TRAN *et al.*, 2012).

As chalconas (Figura 5) são compostos precursores da biossíntese dos flavonóides. Apresentam como característica a pigmentação amarela, justificando assim seu nome *chalcos*, que do grego significa bronze. Na forma natural, são abundantemente encontradas na natureza, em plantas rasteiras ou superiores, tanto nas pétalas como em caules, raízes, folhas, frutos e sementes (SIMÕES, 2010).

Estas substâncias podem ser definidas biologicamente como uma classe de compostos pertencentes à família das fitoalexinas produzidas durante a biossíntese de flavonoides (OSÓRIO *et al.*, 2012). Quimicamente, tais compostos são flavonoides de cadeia aberta, também conhecidos por 1,3-difenil-2-propen-1-ona, e possuem como característica estrutural uma carbonila (C=O) e a subunidade olefínica (-C=C-) conjugadas e ligadas, respectivamente, em cada um dos anéis aromáticos constituintes. Estes anéis são identificados como anel A (advindos da cetona) e anel B (advindos do aldeído) conforme demonstrado na figura 5. Seus dois estereoisômeros, Z e E (Figura 5), são precursores comuns na biossíntese de flavonóides e isoflavonóides. Entretanto, estudos demonstraram que, em extratos vegetais, o produto majoritário isolado é o isômero trans, uma vez que estes são considerados mais estáveis termodinamicamente (SIMÕES, 2010).

Figura 5 - Estrutura geral de uma chalcona, com a numeração da cadeia carbônica e indicações dos anéis A e B e os respectivos estereoisômeros.



Fonte: Adaptado de Correa, 2009, p. 21.

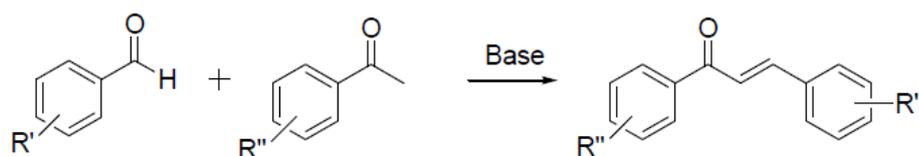
As chalconas são alvo de vários estudos de isolamento, identificação e investigação de propriedades biológicas e farmacológicas, incluindo as atividades antiinflamatória, antioxidante, antitumoral, antimicrobiana, antianginosa, analgésica, antipirética, antiviral,

antimalária, antileishmanial e antialérgica (BANDGAR e GAWANDE, 2010; HASSAN, 2011; TRAN *et al.*, 2012; OSÓRIO, 2012, SAHU *et al.*, 2012).

Um fator de diversificação encontrado nas chalconas naturais é a natureza e posição dos substituintes presentes nos anéis A e B. Geralmente, observam-se grupos hidroxilas, metoxilas, *O*-glicosilas, *C*-glicosilas e *C*-alquilas, distribuídos nas posições *orto*, *meta* e *para*.

Por outro lado, a partir dos advenços da química orgânica sintética é possível produzir esses compostos com uma variedade de substituintes de forma cada vez mais versátil. Para isso, utiliza-se a reação de condensação de Claisen-Schmidt (Figura 6) utilizando hidróxido de sódio (NaOH) ou hidróxido de potássio (KOH) como catalisador e, como solvente, metanol ou etanol à temperatura ambiente (RIBEIRO *et al.*, 2011; HASSAN, 2011).

Figura 6 - Esquema geral da reação de condensação de Claisen-Schmidt utilizada para obtenção do núcleo chalcônico.



A existência da porção da cetona α e β insaturada, de acordo com Sahu *et al.* (2012), é a responsável pela maioria das atividades biológicas observadas para as chalconas. Entretanto, sua retirada resulta em perda de bioatividade e, devido a isso, muitas moléculas bioativas foram e ainda são sintetizadas contendo apenas modificações em ambos anéis (A e B), inclusive com potencial atividade antibacteriana.

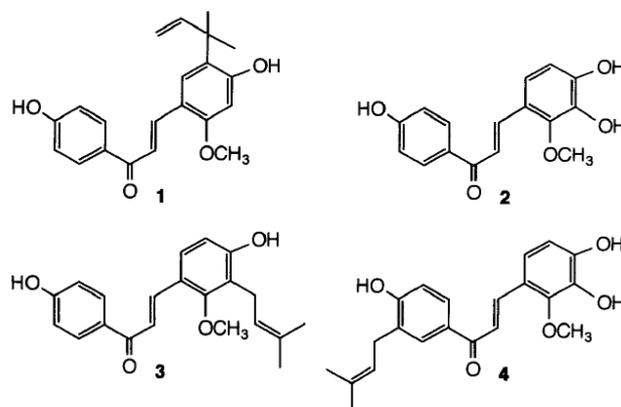
4.4.1 Propriedades antibacterianas das chalconas

O potencial antibacteriano das chalconas tem sido bastante estudado e documentado na última década. Grupos diversos de pesquisadores vêm isolando, sintetizando ou modificando chalconas com esta importante atividade (NIELSEN *et al.* 2004; NIELSEN *et al.* 2005; WU *et al.*, 2012).

Haraguchi *et al.* (1998) isolaram retrochalconas (chalconas que apresentam substituinte oxigenado ligado em posições C-2,3, ou C-2,3,4, ou C-2,4,6), as Licochalconas A, B, C e D (Figura 7) das raízes e rizomas de *Glycyrrhiza inflata*, as quais inibiram o crescimento de bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e

Micrococcus luteus), sendo a Licochalcona A a mais potente. Outros autores como Tsukiyama *et al.* (2002) também testaram a Licochalcona A contra as mais diversas bactérias, como *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Clostridium sporogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus lactis* e *Staphylococcus mutans* determinando atividades antibacterianas promissoras.

Figura 7 – Estrutura das retrochalconas que apresentaram atividade antibacteriana: (1) Licochalcona A; (2) Licochalcona B; (3) Licochalcona C; (4) Licochalcona D.



Fonte: Haraguchi *et al.*, 1998, p. 126.

Kromann *et al.* (2004) sintetizaram análogos da Licochalcona A através da condensação de Claisen-Schmidt e testaram seu potencial antibacteriano contra *Staphylococcus aureus*. Através deste estudo, demonstrou-se que o grupo hidroxil na posição 4' do anel A foi essencial para a atividade antibacteriana, assim como a presença do grupo fenil na posição 5 do anel B. A inserção de grupo hexila alifático em posição *meta*-aromática no anel B resulta em molécula com maior potência que a licochalcona A. Estes dados reforçam as afirmações de que a lipofilicidade deste anel aromático é fator relevante para a atividade antibacteriana e objeto de estudo para o aperfeiçoamento da atividade biológica.

Nielsen *et al.* (2004) sintetizaram 30 moléculas derivadas da Licochalcona A com modificações moleculares (através de bioisosterismo) em ambos os anéis. O anel A teve sua acidez alterada pela substituição do grupo fenol pelo flúor enquanto que o anel B apresentou a troca do grupo fenol pelo ácido carboxílico. Com isso, demonstraram que o grupo hidroxila na posição 4' no anel A associado a substituintes lipofílicos no anel B é essencial para atividade antibacteriana. Além disso, comprovou que com substituições do grupo hidroxila (do anel A) pelo grupo isótero 4-carboxi, obtém-se um composto mais ativo e também mais

hidrossolúvel, sendo apenas bacteriostático e, também, menos tóxico. Estes mesmos pesquisadores, em 2005, novamente estudaram chalconas com inserção de grupamentos volumosos na posição 4' do anel A e mostraram que estas moléculas apresentam pronunciada atividade antibacteriana, correlacionando novamente à lipofilicidade das mesmas.

Ávila *et al.* (2008) avaliaram a atividade antibacteriana de 31 moléculas derivadas de chalconas e constataram que nenhuma das chalconas apresentou boa atividade contra bactérias Gram-negativas, com valores de Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima iguais ou superiores a 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Algumas chalconas com grupo substituinte em posição 4' do anel A foram sintetizadas e submetidas à avaliação da atividade antibacteriana por Kumar *et al.* (2009). Estes autores observaram que algumas 4-aminochalconas, principalmente com grupo cloro ligado ao anel B apresentaram atividade antibacteriana promissora contra cepas de *Staphylococcus aureus*.

Em outro estudo, Prasad, Rao e Rambabu (2009) também avaliaram esta série das aminochalconas tanto para atividade antibacteriana, bem como para as atividades anti-inflamatória e antifúngica. Todos os oito compostos avaliados apresentaram significativa ação antibacteriana contra cepas Gram-positivas (*Bacillus pumilis*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas vulgaris*) comparando-se com a Amicacina e Penicilina G.

Mais recentemente, Wu *et al.* (2012) sintetizaram e avaliaram o potencial antibacteriano (frente a 14 cepas multiresistentes de isolados clínicos) e citotóxico de quarenta chalconas (sendo dez destas da série das 4-aminochalconas), porém foi comprovada apenas uma atividade antibacteriana branda, que pode ser justificada pela utilização de cepas multirresistentes, inclusive insensíveis à levofloxacina. Através do estudo de REA, os autores constataram que os substituintes doadores de elétrons na posição 4 do anel B podem contribuir para a atividade antibacteriana das chalconas.

De acordo com os estudos expostos acima, conclui-se que a modificação estrutural da posição 4 do anel A da estrutura das chalconas ou da hidroxila de derivados da licochalcona A ligados ao anel A e, também, a inserção de grupos substituintes do anel B da molécula das chalconas pode resultar em variação da atividade biológica destes compostos, sendo estas estruturas propostas neste trabalho.

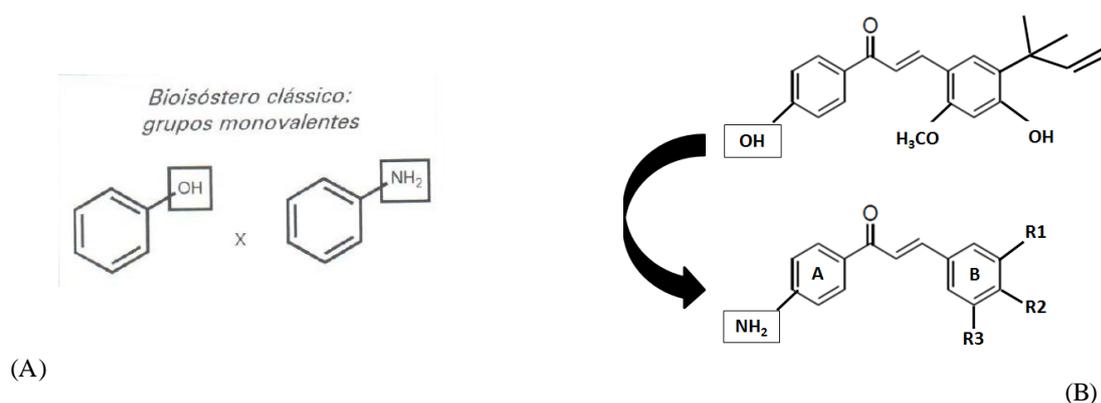
5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 PLANEJAMENTO DOS COMPOSTOS

5.1.1 Substituição no Anel A

Neste estudo propôs-se a substituição, através da utilização da metodologia de bioisosterismo clássico de valência, da hidroxila presente na posição 4' do anel A da Licochalcona pelo grupo amino (demonstrados na Figura 8).

Figura 8 - Padrão de substituição bioisostérica do grupo monovalente hidroxila do composto licochalcona A para a obtenção da série das 4'-aminochalconas.



Fonte: (A) Barreiro e Fraga, 2008, p. 276; (B) Adaptado de Haraguchi *et al.*, 1998, p. 126.

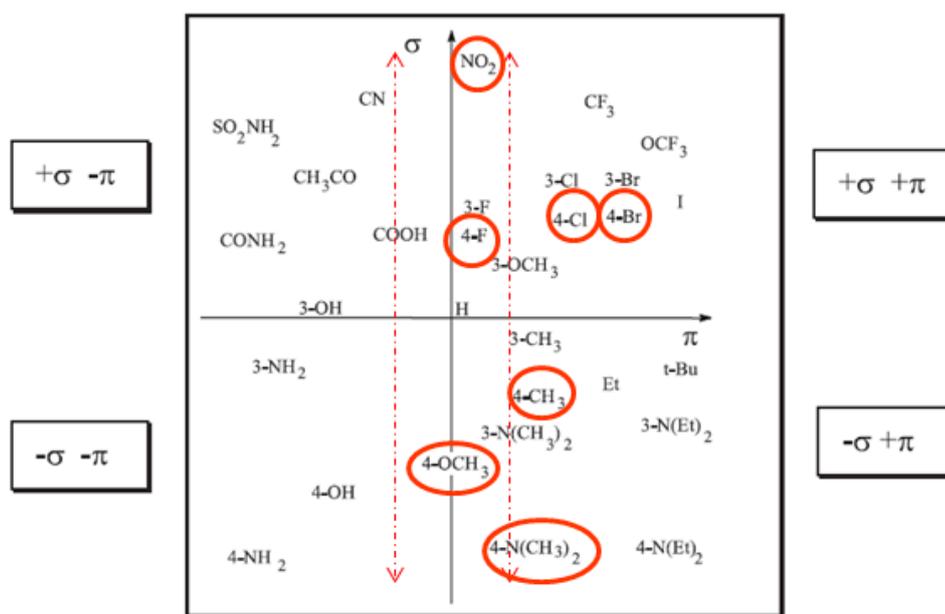
5.1.2 Substituição no Anel B

A variação dos grupos substituintes da série de chalconas ocorreu nas posições *meta* e *para* no anel benzênico B (R_1 , R_2 e R_3) observados na Figura 8, e envolveu grupos com graus variáveis de efeito eletrônico. A escolha ocorreu de acordo com o emprego do Diagrama de Craig (Figura 9), que correlaciona valores de propriedades físico-químicas de hidrofobicidade (π de Hansch) e de efeito eletrônico (σ de Hammett) de grupos substituintes em um diagrama cartesiano bidimensional.

Foram escolhidos inicialmente os compostos contendo grupos funcionais localizados em região que permita variação dos valores de efeito eletrônico (σ de Hammett) no anel B das chalconas, sem variar significativamente os valores de efeito de hidrofobicidade (π de

Hansch). Com esta finalidade, os grupos substituintes escolhidos encontram-se distribuídos ao redor da região caracterizada por uma linha reta paralela ao eixo σ de Hammett e encontram-se grifados em vermelho na Figura 9.

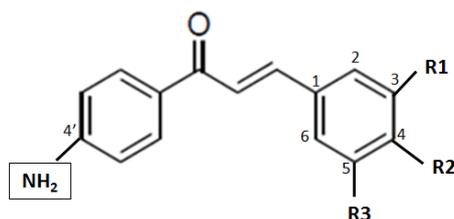
Figura 9 - Diagrama da intercorrelação σ versus π na substituição no Anel B.



Fonte: Adaptado de Tavares, 2004, p. 636.

De acordo com o exposto acima, os grupos substituintes escolhidos para serem ligados no anel B estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Estrutura dos derivados das aminochalconas planejados e sintetizados.



Compostos	R ₁	R ₂	R ₃
1	H	F	H
2	H	NO ₂	H
3	H	N (CH ₃) ₂	H
4	H	Cl	H
5	H	CH ₃	H
6	H	Br	H
7	NO ₂	Cl	H
8	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃

5.2 REAGENTES UTILIZADOS

Os reagentes *p*-aminoacetofenona e os benzaldeídos substituídos são de grau sintético e foram adquiridos comercialmente da marca Sigma-Aldrich[®]. Os demais reagentes utilizados (etanol, diclorometano, dimetilsulfóxido, metanol, entre outros) são de grau analítico das marcas comerciais Sigma-Aldrich[®], Merck[®] e Vetec[®].

5.3 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

Os equipamentos utilizados disponíveis na UNIPAMPA, Campus Uruguaiana, para a realização deste experimento foram: Evaporador rotativo digital Buchi R-215[®], Estufa de cultura bacteriológica, Agitadores Magnéticos com aquecimento, Fusiômetro digital Gehaka PF 1500 FARMA, Micropipetas de volume variável Labmate, Mantas de aquecimento Fisaton, Espectrofotômetro UV Agilent Cary 60.

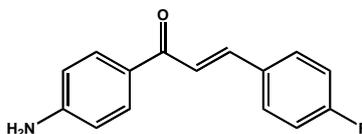
5.4 SÍNTESE E PURIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS

As aminochalconas foram sintetizadas de acordo com a reação de condensação de Claisen-Schmidt utilizando-se a *p*-aminoacetofenona e variando-se os benzaldeídos (mono, di ou trissubstituídos) em quantidades equimolares. A *p*-aminoacetofenona foi dissolvida em metanol seguida da adição da solução de hidróxido de sódio (NaOH) 20% (catalisador) e do benzaldeído e mantida sob agitação à temperatura ambiente por um período variável de 2,5 a 24 horas sob proteção da luz.

As reações foram monitoradas através da Cromatografia em Camada Delgada (CCD), utilizando-se placas de alumínio com sílica gel 60GF 254 da Sigma-Aldrich[®] e visualizando-se as mesmas em luz ultravioleta ($\lambda=254$ e 366 nm). Os eluentes utilizados foram diclorometano puro ou em combinação com etanol a 10%.

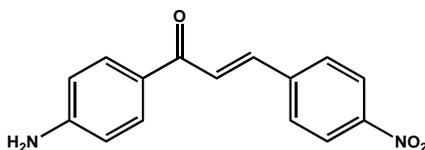
Os compostos foram filtrados sob pressão reduzida e mantidos no dessecador, e novamente foram avaliados por CCD, para verificação da necessidade de purificação a qual ocorreu através de Cromatografia em Coluna ou recristalização com etanol ou dimetilsulfóxido (DMSO) e água.

As sínteses e os métodos empregados para purificação de cada composto estão descritas abaixo de forma específica:

(E)-1-(4-aminofenil)-3-(4-fluorofenil)prop-2-en-1-ona (1)

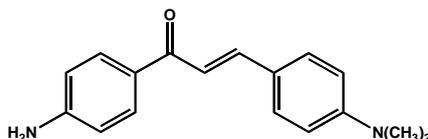
Utilizou-se 2 g (14,79 mmol) da *p*-aminoacetofenona, que foi dissolvida em 8 mL de metanol seguida da adição de 12 mL da solução de NaOH 20%. A seguir, adicionou-se 1620 μ L (14,79 mmol) do 4-fluorbenzaldeído e a mistura foi mantida sob agitação por 24 h à temperatura ambiente. O composto foi purificado por Cromatografia em Coluna utilizando-se como fase estacionária Sílica Vetec[®] (230-400 mesh) e como fase móvel diclorometano puro, aumentando-se a polaridade deste sistema com adição de 10% de etanol (WU *et al.*, 2012). O solvente da solução foi evaporado em evaporador rotativo e o composto recolhido e armazenado no dessecador.

Fórmula molecular: C₁₅H₁₂NFO (241,2 g/mol)

(E)-1-(4-aminofenil)-3-(4-nitrofenil)prop-2-en-1-ona (2)

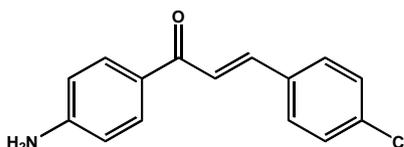
A metodologia foi similar à descrita para o composto 1, porém utilizou-se 1 g (7,4 mmol) da *p*-aminoacetofenona e 1,117 g (7,4 mmol) do 4-nitrobenzaldeído e a mistura foi mantida sob agitação por 24h à temperatura ambiente. O composto foi recristalizado em etanol para purificação, e o solvente da solução foi evaporado em evaporador rotativo. O composto foi recolhido e armazenado no dessecador.

Fórmula molecular: C₁₅H₁₂N₂O₃ (268,2 g/mol)

(E)-1-(4-aminofenil)-3-(4-dimetilaminofenil)prop-2-en-1-ona (3)

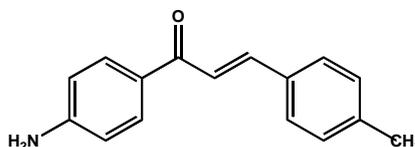
A metodologia foi similar à descrita para o composto 1, porém utilizou-se 1 g (7,4 mmol) da *p*-aminoacetofenona e 1,0138 g (7,4 mmol) do 4-dimetilaminobenzaldeído e a mistura foi mantida sob agitação por 2 h 30 min à temperatura ambiente. O composto foi purificado por Cromatografia em Coluna (igualmente ao composto 1), o solvente da solução foi evaporado em evaporador rotativo e o composto foi recolhido e armazenado no dessecador.

Fórmula molecular: $C_{17}H_{18}N_2O$ (266,3 g/mol)

(E)-1-(4-aminofenil)-3-(4-clorofenil)prop-2-en-1-ona (4)

A metodologia foi similar à descrita para o composto 1, utilizando-se 2 g (14,79 mmol) da *p*-aminoacetofenona e 2,079 g (14,79 mmol) do 4-clorobenzaldeído e a mistura foi mantida sob agitação por 2 h 30 min à temperatura ambiente. O composto purificado foi obtido através de recristalização a frio com etanol.

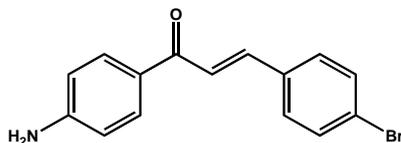
Fórmula molecular: $C_{15}H_{12}NOCl$ (257,7 g/mol)

(E)-1-(4-aminofenil)-3-(4-metilfenil)prop-2-en-1-ona (5)

A metodologia de síntese e purificação foi similar à descrita para o composto 01, porém utilizou-se 1 g (7,4mmol) da *p*-aminoacetofenona e 870 μ L (7,4 mmol) do 4-metilbenzaldeído e a mistura foi mantida sob agitação por 24 h à temperatura ambiente. O composto foi purificado por Cromatografia em Coluna (igualmente ao composto 1), o solvente da solução foi evaporado em evaporador rotativo e o composto foi recolhido e armazenado no dessecador.

Fórmula molecular: $C_{16}H_{15}NO$ (230,3 g/mol)

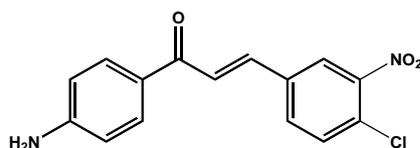
(E)-1-(4-aminofenil)-3-(4-bromofenil)prop-2-en-1-ona (6)



A metodologia de síntese foi similar à descrita para o composto 1, com a utilização de 2 g (14,79 mmol) da *p*-aminoacetofenona e 2,7197 g (14,79 mmol) do 4-bromobenzaldeído e a mistura foi mantida sob agitação por 10 h à temperatura ambiente. O composto purificado foi obtido através de recristalização com DMSO e água.

Fórmula molecular: $C_{15}H_{12}NOBr$ (302,1 g/mol)

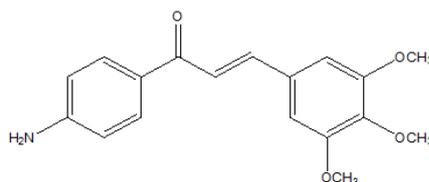
(E)-1-(4-aminofenil)-3-(3-nitro-4-clorofenil)prop-2-en-1-ona (7)



A metodologia foi similar à descrita para o composto 1, porém utilizou-se 0,446 g (3,3 mmol) da *p*-aminoacetofenona e 0,61 g (3,3 mmol) do 3-nitro-4-clorobenzaldeído e a mistura foi mantida sob agitação por 24 h à temperatura ambiente. O composto foi purificado através de recristalização em sistema etanol/água. O composto foi filtrado a vácuo e armazenado em dessecador.

Fórmula molecular: $C_{15}H_{12}N_2O_3Cl$ (302,7 g/mol)

(E)-1-(4-aminofenil)-3-(3,4,5-metóxfenil)prop-2-en-1-ona (8)



A metodologia foi similar à descrita para o composto 1, porém utilizou-se 0,540 g (4 mmol) da *p*-aminoacetofenona e 0,784 g (4 mmol) do 3,4,5-trimetoxibenzaldeído e a mistura foi mantida sob agitação por 24 h à temperatura ambiente. O composto foi purificado por Cromatografia em Coluna (igualmente ao composto 1), e o solvente da solução foi evaporado em evaporador rotativo. O composto foi recolhido e armazenado em dessecador.

Fórmula molecular: $C_{18}H_{19}NO_4$ (313,3 g/mol)

5.5 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS

A comprovação da obtenção das chalconas planejadas foi realizada por meio de análise do ponto de fusão, de espectroscopias de infravermelho e ressonância magnética nuclear de próton (RMN¹H) e carbono 13 (RMN¹³C). Os pontos de fusão dos compostos puros foram determinados através da utilização de fusiômetro digital Gehaka PF 1500 FARMA.

As análises espectrométricas de infravermelho foram realizadas no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), através de espectrofotômetro com transformada de Fourier, pelo modo de Refletância Total Atenuada (ATR – *Attenuated Total Reflectance*).

As análises de RMN¹H e RMN¹³C das aminochalconas purificadas foram obtidas na Faculdade de Farmácia da Universidade de São Paulo (USP) através do aparelho Bruker® DPX utilizando-se como solvente dimetilsulfóxido-hexadeuterado e frequências de 300 e 75 MHz para a análise de próton e carbono 13, respectivamente.

5.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A avaliação da atividade antibacteriana dos compostos obtidos foi realizada através do método de concentração inibitória mínima (CIM) seguindo metodologia de microdiluição do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2009). Os ensaios foram realizados no Laboratório de Microbiologia na UNIPAMPA, Campus Uruguaiana, sob supervisão da Professora Doutora Priscila de Arruda Trindade.

5.6.1 Cepas bacterianas utilizadas

As Cepas utilizadas para a avaliação da atividade bacteriana foram *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e de isolado clínico humano (N315) e *Escherichia coli* ATCC 25922, disponíveis na UNIPAMPA, Campus Uruguaiana. A cepa N315 foi cedida pela Dr. Keichiy Hiramatsu.

5.6.2 Preparo do meio de cultura para o ensaio de Microdiluição

O meio de cultura utilizado foi o caldo Mueller-Hinton (Difco®) Cátion Ajustado (CAMHB ou MHCA), de acordo com as especificações do CLSI (2009). O preparo do meio ocorreu de acordo com as instruções do fabricante.

Em seguida, foi necessário o preparo das soluções padrão de Cloreto de Cálcio e Magnésio na concentração de 10 mg.mL^{-1} cada uma, as quais foram esterilizadas por filtração e armazenadas para serem adicionadas posteriormente ao caldo Mueller-Hinton (frio). Foi realizada a verificação do pH (ideal entre 7,2 a 7,4) e, a partir desta etapa, a solução de cloreto de sódio (NaCl 2% p/v), foi adicionada ao meio de cultura antes da autoclavação. A adição deste sal é recomendada pelo CLSI (2009) para testes com oxacilina contra estafilococos.

5.6.3 Preparo da suspensão bacteriana

Os isolados bacterianos foram cultivados em placas de Petri com Ágar Mac Conkey (*Escherichia coli*) e Ágar Sangue de carneiro 5% (*Staphylococcus aureus*) por 18-24 horas. A partir desse crescimento bacteriano, foi preparada uma suspensão bacteriana na escala 0,5 de McFarland ($\sim 1,5 \times 10^8$ UFC/mL), concentração esta determinada por espectrofotometria, com densidade óptica de 0,08 a 0,1 em comprimento de onda de 625 nm. Esta suspensão foi diluída 1:100 em solução fisiológica ou CAMHB ($\sim 1,5 \times 10^6$ UFC/mL) durante a execução do ensaio de microdiluição (CLSI, 2009).

5.6.4 Preparo da solução estoque

As soluções estoque dos compostos derivados das chalconas e dos antibióticos de referência (oxacilina para *S. aureus* e cloranfenicol para *E. coli*) foram preparadas a uma concentração final de 10 mg.mL^{-1} . Para cada composto foi empregado o solvente adequado, conforme os procedimentos padronizados pelo CLSI (2009).

As aminochalconas foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) e água destilada (80:20). Esta solução estoque foi diluída até atingir a concentração do composto a ser estudado e a concentração final de DMSO foi a 8% nos orifícios da micropalaca. A concentração de DMSO foi previamente testada, comprovando-se que até a concentração de 11% não há a inibição do crescimento bacteriano pelo mesmo.

A oxacilina e cloranfenicol foram diluídos em água Milli-Q estéril no momento da realização do ensaio de microdiluição atingindo a concentração de $256 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a partir da solução estoque de concentração igual a $10.000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

5.6.5 Método de Microdiluição em Caldo

Este ensaio é chamado de microdiluição, pois envolve o uso de pequenos volumes de caldo colocados em placas de plástico estéreis, próprias para microdiluição, com 96 orifícios de fundo redondo dispostos em 12 colunas com 8 poços cada (Figura 10).

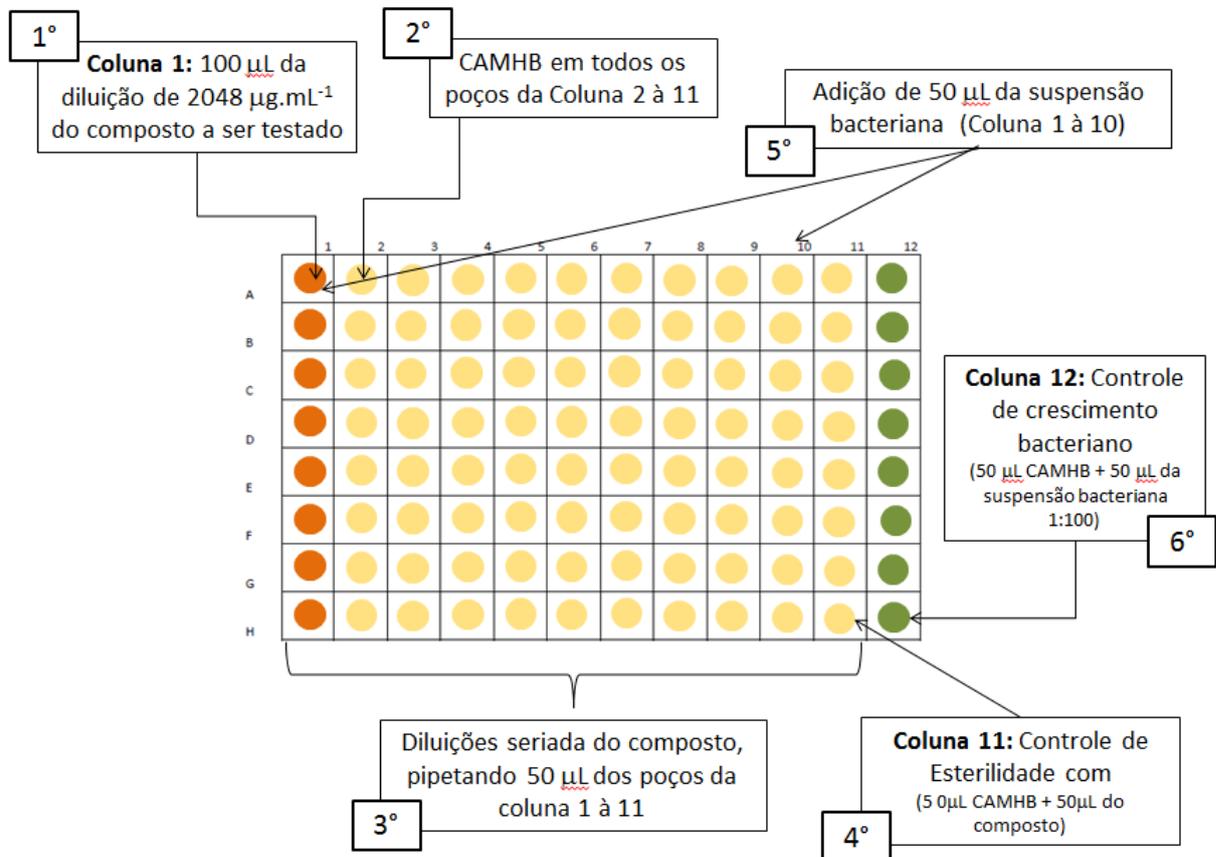
Foram adicionados $50 \mu\text{L}$ de meio de cultura caldo Mueller-Hinton cátion ajustado (CAMHB) em todos os poços da microplaca, exceto na coluna 1, onde foram adicionados apenas $100 \mu\text{L}$ da diluição a $2048 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ do composto a ser testado.

Com uma pipeta multicanal, foi realizada a diluição seriada do antimicrobiano, pipetando $50 \mu\text{L}$ dos poços da coluna 1 para os poços da coluna 2. Posteriormente, foi realizada a homogeneização com a pipeta e em seguida foi pipetado $50 \mu\text{L}$ dos poços da coluna 2 para a coluna 3 e repetiu-se este procedimento até os poços da coluna 11, tendo este um volume final de $100 \mu\text{L}$ ($50 \mu\text{L}$ do meio + $50 \mu\text{L}$ da droga), sendo este designado como controle de esterilidade. Sendo assim, as concentrações testadas para as chalconas abrangeram os cortes de $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a $1024 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Em seguida, adicionou-se $50 \mu\text{L}$ da suspensão bacteriana em todos os poços da coluna 1 até 10. Os poços da última coluna (12) são utilizados como controle de crescimento bacteriano, ou seja, serão adicionados $50 \mu\text{L}$ de meio de cultura CAMHB mais $50 \mu\text{L}$ da suspensão bacteriana.

Após estes procedimentos, as placas foram incubadas em estufa por 24 horas a 35°C .

Figura 10 - Passos do Ensaio de Microdiluição executado no Laboratório de Microbiologia (UNIPAMPA/Campus Uruguaiiana) de acordo com a metodologia CLSI (2009) para *S. aureus* e *E. coli*.



5.6.5.1 Leitura das CIMs e Interpretação dos resultados

A leitura foi realizada em local iluminado, com auxílio de um espelho para leitura de microplacas. A CIM foi determinada de acordo com a observação macroscópica de crescimento bacteriano conforme CLSI (2009).

5.6.6 Análise estatística

Os testes foram realizados em duplicata para cada placa e o composto foi testado em triplicata em dias alternados. Foi aplicado o Teste *t*-Student para a verificação da existência de diferença entre os tratamentos realizados nas distintas datas.

5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SINÉRGICA

A avaliação da atividade sinérgica dos compostos obtidos foi realizada através do teste de *checkerboard* de acordo com *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols* (SCHWALBE, MORE e GOODWIN, 2007). Os ensaios foram realizados no Laboratório de Microbiologia na UNIPAMPA, Campus Uruguaiana, sob supervisão da Professora Doutora Priscila de Arruda Trindade.

Os itens relacionados ao preparo do meio de cultura, das soluções estoque e das suspensões bacterianas, bem como cepas bacterianas utilizadas e a análise estatística empregada foram os mesmos relatados na avaliação da atividade antibacteriana.

5.7.1 Procedimento

Inicialmente, é necessário o preparo de duas microplacas (ou painéis), uma delas contendo o antibiótico Oxacilina (para *S. aureus*) ou Cloranfenicol (para *E. coli*), denominada Painel 1 e outra contendo o composto a ser testado (Painel 2), para que então as diferentes concentrações das duas substâncias (4'-aminochalcona e o antibiótico) sejam testadas juntamente frente à mesma cepa bacteriana.

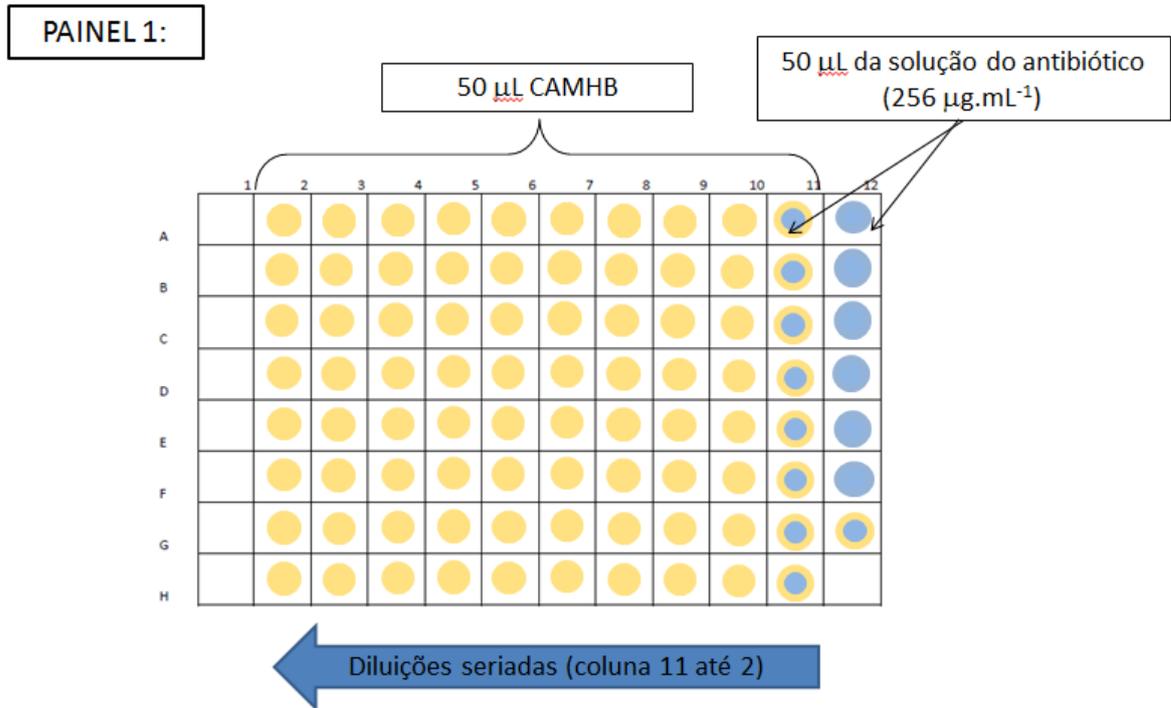
5.7.1.1 Preparo dos painéis 1 e 2:

Para o preparo do Painel 1 foram adicionados 50 μL de CAMHB em todos os poços da microplaca, exceto na coluna 1 e 12, porém no poço G12 o mesmo foi adicionado. Em seguida, adicionou-se 50 μL da solução do antibiótico (oxacilina ou cloranfenicol) na concentração de $256\mu\text{g.mL}^{-1}$ nos poços A12 a G12 e A1 a H11. Com uma pipeta multicanal, foram realizadas diluições seriadas, pipetando 50 μL dos poços da coluna 11 até a coluna 2, onde descartou-se 50 μL , conforme mostra a Figura 11 (A).

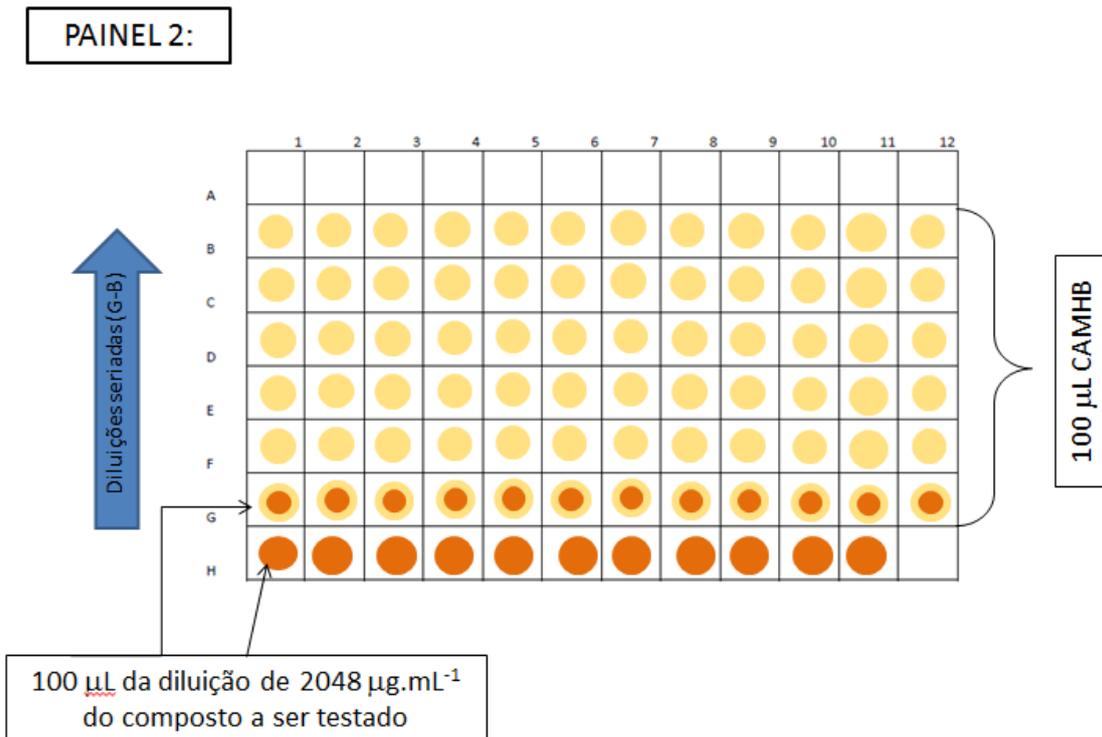
Para o Painel 2, pipetou-se 100 μL de CAMHB em todos os poços da microplaca, exceto nas linhas A e H e adicionou-se 100 μL da solução do composto a ser testado (chalcona) na concentração de $2048\mu\text{g.mL}^{-1}$ nos poços H1 a H11 e G1 a G12. Em seguida, procederam-se diluições seriadas da linha G à B, com descarte de 100 μL restantes da linha B (Figura 11 B).

Figura 11 – Esquema de preparo do Painel 1 (A) e Painel 2 (B) nos ensaios de *checkerboard*.

(A)



(B)



Após ambos os painéis estarem prontos, com uma pipeta multicanal, pipetou-se 50 μL da linha B1 a B11 do painel 2 e dispensou-se na linha correspondente no painel 1, até a linha H. As concentrações do antibiótico e da chalcona investigada está demonstrada na Figura 12.

Figura 12 – Concentrações das soluções ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) do antibiótico (em azul) e da chalcona testada (em laranja).

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	
B	32	0,25 32	0,5 32	1 32	2 32	4 32	8 32	16 32	32 32	64 32	128 32	256
C	64	0,25 64	0,5 32	1 32	2 64	4 32	8 32	16 32	32 32	64 32	128 32	256
D	128	0,25 128	0,5 128	1 128	2 128	4 128	8 128	16 128	32 128	64 128	128 128	256
E	256	0,25 256	0,5 256	1 256	2 256	4 256	8 256	16 256	32 256	64 256	128 256	256
F	512	0,25 512	0,5 512	1 512	2 512	4 512	8 512	16 512	32 512	64 512	128 512	256
G	1024	0,25 1024	128 1024	1 1024	2 1024	4 1024	8 1024	16 1024	32 1024	64 1024	128 1024	256
H	2048	0,25 2048	128 2048	1 2048	2 2048	4 2048	8 2048	16 2048	32 2048	64 2048	128 2048	

5.7.1.2 Inoculação e incubação do painel *checkerboard*:

Neste processo, pipetou-se 50 μL da suspensão bacteriana com uma pipeta multicanal em todos os poços exceto no H12 (Controle de Esterilidade) e, assim, o poço A1, que apenas possui a suspensão bacteriana (inoculo), ficou caracterizada como Controle de Crescimento.

Em seguida, a placa foi incubada em estufa a 35°C (com variação permitida de mais ou menos 2°C) por 16-20 horas para posterior leitura dos resultados.

5.7.2 Cálculo e Interpretação dos resultados

O crescimento bacteriano foi registrado em local iluminado através de observação macroscópica em todos os poços. Os resultados de CIM para a oxacilina e cloranfenicol foram obtidos a partir da observação dos poços A2-A12, enquanto que para as chalconas testadas, nos poços B1-H11.

Para a interpretação do resultado para o efeito sinérgico, é realizado um cálculo através do somatório dos índices de concentração inibitória fracional (*Fractional Inhibitory Concentration* – FIC). Para isso, primeiramente são realizados os cálculos de FIC para cada composto testado, seguido do cálculo da soma do índice FIC (ΣFIC) para cada combinação, de acordo com as equações demonstradas na Figura 13.

Valores para Σ FIC menores ou iguais a 0,5 indicam um efeito sinérgico; Σ FIC maior que 0,5 e menor ou igual a 0,75 correspondem a um efeito parcialmente sinérgico; Σ FIC com valores entre 0,75-4,0 indicam indiferença e Σ FIC maior que 4,0, antagonismo.

Figura 13 – Fórmulas matemáticas utilizadas para cálculo de resultados da atividade sinérgica

$$\text{FIC (A)} = \frac{\text{CIM (A) na combinação}}{\text{CIM (A) sozinho}} \quad (\text{Equação 1})$$

$$\text{FIC (B)} = \frac{\text{CIM (B) na combinação}}{\text{CIM (B) sozinho}} \quad (\text{Equação 2})$$

$$\Sigma\text{FIC} = \text{FIC (A)} + \text{FIC (B)} \quad (\text{Equação 3})$$

5.8 MODELAGEM MOLECULAR

A modelagem molecular foi utilizada para a determinação da estrutura química em 3D e para o cálculo de valores de propriedades físico-químicas e descritores moleculares dos compostos estudados. Estas propriedades foram utilizadas para o estudo da relação estrutura-atividade (SAR) das moléculas propostas.

Foi utilizado o programa computacional *Spartan '08 for Windows* (Wavefunction, Inc., em ambiente Windows®) para desenho, otimização de geometria molecular da estrutura e cálculos dos valores das propriedades dos descritores moleculares (energia de HOMO e LUMO), através do emprego dos métodos semi-empírico AM1 e empíricos *ab initio* e teoria do funcional de densidade com o emprego de base de dados teóricos 6-31G*.

O programa *Chem3D Ultra* (CambridgeSoft, USA), foi utilizado para a determinação do descritor de efeito lipofílico, clogP , referente ao coeficiente de partição da molécula.

Os programas acima citados encontram-se disponíveis para uso na UNIPAMPA, Campus Uruguaiana, sob responsabilidade do Fávero Paula.

A propriedade físico-química do coeficiente de difusão ($\text{Log } D_{7.4}$) foi calculada com o emprego de programa computacional *MarvinSketch 6.2*, ChemAxon, USA, com licença acadêmica disponível para o Campus Uruguaiana da UNIPAMPA.

Os compostos foram também estudados através da aplicação da Regra dos Cinco de Lipinski (Lipinski, 2004), através do emprego do programa gratuito *on line Molinspiration*,

através do JME Editor, cortesia de Peter Erti da Novartis, que se encontra disponível no site <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>, onde se determinaram valores de área de superfície polar (PSA), peso molecular, número de grupos aceptores e doadores de ligação de hidrogênio (nON e nOHNH respectivamente).

5.9 DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES DE TOXICIDADE *IN SILICO*, *DRUGLIKENESS* E *DRUGSCORE*

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

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 PLANEJAMENTO DOS COMPOSTOS

Foram planejados oito compostos derivados de chalconas com modificações em ambos os anéis, mantendo-se a porção estrutural da cetona ligada aos carbonos α - β insaturados.

Conforme já descrito anteriormente, a alteração proposta para o anel A baseou-se no emprego do bioisosterismo clássico de valência, pois ocorreu através da substituição de um grupo OH por um NH₂ (fragmentos monovalentes). De acordo com Barreiro e Fraga (2008), a metodologia do bioisosterismo ocupa lugar de destaque dentre as estratégias para o planejamento, desenho e modificação molecular para a descoberta de novos compostos protótipos devido à sua versatilidade.

Para o anel benzênico B, as alterações dos grupos substituintes da série de chalconas ocorreram nas posições *meta* e *para* com a variação de efeito eletrônico, expresso pelo descritor estrutural σ de Hammett. O citado parâmetro tem sido amplamente utilizado em estudos de REA como medida da reatividade e de efeito eletrônico de grupos substituintes, uma vez que mede a contribuição individual destes grupos para a eletronegatividade da molécula como um todo (TAVARES, 2004).

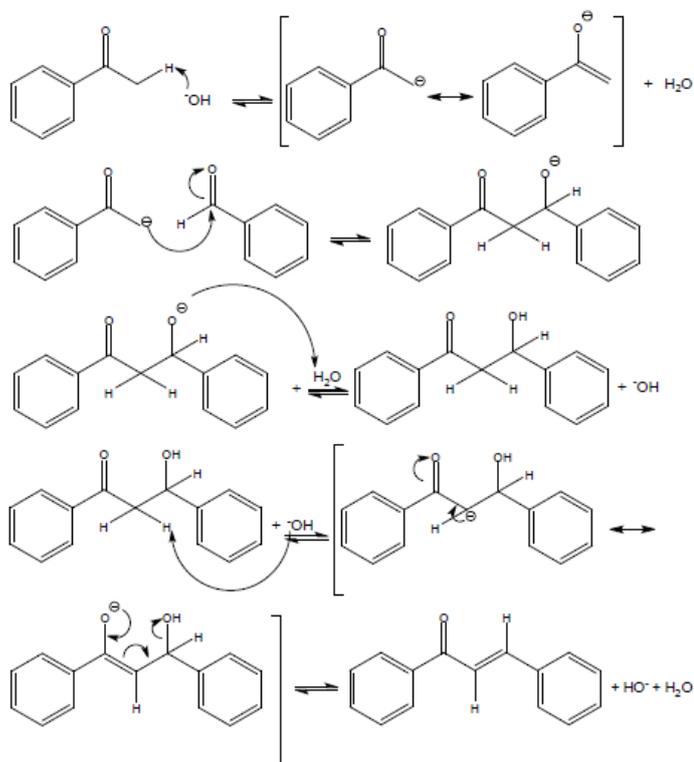
Os compostos foram escolhidos de acordo com o emprego do Diagrama de Craig, ferramenta esta que fundamenta diversas técnicas mais atuais de desenvolvimento racional de novos fármacos e se apresenta como uma metodologia adequada para a escolha de grupos substituintes visando o delineamento de série de compostos análogos para o estudo de REA pela Análise de Hansch (TAVARES e FERREIRA, 2006).

Tavares (2004) cita que para a escolha adequada de grupos substituintes na definição de séries para o estudo da atividade biológica relacionada a estes dois descritores estruturais, é aconselhável a seleção de substituintes em quadrantes diferentes. Por outro lado, quando o objetivo é a análise da influência de uma única propriedade físico-química afetando o efeito biológico, deve-se escolher substituintes traçando-se uma linha imaginária paralela ao eixo da propriedade a ser estudada.

6.2 SÍNTESE, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS

Para a síntese das 4'-aminochalconas, reagiram-se quantidades equimolares da 4-aminoacetofenona variando-se os benzaldeídos, através da reação de condensação aldólica de Claisen-Schmidt. Esta reação de Claisen-Schmidt inicia-se com a condensação aldólica, seguida por desidratação básica (Figura 14). Na primeira etapa da reação ocorre a desprotonação da cetona, onde o catalizador básico remove o hidrogênio alfa ácido da molécula para formar um carbânion que é estabilizado por ressonância. Este carbânion, através de um ataque nucleofílico, ataca o carbono carbonílico do aldeído formando um íon alcóxido (intermediário tetraédrico), que ao ser protonado por um dos átomos de hidrogênio da água (solvente da reação) gera o produto da condensação e regenera o catalizador básico. A formação da enona conjugada ocorre por desidratação. Nesse caso, em condições básicas, um hidrogênio ácido é abstraído da posição alfa para resultar na geração de um íon enolato que elimina o grupo de saída (-OH) formando assim, a chalcona (VOGEL, 1989).

Figura 14 - Mecanismo de condensação de Claisen-Schmidt.



Fonte: Adaptado de Vogel, 1989, p.1017

As 4-aminochalconas com os substituintes 4-F (**1**), 4-NO₂ (**2**), 4-N(CH₃) (**3**), 4-Cl (**4**), 4-CH₃ (**5**), 4-Br (**6**) e 3,4,5-OCH₃ (**8**) apresentam sínteses relatadas na literatura (CAMPOS-

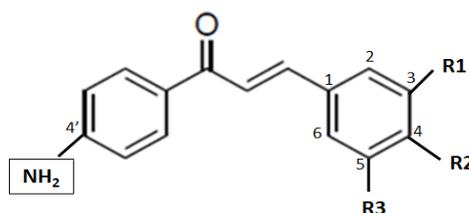
BUZZI, 2007; JHA *et al.*, 2007; PRASSAD, RAO e RAMBABU, 2009; KUMAR *et al.*, 2009; TOMAR *et al.*, 2010; ZERAIK *et al.*, 2012). O composto contendo os grupos 3-NO₂-4-Cl (**7**) ligados ao anel B da estrutura das chalconas não apresenta citação em pesquisa realizada no sítio eletrônico *SciFinder Scholar*, da *Chemical Abstracts*, e não possui número de CAS, sendo, desta forma, considerado inédito.

Os resultados das reações estão expressos na Tabela 2. Ao analisar estes dados, pode-se observar que as reações apresentaram bons rendimentos, porém variados (52-94%). Esta variação de rendimento dos diferentes compostos é comumente registrado na literatura. Wu *et al.* (2012) sintetizaram 40 chalconas com substituintes diversos e encontraram uma variação de 10-95% nos rendimentos e, notaram que de um modo geral, os rendimentos de reações utilizando NaOH como catalisador foram maiores em comparação a reações que utilizaram HCl. Correa (2009), ao sintetizar 13 chalconas também pelo método de condensação de Claisen-Schmidt, relatou um rendimento médio de 76%, enquanto que Bandgar e Gawande (2010) encontraram valores entre 70-93% e Tomar *et al.* (2010), entre 59-67%.

O rendimento do composto **1** de 93% foi superior aos dados já relatados na literatura (PRASSAD, RAO e RAMBABU, 2009; ZERAIK *et al.*, 2012). Os valores aqui encontrados para os compostos **2** (85,08%), **3** (52,03%) e **5** (82,53%) aproximam-se muito dos relatados por Campos-Buzzi (2007), onde igualmente utilizou-se como metodologia para síntese a agitação em temperatura ambiente, respectivamente, 88%, 53% e 82%. Todavia, Zeraik *et al.* (2012) descreveram valor inferior para o composto **5** (39% de rendimento), porém o método de síntese utilizou como catalisador, hidróxido de lítio seguido de resfriamento com água. Resultados inferiores também foram descritos por Krumar *et al.* (2009) para os compostos **4** e **6**, respectivamente de 78% e 70%, onde também empregou-se agitação constante sob frio/gelo. Prasad, Rao e Rambabu (2009), utilizaram como metodologia para síntese a agitação sob temperatura ambiente, e citam valores superiores aos achados por autores que utilizaram agitação sob gelo para o composto **4** (77%). Porém, mesmo assim, inferior ao encontrado neste estudo. O composto **8** apresentou valor de rendimento muito próximo ao relatado por Prasad, Rao e Rambabu (2009), de 71%.

Em todas as reações houve a ocorrência de impurezas e/ou sub-produtos. Para purificação dos compostos **1**, **3**, **5** e **8** foi realizada Cromatografia em Coluna inicialmente com diclorometano puro, aumentando-se a polaridade do sistema com a adição de 10% de etanol; para os compostos **2**, **4** e **7** foi realizada recristalização em etanol e, igualmente para o composto **6**, porém com a utilização de DMSO e água.

Tabela 2 - Dados da síntese das aminochalconas.



Código	Radical	Tempo de Reação (h)	Rendimento (%)	Ponto de Fusão (°C)	Fator de Retenção (Rf)
1	R ₁ ,R ₃ : H R ₂ : F	24	93,98	135,6-138,4	0,51
2	R ₁ ,R ₃ : H R ₂ : NO ₂	24	85,08	216,9-218,4	0,31
3	R ₁ ,R ₃ : H R ₂ : N(CH ₃) ₂	2,5	52,03	176,5 - 177,1	0,30
4	R ₁ ,R ₃ : H R ₂ : Cl	2,5	94,97	157,4–160,3	0,27
5	R ₁ ,R ₃ : H R ₂ : CH ₃	24	82,53	144,3 - 146,8	0,34
6	R ₁ ,R ₃ : H R ₂ : Br	10	90,60	157,1 - 158,3	0,22
7	R ₁ : NO ₂ ; R ₂ : Cl R ₃ : H	24	75,9	216,3- 218,1	0,13
8	R ₁ , R ₂ , R ₃ : OCH ₃	24	71,9	160,1-162,9	0,31

A tabela 2 demonstra ainda o tempo reacional empregado na síntese de cada composto, bem como seus respectivos pontos de fusão e fator de retenção, o qual foi calculado através de valores obtidos por cromatografia em camada delgada utilizando-se diclorometano como eluente. Os valores de ponto de fusão determinados não foram corrigidos e demonstram pequena variação em relação aos já relatados na literatura (Tabela 3), sendo este um dos parâmetros utilizados para comprovação da obtenção das chalconas planejadas.

Tabela 3 - Faixa de Fusão (°C) dos compostos sintetizados.

Composto	Experimental	Literatura
1	135,6 - 138,4	142 ^b
2	216,9 - 218,4	219,3-219,8 ^a
3	176,5 - 177,1	182,7 - 184,9 ^a
4	157,4 - 160,3	158 ^b
5	144,3 - 146,8	144,5 - 145 ^a
6	157,1 - 158,3	150-152 ^c
7	216,3 - 218,1	-
8	160,1-162,9	160 ^b

^aCampos-Buzzi (2007); ^bPrassad, Rao e Rambabu (2009); ^cKumar *et al.* (2009)

Além da verificação do ponto de fusão, foram utilizadas para a comprovação da obtenção das chalconas propostas, análises de infravermelho e ressonância magnética nuclear de próton (RMN¹H) e carbono 13 (RMN¹³C). Entretanto, para o composto **6**, os dados referentes às análises espectroscópicas de RMN¹H e RMN¹³C não foram obtidas, visto que o mesmo não havia sido purificado no momento do envio das amostras para análise para a Faculdade de Farmácia da USP.

De acordo com Correa (2009), as chalconas podem ser facilmente caracterizadas por espectroscopia de infravermelho, devido à presença de grupamentos funcionais característicos, como a carbonila e a insaturação conjugada à mesma (Tabela 4).

Tabela 4 - Frequências características de grupos funcionais encontrados nas aminochalconas.

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

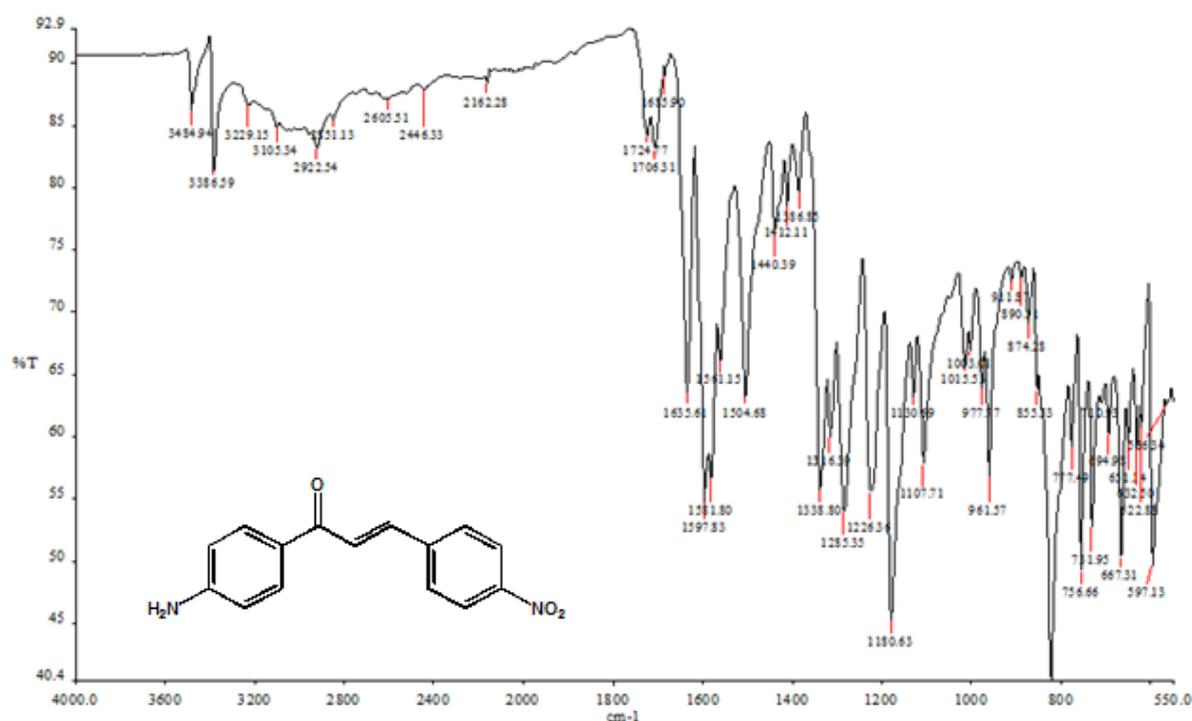
Fonte: Adaptado de Pavia *et al.*, 2010.

Os espectros da 4-aminochalcona **2** foram selecionados para uma análise mais detalhada, a título de ilustração, tanto para o Infravermelho quanto para a Ressonância Magnética Nuclear de Próton e Carbono 13. Os demais espectros dos compostos propostos seguem em anexo a esta dissertação.

No espectro demonstrado na Figura 15, verifica-se a presença de duas deformações axiais em 3484 e 3386 cm^{-1} caracterizando a amina primária (N-H), uma deformação em 1635 cm^{-1} relacionada ao grupo carbonila (C=O) e outra em 1597 cm^{-1} referente à ligação C=C. De acordo com Silverstein, Webster e Kiemle (2012), o efeito de ressonância causado pelo grupo amina e o sistema conjugado da chalcona, aumentam o comprimento das ligações e reduzem a frequência da absorção C=O e C=C.

Além disso, é possível a observação de uma deformação angular em 850 cm^{-1} dos anéis aromáticos *para* substituído e um estiramento simétrico forte em 1338 cm^{-1} e outro assimétrico em 1504 cm^{-1} referentes ao nitrocomposto aromático (NO_2), igualmente citadas por Silverstein, Webster e Kiemle (2012) em bandas entre 1355-1315 cm^{-1} e 1550-1490 cm^{-1} , respectivamente.

Figura 15 – Espectro de infravermelho com composto (*E*)-1-(4-aminofenil)-3-(4-nitrofenil)prop-2-en-1-ona (2).



Os dados da espectroscopia de infravermelho de todos os compostos estão demonstrados na Tabela 5. Optou-se por discutir a seguir as ligações/radicais que diferenciam os compostos sintetizados, visto que a tabela 4 já detalhou as demais frequências características de grupos funcionais encontrados nas 4-aminochalconas sintetizadas.

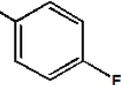
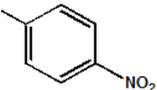
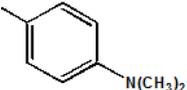
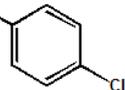
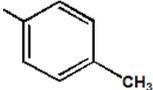
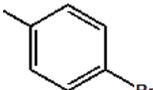
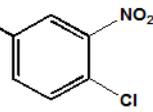
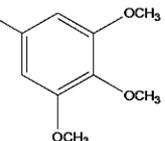
Para o composto **1**, foi detectado um estiramento forte em 1220 cm^{-1} representando a ligação C-F. Prasad, Rao e Rambabu (2009) relatam esta banda em 1223 cm^{-1} e Pavia *et al.* (2010) entre $1000\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$. O composto **3**, que contém o radical dimetilamino, pôde ser caracterizado por um estiramento em 1301 cm^{-1} , confirmado por Silverstein, Webster e Kiemle (2012) que citam uma faixa de absorção forte entre $1200\text{ - }1400\text{ cm}^{-1}$.

A ligação C-Cl (composto **4**) foi descrita em 1176 cm^{-1} por Prasad, Rao e Rambabu, (2009) e em 1263 cm^{-1} por Kumar *et al.* (2009). Nos espectros de infravermelho para este composto, foi detectado um estiramento em 1171 cm^{-1} .

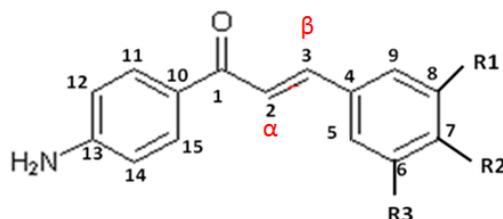
O grupo metila pôde ser visualizado no espectro do composto **5** em 1339 cm^{-1} , encontrado também por Campos-Buzzi (2007) em 1334 cm^{-1} . Segundo Pavia *et al.* (2010), este grupamento apresenta uma absorção em aproximadamente 1375 cm^{-1} . Já a ligação C-Br, encontrada no composto **6** em 1174 cm^{-1} também foi referida em 1220 cm^{-1} por Kumar *et al.* (2009) e por Prasad, Rao e Rambabu (2009) em 1177 cm^{-1} .

O composto **7**, inédito, foi caracterizado pela presença da ligação C-Cl em 1173 cm^{-1} (já discutida acima) e pelo aparecimento de um estiramento forte em 1336 cm^{-1} , característico do grupamento nítro (NO_2), que pode ser confirmado por Pavia *et al.* (2010), que cita esta banda entre $1355\text{ - }1315\text{ cm}^{-1}$. O espectro do composto **8** foi descrito por Prasad, Rao e Rambabu (2009), que encontraram valores de 1219 e 1026 cm^{-1} para a ligação C-O-C, corroborando com dados aqui encontrados em 1004 e 1026 cm^{-1} .

Tabela 5 - Dados da espectrometria de Infravermelho.

Composto	Radical	IV (cm^{-1})
1		3410 e 3329 (N-H); 1630 (C=O); 1578 (C=C); 1220 (C-F); 820 (aromático <i>para</i> substituído)
2		3484 e 3386 (N-H); 1635 (C=O); 1597 (C=C); 1338 e 1504 (NO ₂); 850 (aromático <i>para</i> substituído)
3		3475 e 3325 (N-H); 1617 (C=O); 1589 (C=C); 1368 (CH ₃); 1301 (C-N); 795 (aromático <i>para</i> substituído)
4		3453 e 3426 (N-H); 1649 (C=O); 1588 (C=C); 1171 (C-Cl); 810 (aromático <i>para</i> substituído)
5		3458 e 3338 (N-H); 1645 (C=O); 1598 (C=C); 1339 (CH ₃); 805 (aromático <i>para</i> substituído)
6		3458 e 3336 (N-H); 1645 (C=O); 1603 (C=C); 1174 (C-Br); 784 (aromático <i>para</i> substituído)
7		3421 e 3328 (N-H); 1655 (C=O); 1552 (C=C); 1336 (NO ₂); 1173 (C-Cl); 820 (aromático <i>para</i> substituído)
8		3443 e 3324 (N-H); 1631 (C=O); 1605 (C=C); 1339 (CH ₃); 1004,1026 (C-O-C); 822 (aromático <i>para</i> substituído)

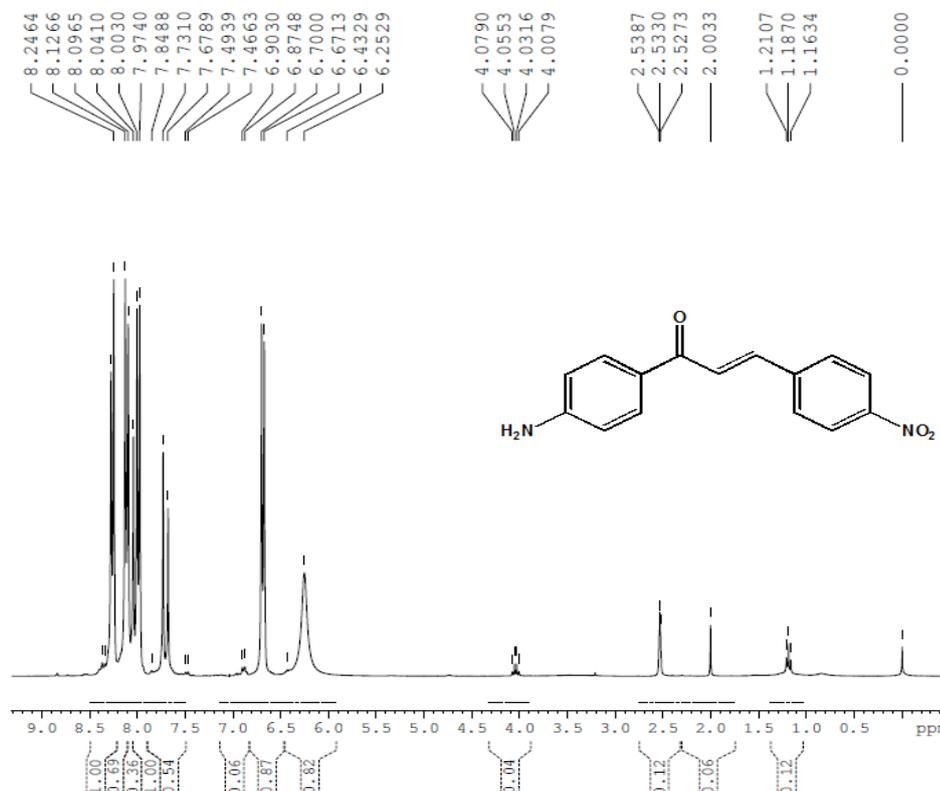
Na espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN¹H) das 4-aminoalconas sintetizadas pode-se evidenciar dois dupletos referentes aos hidrogênios α e β insaturados, na região entre 7,6 a 8,1 ppm, valores estes melhor especificados para cada composto na tabela 6. Além disso, os valores das constantes de acoplamento (J) obtidos para estes hidrogênios, entre 15 - 17 Hz, confirmam a geometria E (SILVERSTEIN, WEBSTER e KIEMLE, 2012). Na caracterização dos hidrogênios da amina primária, verificou-se a presença em todos os espectros de um singlete entre 6,03 e 6,25 ppm (Tabela 6).

Tabela 6 - Dados espectroscópicos de RMN¹H.

Composto	Radical	RMN ¹ H (DMSO), δ ppm
1		6,19 (2H, S, NH ₂); 6,72 (2H, d, $J=8,7$ Hz, C-12 e 14); 7,26 (2H, d, $J=8,82$ Hz, C-6 e 8); 7,29 (2H, d, $J=8,82$ Hz, C-5 e 9); 7,67 (2H, d, $J=9,9$ Hz, C-11 e 15); 7,68 (1H, d, $J=15,54$ Hz, C-2); 7,87 (1H, d, $J=16,59$ Hz, C-3)
2		6,25 (2H, S, NH ₂); 6,68 (2H, d, $J=8,61$ Hz, C-12 e 14); 7,70 (1H, d, $J=15,63$ Hz, C-2); 7,98 (2H, d, $J=8,3$ Hz, C-11 e 15); 7,98 (2H, d, $J=8,3$ Hz, C-5 e 9); 8,06 (1H, d, $J=16,65$ Hz, C-3); 8,4 (2H, d, C-6 e 8)
3		2,96 (6H, S, R ₂); 6,03 (2H, S, NH ₂); 6,66 (2H, d, $J=7,53$ Hz, C-6 e 8); 6,71 (2H, d, $J=8,01$ Hz, C-12 e 14); 7,61 (1H, d, $J=9,00$ Hz, C-2); 7,63 (1H, d, $J=17,70$ Hz, C-3); 7,64 (2H, d, $J=8,67$ Hz, C-5 e 9); 7,92 (2H, d, $J=7,59$, C-11 e 15)
4		6,17 (2H, S, NH ₂); 6,67 (2H, d, $J=8,73$ Hz, C-12 e 14); 7,49 (2H, d, $J=8,52$ Hz, C-6 e 8); 7,62 (1H, d, $J=15,6$ Hz, C-2); 7,87 (2H, d, $J=6,63$ Hz, C-11 e 15); 7,91 (1H, d, $J=10,56$, C-3); 7,96 (2H, d, $J=8,73$ Hz, C-5 e 9)
5		2,34 (3H, S, R ₂); 6,13 (2H, S, NH ₂); 6,67 (2H, d, $J=8,52$ Hz, C-6 e 8); 7,25 (2H, d, $J=7,92$ Hz, C-12 e 14); 7,62 (1H, d, $J=15,51$ Hz, C-2); 7,69 (2H, d, $J=8,7$ Hz, C-5 e 9); 7,89 (1H, d, $J=18,63$ Hz, C-3); 7,93 (2H, d, C-11 e 15)
7		3,98 (2H, S, NH ₂); 6,18 (2H, d, C-12 e 14); 6,66 (2H, d, $J=8,46$ Hz, C-11 e 15); 7,6 (1H, d, $J=6,72$ Hz, C-6); 7,849 (1H, d, $J=13,26$ Hz, C-2); 7,96 (1H, d, $J=8,46$ Hz, C-5); 8,042 (1H, d, $J=15,75$ Hz, C-3); 8,12 (1H, d, $J=9,48$ Hz, C-9)
8		3,73 (3H, S, R ₂); 3,87 (6H, S, R ₁ e R ₃); 6,13 (2H, S, NH ₂); 6,67 (2H, d, $J=8,58$ Hz, C-12 e 14); 7,18 (2H, S, C-4 e 5); 7,60 (1H, d, $J=15,42$ Hz, C-2); 7,84 (1H, d, $J=15,48$ Hz, C-3); 7,98 (2H, d, $J=8,55$ Hz, C-11 e 15).

Uma análise mais detalhada do espectro de RMN¹H do composto **2** (Figura 16) permite a identificação de um sinal largo em 6,25 ppm indicando os hidrogênios da amina primária (NH₂) e, na região entre 6,68 - 8,4 ppm, verifica-se os sinais dos 8 hidrogênios aromáticos ($J= 8,61 - 8,3$ Hz) confirmando a substituição *para* dos anéis aromáticos.

Figura 16 – Espectro de RMN¹H da (*E*)-1-(4-aminofenil)-3-(4-nitrofenil)prop-2-en-1-ona (**2**) (DMSO, 300MHz).



Os dados descritos na Tabela 6 foram comparados com os autores que também sintetizaram estas moléculas (embora utilizando solventes diferentes e aparelhos com potências variadas) e com a estimativa obtida através do programa *ChemDraw Ultra 8.0*.

Os espectros dos compostos **1**, **4** e **7** não serão aqui discutidos, visto que os sinais apresentados nos espectros já foram relatados anteriormente (hidrogênios α e β insaturados, da amina primária e aromáticos). O composto **3** apresenta como diferencial aos demais, um singleto em 2,96 ppm referente aos seis hidrogênios das metilas ligadas ao nitrogênio, valor este confirmado pela estimativa realizada no programa *ChemDraw Ultra 8.0*, que o cita em 2,85 ppm.

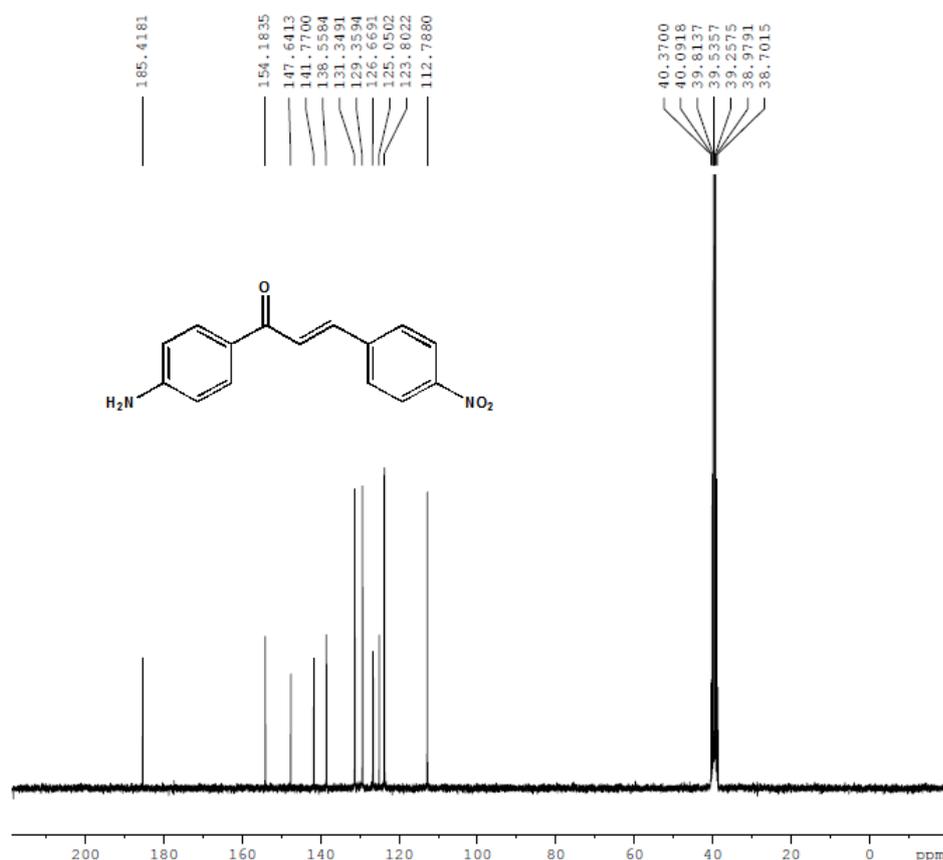
Para o composto **5**, verificou-se a existência de um singleto em 2,34 ppm referente aos hidrogênios do grupo metila ligado ao anel aromático. Este valor pode ser comparado aos encontrados por Campos-Buzzi (2007) e Zeraik *et al.* (2012) que o descrevem em 2,33 e 2,32 ppm respectivamente.

A presença das metilas no composto **8** foi descrita por Zeraik *et al.* (2012) em 3,90 ppm (referente aos três hidrogênios ligados no R2) e 3,93 ppm (relacionado aos seis

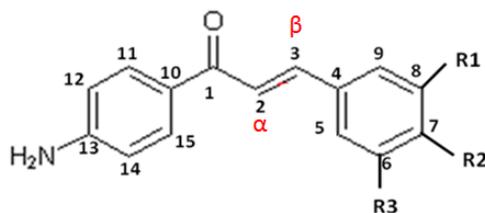
hidrogênios ligados nas posições um e três). Estes valores são confirmados no espectro deste composto por dois singletos, o primeiro em 3,73 ppm e o segundo em 3,87 ppm.

Na espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN¹³C) das 4-aminochalconas sintetizadas, observou-se no espectro do composto **2** (Figura 17) a presença da carbonila em 185,41 ppm e dos carbonos olefínicos (α e β) respectivamente em, 123,80 e 141,77 ppm. Além disso, verifica-se o carbono aromático ligado ao grupo amina em 154,18 ppm e o carbono aromático ligado ao grupo nitro em 147,64 ppm. Os demais carbonos aromáticos encontram-se na região de 138,55 a 112,78 ppm.

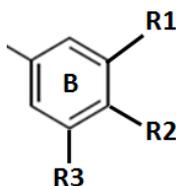
Figura 17 – Espectro de RMN ¹³C da (*E*)-1-(4-aminofenil)-3-(4-nitrofenil)prop-2-en-1-ona (**2**) (DMSO, 75MHz).



A Tabela 7 especifica os valores encontrados para cada composto sintetizado. Diferentemente dos espectros de RMN¹H, estes valores foram confrontados apenas com a estimativa obtida através do programa *ChemDraw Ultra 8.0* e a ligação dos carbonos aos radicais que os diferenciam estão demonstradas na Tabela 8.

Tabela 7 - Dados espectroscópicos de RMN¹³C.

Composto	Radical	RMN ¹³ C (DMSO), δ ppm
1		112,79 (C-6 e 8); 115,58 (C-12 e 14); 122,38 (C-2); 125,41 (C-5 e 9); 130,69 (C-10); 131,11 (C-11 e 15); 131,78 (C-4); 140,16 (C-3); 153,86 (C-13); 161,36 (C-7); 185,89 (C-1)
2		112,78 (C-12 e 14); 123,80 (C-2); 125,05 (C-10); 126,66 (C-6 e 8); 129,35 (C-5 e 9); 131,34 (C-11 e 15); 138,55 (C-4); 141,77 (C-3); 147,64 (C-7); 154,18 (C-13); 185,41 (C-1)
3		39,66 (C-R2); 111,78 (C-6 e 8); 112,73 (C-12 e 14); 116,65 (C-2); 122,55 (C-4); 126,07 (C-10); 130,09 (C-5 e 9); 130,65 (C-11 e 15); 142,49 (C-3); 151,51 (C-7); 153,33 (C-13); 185,95 (C-1)
4		112,76 (C-12 e 14); 123,26 (C-2); 125,29 (C-10); 128,80 (C-6 e 8); 130,10 (C-11 e 15); 131,15 (C-5 e 9); 134,14 (C-4); 134,37 (C-7); 139,88 (C-3); 153,93 (C-13); 185,73 (C-1)
5		20,98 (R2); 112,49 (C-12 e 14); 121,37 (C-2); 125,49 (C-10); 128,43 (C-5 e 9); 129,43 (C-6 e 8); 131,01 (C-11 e 15); 132,42 (C-4); 139,82 (7); 141,43 (C-3); 153,77 (C-13); 185,95 (C-1)
7		112,79 (C-12 e 14); 122,71 (C-2); 125,19 (C-9); 125,76 (C-10); 131,17 (C-7); 131,35 (C-6); 131,84 (C-11 e 15); 134,38 (C-5); 135,91 (C-4); 148,18 (C-3); 152,51 (C-8); 154,15 (C-13); 185,49 (C-1)
8		56,08 (R1 e R3); 60,08 (R2); 106,13 (C-5 e 9); 112,71 (C-12 e 14); 121,63 (C-2); 125,48 (C-10); 130,74 (C-4); 131,09 (C-11 e 15); 139,28 (C-7); 141,86 (C-3); 153,08 (C-6 e 8); 153,79 (C-13); 185,89 (C-1)

Tabela 8 - Dados espectroscópicos de RMN¹³C versus estimativa ChemDraw Ultra 8.0.

Composto	Radical	RMN ¹³ C (DMSO), δ ppm	ChemDraw Ultra 8.0
1		161,36	162,1
2		147,64	147,6
3		151,51	148,8
4		134,37	133,5
5		139,82	137,6
7		R ₁ : 152,51 R ₂ : 131,17	R ₁ : 148,7 R ₂ : 128,1
8		R ₁ e R ₃ : 56,08 R ₂ : 60,08	R ₁ e R ₃ : 56,2 R ₂ : 56,5

6.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A atividade antibacteriana de derivados de chalconas é estabelecida a partir de diversos relatos disponíveis na literatura (KROMANN *et al.*, 2004; NIELSEN *et al.*, 2004; NOWAKAWSKA, 2007; SAHU *et al.*, 2012). De acordo com Nowakawska (2007), a ação antibacteriana decorre da habilidade da porção estrutural cetona ligada aos carbonos α - β insaturados em reagir com o grupo tiol de proteínas essenciais de bactérias. Associado a isso, vários autores reforçam que o caráter lipofílico das moléculas é essencial para delinear a atividade bacteriana, visto que a presença de grupamentos hidrofóbicos demonstra-se de

fundamental importância para tal atividade (KROMANN *et al.*, 2004; NIELSEN *et al.* 2004; NOWAKAWSKA, 2007).

A Licochalcona A, primeiramente isolada por Haraguchi *et al.* (1998), demonstrou ótima atividade antibacteriana (CIM entre 3,13 - 12,5µg.mL⁻¹ para *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus*), porém, com uma toxicidade acentuada para o teste com *Artemia salina*.

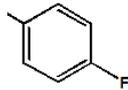
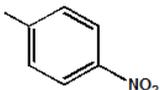
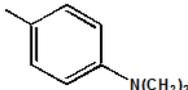
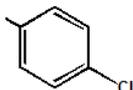
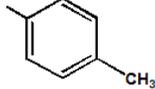
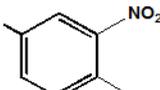
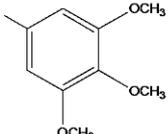
Uma série de chalconas contendo o grupamento amino alifático ligado ao anel A foi inicialmente estudada por Nielsen *et al.* (2005), onde foram sintetizadas 11 moléculas com variação dos substituintes no anel B. Neste estudo, todos os compostos testados apresentaram atividade contra bactérias Gram-positivas e falta de atividade frente a bactérias Gram-negativas. Além disso, ficou demonstrado que a localização do grupamento amino no anel A é indiferente ao efeito bacteriano enquanto que, a lipofilia dos substituintes do anel B é a propriedade mais importante.

Ainda neste estudo de Nielsen *et al.* (2005), foi testado o mecanismo de ação destes compostos por quatro diferentes métodos e concluiu-se que eles atuam através da destruição da membrana celular bacteriana de forma seletiva, sem afetar as membranas eucarióticas. A introdução de grupos mais básicos ligados ao anel B favorece este mecanismo de ação (NIELSEN *et al.*, 2004; SAHU *et al.*, 2012).

A avaliação da atividade antibacteriana das 4-aminochalconas propostas neste trabalho foi realizada através do método de concentração inibitória mínima (CIM) frente a cepas referências de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Escherichia coli* ATCC 25922), além da utilização de uma cepa de *S. aureus* resistente à meticilina (N315), um importante patógeno causador de infecções hospitalares e que apresenta seu genoma já sequenciado (KURODA *et al.*, 2001).

De acordo com os resultados descritos na Tabela 9, pode-se observar que os compostos **1**, **3** e **7** apresentaram os menores valores de CIM quando ensaiados frente a cepas *S. aureus* ATCC 29213 e N315, resistente a antibióticos penicilínicos. Os compostos **5** e **8** foram os mais ativos frente a cepas *E. coli* ATCC 25922. A avaliação da atividade antibacteriana do composto **6** não pode ser realizada, pois o mesmo não solubilizou durante o preparo da solução estoque das chalconas.

Tabela 9 - Concentração Inibitória Mínima (CIM - $\mu\text{g.mL}^{-1}$) das 4-aminochalconas.

Composto	Radical	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S. aureus</i> N315	<i>E. coli</i> ATCC 25922
1		> 512	> 512	> 512
2		> 2048	> 2048	>2048
3		> 512	> 512	> 512
4		> 1024	> 1024	>2048
5		>1024	>1024	>256
7		> 512	> 512	> 1024
8		> 1024	> 512	> 256
Oxacilina		> 0,25	> 128	-
Cloranfenicol		-	-	> 16

Ainda de acordo com os resultados obtidos, com exceção do composto **2** para *S. aureus* e *E. coli* e o composto **4** para *E. coli*, verifica-se que as demais 4-aminochalconas apresentaram atividade moderada frente às cepas avaliadas, em concentrações iguais ou superiores a $256 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Todas as 4-aminochalconas ensaiadas apresentaram menor atividade em comparação com os antibióticos (oxacilina e cloranfenicol) utilizados como padrões nos ensaios. Todas as chalconas ativas frente à cepa padrão também foram ativas frente à cepa N315 resistente a penicilínicos, o que sugere que o mecanismo de resistência da bactéria não afeta a atividade desempenhada pelas 4-aminochalconas.

O composto **7**, inédito, apresentou melhor atividade para bactérias Gram-positivas do que para as Gram-negativas (Tabela 9), este fato não foi observado para nenhuma das outras chalconas estudadas.

Campos-Buzzi (2007) realizou a avaliação da atividade antibacteriana de 4-aminochalconas idênticas às propostas neste trabalho (compostos **2**, **3**, **4** e **5**) e encontrou para todas elas um valor de CIM superior a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Neste estudo, para ambas as cepas de *S. aureus*, a CIM dos compostos avaliados foi maior que $512 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e valores inferiores a este (CIM $> 256 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foram encontrados para *E.coli* para o composto **5**.

O composto **1**, que contém o grupamento flúor ligado a posição *para* do anel B, foi também descrito por Prasad, Rao e Rambabu (2009). Estes autores encontraram para este composto uma atividade antibacteriana igual tanto para cepas de *S. aureus* (CIM $> 512 \mu\text{g.mL}^{-1}$) quanto para *E. coli* (CIM $> 256 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Ainda de acordo com Prasad, Rao e Rambabu (2009), grupos halogênicos, como o flúor, não modificam significativamente a atividade bacteriana, mas são importantes para o controle do caráter lipofílico da molécula. Wu *et al.* (2012) sintetizou e avaliou uma aminochalcona com o substituinte flúor ligado em posição *orto* do anel B, porém o mesmo não demonstrou atividade antibacteriana, reforçando os achados por Nielsen *et al.* (2004) que relatam uma maior potência para compostos com substituição *para* neste anel.

O composto **2** não demonstrou atividade bacteriana. Esta falta de atividade pode estar relacionada ao grupo amino ligado ao anel A, visto que Kumar *et al.* (2009) ao sintetizar esta molécula sem este grupamento encontrou forte atividade frente *S. aureus* e *E. coli* e moderada atividade para *B. subtilis* e *P. putida*. O contrário é percebido para o composto **3**, cujos CIM para as três cepas foi superior a $512 \mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto que Kumar *et al.* (2009) testou este composto sem o grupamento amino e não foi verificada atividade para *S. aureus* e *E. coli*.

Chalconas contendo o grupamento cloro (composto **4**) no anel B já foram bem estudadas (NIELSEN *et al.*, 2004; NIELSEN *et al.*, 2005; CAMPOS-BUZZI, 2007; PRASSAD, RAO e RAMBABU, 2009; KUMAR *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2012). Entretanto, os resultados aqui encontrados diferem dos achados por Prasad, Rao e Rambabu (2009) que o cita como altamente ativo contra *S. aureus* e *E. coli*, e são semelhantes a Kumar *et al.* (2009) que descreveram atividade para *S. aureus* e ausência da mesma para *E. coli*.

Prasad, Rao e Rambabu (2009) e Wu *et al.* (2012) avaliaram aminochalconas contendo grupamento cloro em mono ou dissubstituição do anel B das moléculas. Os autores observaram que o átomo de cloro ligado em posição *orto* ou ainda a presença de dois átomos

de cloro ligados a este anel resultam em redução da atividade antibacteriana. Neste cenário, de acordo com Tavares (2004), a posição do grupo substituinte influi significativamente no valor da constante de hidrofobicidade de grupos substituintes, sendo assim, pode também ser responsável pela variação da atividade antibacteriana observada.

Em relação à atividade antibacteriana frente a cepas Gram-negativas, os compostos **5** e **8** foram os que apresentaram CIM menores (Tabela 9), resultado este igual a Prasad, Rao e Rambabu (2009), que citam o composto com três grupamentos metoxila como o mais ativo para *E. coli*.

Wu *et al.* (2012) testaram duas 4-aminochalconas com dois grupamentos metoxila no anel B, a primeira com substituição nas posições 2 e 4 e a segunda, nas posições 2 e 3. A primeira molécula não apresentou atividade bacteriana e a segunda, apresentou atividade com valores de CIM superiores a 325µg/mL para ambas as bactérias (*S. aureus* e *E. coli*), sendo mais efetiva frente a cepas Gram-positivas e menos ativas para Gram-negativas que o composto estudado neste trabalho.

6.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA SINÉRGICA

Para a avaliação da atividade antibacteriana sinérgica dos compostos propostos utilizou-se o teste de *checkerboard*, um dos mais utilizados atualmente, por ser de fácil execução e interpretação. O termo *checkerboard* se refere ao padrão de diluição dos antibióticos distribuídos na placa de microtitulação, as mesmas utilizadas para o teste de microdiluição em caldo (CLSI, 2009).

Alguns estudos têm sido realizados no intuito de investigar a atividade sinérgica entre derivados naturais contendo flavonóides e antibióticos (TALIA, DEBATTISTA e PAPPANO, 2011; TRAN *et al.*, 2012). Shibata *et al* (2005) descobriram que flavonas e seus derivados têm ação sinérgica com os β-lactâmicos e que a mesma intensificou a suscetibilidade dos antibióticos frente a cepas *S. aureus* meticilina resistente (MRSA).

O sinergismo é uma interação positiva, onde a combinação de antibióticos com diferentes modos de ação é maior que seus efeitos quando utilizados de forma separada. O efeito sinérgico pode ser do tipo aditivo (Σ FIC menor ou igual a 0,5) ou antagonista (Σ FIC maior que 4,0) e a sua confirmação deste efeito pode favorecer o perfil farmacoterapêutico de um antibiótico.

Neste estudo, foi proposta a avaliação da atividade antibacteriana sinérgica dos compostos mais ativos, **1**, **3** e **7**, frente a *S. aureus* e os compostos **5** e **8** foram avaliados frente a bactéria *E. coli*. Os resultados obtidos estão descritos nas Tabela 10. Entretanto, os compostos 5 e 7 precipitaram em todas as placas ensaiadas o que dificultou a obtenção de resultados de efeito sinérgico.

Tabela 10 - Valores de CIM e do Somatório dos Índices de Concentração Inibitória Fracional (Σ FIC) dos compostos mais ativos.

	<i>S. aureus</i> ATCC29213 CIM ($\mu\text{g/mL}$)		<i>E. coli</i> ATCC 25922 CIM ($\mu\text{g/mL}$)		Σ FIC	Interpretação
	Isolado	Associado	Isolado	Associado		
1	> 512	>1024	-	-	6	Antagonismo
3	> 512	>1024	-	-	6	Antagonismo
8	-	-	> 256	> 256	2	Indiferença
Oxacilina (1)	> 16	> 64	-	-	-	-
Oxacilina (3)	> 32	> 128	-	-	-	-
Cloranfenicol (8)	-	-	> 16	> 16	-	-

A partir dos resultados demonstrados na tabela 10 observou-se que não há interação significativa entre o antibiótico testado (cloranfenicol) e o composto **8**, uma vez que o resultado do Somatório dos índices de concentração inibitória fracional resultou em valor que corresponde a indiferença.

Os valores de FIC obtidos para os compostos **1** e **3** sugerem a ocorrência de antagonismo, o que pode representar uma interação negativa, onde os efeitos dos compostos são menores quando os compostos foram associados com a oxacilina.

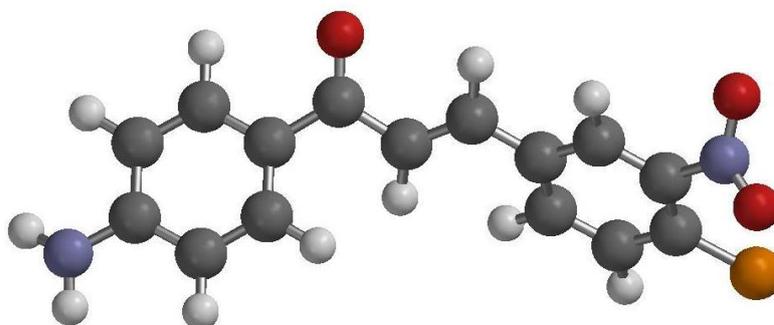
Outras chalconas contendo grupamentos hidroxila ligados aos anéis A e B apresentaram efeito sinérgico com a oxacilina (TALIA, DEBATTISTA E PAPPANO, 2011). Em outro estudo, derivados de chalconas contendo anéis heteroaromáticos em substituição ao anel A também apresentaram efeito sinérgico quando associados a antibióticos (TRAN *et al.*, 2012). A diferença destes efeitos pode ser resultado da presença de grupos substituintes diferentes ligados aos anéis da estrutura química das chalconas.

6.5 MODELAGEM MOLECULAR

6.5.1 Avaliação da estrutura química das 4-aminochalconas

A determinação da estrutura química em 3D em modelos tubo e bolas e *Space Filling* foi realizada através do emprego do programa *Spartan'08 for Windows* demonstrada na Figura 18.

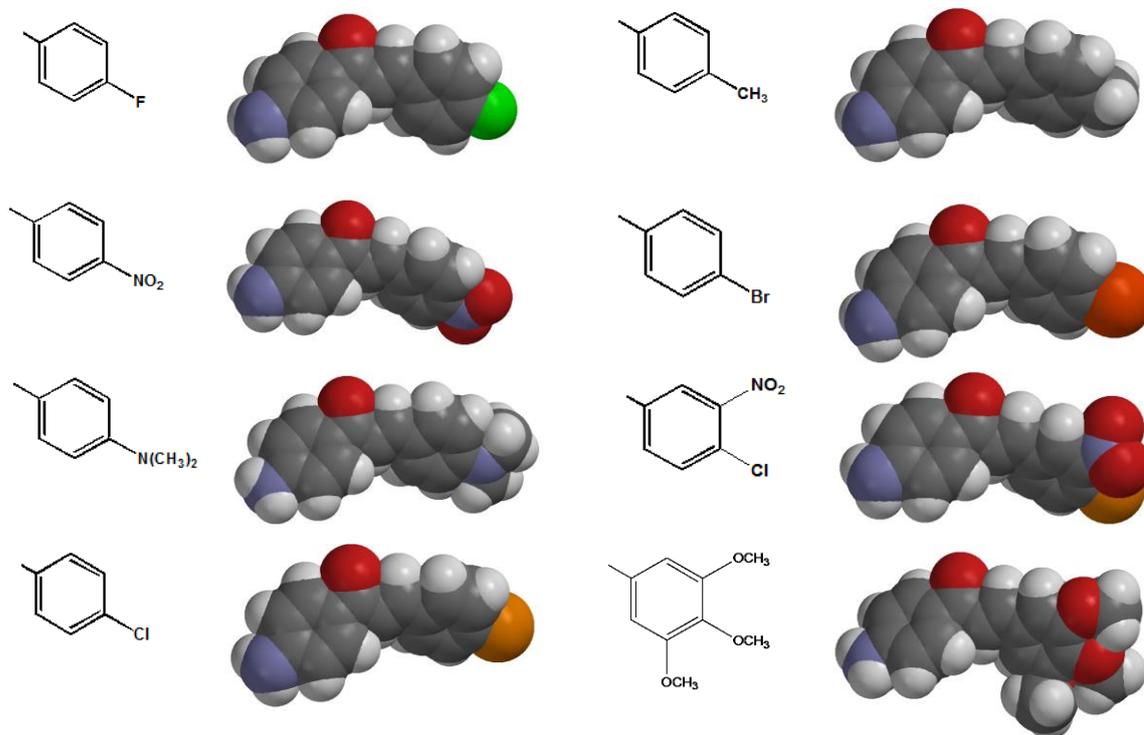
Figura 18 – Modelo molecular do composto **7** em tubo e bolas obtido a partir do programa *Spartan'08 for Windows* (átomos de carbono: cinza; hidrogênio: branco, nitrogênio: azul; oxigênio: vermelho e cloro: laranja).



As estruturas foram desenhadas e submetidas à otimização da geometria com o emprego de cálculo de mecânica quântica DFT com base de dados 6.31G*. Os modelos em formato *Space Filling* podem ser observados na figura 19.

Avaliando-se a estrutura química das 4-aminochalconas, observou-se que não há diferença na disposição espacial e conformação dos grupos funcionais das moléculas (Figura 19). A variação do efeito estérico dos grupamentos no anel B embora promovam uma alteração no volume deste anel, não está relacionada com a ação antibacteriana. Entretanto, de acordo com a literatura, a presença de grupos volumosos no anel A (mais especificamente na posição 4') demonstrou apresentar pronunciada atividade antibacteriana (NIELSEN *et al.*, 2005).

Figura 19 - Estrutura química das 4-aminochalconas estudadas em modelos 2 e 3D (*Space Filling*).



6.5.2 Obtenção de valores de propriedades físico-químicas

Os valores das propriedades físico-químicas e dos descritores moleculares de efeito eletrônico foram determinadas com o emprego de programas computacionais *Spartan for Windows 08*, *Chem3D Ultra*, *MarvinSketch 6.2* e *Molinspiration*.

As propriedades de efeito eletrônico, lipofílico e estruturais podem ser importantes para o entendimento da contribuição de determinadas subunidades ou em átomos específicos do composto analisado, para a interação fármaco-receptor e sobre a atividade biológica (ARROIO, HONORIO e SILVA, 2010). Diversos descritores moleculares de efeito eletrônico são relatados na literatura, a saber: σ de Hammett, E_{LUMO} , E_{HOMO} , polarizabilidade, momento de dipolo, energias de formação e repulsão, cargas parciais, eletronegatividade, constantes de Swain e Lupton, pKa, entre outros. Os principais descritores de lipofilicidade são cLog P, π de Hansch, PSA e Log $D_{7,4}$.

Neste trabalho, as propriedades físico-químicas das energias de HOMO, E_{HOMO} , (do inglês *highest occupied molecular orbital* - último orbital molecular de mais alta energia), e LUMO, E_{LUMO} , (do inglês *lowest unoccupied molecular orbital* - último orbital desocupado

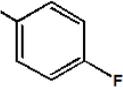
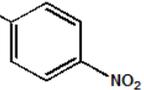
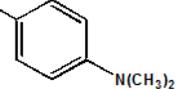
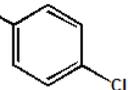
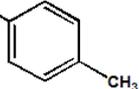
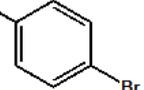
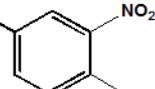
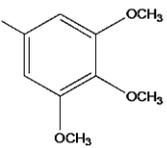
de mais baixa energia), o intervalo entre estas energias (GAP), o número de aceptores e doadores de ligação de hidrogênio, o peso molecular, as propriedades de caráter lipofílico, $\log P$ e área de superfície polar (PSA) foram utilizadas.

A E_{HOMO} está diretamente relacionada ao potencial de ionização e caracteriza a habilidade da molécula em realizar um ataque nucleofílico em uma dada reação química ou na interação do composto bioativo com o biorreceptor. A E_{LUMO} está diretamente relacionada com a afinidade por elétrons e caracteriza a susceptibilidade da molécula em sofrer um ataque nucleofílico. A diferença entre as energias E_{HOMO} e E_{LUMO} é um importante indicador de estabilidade da molécula e é conhecida como energia GAP. Uma grande diferença entre as energias $E_{\text{HOMO}}-E_{\text{LUMO}}$ implica em uma maior estabilidade da molécula no sentido de uma menor reatividade frente a reações químicas (ARROIO, HONORIO e SILVA, 2010).

Os valores das energias E_{HOMO} , E_{LUMO} (calculadas com o emprego de programa *Spartan for Windows 08*) e do GAP estão descritas na Tabela 11.

De acordo com Nielsen *et al.* (2005), a introdução de grupos doadores de elétrons em posição 4 no anel B favorece a ação antibacteriana. Esses grupos doadores podem ser observados nos compostos **3**, **5** e **8**, pois apresentam menores valores de E_{LUMO} . Entretanto, o composto **1**, com grupo substituinte flúor em posição 4 no anel B, e o composto **7** também apresentaram melhores valores de CIM e apresentam valores de E_{LUMO} de, respectivamente, -0,78 e -1,37, não sendo então, observada influência entre os valores dos descritores calculados para as energias $E_{\text{HOMO}}-E_{\text{LUMO}}$ e a atividade antibacteriana das 4-aminochalconas.

Tabela 11 - Propriedades eletrônicas teóricas das 4-aminochalconas.

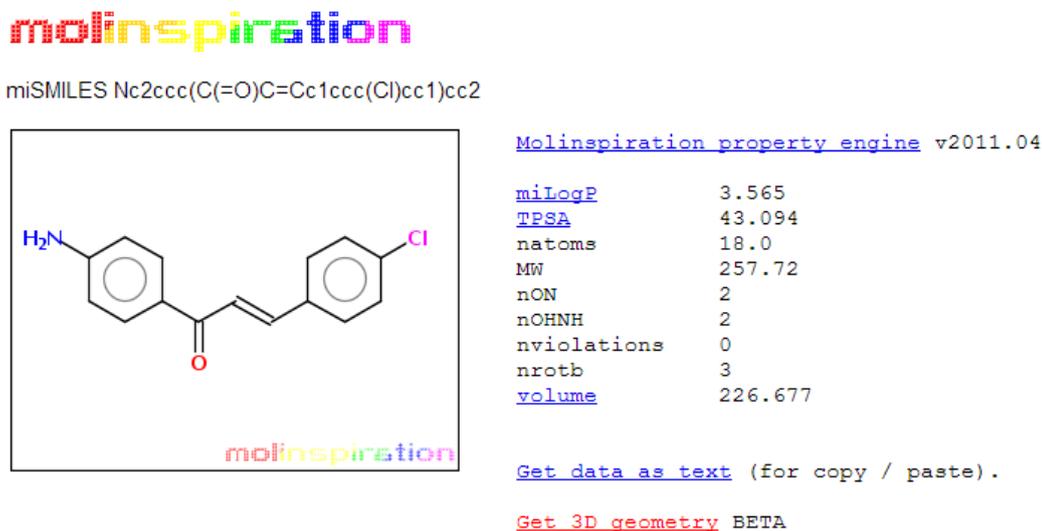
Composto	E_{HOMO} (eV)	E_{LUMO} (eV)	GAP ($E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}}$)
1 	-8,76	-0,78	7,98
2 	-8,92	-1,51	7,41
3 	-8,21	-0,43	7,78
4 	-8,76	-0,78	9,57
5 	-8,70	-0,58	8,12
6 	-8,78	-0,83	7,95
7 	-8,92	-1,37	7,55
8 	-8,73	-0,65	8,08

A avaliação dos parâmetros farmacocinéticos teóricos *in silico* é uma abordagem atualmente muito utilizada no estudo inicial das propriedades ADMET (absorção, distribuição, metabolização, excreção e toxicidade) e apresentam como objetivo limitar gastos desnecessários em ensaios biológicos de compostos com alta probabilidade de problemas farmacocinéticos e tóxicos futuros, economizando tempo e investimento (LIPINSKI, 2004). A confiabilidade nestes modelos teóricos é dependente de informações de banco de dados privados, sendo que os mesmos estão sendo gradualmente liberados pelas empresas e indústrias farmacêuticas (ARROIO, HONÓRIO e SILVA, 2010).

Os cálculos dos demais descritores moleculares de propriedades físico-químicas das 4-aminochalconas aqui estudadas foram realizados através do programa computacional

Chem3D Ultra 8.0 (CambridgeSoft, USA) e do programa gratuito *Molinspiration*, demonstrado na Figura 20.

Figura 20– Resultados e representação do composto 4 calculado no programa *Molinspiration*.

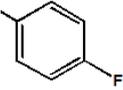
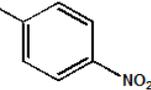
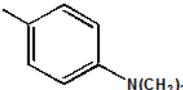
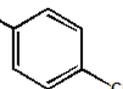
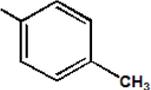
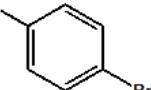
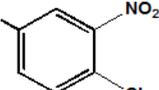
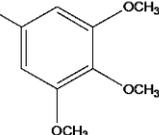


Os valores de cLog P foram obtidos com o emprego do *Chem3D Ultra*, assim como valores do coeficiente de distribuição ($\text{LogD}_{7.4}$), através do programa *MarvinSketch 6.2* e estão demonstrados na tabela 12.

O programa *Molinspiration* possibilitou a obtenção de valores das propriedades PSA, nON e nOHNH, envolvidos com a biodisponibilidade oral de uma molécula bioativa, que é uma consideração importante para que a mesma torne-se um agente terapêutico. Os resultados obtidos (demonstrados na Tabela 12) foram confrontados com a Regra dos Cinco de Lipinski (LIPINSKI, 2004), na qual são afirmados que um composto deve apresentar para o sucesso de biodisponibilidade oral os seguintes resultados:

- Área de superfície polar (PSA) menor ou igual a 140 \AA ou a soma do número de aceptores e doadores de ligação de hidrogênio menor que 12;
- Máximo de 10 grupos aceptores de ligação de hidrogênio (nON), que é expresso pela soma de átomos de N e O;
- Máximo de 5 grupos doadores de ligação de hidrogênio (nOHNH), expresso pela soma de OH e NH na molécula;
- cLogP (lipofilicidade) menor que 5;
- Peso molecular menor que 500 Daltons (D).

Tabela 12 - Propriedades físico-químicas dos compostos propostos.

Composto	PSA (Å)	n ON	n OHNH	cLogP	PM (D)	LogD _{7,4}
1 	43	2	2	3,05	241,26	3,20
2 	88	5	2	2,65	268,27	3,00
3 	46	3	2	3,07	266,34	3,17
4 	43	2	2	3,62	257,72	3,67
5 	43	2	2	3,40	237,30	3,57
6 	43	2	2	3,77	302,17	3,83
7 	88	5	2	3,21	302,71	3,61
8 	70	5	2	2,20	313,35	2,59

De acordo com os valores calculados (tabela 12) pode-se observar que todos os compostos encontram-se dentro dos limites postulados na Regra dos cinco, sugerindo a importância destes como candidatos a fármacos e com boa biodisponibilidade por via oral. Entretanto, o enquadramento das 4^o-aminochalconas dentro destes parâmetros não garante sua ação antibacteriana, visto que Lipinski (2004) e O'Shea e Moser (2008) citam que os compostos antibacterianos sempre foram considerados uma exceção a esta regra, juntamente com antifúngicos, vitaminas e cardiotônicos, pois estas classes farmacológicas atuam como substratos para transportadores que ocorrem naturalmente.

A área da superfície polar (PSA) é a soma das áreas de superfície de van der Waals dos átomos polares (oxigênio e nitrogênio) e está relacionada à avaliação da permeabilidade celular e com a biodisponibilidade *in vivo* de um agente terapêutico. De acordo com pesquisa realizada por O'Shea e Moser (2008) com 147 antibacterianos (já em uso ou ainda em fases clínicas de pesquisas) quanto maior o valor de PSA maior parece ser o efeito contra bactérias Gram-positivas. Este resultado pode ser percebido entre as 4-aminochalconas estudadas, uma vez que o composto **7** (com valor de PSA de 88 Å) apresentou valores de CIM superiores a 512 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para ambas as cepas de *S. aureus* e uma menor atividade para *E.coli* (CIM >1024 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

O parâmetro cLogP expressa a lipofilicidade do composto, e é determinado através da partição de um composto entre dois líquidos imiscíveis, sendo um em fase orgânica (geralmente octanol) e uma fase aquosa em um pH onde as moléculas encontram-se na forma neutra (MODA, 2007). Quanto maior o cLogP, mais hidrofóbica será a molécula. Dentre as 4-aminochalconas avaliadas, o composto **8** foi o que apresentou menor valor de cLogP, sendo portanto, o mais hidrofílico. O'Shea e Moser (2008), relataram que compostos mais hidrofílicos foram os que melhor apresentaram atividade contra bactérias Gram-negativas, fato igualmente ao ocorrido neste trabalho. Associado a isso, estes mesmo autores citam que um maior peso molecular está associado a uma maior polaridade (menor valor de cLogP) e uma maior ação contra bactérias Gram-negativas, parâmetros esses evidenciados no composto **8**. Esta maior polaridade observada para este composto está relacionada ao maior número de oxigênios presentes na molécula.

O'Shea e Moser (2008) citam vários estudos que demonstram que fármacos anti-infecciosos apresentam um maior peso molecular e polaridade, sugerindo que existe um requisito de propriedades diferentes para a penetração em células não-humanas.

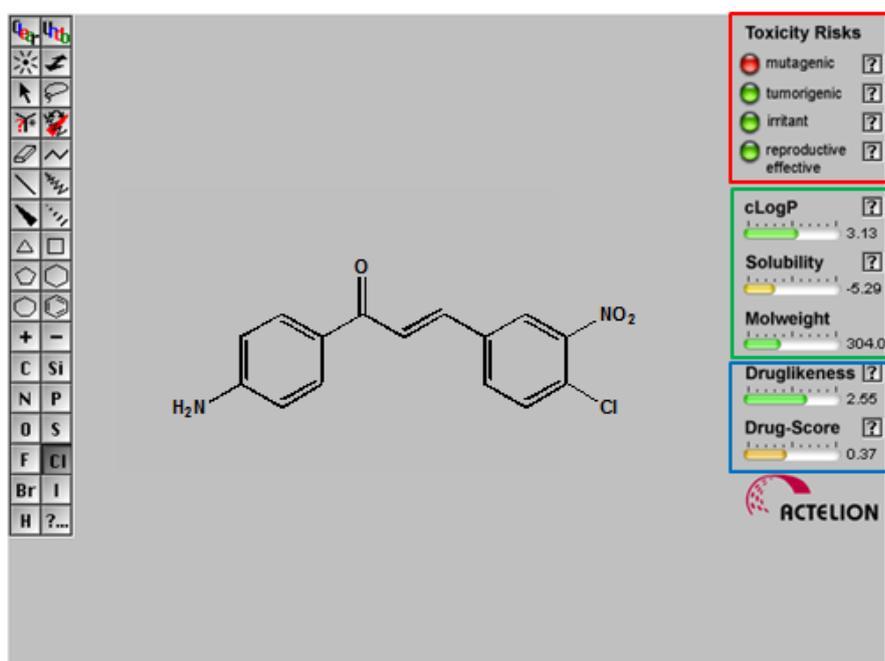
A partir da observação dos valores do número de grupos aceptores ou doadores de ligação de hidrogênio descritos na tabela 12 verificou-se que não há influência sobre a ação antibacteriana para as moléculas avaliadas, visto que os compostos apresentam valores muito parecidos para este parâmetro e atividade antibacteriana variável frente às cepas estudadas.

O coeficiente de distribuição ($\text{LogD}_{7.4}$) é determinado através da partição de um composto entre dois líquidos imiscíveis, sendo uma fase orgânica (octanol) em um pH específico (pH=7,4). De acordo com O'Shea e Moser (2008), valores menores para esta propriedade indicam um aumento na polaridade e uma maior ação contra bactérias Gram-negativas, dado este encontrado para o composto **8** em relação as demais 4-aminochalconas

6.5.3 Análise do Perfis *Druglikeness* e *Drugscore*

Os perfis de *Druglikeness* e *Drugscore* foram obtidos através do programa *Osiris*® *Property Explorer* da Actelion Pharmaceuticals (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>), demonstrado na Figura 21.

Figura 21 - Interface gráfica e resultados obtidos para o composto 7 no programa *Osiris* com os respectivos perfis toxicológicos (vermelho), propriedades físico-químicas (verde) e *Druglikeness* e *Drugscore* (azul).



Fonte: Adaptado de <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>

O potencial *Druglikeness* de uma molécula pode ser entendido como compostos que possuem grupos funcionais e/ou têm propriedades físicas (lipofilicidade, distribuição eletrônica, características de ligação hidrogênio, tamanho e flexibilidade molecular e a presença de características farmacofóricas) parecidas com a maioria dos fármacos conhecidos. Para realizar este cálculo, o programa *Osiris*® utiliza a frequência de ocorrência de cada fragmento e determina essa frequência através de uma lista de fragmentos criada a partir de um banco de dados de 3300 fármacos comerciais (fragmentos *Drug-Like*) assim como 15.000 substâncias químicas comercialmente disponíveis no catálogo Fluka® (fragmentos não *Drug-Like*) formando uma lista completa com todos os fragmentos disponíveis.

O perfil *Drugscore* combina os valores obtidos de *druglikeness*, cLogP (lipofilicidade), logS (solubilidade), peso molecular e riscos de toxicidade em um único valor

de modo a avaliar se o composto tem potencial para se tornar um fármaco, medido em uma escala de 0 a 1, onde valores mais próximos a 1 indicam um bom perfil *DrugScore* (Figura 22).

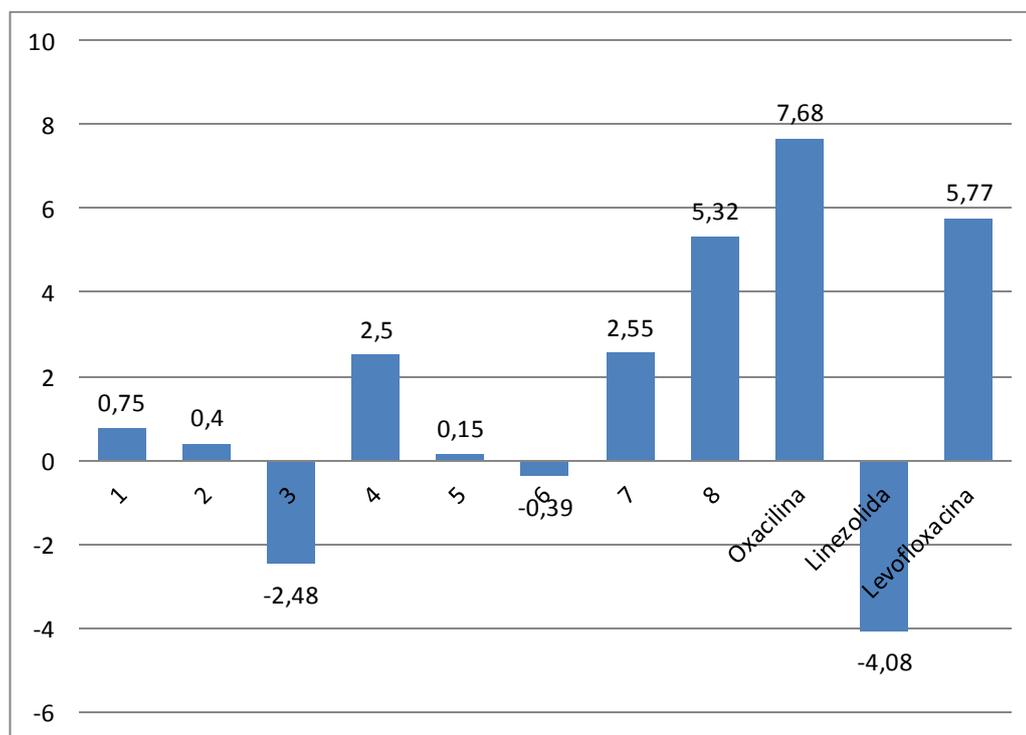
Figura 22: Escala do perfil *DrugScore*.



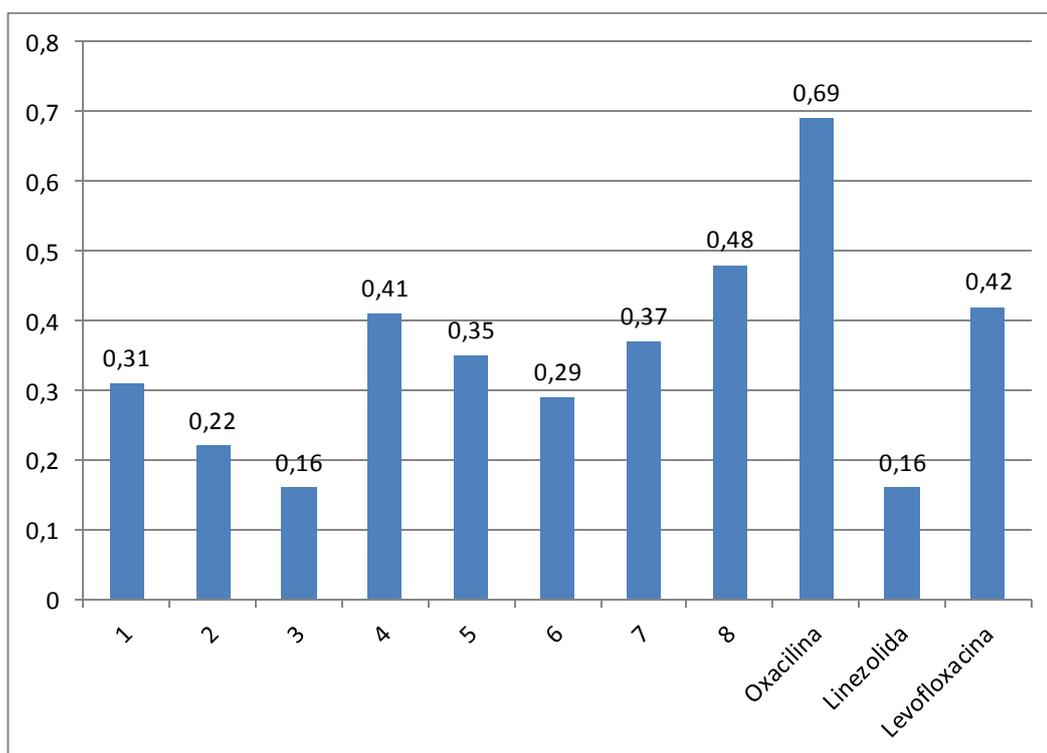
Fonte: <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>.

Como sugestão de comparação para estes parâmetros, empregou-se fármacos já utilizados comercialmente como a Linezolida (um dos mais recentes antibióticos lançados, da classe das oxazolidinonas e que é ativo contra cepas de *S.aureus* resistentes à meticilina), Oxacilina, que foi utilizada como padrão nos ensaios de atividade antibacteriana e a Levofloxacina, uma fluorquinolona, ativa contra bactérias Gram-negativas e que, de acordo com O'Shea e Moser (2008) foi a classe de antibióticos que melhor se enquadrou dentro das propriedades físico-químicas teóricas desejadas.

Analisando-se o potencial *Druglikeness* (Figura 23), o composto **8**, que foi um dos mais ativos para *E.coli*, foi o que melhor resultado apresentou, chegando a valores bem próximos à Levofloxacina. O composto **4** e **7**, foram os que apresentaram o segundo melhor resultado.

Figura 23: Comparação do potencial *Druglikeness* das 4-aminochalconas frente a fármacos antibacterianos.

No perfil *Drugscore*, foi observado o mesmo resultado do parâmetro *Druglikeness*, com o melhor índice para o composto **8**, sendo este inclusive superior à linezolida e levofloxacina (Figura 24). Neste cenário, verifica-se que o composto **8** apresentaria, se tivesse uma atividade antibacteriana efetiva, maior igualdade de propriedades físico-químicas a outros fármacos já disponíveis na terapêutica em comparação as demais 4-aminochalconas.

Figura 24 - Perfil *DrugScore* das 4-aminochalconas e fármacos antibacterianos.

6.6 DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES DE TOXICIDADE *IN SILICO*

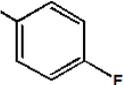
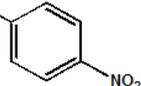
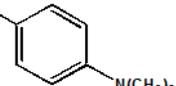
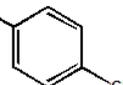
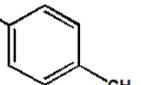
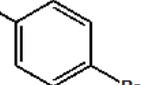
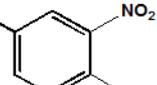
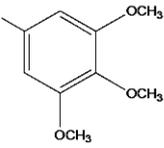
A análise da toxicidade *in silico* foi realizada pelo programa OSIRIS® *Property Explorer*, onde foram obtidos dados relacionados à mutagenicidade, potencial tumorogênico, risco irritante e efeitos sobre o sistema reprodutor.

Mesmo sendo gratuito, este programa apresenta um bom grau de confiabilidade visto que o risco de toxicidade é calculado baseado no banco de dados de substâncias químicas que possuem comprovadamente efeito tóxico (*Registry of Toxic Effects of Chemical Substances - RTECS*) e validado com um banco de dados contendo fármacos comercialmente disponíveis e largamente usado no mercado. De acordo com dados disponibilizados pela *Actelion Pharmaceuticals*, apenas 14% das substâncias químicas tóxicas avaliadas foram erroneamente classificadas com risco baixo, enquanto que 86% tiveram atribuição entre alto e médio e, portanto, de acordo com dados experimentais.

A partir da avaliação dos dados (Tabela 13) verificou-se que todos os compostos apresentaram alto risco teórico para o efeito mutagênico e baixo perfil toxicológico para o efeito irritante. Em relação aos efeitos no sistema reprodutor, apenas o composto **1** apresentou um risco médio, e para os compostos **2** e **3** foi descrito alto risco para o efeito tumorogênico.

A toxicidade teórica elevada para o efeito mutagênico das 4-aminochalconas pode ser decorrente da presença da cetona α - β insaturada. Esta porção é suscetível ao ataque de um íon enolato nucleofílico, processo este conhecido como Reação de Michael. Entretanto, analisando-se a estrutura química das chalconas, esta cetona encontra-se entre dois anéis aromáticos, dificultando assim, a ocorrência desta reação na prática.

Tabela 13 - Toxicidade teórica das 4-aminochalconas.

Composto	Risco mutagênico	Risco Tumorigênico	Efeito irritante	Risco Reprodutivo
1 	A	B	B	M
2 	A	A	B	B
3 	A	A	B	B
4 	A	B	B	B
5 	A	B	B	B
6 	A	B	B	B
7 	A	B	B	B
8 	A	B	B	B

A: risco alto; M: risco moderado; B: risco baixo

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesta pesquisa, foi realizado o planejamento, síntese e determinação da atividade antibacteriana de uma série de oito derivados de chalconas. Em adição ao ensaio biológico, foi desenvolvida uma análise da relação estrutura-atividade através da determinação das propriedades físico-químicas, estereoelétrônicas e de toxicidade *in silico* dos mesmos.

Todos os compostos foram sintetizados através da reação de condensação aldólica de Claisen-Schmidt, sendo o composto **7** considerado inédito. As reações resultaram em compostos com rendimentos similares aos já relatados na literatura, igualmente aos dados encontrados nas análises utilizadas para a caracterização dos mesmos.

Em relação à atividade antibacteriana, os compostos **1**, **3** e **7** apresentaram menores valores de CIM frente as cepas de *S. aureus* (ATCC 29213 e N315), enquanto que os compostos **5** e **8** foram os mais ativos frente a cepas *E. coli* ATCC 25922, entretanto não foi observado atividade sinérgica destas moléculas quando associadas à oxacilina e cloranfenicol, respectivamente.

Mesmo apresentando uma atividade antibacteriana baixa, estas moléculas se apresentam como substâncias protótipo para estudos de modificações estruturais com o intuito de aumento da ação biológica, visto que todas se enquadram dentro dos parâmetros delineados na Regra dos Cinco e, devido a isso, são promissoras a apresentar uma boa biodisponibilidade oral. Através da avaliação preliminar das relações estrutura-atividade, verificou-se que o composto **8** apresentou vários parâmetros que podem justificar sua ação frente a bactérias gram-negativas, como peso molecular elevado e menor valor de cLogP e LogD_{7.4}. Além disso, este composto apresentou resultados superiores à levofloxacina quando calculado seu potencial de *druglikeness* e de *drugscore*.

Ensaio experimentais de toxicidade devem ser realizados para confirmar os efeitos tóxicos teóricos aqui determinados, principalmente relacionados à mutagenicidade.

PERSPECTIVAS

- Realizar testes toxicológicos experimentais nas moléculas já sintetizadas;
- Sintetizar uma série de derivados contendo alterações no Anel A a partir das moléculas já existentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARROIO, A.; HONÓRIO, K.; SILVA, A. Propriedades químico-quânticas empregadas em estudos das relações estrutura-atividade. **Quim. Nova**, v.33, n. 3, p. 694–699, 2010.
- ÁVILA, H.; SMÂNIA, E. A.; MONACHE, F. D; SMÂNIA A. J. Structure–activity relationship of antibacterial chalconas. **Bioorg. Med.Chem.**, v.16, p. 9790–9794, 2008.
- BANDGAR, B.P.; GAWANDE,S.S. Synthesis and biological screening of a combinatorial library of b-chlorovinyl chalconas as anticancer, anti-inflammatory and antimicrobial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 2060 – 2065, 2010.
- BARREIRO, E. J.; RODRIGUES, C. R. Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal. **Quim. Nova**, v. 20, n. 1, p. 1-11, 1997.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. A questão da inovação em fármacos no Brasil: proposta de criação do Programa Nacional de Fármacos (PRONFAR). **Quim. Nova**, v. 28, Suplemento, p. 56-63, 2005.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**, 2ed. Porto Alegre, RS : Artmed Editora, 2008.
- BARREIRO, E. J. Biodiversidade: ponte potencial para a descoberta de fármacos. **Quim. Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.
- BOUCHER, H.W.; TALBOT, G. H.; BRADLEY, J. S.; EDWARDS, J. E; GILBERT, D.; RICE, L.B.; SCHELD, M.; SPELLBERG, B.; BARTLETT, J. Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, p. 1-12, 2009.
- BRASIL. Resolução-RDC n° 44, de 26 de outubro de 2010. **Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2010. Disponível em <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0044_26_10_2010.html>. Acesso em 10 out. 2012.
- BRITO, M.A.; CORDEIRO, B.C. Necessidade de novos antibióticos. **J.Bras.Patol.Med.Lab**, Niterói-RJ, v. 98, n.4, p. 247-249, agosto 2012.
- BRUNTON, L.; CHABNER, B.; KNOLLMANN, B. (Org.). **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman e Gilman**. 12 ed. São Paulo : McGraw-Hill, 2012.
- CALIXTO, J.B.; SIQUEIRA, J.M. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: desafios. **Gaz.méd.Bahia**, 78 (Suplemento 1), p. 98-106, 2008.
- CAMPOS-BUZZI, F. **Síntese de novas moléculas com potencial terapêutico: imidas cíclicas, chalconas e compostos relacionados**. 2007. 198 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

CARVALHO, I. PUPO, M.T.; BORGES, A.D.; BERNARDES, L.S. Introdução à modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. **Quim. Nova**, v. 26, n. 3, p. 428-438, 2003.

COATES, A.R.; HU Y. Targeting non-multiplying organisms as a way to develop novel antimicrobials. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 29, n. 3, p. 143-150, 2008.

CORREA, R. **Chalconas, imidas e derivados como moléculas bioativas: estudo da relação estrutura-atividade**. 2009. 174 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard—Eighth Edition. CLSI document M07-A8. Wayne, PA: 2009

CUSHINE, T.P; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoides. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 343-356, 2005

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 74, n. 3, p. 417-433, september 2010.

DEVIA, C.M. PAPPANO, N.B.; DEBATTISTA, N.B. Structure-biological activity relationship of synthetic trihydroxylated chalcones. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v. 29, n. 4, out/dez. 1998.

FERREIRA, R.S.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A.D. Integração das técnicas de triagem virtual e triagem biológica automatizada em alta escala: oportunidades e desafios em P&D de fármacos. **Quim. Nova**, v. 34, n. 10, p. 1770-1778, 2011.

FUCHS, F.D; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M.B. **Farmacologia clínica: fundamentos da terapia racional**. 3 ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2006.

GUIDO, R.V.; ANDRICOPULO, A.D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 81-98, 2010

GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-672, 2010.

HARAGUCHI H.; TANIMOTO K.; TAMURA, Y.; MIZUTANI K.; KINOSHITA, T. Mode of antibacterial action of retrochalcones from glycyrrhiza inflata. **Phytochemistry**, Londres, v. 48, n. 1, p. 125-129, 1998.

HASSAN, S.Y. Synthesis and biological activity of some new pyrazoline and pyrimidine derivatives. **J.Bra.Chem.Soc**, v. 22, n. 7, p.1286-1298, 2011.

ISDA – INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA. The 10 x '20 initiative: pursuing a global commitment to develop 10 new antimicrobial drugs by 2020. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, p. 1081-1083, 2010.

JHA, A.; MUKHERJEE, C.; ROLLE, A. J.; CLERCQ, E.; BALZARINI, J.; STABLES, J. P. Cytostatic activity of novel 4'-aminochalcone-based imides. **Bioorg. Med. Chem. Lett**, v. 17, p. 4545-4550, 2007.

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

KUMAR, N.; JAIN, J. S.; SINHA, R.; GARG, V. K.; BANSAL, S. K. Evaluation of some novel chalcone derivatives for antimicrobial and anti-inflammatory activity. **Der Pharmacia Lettre**, v. 1, n. 1, p. 169-176, 2009.

KURODA, M.; OHTA, T.; UCHIYAMA, I.; BABA, T.; YUZAWA, H.; KOBAYASHI, I.; CUI, L.; OGUCHI, A.; AOKI, K.; NAGAI, Y.; LIAN, J.; ITO, T.; KANAMORI, M.; MATSUMARU, H.; MARUYAMA, A.; MURAKAMI, H.; HOSOYAMA, A.; MIZUTANIUI, Y.; TAKAHASHI, N.; SAWANO, T.; INOUE, R.; KAITO, C.; SEKIMIZU, K.; HIRAKAWA, H.; KUHARA, S.; GOTO, S.; YABUZAKI, J.; KANEHISA, M.; YAMASHITA, A.; OSHIMA, K.; FURUYA, K.; YOSHINO, C.; SHIBA, T.; HATTORI, M.; OGASAWARA, N.; HAYASHI, H.; HIRAMATSU, K. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Lancet**, v. 357, p. 1225-1240, 2001.

KURUP, A. CHLEBOCKI, M.; LING, M.; KOH, T.; TAN, K.; LEE, L.; HOWE, K. Control of a hospital-wide vancomycin-resistant Enterococci outbreak. **Am. J. Infect. Control.**, v. 36, n. 3, p. 206-211, 2008.

LIMA, L. M. Química Medicinal Moderna: desafios e contribuição brasileira. **Quim. Nova**, v. 30, n. 6, p. 1456-1468, 2007.

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

LISBOA, T.; NAGEL, F. Infecção por patógenos multi-resistentes na UTI: como escapar?. **Rev Bras Ter Intensiva**, v. 23, n. 2, p. 120-124, 2011.

MODA, T. L. **Desenvolvimento de modelos *in silico* de propriedades ADME para a triagem de novos candidatos a fármacos.** 2007. 93 f. Dissertação (Mestrado em Física) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

NEVES, P. R. MAMIZUKA, E. M.; LEVY, E. E.; LINCOPAN, N. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **J. Bras Patol Med Lab**, v. 47, n. 4, p. 409-420, agosto 2011.

NIELSEN, S. F.; BOESEN, T.; LARSEN, M.; SCHONNING, K.; KROMANN, H. Antibacterial chalcones-bioisosteric replacement of the 4'-hydroxy group, **Bioorg. Med. Chem.**, Oxford, v. 12, p. 3047-3054, 2004.

NIELSEN, S. F.; BOESEN, T.; LARSEN, M.; SCHONNING, K.; KROMANN, H. Cationic chalcone antibiotics. Design, synthesis, and mechanism of action, **J. Med. Chem.**, Columbus, v. 48, p. 2667-2677, 2005.

NOWAKAWSKA, Z. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, p. 125-137, 2007.

OLIVEIRA, G. A.; DELL'AQUILA, A. M.; MASIERO, R. L.; LEVY, C. E.; GOMES, M. S.; CUI, L.; HIRAMATSUU, K.; MAMIZUKA, E. M. Isolation in Brazil of nosocomial *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin, **Infect. Contr. Hosp. Epidem.**, v. 22, n. 7, p. 443-448, 2001.

O'SHEA, R., MOSER, H.E. Physicochemical properties of antibacterial compounds: implications for drug discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 2871-2878, 2008.

OSÓRIO, T. M.; MONACHE, F.D.; CHIARADIA, L.D.; MASCARELLO, A.; STUMPF, T.R.; ZANETTI, C.R.; SILVEIRA, D.B.; BARARDI, C.M.; SMÂNIA, E.A.; VIANCELLI, A.; GARCIA, L.T.; YUNES, R.A.; NUNES, R. J.; SMÂNIA, A. Antibacterial activity of chalcones, hydrazones and oxadiazoles against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 22, p. 225-230, 2012.

PAVIA, D.L. LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introdução à espectroscopia**. 4ª ed., São Paulo: Cengage Learning, 2010. 716 f.

PRASSAD, Y.R, RAO, A.S., RAMBABU, R. Synthesis of some 4'-amino chalcones and their anti-inflammatory and antimicrobial activity. **Asian Journal of Chemistry**, v. 21, n.2, p. 907-914, 2009.

PRASSAD, Y.R, RAO, A.S. A study of anti-inflammatory and analgesic activity of new 2,4,6-trisubstituted pyrimidines, **Chem. Pharm. Bull**, v. 59, n.9, p. 1079-1082, 2011.

RIBEIRO, T.F.; CIDADE, A.F.; CLEMENTINO, C.O.; RIBEIRO, L.S.; DIAS, L.D.; BESSA, L.S.; AQUINO, G.B. Síntese de compostos pirazolidínicos a partir de chalconas com potencial terapêutico. In: VI JORNADA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO E SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA, 2011, Goiânia, **Anais do IX Seminário de Iniciação Científica**, 2011, p. 1-5.

RICE, L.B. Federal Funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: NO ESKAPE. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, p. 1079-1081, 2008

SANT'ANNA, C.M.R. Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: uma introdução. **Rev. Virtual Quím.**, v. 1, p. 49-57, 2009.

SAHU, N.K.; BALBHADRA, S.S.; CHOUDHARY, J.; KOHLIET, D.V. Exploring pharmacological significance of chalcone scaffold: a review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 209-225, 2012.

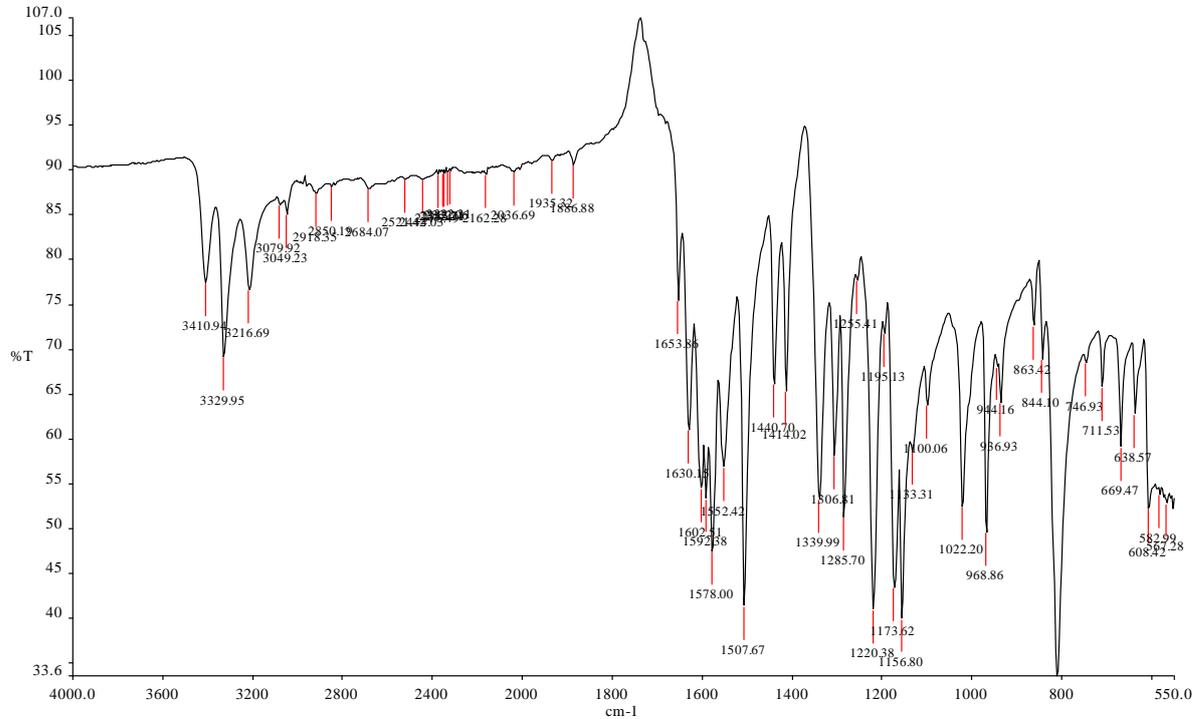
SCHWALBE, R.; MORE, L.; GOODWIN, A. **Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols**. Londres, CRC Press, 2007.

SILVERSTEIN, R. M; WEBSTER, F.X; KIEMLE, D.J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7ª ed., Rio de Janeiro, LTC, 2012.

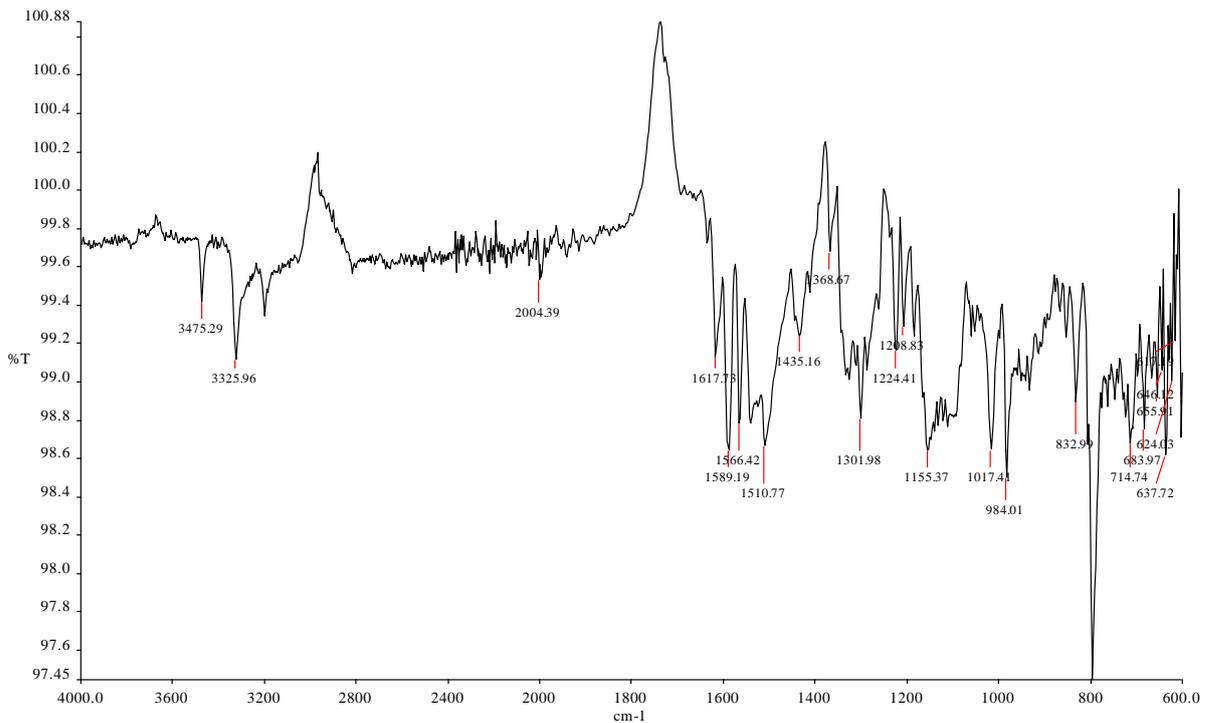
- SIMÕES, C. M. O. (Coord). **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 6^a ed., Porto Alegre/Florianópolis, Ed. Universidade UFRGS/Ed. da UFSC, 2010.
- SHIBATA, H. KONDO, K.; KATSUYAMA, R.; KAWAZOE, K.; SATO, Y.; MURAKAMI, K.; TAKAISHI, Y.; ARAKAKI, N.; HIGUTI, T. Alkyl Gallates, Intensifiers of β -Lactam Susceptibility in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Ag. Chemother.** v. 49, p. 549-555, 2005.
- TALIA, J.M., DEBATTISTA, N.B., PAPPANO, N.B. New antimicrobial combinations: substituted chalcones-oxacillin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 470-475, 2011
- TAVARES, L. C. QSAR: A abordagem de Hansch. **Quim. Nova**, v. 27, n. 4, p. 631-639, 2004.
- TAVARES, L. C; FERRERIA, E.I. Reações quantitativas estrutura-atividade: fundamentos e aplicação da Análise de Hansch. **IUPAC**, v. 1, p. 1-31, 2006.
- TOMAR, V.; BHATTACHARJEE, G.; KAMALUDDIN; RAJAKUMAR, S.; SRIVASTAVA, K.; PURIET, S.K. Synthesis of new chalcone derivatives containing acridinyl moiety with potential antimalarial activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 745-751, 2010.
- TRAN, T.D.; NGUYEN, T.N.; DO, T.H.; HUYNH, T. P.; TRAN, C. D.; THAI, K. M. Synthesis and antibacterial activity of some heterocyclic chalcone analogues alone and in combination with antibiotics. **Molecules**, v. 17, p. 6684-6696, 2012.
- TSUKIYAMA, R. I.; KATSURA, H.; TOKURIKI, N.; KOBAYASHI, M. Antibacterial Activity of Licochalcone A against Spore-Forming Bacterial. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, p. 1226-1230, 2002.
- VOGEL, A. I. **Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry**, 5 ed. New York : John Wiley & Sons, 1989. p.1017.
- ZERAIK, M.L.; XIMENES, V.F. ; REGASINI, L.O.; DUTRA, L.A.; SILVA, D.H.S.; FONSECA, L.M.; COELHO, D.; MACHADO, S.A.S.; BOLZANI, V.S. 4'-aminochalcones as novel inhibitors of the chlorinating activity of myeloperoxidase, **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 5404-5413, 2012.
- WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida? **Organização Pan-Americana de Saúde**, Brasília, v. 1, n. 4, p. 1-6, março 2004.
- WRIGHT, G. D. Antibiotics: A new hope, **Chem. & Biol.**, v. 19, p. 3-9, 2012
- WU, J.; WANG, C.; CAI, Y.; PENG, J.; LIANG, D.; ZHAO, Y.; YANG, S.; LI, X.; WU, X.; LIANG, G. Synthesis and crystal structure of chalcones as well on cytotoxicity and antibacterial properties, **Med Chem Res**, v. 21, p. 444-452, 2012

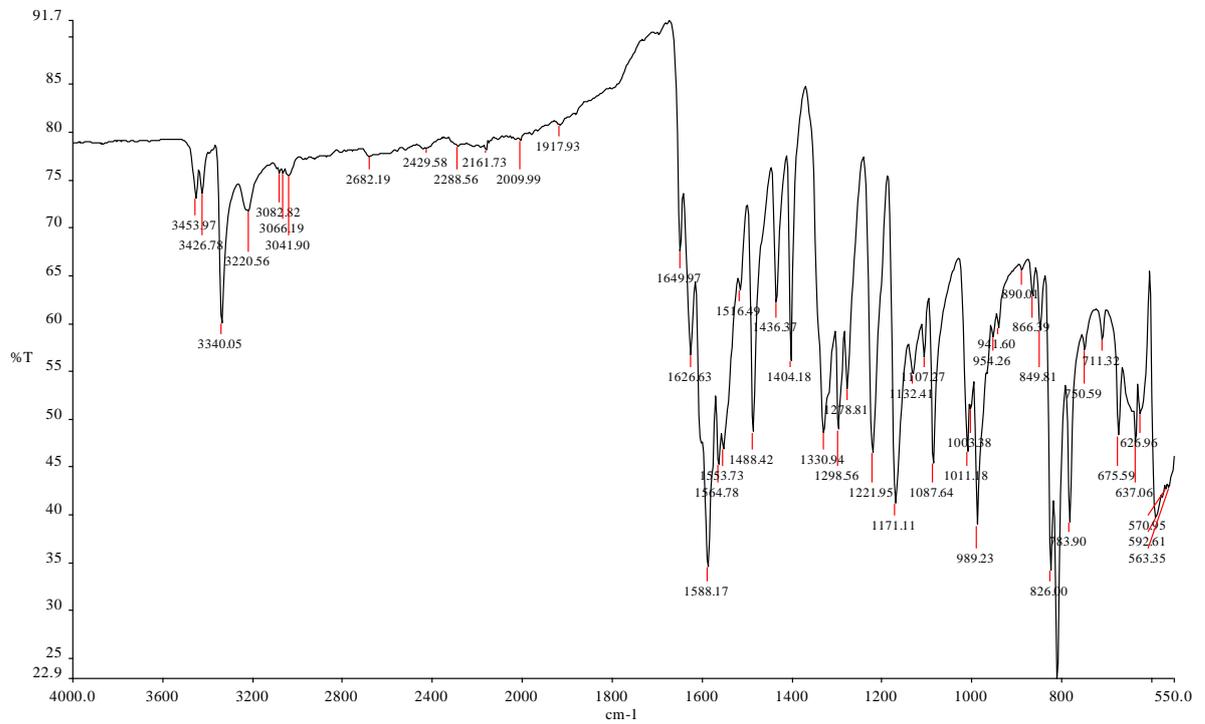
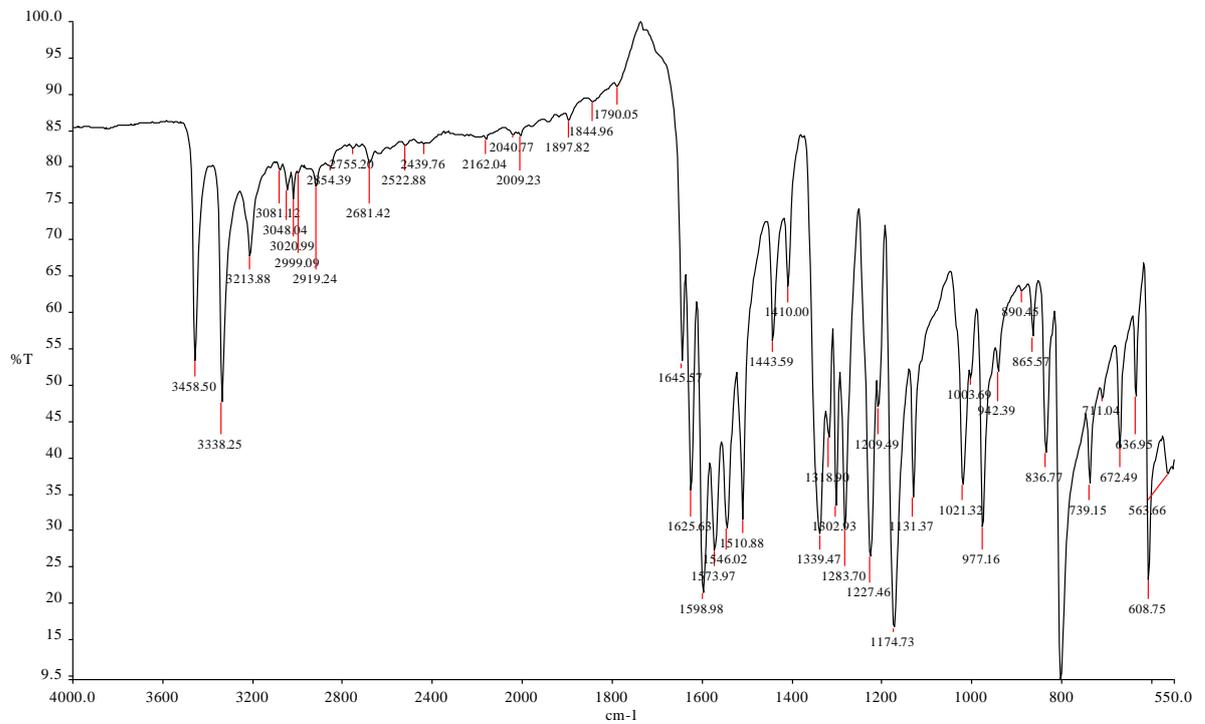
ANEXOS

Anexo I: Espectroscopia de Infravermelho do composto 1.

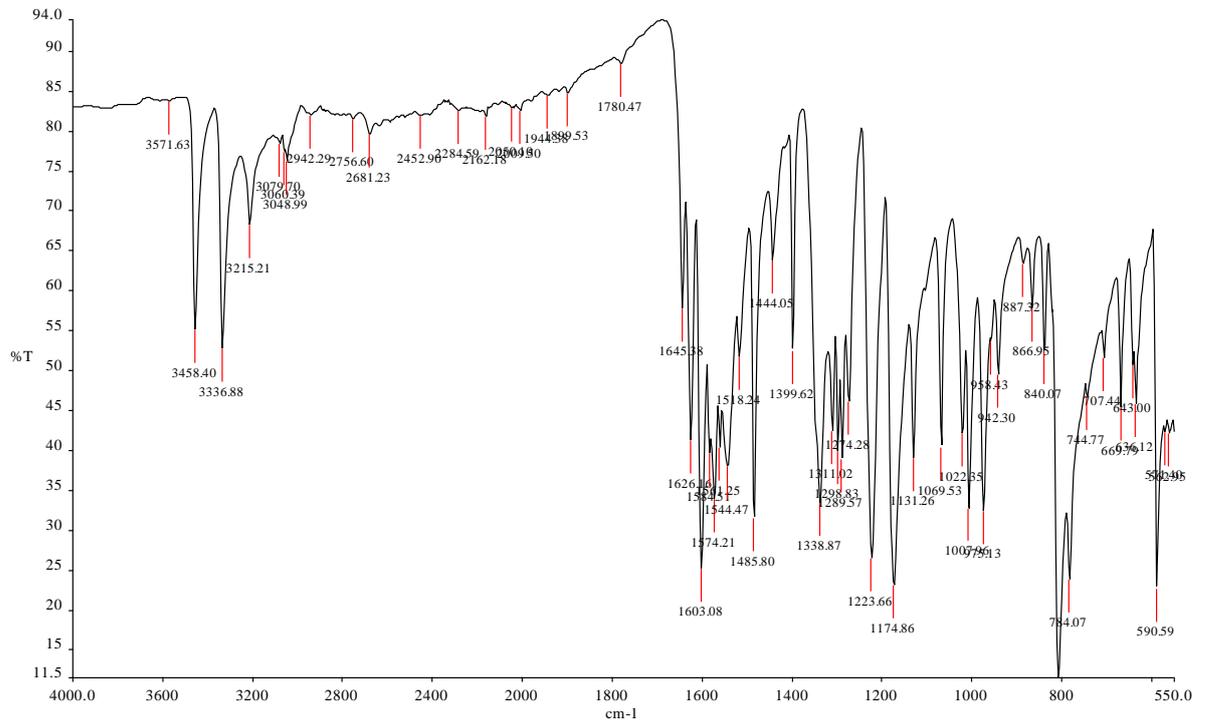


Anexo II: Espectroscopia de Infravermelho do composto 3.

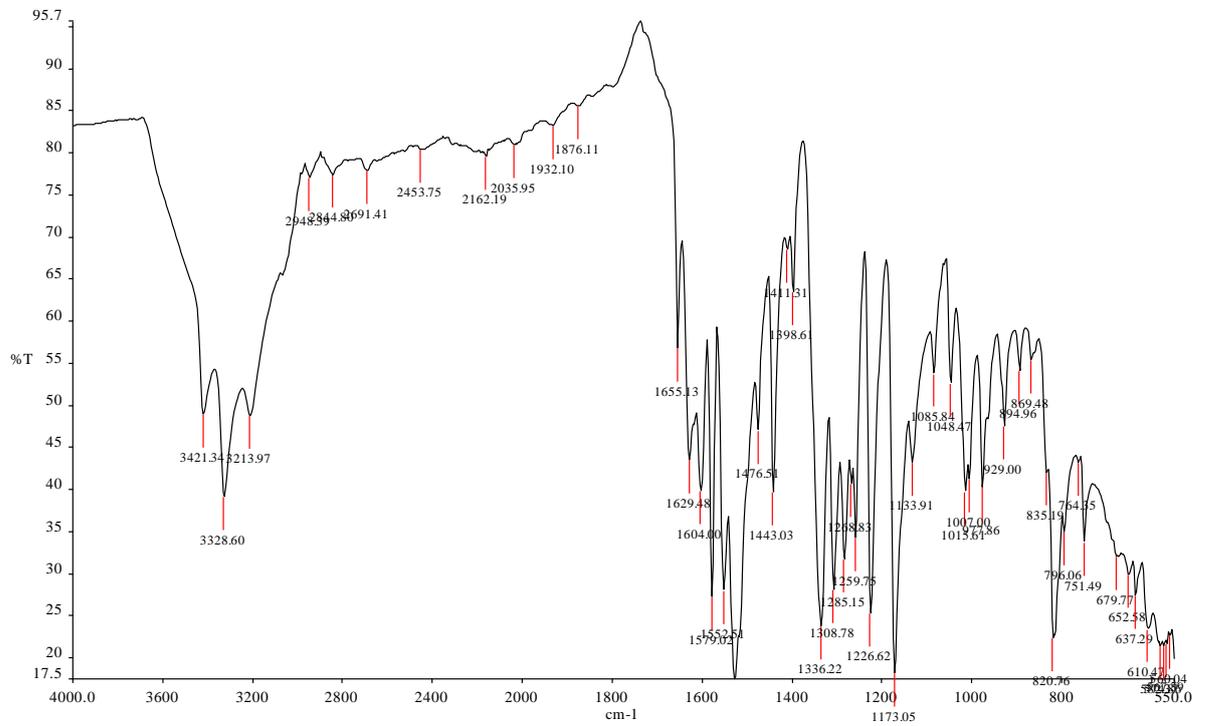


Anexo III: Espectroscopia de Infravermelho do composto **4**.Anexo IV: Espectroscopia de Infravermelho do composto **5**.

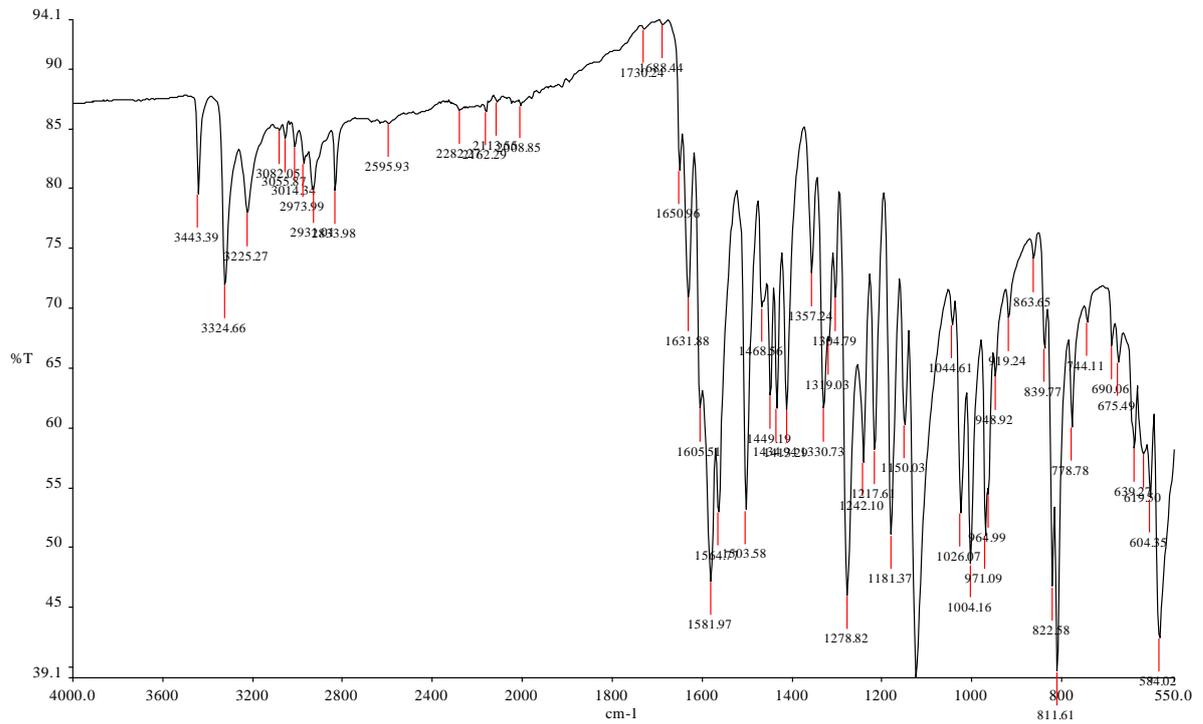
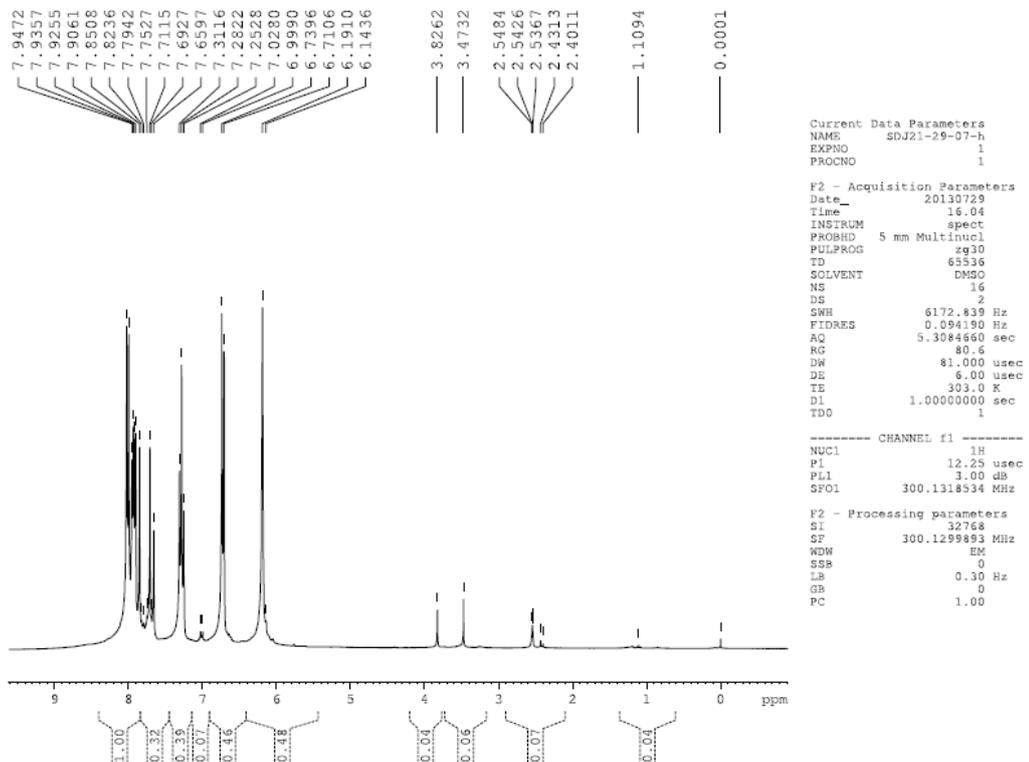
Anexo V: Espectroscopia de Infravermelho do composto 6.

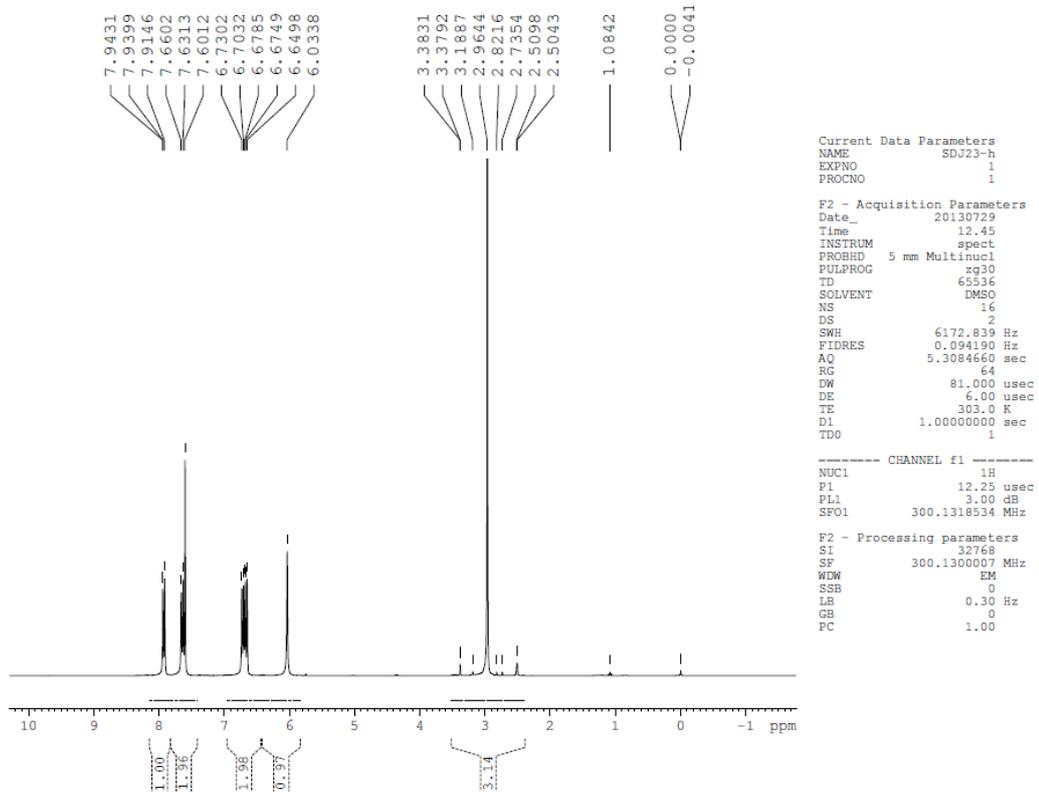
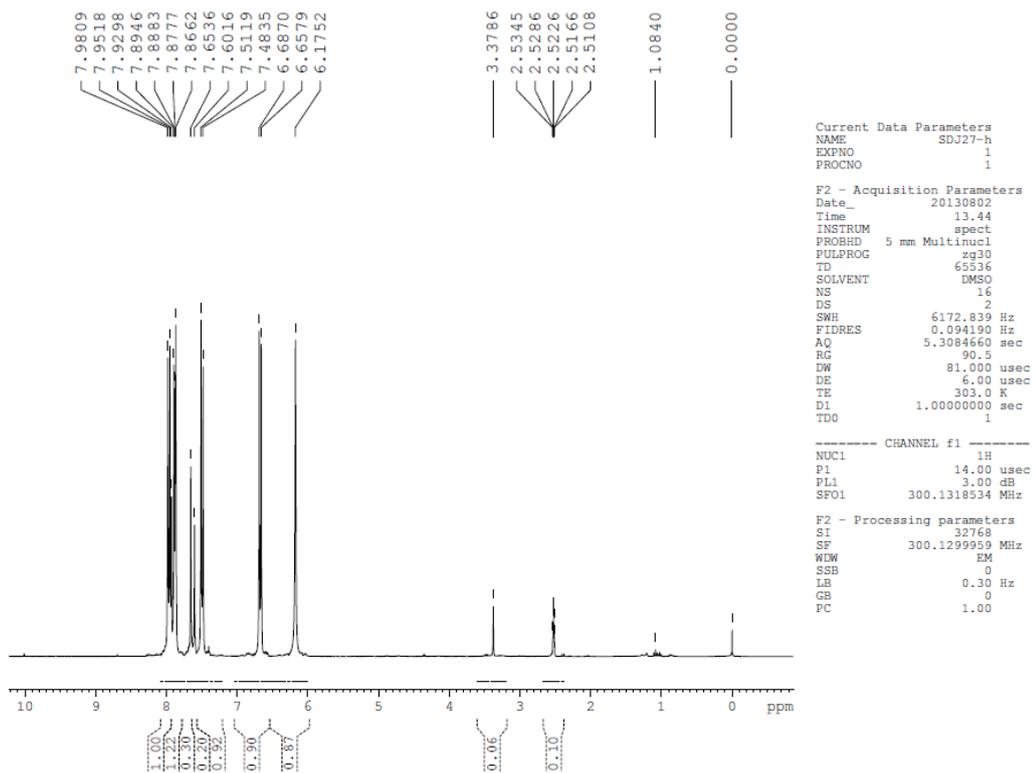


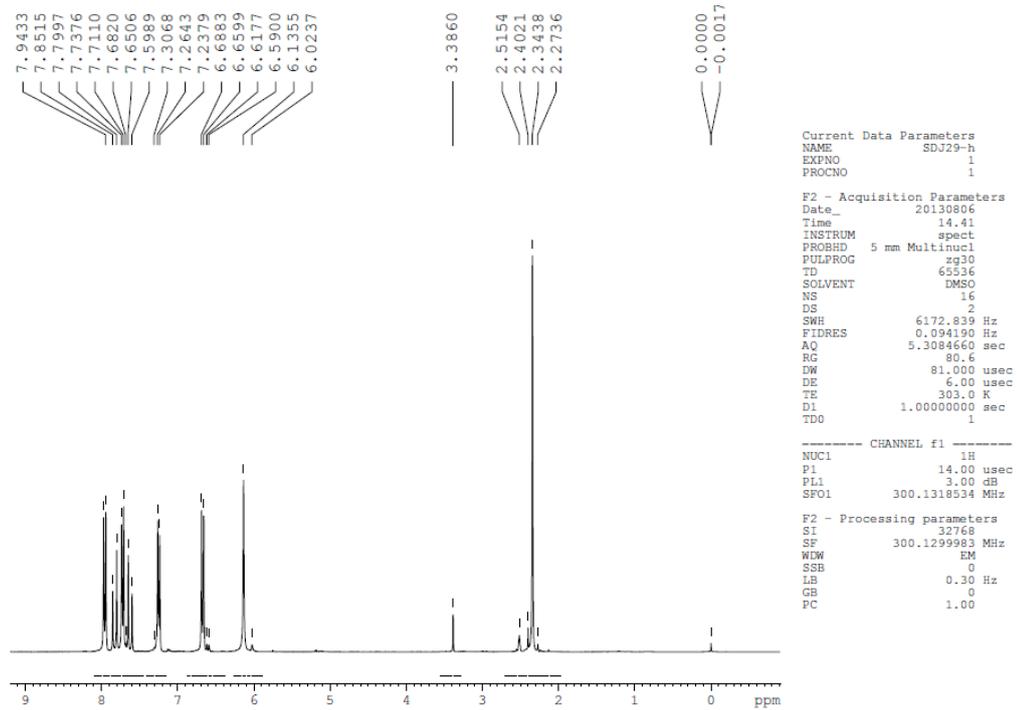
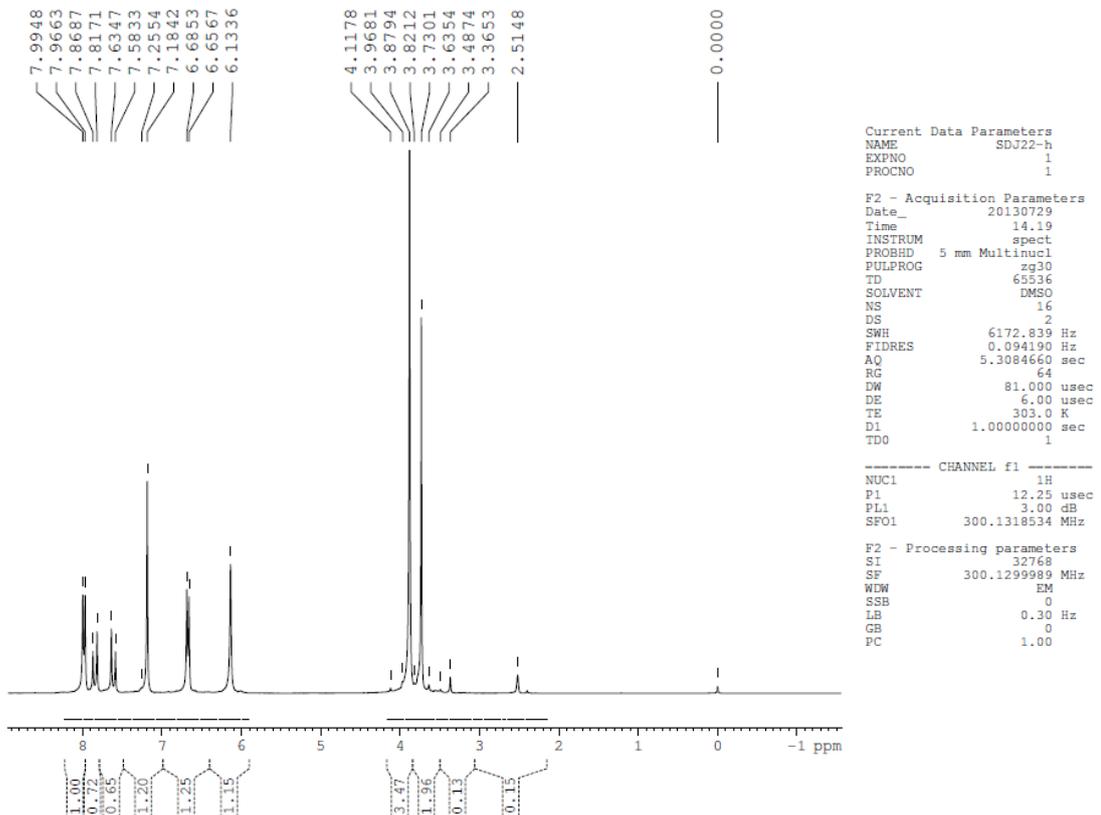
Anexo VI: Espectroscopia de Infravermelho do composto 7.

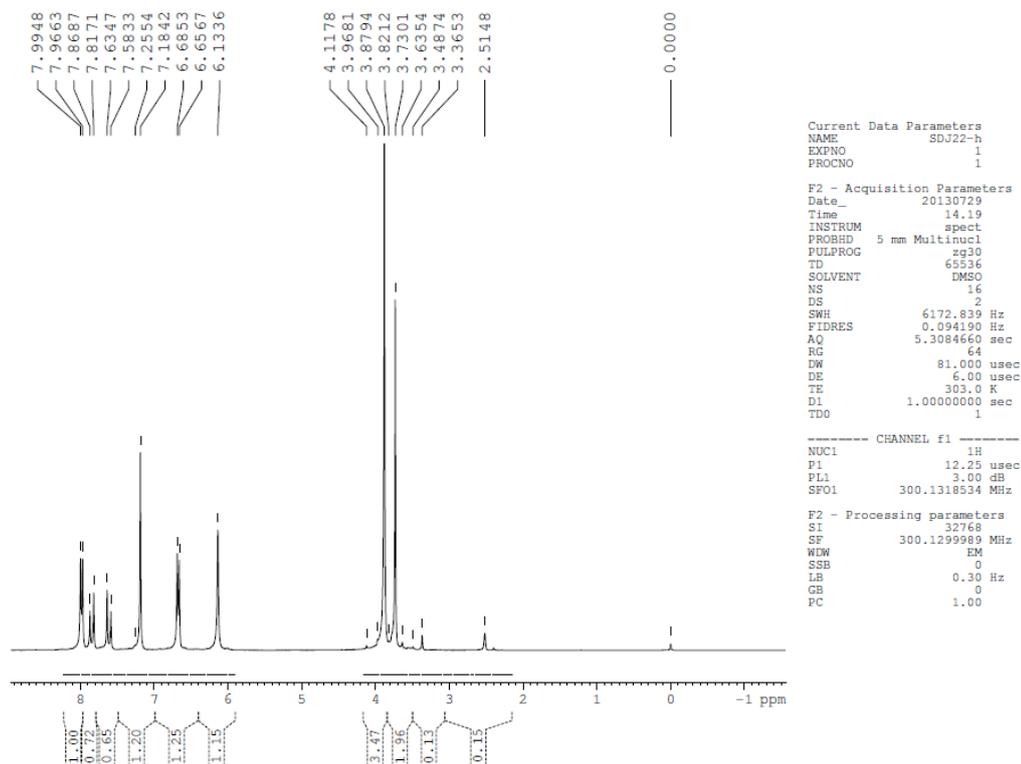
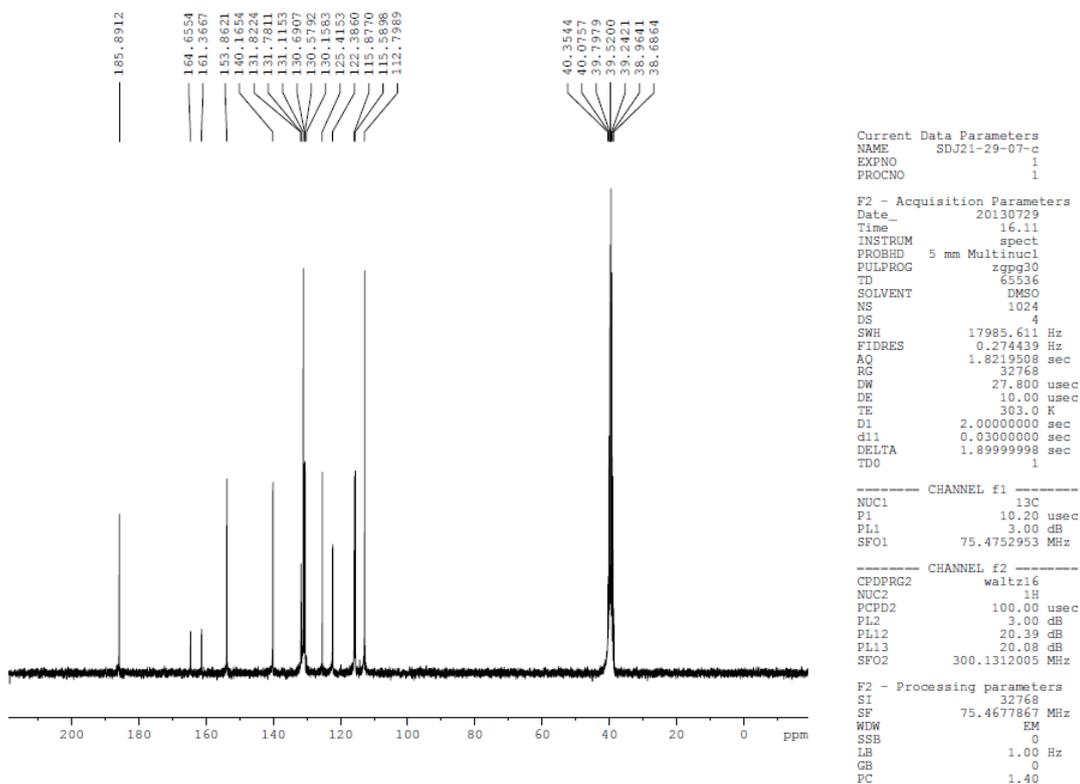


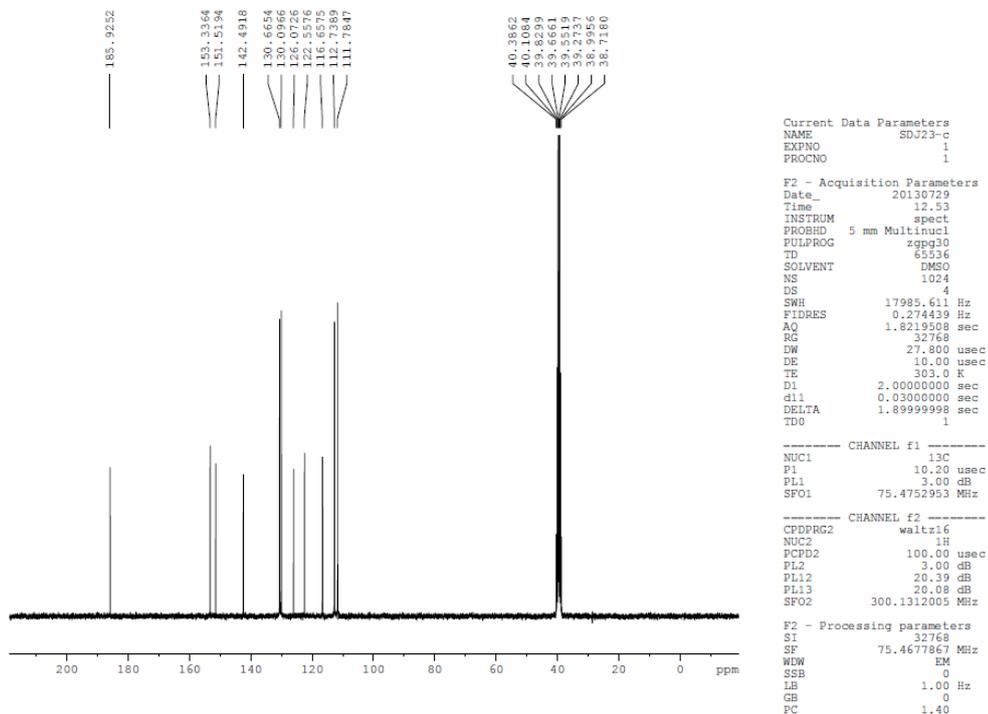
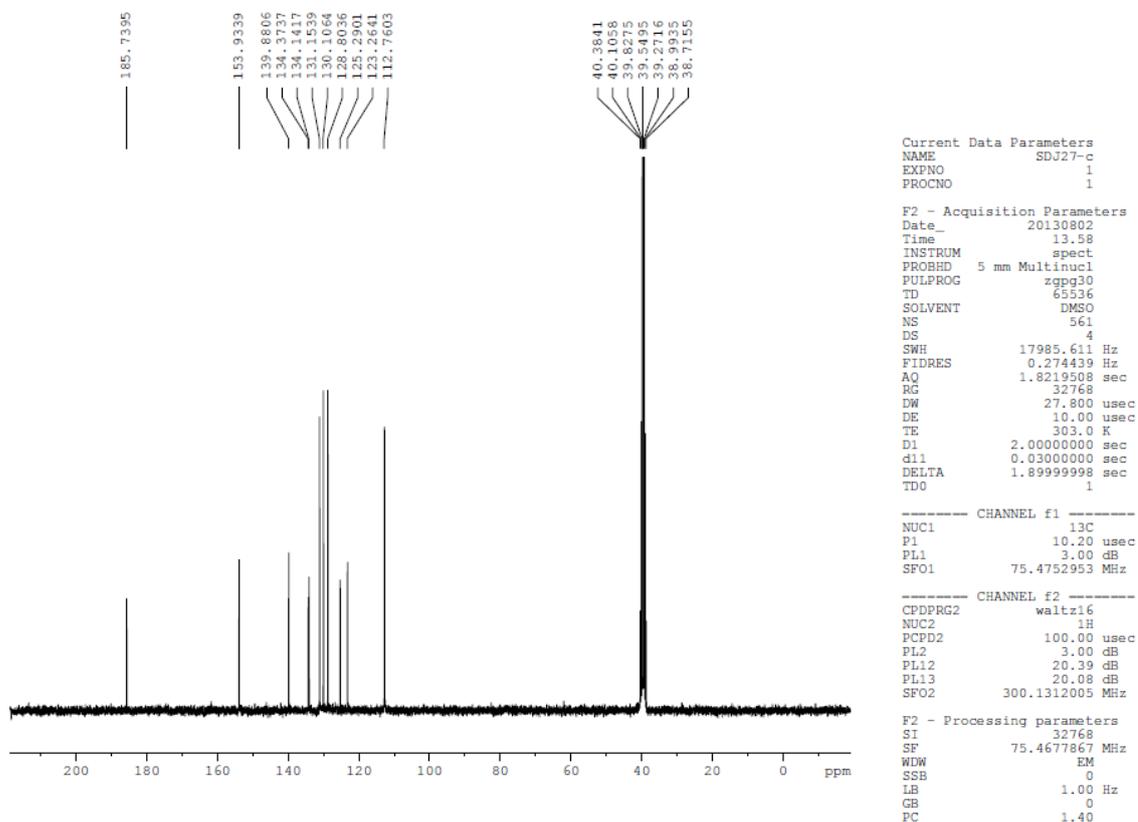
Anexo VII: Espectroscopia de Infravermelho do composto 8.

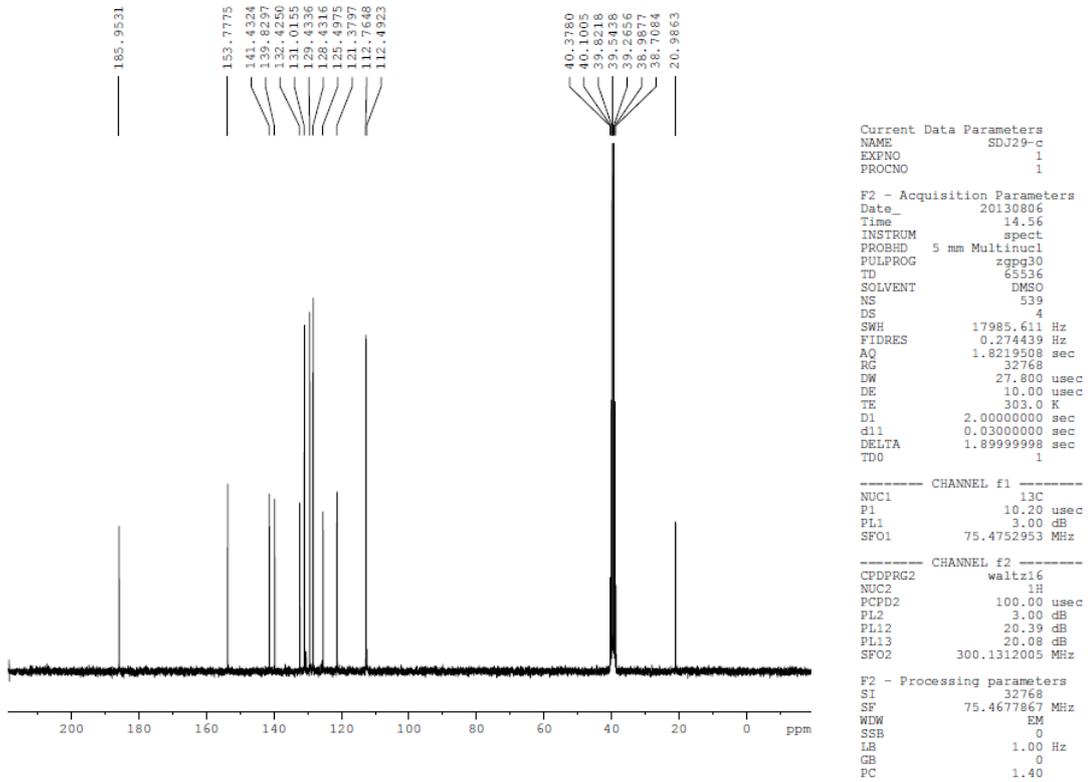
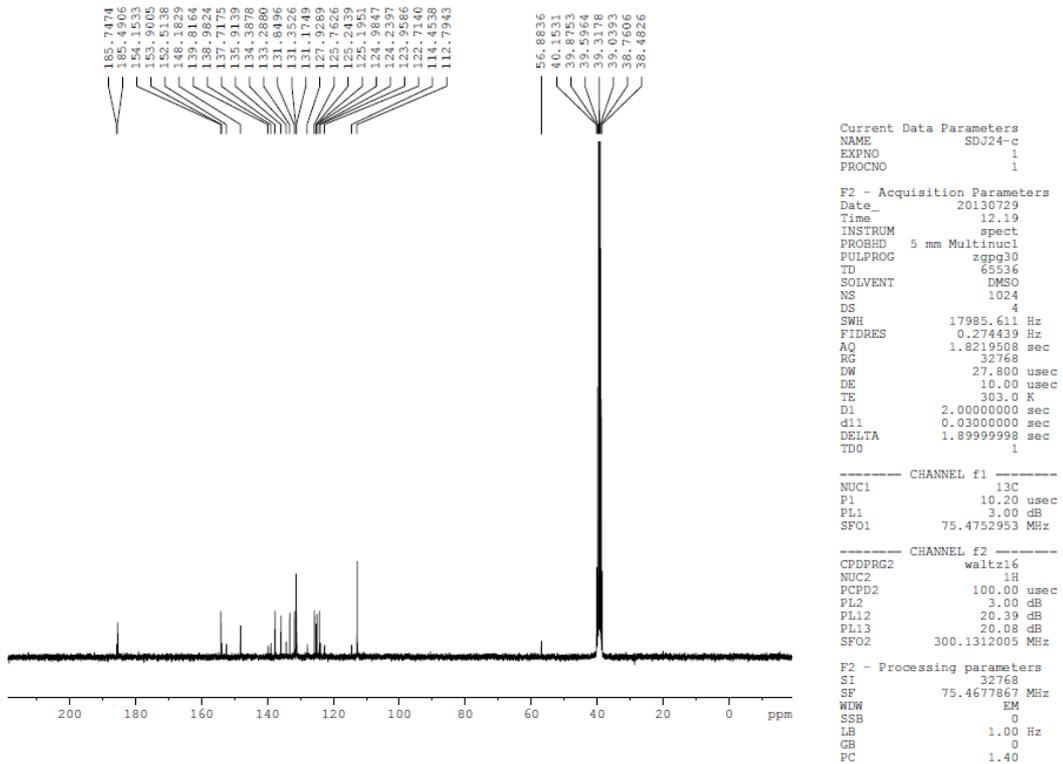
Anexo VIII: Espectroscopia de RMN¹H do composto 1.

Anexo IX: Espectroscopia de RMN¹H do composto 3.Anexo X: Espectroscopia de RMN¹H do composto 4.

Anexo XI: Espectroscopia de RMN¹H do composto 5.Anexo XII: Espectroscopia de RMN¹H do composto 7.

Anexo XIII: Espectroscopia de RMN¹H do composto 8.Anexo XIV: Espectroscopia de RMN¹³C do composto 1.

Anexo XV: Espectroscopia de RMN¹³C do composto 3.Anexo XVI: Espectroscopia de RMN¹³C do composto 4.

Anexo XVII: Espectroscopia de RMN¹³C do composto 5.Anexo XVIII: Espectroscopia de RMN¹³C do composto 7.

Anexo XIX: Espectroscopia de RMN¹³C do composto **8**.