



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Centro de Ciências Físicas e Matemáticas

Programa de Pós-Graduação em Química

**Síntese e estudos da relação estrutura-atividade de chalconas
biologicamente ativas em células de melanoma B16-F10 e na PtpA de
*Mycobacterium tuberculosis***

ALESSANDRA MASCARELLO

Florianópolis - SC, fevereiro 2009.

ALESSANDRA MASCARELLO

**Síntese e estudos da relação estrutura-atividade de chalconas
biologicamente ativas em células de melanoma B16-F10 e na PtpA de
*Mycobacterium tuberculosis***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química. Área de concentração: Química Farmacêutica e Medicinal.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo José Nunes
Co-orientador: Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes

Florianópolis - SC, fevereiro 2009.

AGRADECIMENTOS

Devo, primeiramente, agradecer a Deus, que presente em todos os momentos de minha vida, me acompanha, protege e guia todos os meus passos e minhas evoluções.

Aos meus pais, Valdecir e Salete, por todo o amor, esforço e companheirismo, por me ensinarem os valores essenciais e por irradiarem de luz o meu viver.

A toda minha família, principalmente, meu irmão Luís; meus avós Luiz e Graciosa; minha afilhada Gabriela e em especial à minha madrinha Rose, por todo o carinho e amor, sem os quais meus objetivos não teriam sido alcançados.

Ao meu orientador, prof. Ricardo José Nunes, por todo o tempo dedicado, fios de cabelos brancos, aceleramentos cardíacos e compreensão, me orientando da melhor maneira possível e me ensinando muito mais do que ele mesmo possa imaginar.

Ao professor e amigo, Dr. Rosendo Augusto Yunes, que me co-orientou desde a minha graduação, sendo um grande apoio tanto científico quanto filosófico.

Ao grupo de pesquisa Estrutura e Atividade: Louise, Taisa, Marlon e Anderson, que, como verdadeiros irmãos, acompanharam cada passo desta minha caminhada, auxiliando e tornando este trabalho mais prazeroso.

Parágrafo Especial: À Louise e sua grande contribuição, que me ajudou nos primeiros passos, aprofundou o meu conhecimento em química farmacêutica com toda a paciência do mundo e tornou-se uma grande amiga para todos os momentos.

Aos professores Dr. Hernán Terenzi, Dra. Tânia Creczynski Pasa e Dr. Adriano Andricopulo, que cederam disposição, tempo, laboratório, materiais e valiosos conhecimentos, sou muito grata a vocês e respectivos grupos de pesquisa, em especial ao Dr. Rafael Guido pelo apoio na área de Modelagem Molecular e à Msc. Andréia Navarini pelos testes em melanoma.

A todos os meus amigos, que tornam os meus dias mais alegres e minha caminhada mais prazerosa e cheia de sorrisos. Em especial, quero agradecer à minha amiga e colega de mestrado Juliana, que tem se tornado cada dia mais indispensável em minha vida; também, aos meus amigos: Irede, Marcel, Isadora, Samara, Renata, Caroline, Geneviève, Françoise (...) que igualmente enchem de luz o meu caminho; E aos demais, e não menos importante, que conheci nesta Universidade e que por algum motivo devo agradecer porque fizeram parte do meu dia-a-dia, compartilhando conhecimentos, congressos, horas de estudos, festas e momentos inesquecíveis.

Ao Departamento de Química da UFSC e à Central de Análises do Departamento de Química da UFSC pelas análises espectroscópicas.

Ao CNPq e CAPES, pelo suporte financeiro.

*“Não podemos fazer muito sobre a extensão de
nossas vidas, mas podemos fazer muito sobre a
largura e profundidade delas”*
(Evan Esar)

RESUMO

Chalconas são compostos intermediários essenciais para a biossíntese dos flavonóides em plantas e têm demonstrado uma grande variedade de efeitos farmacológicos. Em vista disso, um dos objetivos deste trabalho foi estudar a atividade antitumoral das hidroxichalconas em células murinas de melanoma B16-F10. Foi analisada a viabilidade celular em células tumorais e em células não-tumorais (VERO), bem como, o mecanismo de morte celular. Observou-se que as hidroxichalconas **1**, **3** e **13** reduziram a viabilidade celular da B16-F10, em 98%, 75% e 50%, e das células VERO em 83%, 39% e 30%, respectivamente, quando comparadas com o grupo controle. Apenas as hidroxichalconas **1** e **3** induziram a fragmentação do DNA e a hidroxichalcona **1** mostrou o menor valor de IC_{50} em 24 e em 72 horas, nas concentrações de $57\mu M$ e $12\mu M$, respectivamente. A hidroxichalcona **3** apresentou o menor valor de IC_{50} em 48h, $28\mu M$. Através de ensaios anteriores com análogos metoxilados no anel A, pode-se sugerir que os grupos hidroxila, presentes somente neste anel, sejam responsáveis pela citotoxicidade dos compostos **1** e **3**. Desta forma, estas hidroxichalconas mostram-se promissoras para a continuidade dos estudos de mecanismo de ação.

Outra proposta deste trabalho foi a busca por compostos anti-tuberculose, através do estudo da atividade de 22 naftilchalconas sobre a proteína tirosina fosfatase A de *Mycobacterium tuberculosis* – PtpA, que está relacionada com a virulência da bactéria. Os compostos mais ativos apresentaram valores de IC_{50} de $8,4\pm 0,9\mu M$ (**22**), $23,1\pm 1,6\mu M$ (**29**) e $39,5\pm 1,1\mu M$ (**14**). A análise da estrutura-atividade revelou que o fator predominante para a atividade dessas moléculas é a posição e a natureza dos substituintes no anel A, e o padrão de substituição do anel B pelos grupos 1 ou 2-naftil. O estudo cinético desta família de compostos indicou que o mecanismo de inibição ocorre de forma competitiva no sítio ativo e, através de modelagem molecular, verificamos como ocorre o reconhecimento dos inibidores pela proteína, através de estudos de docking da PtpA com os inibidores. Estes estudos revelaram que a posição das metoxilas presentes no anel A são essenciais para a atividade das moléculas, pois estas fazem ligação hidrogênio com os resíduos de aminoácidos Arg17, His49 e Thr12; e o anel B contendo o grupo 2-naftil faz interações hidrofóbicas com o Trp48, do tipo π *stacking*, mais fortes se comparadas ao grupo 1-naftil como anel B. Considerando o conjunto de resultados obtidos, estas naftilchalconas mostraram ação específica como inibidoras da MPtpA.

Palavras-chave: hidroxichalconas, naftilchalconas, melanoma, MPtpA.

ABSTRACT

Chalcones are essential intermediate compounds for the biosynthesis of flavonoids in plants and have demonstrated a variety of pharmacological effects. Thus, one of the objectives of this paper was to study the antitumor activity of hydroxychalcones in murine cells of B16-F10 melanoma. Cell viability was examined in tumor cells and in non-tumor cells (VERO), as well as the mechanism of cell death. It has been observed that the hydroxychalcones **1**, **3** and **13** reduced the cell viability of B16-F10, in 98%, 75% and 50%, and VERO cells in 83%, 39% and 30%, respectively, when compared with the control group. Only the hydroxychalcones **1** and **3** led to fragmentation of DNA and the hydroxychalcone **1** showed the lowest value of IC_{50} in 24 and 72 hours, in the concentration of $57\mu\text{M}$ and $12\mu\text{M}$, respectively. The hydroxychalcone **3** showed the lowest value of IC_{50} in 48 hours, $28\mu\text{M}$. Through previous tests with similar methoxylates in the A ring, you can suggest that the hydroxyl groups, present only in this ring, are responsible for the cytotoxicity of compounds **1** and **3**. Thus, these hydroxychalcones, are promising for the continuation of studies about mechanism of action.

Another proposal of this work was the search for anti-TB compounds, through the study of the activity of 22 naftilchalcones on the tyrosine phosphatase A protein of *Mycobacterium tuberculosis* - PtpA, which is related to the virulence of the bacteria. The most active compounds showed IC_{50} values of $8,4\pm 0,9\mu\text{M}$ (**22**), $23,1\pm 1,6\mu\text{M}$ (**29**) e $39,5\pm 1,1\mu\text{M}$ (**14**). The analysis of the structure-activity showed that the predominant factor for the activity of these molecules is the position and the nature of substituents in A ring, and the pattern of replacement of B ring by groups 1 or 2-naphthyl. The kinetic study of this family of compounds indicated that the mechanism of inhibition occurs in a competitive way in the active site and, through molecular modeling, it can be verified how the recognition of the inhibiting protein occurs, through the studies of the PtpA docking with the inhibitors. These studies revealed that the position of the methoxyls in the A ring are essential for the activity of the molecules, since they make hydrogen connection with the waste of amino acids Arg17, His49 and Thr12, and B ring containing the B group 2-naphthyl makes hydrophobic interactions with the Trp48, like π stacking, stronger when compared to the group 1-naphthyl as B ring. Considering the set of results, the naphthylchalcones showed specific action as MPtpA inhibitors.

Keywords: hydroxychalcones, naphthylchalcones, melanoma, MPtpA.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	10
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	13
1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Química Medicinal	15
1.2 Desenvolvimento de novos fármacos	15
1.3 Correlações Estrutura Química e Atividade Biológica	16
1.4 Chalconas	17
1.5 Câncer de pele – Melanoma	18
1.6 Tuberculose	19
CAPÍTULO 1 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DE HIDROXICHALCONAS SOBRE A LINHAGEM CELULAR B16-F10 DE MELANOMA – ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DESTES COMPOSTOS	
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Processos cancerosos – câncer de pele	21
2.2 Câncer de pele melanoma	22
2.3 Chalconas e flavonóides ativos em melanoma	23
3. OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo geral	26
3.2 Objetivos específicos	26
4. JUSTIFICATIVA	27
5. MATERIAIS E MÉTODOS	28
5.1 Síntese dos compostos	28
5.1.1 Procedimento geral para obtenção da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofeno (xantoxilina)	28
5.1.2 Procedimento geral para obtenção da 2-hidroxi-3-bromo-4,6-dimetoxi- acetofenona (bromo-xantoxilina)	29

5.1.3	Procedimento geral para obtenção das chalconas derivadas da xantoxilina e da bromo-xantoxilina	29
5.1.4	Procedimento geral para obtenção das chalconas derivadas do 1 e do 2-naftaldeído	30
5.2	Testes em células de melanoma	34
5.2.1	Cultura de células	35
5.2.2	Tratamento das células	36
5.2.3	Ensaio de viabilidade celular (teste do MTT)	36
5.2.4	Análise de apoptose pelo método de fragmentação nuclear	36
5.2.5	Determinação da curva dependente de concentração	37
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
6.1	Síntese das hidroxichalconas	38
6.2	Citototoxicidade das chalconas em células tumorais, células não-tumorais e análise do DNA	41
6.2.1	Atividade das hidroxichalconas dependente de concentração – IC ₅₀	44
7.	CONSIDERAÇÕES PARCIAIS	48
CAPÍTULO 2 - IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS INIBIDORES DE PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASE A (PtpA) DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i> – ATIVIDADE BIOLÓGICA, ESTUDO DO MECANISMO DE INIBIÇÃO E MODELAGEM MOLECULAR		
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	49
2.1	Tuberculose	49
2.2	Chalconas e tuberculose	50
2.3	Inibidores de proteínas de importância na medicina	51
2.4	MPtpA – proteína tirosina fosfatase A de <i>M. tuberculosis</i>	52
2.5	Cinética enzimática	54
2.6	Modelagem Molecular – Docking de proteínas	55
3.	OBJETIVOS	57
3.1	Objetivo geral	57
3.2	Objetivos específicos	57

4.	JUSTIFICATIVA	58
5.	MATERIAIS E MÉTODOS	59
5.1	Síntese dos compostos	59
5.2	Atividade biológica – Ensaio de inibição da MPtpA	64
5.2.1	MPtpA: expressão e purificação	65
5.2.2	Medidas da atividade residual de MPtpA	66
5.2.3	Determinação dos valores de IC ₅₀ dos compostos	66
5.2.4	Cinética enzimática	67
5.2.5	Modelagem Molecular	67
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
6.1	Síntese das naftilchalconas	69
6.2	Triagem biológica e determinação do valor de IC ₅₀	71
6.2.1	Estudos cinéticos – Determinação do mecanismo	73
6.2.2	Modelagem Molecular – estudos de docagem molecular dos compostos	77
7.	CONSIDERAÇÕES PARCIAIS	79
8.	CONCLUSÕES	80
9.	REFERÊNCIAS	81
10.	Anexos	90
	A Espectros de ¹ H e ¹³ C RMN e IV	
	B Artigos publicados (referentes aos capítulos 1 e 2)	

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Núcleo fundamental das chalconas	17
Figura 2.	Estruturas químicas da (a) dacarbazina e (b) temozolomida	19
Figura 3.	Câncer de pele não-melanoma	21
Figura 4.	Melanoma maligno	22
Figura 5.	Mecanismos de morte celular: necrose e apoptose	23
Figura 6.	Chalconas ativas em células tumorais	25
Figura 7.	Síntese da xantoxilina	29
Figura 8.	Síntese da bromo-xantoxilina	29
Figura 9.	Metodologia geral para obtenção de chalconas	30
Figura 10.	Esquema dos testes realizados com os compostos em células de melanoma B16F10 e células VERO.	35
Figura 11.	Síntese das hidroxichalconas	39
Figura 12.	Efeito citotóxico das hidroxichalconas em células B16-F10	41
Figura 13.	Efeito citotóxico das hidroxichalconas em células VERO (não-tumorais)	42
Figura 14.	Fragmentação do DNA induzida por hidroxichalconas em células B16-F10	43
Figura 15.	Atividade das hidroxichalconas dependente de concentração em células B16-F10, em (a) 24h; (b) 48h e (c) 72h.	45
Figura 16.	Estrutura da glutationa (GSH).	46
Figura 17.	Estrutura química da (a) rifampicina; (b) pirazinamida; (c) isoniazida.	50
Figura 18.	Estrutura das chalconas bioativas em <i>M. tuberculosis H37Rv</i>	51
Figura 19.	Estrutura primária da MPtpA exibindo a sequência de aminoácidos conservada no sítio característico das PTPs	54
Figura 20.	Hidrólise de resíduos de aminoácidos fosforilados em duas etapas, com a formação de um intermediário tio-fosforilado	55
Figura 21.	Sobreposição das duas únicas estruturas de MPtpA depositadas no PDB	68
Figura 22.	Síntese dos possíveis inibidores de MPtpA	69
Figura 23.	Análise cinética da inibição de PtpA. (a) Gráfico Michaelis-Menten e	74

	(b) gráfico duplo recíproco de Lineweaver-Burk para o composto 14	
Figura 24.	Análise cinética da inibição de PtpA. (a) Gráfico Michaelis-Menten e (b) gráfico duplo recíproco de Lineweaver-Burk para o composto 22	74
Figura 25.	Análise cinética da inibição da PtpA. (a) Gráfico Michaelis-Menten e (b) gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk para o composto 29	75
Figura 26.	Sítio ativo da MPTpA contendo os três inibidores mais ativos sobrepostos, (a) estrutura da proteína destacando a cadeia principal dos resíduos de aminoácidos; (b) estrutura da proteína com densidade sólida	77
Figura 27.	Modo de ligação proposto pelo programa FlexX da MptpA com o composto 22 (azul); destacando as duas ligações hidrogênio com a metoxila em posição <i>meta</i> , e uma ligação hidrogênio para a metoxila em posição <i>orto</i> do anel A.	78
Quadro 1.	Exemplos de inibidores enzimáticos utilizados como medicamentos.	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Dados cristalográficos do composto inédito 6	32
Tabela 2.	Rendimentos e pontos de fusão das hidroxichalconas	40
Tabela 3.	Comparação da viabilidade das células B16-F10 e células VERO tratadas com hidroxichalconas	43
Tabela 4.	Valores de IC ₅₀ das hidroxichalconas 1 , 3 e 13 , em 24, 48 e 72 horas de incubação, nas células de melanoma B16-F10	46
Tabela 5.	Rendimentos (%) e pontos de fusão (°C) das naftilchalconas	70
Tabela 6.	Atividade da MPtpA na presença de 25µM das chalconas.	71
Tabela 7.	Valor de IC ₅₀ dos compostos mais ativos em PtpA de <i>M tuberculosis</i> , ensaiados nas concentrações entre 5 a 60 µM.	72
Tabela 8.	Parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten, V _{máx} , K _m e k _i de MPtpA e o substrato pNPP para os compostos 14 , 22 e 29 .	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Trifosfato de adenosina
A431	Linhagem de células de carcinoma epidermóide humana
B16-F10	Linhagem de células de melanoma murino
B16-F4A5	Linhagem de células de melanoma murino
BCR-ABL	Proteína oncogênica de fusão
CC	Cromatografia de coluna
CCD	Cromatografia de camada delgada
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
COX	Ciclooxigenase
DMEM	Meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DQ	Dopaquinona
DTIC	Dacarbazina
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona oxidada
GST	Glutathiona S-transferase
HCT-116	Linhagem de células de câncer de cólon
HEPES	Ácido N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanosulfônico]
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HL-60	Linhagem de células de leucemia humana
HUVEC	Linhagem de células endoteliais de cordão umbilical humano
IAP	Proteínas inibidoras de apoptose
IC ₅₀	Concentração que inibe 50% do crescimento celular
IMAC	Cromatografia de afinidade por metal imobilizado
INCA	Instituto Nacional do câncer
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
IV	Infravermelho
<i>K_i</i>	Constante de inibição
<i>K_M</i>	Constante de Michaelis

LB	Meio de cultura Luria-Bertani
MAO	Monoamino oxidase
MCF-7	Linhagem de células de adenocarcinoma mamário humano
MDR	Resistência a múltiplos fármacos
MPtpA	Proteína tirosina fosfatase A de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MPtpB	Proteína tirosina fosfatase B de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTT	Brometo de dimetilazol difeniltetrazólio
OMS	Organização Mundial da Saúde
OTMS	(oxalylamino-methylene)-thiophene sulfonamide
PBS	Tampão fosfato salino
PCC	Principais propriedades dos substituintes
PDB	Banco de dados de proteínas
PDE-5	Enzima fosfodiesterase tipo 5
pET28a	Vetor de expressão do gene da PtpA
PTP	Proteína tirosina fosfatase
PtpA	Proteína tirosina fosfatase A
pNPP	<i>para</i> -nitrofenilfosfato
QSAR	Relação estrutura-atividade quantitativa
RMN	Ressonância magnética nuclear
SAR	Relação estrutura-atividade
SBDD	Planejamento baseado na estrutura do receptor
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida – dodecil sulfato de sódio
t.a.	Temperatura ambiente
TB	Tuberculose
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta
VERO	Linhagem de células epiteliais de rim de macaco
V_{\max}	Velocidade máxima de reação
VPS33B	Regulador de membrana de fusão
δ	Deslocamento químico (ppm)

1. INTRODUÇÃO

1.1 Química Medicinal

Devido à complexidade para a elucidação das estruturas químicas dos fármacos e a correlação entre propriedades físico-químicas, determinação da atividade biológica e estudo das relações estrutura-atividade; tornou-se necessário a interação entre a química, a farmacologia e áreas correlatas, com o intuito de obter fármacos mais específicos, com atividades e aplicações bem definidas. Desta interação multidisciplinaridade, surgiu a Química Medicinal, que inclui o planejamento de fármacos, a determinação de suas estruturas, ensaios farmacológicos e estudos das relações estrutura química-atividade biológica (Amaral *et al.*, 2002).

A descoberta de novos fármacos inclui três etapas importantes: i) *etapa de descobrimento* - consiste na identificação e produção de novas substâncias ativas, originadas da síntese orgânica, de produtos naturais ou de processos biotecnológicos; ii) *etapa de otimização* – baseia-se nas modificações sintéticas das estruturas, no sentido de aumentar a potência, seletividade e conferir menor toxicidade; iii) *etapa de desenvolvimento* - consiste na otimização das rotas sintéticas para a produção em larga escala e a modificação das propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas da substância ativa para uso clínico (Wermuth, 1996).

1.2 Desenvolvimento de novos fármacos

Os fármacos de origem sintética representam significativa parcela do mercado farmacêutico, estimado, em 2000, em 390 bilhões de dólares. Até 1991, dos 866 fármacos usados na terapêutica, 680 (79%) eram de origem sintética e o restante (21%) correspondia àqueles de origem natural ou semi-sintética (Barreiro, 2001). Porém, a utilização de produtos naturais ativos como matéria-prima, modelo ou molécula-protótipo para a síntese de análogos mais potentes e seletivos, têm contribuído significativamente para a obtenção de novos agentes terapêuticos (Cechinel-Filho *et al.*, 2001).

A modificação estrutural constitui-se no método mais utilizado para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos ou para otimizar a atividade de substâncias ativas naturais (Barreiro, 1991).

A pesquisa acadêmica constitui a base para o desenvolvimento sustentável da indústria farmacêutica e farmoquímica (responsável pela fabricação das substâncias ativas e de intermediários) no país (Calixto, 2001), no entanto, apesar do desenvolvimento da indústria farmacêutica brasileira, o crescimento da indústria farmoquímica foi praticamente nulo (Comciencia, 2001). Desta forma, percebe-se claramente a necessidade de uma política de incentivo à pesquisa e desenvolvimento da indústria nacional para o crescimento destes setores.

1.3. Correlações entre estrutura química e atividade biológica

Uma molécula ativa e com eficácia elevada é reflexo das interações responsáveis pelo reconhecimento molecular do fármaco pelo biorreceptor (farmacodinâmica) e biodisponibilidade, resultado de fatores responsáveis pela absorção, distribuição, metabolismo e eliminação do fármaco (farmacocinética), além de apresentar baixa toxicidade (Barreiro, 2001).

A substituição de um átomo de hidrogênio por um determinado substituinte pode modificar a potência, duração e ainda a natureza do efeito farmacológico de uma molécula. Os estudos de correlação estrutura e atividade, fundamentados no efeito do substituinte em um determinado anel aromático, são muito comuns na química medicinal, uma vez que mais de 50% dos fármacos ou compostos bioativos possuem este tipo de anel (Calixto, 2001). As modificações produzidas pela introdução de um substituinte podem modificar várias propriedades físico-químicas da molécula, tais como: hidrofobicidade, densidade eletrônica e conformação estrutural, cuja análise poderá orientar novas sínteses.

Várias estratégias foram desenvolvidas para compreender os diversos parâmetros físico-químicos numa pequena série de compostos ou grupo de teste. Um bom planejamento permite conseguir um grupo de substâncias-teste importante para realizar um tratamento quantitativo da relação estrutura-atividade. Entre estas, podemos citar os métodos de Hansch e Leo, Craig, PCC (principais propriedades substituintes) (De Waterbeemd, 1996), Topliss (Topliss, 1972), e o método modificado de Topliss

(Yunes, 2002). Podem ser realizados também estudos de química computacional, através de métodos de QSAR.

Podemos destacar ainda, que o caráter hidrofílico/hidrofóbico dos fármacos é um fator crucial que afeta a absorção através das paredes do intestino, e o peso molecular da substância deveria, em teoria, ser irrelevante. Na prática, porém, moléculas grandes tendem a ser pobremente absorvidas, porque geralmente contêm um grande número de grupos funcionais polares, o que faz com que estes compostos sejam absorvidos ou metabolizados pelo sistema digestivo. Como regra, fármacos absorvidos oralmente tendem a obedecer o que é conhecido como as “Regras de Lipinski”, que são: Massa Molecular ≤ 500 ; não conter mais do que 5 grupos doadores de ligação hidrogênio; não conter mais do que 10 grupos aceptores de ligação hidrogênio e ter $\log P \leq 5$ (Patrick, 2005).

1.4 Chalconas

Chalconas são precursores dos flavonóides nas plantas (Dewick, 1997) e possuem como núcleo fundamental a 1,3-diarilpropenona (Zuanazzi, 2001). São caracterizadas pela abertura de um terceiro anel, presente nas demais classes de flavonóides, levando à formação de uma ligação dupla com os carbonos denominados α e β em função da carbonila (Waterman *et al.*, 1994) (Figura 1).

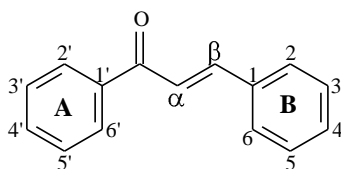


Figura 1. Núcleo fundamental das chalconas.

Também podem ser obtidas sinteticamente através de métodos como o de Suzuki (Eddarir, 2003); condensação aldólica (ou condensação de Claisen-Schmidt), por meio de irradiação ultra-som (Li *et al.*, 2002; Calvino *et al.*, 2006) ou com catalizador NaNO_3/NP (fosfato natural) (Sebti *et al.*, 2001); ou ainda, reagindo acetofenonas e aldeídos, com hidróxido de sódio (NaOH) ou potássio (KOH) como catalizador e metanol ou etanol como solvente, à temperatura ambiente (Vogel, 1989).

As chalconas apresentam um amplo espectro de atividades biológicas, as quais variam conforme os diferentes substituintes nas moléculas, e são alvo de vários estudos

de isolamento, identificação e investigação de suas propriedades. São referenciados efeitos antifúngico (Boeck *et al.*, 2005); anti-leishmania (Bergmann *et al.*, 2004, Boeck *et al.*, 2006); antioxidante (Anto *et al.*, 1995); antimalárico (Dominguez *et al.*, 2005); tripanossomicida (Lunardi *et al.*, 2003); antitumoral (Won *et al.*, 2005), antileucêmico (LeBlanc *et al.*, 2005) e antibacteriano (Nielsen *et al.*, 2004).

1.5 Câncer de pele – Melanoma

O câncer de pele é uma das três mais comuns malignidades humanas (Gray-Schopper *et al.*, 2007). Está dividido em duas categorias: câncer de pele melanoma e câncer de pele não-melanoma (Bagheri e Safai, 2001). Embora o melanoma só represente 5% dos cânceres de pele, é considerado o mais grave, devido à elevada possibilidade de produzir metástase. Para o ano de 2008 foram constatados 5.920 novos casos de melanoma no Brasil, dentre os quais 510 novos casos apenas no estado de Santa Catarina (INCA, 2008).

O melanoma tem origem nos melanócitos, que são células responsáveis pela pigmentação da pele, dos olhos e dos cabelos (Carvalho *et al.*, 2004). Essa pigmentação ocorre através da síntese de melanina, que é resultado de sucessivas reações oxidativas do aminoácido tirosina. Durante esse processo, há uma grande geração de peróxido de hidrogênio e de dopaquinona. Essas substâncias são altamente reativas e causam alteração no DNA, desencadeando a carcinogênese (Frank *et al.*, 2001).

O regime padrão atual de tratamento para o melanoma inclui a retirada do tumor por cirurgia, seguida de quimioterapia, de imunoterapia e/ou de radioterapia. Entretanto, nem todos os pacientes respondem à terapia, e muitos têm recaída ou progressão da doença (Somasundar *et al.*, 2005). Apesar da grande capacidade de produzir metástase, o melanoma é potencialmente curável, se detectado em estágio precoce (Tarhini e Agarwala, 2004).

Até hoje, ainda não há um agente terapêutico conhecido que proporcione o prolongamento da vida dos pacientes com melanoma metastático. As estratégias quimioterápicas têm sido baseadas no uso de dacarbazina (Figura 2a), que é o fármaco mais ativo para a doença (taxa de resposta de 11 a 25%) (Tarhini e Agarwala, 2006). A temozolomida (Figura 2b) é o fármaco selecionado para os pacientes com melanoma metastático que precisam de tratamento sistêmico (Middlenton *et al.*, 2000).

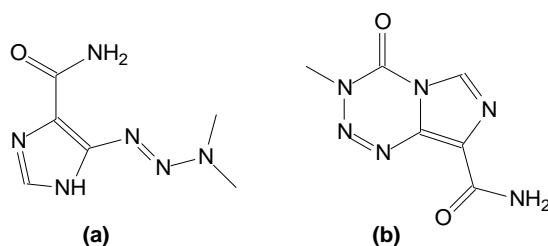


Figura 2. Estruturas químicas da (a) dacarbazina e (b) temozolomida.

Com o intuito de alcançar resultados mais eficazes, o meio científico aumentou os estudos de antitumorais com compostos extraídos de plantas e com seus análogos sintéticos. Destacam-se os flavonóides, por apresentarem efeitos benéficos pela atividade antioxidante, pelo efeito inibitório da atividade de crescimento do tumor e pela atividade indutora de apoptose, em várias linhagens de células tumorais. Em plantas, os flavonóides e isoflavonóides são sintetizados a partir de hidroxichalconas, que são amplamente encontradas nas plantas e têm mostrado sua efetividade como agentes antitumorais.

1.6 Tuberculose

A tuberculose é uma doença infecciosa que mata anualmente cerca de dois milhões de pessoas no mundo, dado o alto impacto causado por este tipo de infecção pulmonar associado à toxicidade e desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos. Apesar da existência de antibióticos anti-tuberculose e da vacina BCG, a bactéria causadora da tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, continua sendo um dos agentes que causa mais mortes de origem infecciosa no mundo (WHO, 2008). A vacina BCG protege contra as formas mais ativas de tuberculose, principalmente em crianças; a proteção em adultos varia de 0 a 80%.

O tratamento para tuberculose utilizado atualmente tem 6 meses de duração e, associa 4 antibióticos por 2 meses e 2 antibióticos por 4 meses (Dye *et al.*, 1999; Blomberg *et al.*, 2002), devido a isto, o tratamento tem como consequência a dificuldade de implementação e a aparição de novos bacilos resistentes, emergenciando a necessidade do desenvolvimento de novos medicamentos multi-resistentes, voltados, principalmente aos pacientes imunocomprometidos.

Estima-se que 79 enzimas e 24 tipos de diferentes receptores totalizem os alvos terapêuticos dos fármacos sintéticos empregados, embora sejam cerca de 200 enzimas

estudadas atualmente para a possível ação de novos fármacos (Barreiro, 2001). Pesquisas recentes mostraram o envolvimento da proteína tirosina fosfatase A (PtpA) na virulência da *Mycobacterium tuberculosis* (Bach *et al.*, 2008), aparecendo como um novo alvo para o desenvolvimento de agentes terapêuticos contra a tuberculose.

Através do exposto, esta pesquisa está dividida em dois capítulos: o primeiro trata dos estudos de bioatividade com as hidroxichalconas em células de melanoma B16-F10 e no segundo, apresentamos e discutimos os resultados obtidos com as naftilchalconas em proteína tirosina fosfatase A (PtpA) de *M. tuberculosis*, estudos cinéticos e modelagem molecular dos compostos com esta proteína.

CAPÍTULO I:

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE HIDROXICALCONAS SOBRE A LINHAGEM CELULAR B16-F10 DE MELANOMA – ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DESTES COMPOSTOS

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Processos cancerosos – câncer de pele

O câncer é uma doença caracterizada pela proliferação descontrolada de formas anormais das próprias células humanas, estas células diferenciam-se das normais pelo poder de invasão que possuem, pela perda de função, perda de diferenciação e pela capacidade de metástase (Rang *et al.*, 2004). É a segunda maior causa de morte no Brasil, com registro de 141 mil óbitos em 2004 (INCA, 2008).

Os cânceres de pele não-melanoma (Figura 3), por não estarem associados à metástases, raramente são letais. O tratamento cirúrgico geralmente é curativo e, dependendo da extensão, este tipo de câncer pode ser tratado também através de medicamento tópico ou radioterapia (WHO, 2008).



Figura 3: Câncer de pele não-melanoma.

Fonte: WHO - World Health Organization. Disponível em: http://www.who.int/uv/health/uv_health2/en/index1.html.

2.2. Câncer de pele melanoma

O melanoma é uma neoplasia maligna originada a partir dos melanócitos, que são células responsáveis pela pigmentação, encontradas predominantemente na pele, nos cabelos e nos olhos, locais onde produzem melanina, sendo a principal causa de morte por doença de pele, caracterizada pela alta capacidade de infiltração no sistema nervoso central (SNC) (Ewend *et al.*, 1996).

A incidência do melanoma vem aumentando de 3% a 7% anualmente, no mundo inteiro (INCA, 2008; Lui *et al.*, 2007). No Brasil a estimativa é de 116 mil novos casos anualmente (Ni *et al.*, 2004) (Figura 4). Em estágio avançado é letal, pois atualmente há poucos tratamentos eficazes que resultam em melhora efetiva do paciente vítima dessa neoplasia.



Figura 4: Melanoma maligno.

Fonte: WHO - World Health Organization. Disponível em: http://www.who.int/uv/health/uv_health2/en/index1.html.

O principal agravante desta doença é o melanoma metastático, em que as células tumorais se localizam em áreas distantes do tumor primário, levando a um prognóstico desfavorável, com sobrevida somente de seis a dez meses em média (Lee *et al.*, 2000).

O alto potencial metastático do melanoma e a alta resistência a agentes quimioterápicos são, em grande parte, devido ao fato destas células possuírem baixo índice de apoptose espontânea *in vivo* (Figura 5), comparado aos outros tipos de células tumorais. Essa resistência a apoptose é, possivelmente, a razão da resistência do melanoma à quimioterapia, à radioterapia e à imunoterapia (Soengas e Lowe, 2003).

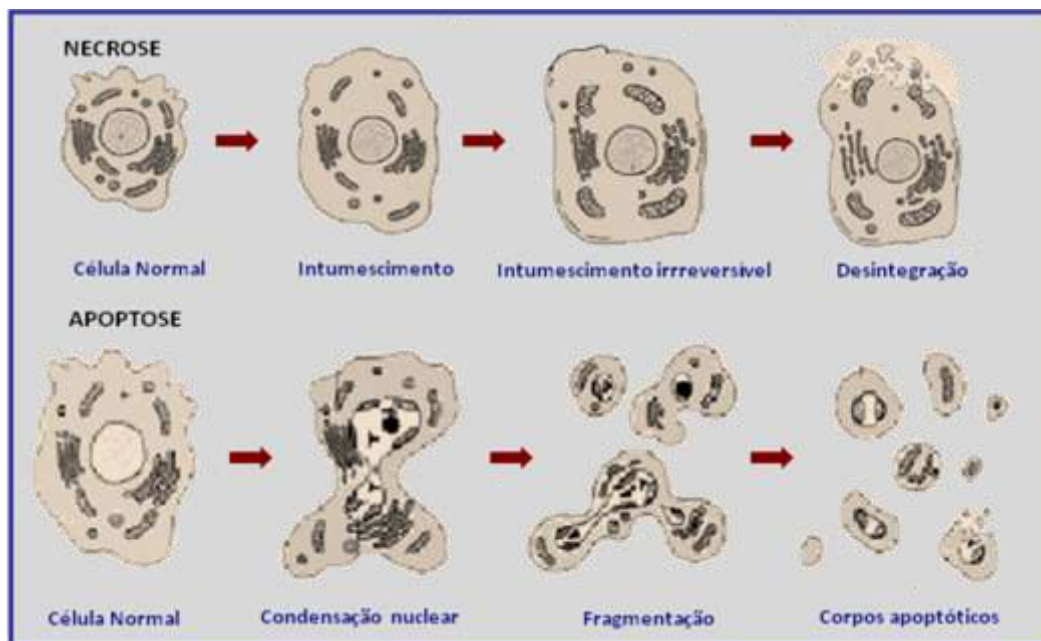


Figura 5: Mecanismos de morte celular: necrose e apoptose.

Fonte: Adaptado do Catálogo BioAgency 2004-05, Cap. 9 - Apoptose e Inflamação.

O desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de tumores malignos, como o melanoma, pode ser baseado na capacidade inibitória da proliferação celular desses compostos, bem como na capacidade de induzirem células à apoptose, pois a habilidade da célula maligna em evitar esta forma de morte celular é uma marca característica do câncer, e a resistência à apoptose constitui um importante problema clínico (Hanahan e Weinberg, 2000).

2.3. Chalconas e flavonóides ativos em melanoma

Os flavonóides, além de sua função fisiológica nos vegetais, apresentam várias propriedades bioquímicas e farmacológicas. Um dos efeitos mais investigados é sua participação na prevenção do câncer (Shih *et al.*, 2000). As atividades antioxidantes, bem como as propriedades citotóxicas dos flavonóides, são influenciadas pelo seu grau de pureza, pela posição dos substituintes e pela quantidade de hidroxilas (Schroeter *et al.*, 2002).

Cerca de 8.000 compostos formados a partir de um esqueleto básico de flavonóide e combinações de vários grupos substituintes, como hidroxilas e metoxilas já foram identificados (Hodek *et al.*, 2002).

Os flavonóides e isoflavonóides são biossintetizados a partir das chalconas, que estão abundantemente distribuídas nos vegetais, principalmente nas pétalas das flores, sendo responsáveis pela pigmentação das mesmas, e minoritariamente nas folhas, frutos, cascas, raízes de várias árvores e plantas (Ni *et al.*, 2004).

Nam e col. (2003) produziram uma série de 2',5'-dihidroxichalconas com potente atividade citotóxica, em três linhagens celulares, incluindo melanoma murino (B16), células tumorais de câncer de cólon (HCT-116) e carcinoma epidermóide humano (A431). Foi observado também que vários compostos mostraram-se seletivamente citotóxicos para células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC) e, conseqüentemente, inibidores da angiogênese (processo de formação de novos capilares sangüíneos que irrigam o tumor).

Estudos feitos por Kobori e col. (1999) descreveram que a 2',4',6',4-tetrahidroxidihidrochalcona (floretilina) (Figura 6a) induziu apoptose em células de melanoma murino (B16-4A5) e em células de leucemia humana (HL-60). Posteriormente, Iwashita e col. (2000) demonstraram que a 2',4',3,4-tetrahidroxichalcona (Figura 6b) inibiu significativamente a proliferação celular e induziram este mesmo tipo de célula de melanoma (B16-4A5) à apoptose.

Won e col. (2005) estudaram chalconas em células de câncer de mama (MCF-7), e a estrutura com metoxilas nas posições 2' e 5', e hidroxila na posição 4 (Figura 6c), mostrou potente citotoxicidade seletiva para estas células, provocando morte celular por apoptose.

Em outro estudo, chalconas derivadas do 2-naftaldeído foram divulgadas como potentes agentes anti-angiogênicos e antitumorais em células endoteliais (SVR). O composto com substituintes 2',6'-dicloro (Figura 6d) inibiu o crescimento das células *in vitro* em 81-91%, na concentração de 3 µg/ml (Bowen *et al.*, 2001).

Através do exposto, pretendemos encontrar novas chalconas que apresentem atividade citotóxica e seletividade contra células de melanoma, buscando efetividade para o tratamento, com redução dos efeitos adversos, visto que as células de melanoma B16-F10 têm elevado potencial metastático e, em geral, não respondem facilmente a agentes citotóxicos.

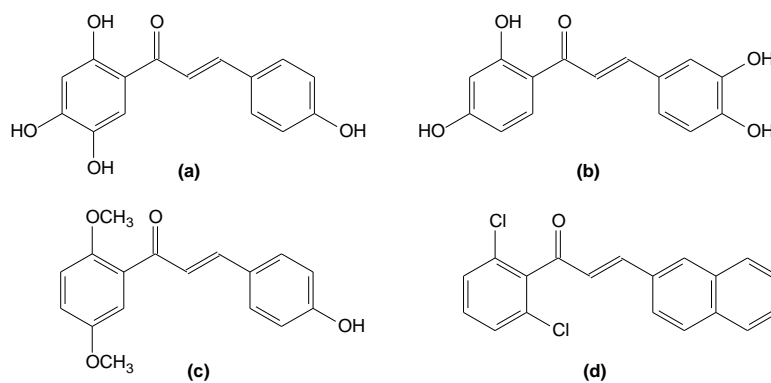


Figura 6: Chalconas ativas em células tumorais. (a) 2',4',6',4'-tetrahydroxidihydrochalcona; (b) 2',4',3,4-tetrahydroxichalcona; (c) 2',5'-metoxi-4-hydroxichalcona; (d) 2',6'-dicloro-2-naftilchalcona.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo deste capítulo é a obtenção de uma série de chalconas hidroxiladas e a avaliação de sua atividade em células de melanoma B16-F10, bem como, investigar o possível mecanismo de ação destes compostos.

3.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver as sínteses, purificar e caracterizar as hidroxichalconas obtidas através de condensação aldólica, a partir de diferentes aldeídos e acetofenonas.

- Estudar a ação dos compostos sintetizados em células de melanoma (B16-F10) *in vitro*, objetivando:

1. Analisar o efeito das hidroxichalconas ativas em células tumorais e não-tumorais (VERO).
2. Identificar por qual via os compostos causam morte celular: por apoptose ou por necrose.
3. Determinar a curva dependente de concentração para obtenção das IC₅₀ dos compostos mais ativos.

4 JUSTIFICATIVA

A busca pelo tratamento de inúmeras patologias tem impulsionado a pesquisa científica na área da química medicinal, com o intuito da obtenção de novos fármacos, mais eficientes e seguros, com menores efeitos colaterais e com custos reduzidos para o tratamento.

Todo ano, mais de 11 milhões de pessoas são diagnosticadas com câncer, deste total cerca de 7 milhões morrem anualmente, isso representa 12,5% do total mundial (WHO, 2008). E os cânceres de pele, do tipo melanoma, vem aumentando de 3% a 7% anualmente, no mundo inteiro (INCA, 2008).

Apesar de recentes avanços no conhecimento dos processos biológicos responsáveis pelo surgimento do câncer, ainda não se conhecem os mecanismos de citotoxicidade contra várias linhagens celulares tumorais humanas. Considerando o potencial citotóxico de muitos produtos naturais, a síntese de chalconas pode ser uma estratégia promissora no desenvolvimento de fármacos antitumorais, visto que ainda não se conhece um agente terapêutico que proporcione o prolongamento da vida dos pacientes com melanoma metastático. As estratégias quimioterápicas atuais têm sido baseadas no uso de fármacos que precisam de tratamento sistêmico e provocam alta debilidade do organismo. Sendo assim, a necessidade de focalizar a pesquisa aplicada ao desenvolvimento de novos fármacos que possam ser administrados oralmente e que apresentem menores efeitos secundários que os medicamentos disponíveis comercialmente não pode ser subestimada.

A síntese total de análogos representa um alvo promissor para o desenvolvimento de novos fármacos e tem sido o objeto de estudo do nosso grupo de pesquisa. Dentre os muitos compostos ativos estudados, estão chalconas que apresentaram importante ação anti-melanoma em experimentos *in vitro* (Sorgato *et al.*, 2005; Navarini *et al.*, 2006). Desta forma, a síntese e avaliação dos compostos propostos neste capítulo são de extrema importância para direcionarmos a pesquisa em busca de protótipos de novos fármacos ativos em células de melanoma.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Síntese dos compostos

Todas as reações contidas nos Capítulos 1 e 2 foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando placas de alumínio com sílica gel 60 GF 254 da Merck, visualização em luz ultra violeta ($\lambda = 254$ e 366 nm) e revelação com pulverização de anisaldeído sulfúrico.

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H (400 MHz) e de ^{13}C (100 MHz) foram realizados em equipamento VARIAN OXFORD AS-400, tendo como referência interna o tetrametilsilano (TMS) ou o próprio solvente. Para todas as amostras analisadas utilizou-se clorofórmio deuterado (CDCl_3) e acetona deuterada como solventes. Os espectros de absorção no infravermelho (IV) foram obtidos através de um espectrômetro Abb Bomen FTLA 2000, utilizando pastilha de KBr. O ponto de fusão não corrigido dos compostos foi determinado em aparelho digital de ponto de fusão, MGAPF-301, Microquímica Equipamento Ltda. Os reagentes e solventes utilizados nesta pesquisa foram das marcas comerciais: Aldrich, Merck, Sigma, Fluka e Vetec.

A análise elementar dos compostos foi obtida em equipamento CHNS EA 1110; E a estrutura cristalográfica da chalcona **6** foi obtida em difratômetro automático para monocristais, ENRAF-NONIUS CAD-4.

5.1.1 Procedimento geral para obtenção da 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona (xantoxilina).

A 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona foi obtida a partir de duas etapas reacionais: (i) geração da floroacetofenona a partir do floroglucinol e (ii) metilação das hidroxilas da acetofenona nas posições 4 e 6. A reação ocorre através de uma acilação de Friedel-Crafts a 0°C entre o floroglucinol (8mmol) (Figura 7a) e anidrido acético (24,6mmol), em éter etílico anidro (100mL), utilizando cloreto de zinco (1g) e ácido clorídrico gasoso borbulhado na reação, com posterior hidrólise, obtém-se a floroacetofenona com 86% de rendimento (Figura 7b). A xantoxilina (Figura 7c) é obtida pela metilação da floroacetofenona (17,85mmol) com sulfato de dimetila (39,2mmol), utilizando acetona (100mL) como solvente e carbonato de potássio

(35,7mmol) como base, sob refluxo, com posterior acidificação do meio com ácido clorídrico concentrado a 0°C. O produto é extraído com diclorometano e recristalizado com diclorometano e hexano, obtendo-se a xantoxilina com rendimento de 88% (Boeck *et al.*, 2006; Cechinel-Filho *et al.*, 1996).

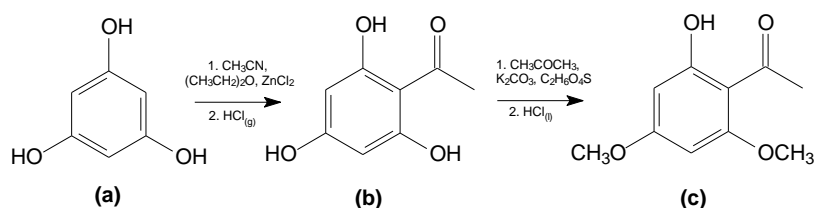


Figura 7: Síntese da xantoxilina (a) floroglucinol; (b) flooroacetofenona; (c) xantoxilina.

5.1.2. Procedimento geral para obtenção da 2-hidroxi-3-bromo-4,6-dimetoxi-acetofenona (bromo-xantoxilina)

A 2-hidroxi-3-bromo-4,6-dimetoxi-acetofenona foi obtida a partir de uma única etapa reacional à 0°C entre a xantoxilina (2,55mmol) obtida e bromo (2,55mmol) em ácido acético (2,5mL). O sólido foi lavado com etanol e recristalizado em etanol à quente, obtendo-se a bromo-xantoxilina com rendimento de 72% (Figura 8) (Boeck *et al.*, 2006; Cechinel-Filho *et al.*, 1996).

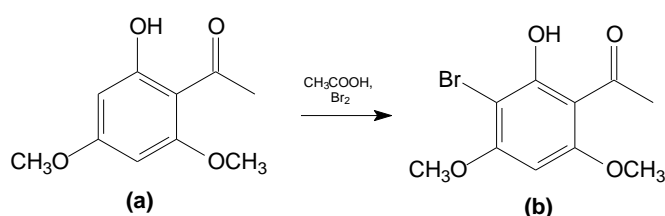


Figura 8: Síntese da bromo-xantoxilina (a) xantoxilina; (b) xantoxilina bromada.

5.1.3. Procedimento geral para obtenção das chalconas derivadas da xantoxilina e da bromo-xantoxilina

Para a preparação das chalconas **2**, **7-13**, utilizou-se um balão de reação de 100 mL e de uma boca. Colocou-se o benzaldeído (2 mmol), a xantoxilina (ou a bromo-xantoxilina) (2mmol) e metanol (15mL). Dissolveu-se os reagentes sob agitação magnética e em seguida adicionou-se lentamente KOH 50% v/v (10mL). Deixou-se a reação sob agitação magnética, à temperatura ambiente, por 24 horas (Figura 9). Após

este período, adicionou-se água destilada à mistura reacional, o que provocou a precipitação dos compostos, e adicionou-se, então, ácido clorídrico 10%, para neutralização do meio. Filtrou-se em funil de Büchner, verificou-se a pureza por CCD e as chalconas foram recristalizadas em diclorometano, tendo sua precipitação forçada com hexano. As chalconas **7**, **8**, **12** e **13** foram também purificadas por cromatografia em coluna, utilizando concentrações variadas de eluentes apolares e polares (hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, nesta sequência).

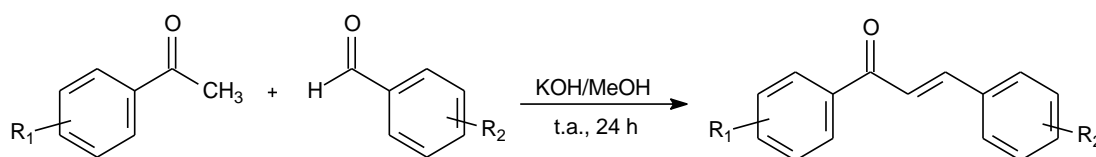


Figura 9: Metodologia geral para obtenção de chalconas.

Fonte: Vogel (1989).

5.1.4. Procedimento geral para a preparação das chalconas derivadas do **1** e do **2**-naftaldeído

Para a preparação dos compostos **1**, **3-6**, utilizou-se um balão de reação de 100 ml de uma boca. Colocou-se o 1-naftaldeído (ou o 2-naftaldeído) (2mmol), a acetofenona (2mmol) e metanol (15mL). Dissolveu-se os reagentes sob agitação magnética e em seguida adicionou-se lentamente KOH 50% v/v (10mL). Deixou-se a reação sob agitação magnética, à temperatura ambiente, por 24 horas (Figura 9). Após este período, adicionou-se água destilada à mistura reacional, o que provocou a precipitação dos compostos, e adicionou-se, então, ácido clorídrico 10%, para neutralização do meio. Filtrou-se em funil de Büchner, verificou-se a pureza por CCD e as chalconas foram recristalizadas em diclorometano, tendo sua precipitação forçada com hexano.

De acordo com os procedimentos descritos, os compostos **1-13** foram sintetizados, e os dados espectroscópicos seguintes são descritos para todos os compostos, inclusive a estrutura cristalográfica para o composto inédito **6**, o qual teve sua estrutura também confirmada por raio-X. Os espectros de todos os compostos encontram-se no Anexo A neste trabalho, exceto os compostos **1**, **2**, **3** e **6**, que já foram apresentados em meu trabalho de conclusão de curso (Mascarello, 2006) e os compostos **4** e **5** na dissertação de Louise Domeneghini Chiaradia (Chiaradia, 2006).

1 – (2E)-1-(3'-hidroksifenil)-3-(1-naftil)-2-propen-1-ona. ^1H RMN (CDCl_3) δ 7.10 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H4'), 7.40 (dd, 1H, H5'), 7.51-7.65 (m, 5H, H3, H4, H6, H7, H2'), 7.60 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, H α), 7.90 (d, 2H, H5, H8), 7.94 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H6'), 8.26 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H2), 8.67 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, H β). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ 115.07 (C2'), 120.22 (C4'), 120.32 (C6'), 123.41 (C α), 124.97 (C2), 125.56 (C3), 125.89 (C8), 126.52 (C6), 127.30 (C7), 129.07 (C4), 130.08 (C5), 130.93 (C5'), 132.01 (C9), 132.34 (C10), 134.16 (C1), 139.91 (C1'), 140.39 (C β), 158.06 (C3'), 189.09 (C=O). IV $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3176, 1642, 1351, 1571, 1273, 1475, 1172, 962, 772, 707 (KBr). Anal. Calc. $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{O}_2$: C 83.19, H 5.14. Exp.: C 83.42, H 5.21.

2 – (2E)-1-(2'-hidroksi-4',6'-dimetoksifenil)-3-(3-nitrofenil)-2-propen-1-ona. ^1H RMN (CDCl_3) δ 3.85 (s, 3H, OCH $_3$), 3.94 (s, 3H, OCH $_3$), 5.98 (s, 1H, H5'), 6.12 (s, 1H, H3'), 7.74 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, H α), 7.84-7.88 (m, 2H, H4, H5), 7.98 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, H β), 8.22 (d, 1H, $J = 7.75$ Hz, H6), 8.46 (s, 1H, H2), 14.09 (s, 1H, OH). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ 55.56 (OCH $_3$), 55.82 (OCH $_3$), 91.37 (C5'), 93.84 (C3'), 106.20 (C1'), 122.08 (C2), 123.99 (C4), 129.78 (C α), 130.51 (C5), 134.01 (C6), 137.43 (C1), 138.68 (C β), 148.71 (C3), 162.45 (C2'), 166.45 (C6'), 168.46 (C4'), 191.78 (C=O). IR $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 1640, 4580 (KBr). Anal. Calc. $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{NO}_6$: C 62.00, H 4.59, N 4.59. Exp.: C 62.08, H 4.26.

3 – (2E)-1-(2'-hidroksifenil)-3-(1-naftil)-2-propen-1-ona. ^1H RMN (CDCl_3) δ 6.97 (dd, 1H, $J = 7.4$ Hz, H5'), 7.06 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H3'), 7.51-7.62 (m, 4H, H3, H6, H7, H4'), 7.76 (d, 1H, $J = 15.2$ Hz, H α), 7.90-7.99 (m, 4H, H6', H4, H5, H8), 8.29 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H2), 8.79 (d, 1H, $J = 15.2$ Hz, H β), 12.88 (s, 1H, OH). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ 118.93 (C3'), 119.17 (C5'), 122.99 (C α), 123.67 (C2), 125.59 (C8), 125.68 (C1'), 126.67 (C3), 127.41 (C6), 129.07 (C4, C5), 130.00 (C9, C6'), 131.48 (C10), 136.74 (C1, C4'), 142.66 (C β), 163.93 (C2'), 194.12 (C=O). IV $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3451, 1635, 1351, 1576, 1203, 1015, 3047, 1435, 1162, 972, 760 (KBr). Anal. Calc. $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{O}_2$: C 83.19, H 5.14. Exp.: C 83.88, H 5.18.

4 – (2E)-1-(2'-hidroksifenil)-3-(2-naftil)-2-propen-1-ona. ^1H RMN (CDCl_3) δ 6.96 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H3'), 7.03-7.10 (m, 1H, H5'), 7.48-7.54 (m, 3H, H3, H4, H4'), 7.75 (d, 1H, $J = 16.0$ Hz, H α), 7.78-7.89 (m, 5H, H5, H6, H7, H8, H6'), 7.93 (d, 1H, $J = 16.0$ Hz, H β), 8.04 (s, 1H, H1), 12.89 (s, 1H, OH). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ 118.89 (C3'), 120.41 (C5'), 121.93 (C3), 123.89 (C α), 125.65 (C1'), 126.80 (C6), 127.13 (C7), 127.33 (C1), 128.40 (C5), 129.08 (C8), 129.94 (C4), 131.39 (C6'), 132.31 (C10), 133.57 (C9), 134.78 (C2), 136.65 (C4'), 145.79 (C β), 163.86 (C2'), 193.91 (C=O). IV $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3195 (OH), 1689 (C=O), 1568 (C=C), 3046, 1482, 1432, 1021, 985, 819, 752 (Ar) (KBr). Anal. Calc. $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{O}_2$: C 83.19, H 5.14. Exp.: C 82.04, H 5.18.

5 – (2E)-1-(3'-metoksi-4'-hidroksifenil)-3-(2-naftil)-2-propen-1-ona. ^1H RMN (CDCl_3) δ 4.01 (s, 3H, OCH $_3$), 6.10 (s, 1H, OH), 7.02 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H5'), 7.29 (s, 1H, H2'), 7.52-7.54 (m, 1H, H6'), 7.66-7.72 (m, 3H, H3, H6, H7), 7.83 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, H α), 7.80-7.87 (m, 3H, H4, H5, H8), 7.97 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, H β), 8.05 (s, 1H, H1). ^{13}C RMN ($\text{DMSO}-d_6$) δ 56.37 (*m*-OCH $_3$), 110.74 (C2'), 114.05 (C5'), 121.99 (C3), 123.96 (C α), 126.97 (C6'), 127.51 (C6), 128.03 (C7), 128.85 (C1), 128.91 (C8), 130.68 (C4,

C5), 131.33 (C1'), 132.81 (C10), 133.63 (C9), 134.54 (C2), 144.30 (C β), 147.15 (C4'), 150.64 (C3'), 188.74 (C=O). IV $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3265 (OH), 1643, 1202 (C=O), 1280, 1025 (C-O), 1563 (C=C), 2950, 2835, 1522, 1445, 970, 844, 816, 779 (Ar) (KBr). Anal. Calc. C₂₀H₁₆O₃: C 78.93, H 5.30. Exp.: C 78.86, H 5.76.

6 – (2*E*)-1-(2'-hidroxi-4',6'-dimetoxifenil)-3-(1-naftil)-2-propen-1-ona. ¹H RMN (CDCl₃) δ 3.85 (s, 3H, OCH₃), 3.92 (s, 3H, OCH₃), 5.98 (s, 1H, H3'), 6.14 (s, 1H, H5'), 7.50-7.61 (m, 3H, H3, H6, H7), 7.83-7.92 (m, 3H, H4, H5, H8), 7.97 (d, 1H, *J* = 15.2 Hz, H α), 8.31 (d, 1H, H2), 8.61 (d, 1H, *J* = 15.2 Hz, H β), 12.83 (OH). ¹³C RMN (CDCl₃) δ 55.87 (OCH₃), 56.15 (OCH₃), 91.54 (C5'), 94.03 (C3'), 101.63 (C1'), 124.00 (C α), 125.39 (C2), 125.71 (C8), 126.46 (C3), 127.03 (C6), 128.93 (C7), 130.46 (C4), 130.55 (C5), 132.02 (C9), 133.32 (C10), 133.99 (C1), 139.49 (C β), 162.79 (C2'), 166.55 (C6'), 168.68 (C4'), 192.79 (C=O). IV $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3450, 1627, 1341, 1571, 1215, 1109, 1440, 1153, 975, 810, 768 (KBr). Anal. Calc. C₂₁H₁₈O₄: C 75.43, H 5.43. Exp.: C 75.66, H 5.94.

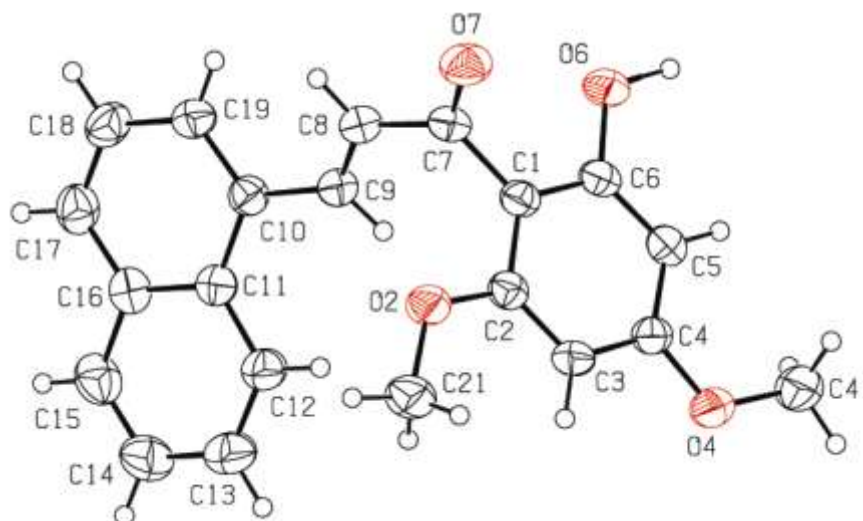


Tabela 1. Dados cristalográficos para o composto inédito **6***.

Fórmula empírica	C ₂₁ H ₁₈ O ₄
Peso molecular	334.38
Temperatura	293(2) K
Comprimento de onda	0.71069 Å
Sistema cristalográfico	Monoclinic
Grupo espacial	P 21/c
Dimensões das células unitárias	a = 8.502(1) Å α = 90° b = 26.295(2) Å β = 90.83(1)° c = 8.016(1) Å γ = 90°
Volume	1791.9(3) Å ³
Densidade (calculada)	1.291 mg/m ³
Coefficiente de absorção	0.088 mm ⁻¹
Tamanho do cristal	0.50 x 0.33 x 0.30 mm ³
Escala do theta	1.55 to 25.07°.
Reflexões coletadas	3403

Reflexões independentes	3184 [R(int) = 0.0178]
Método de refinamento	Full-matrix least-squares on F ²
Coefficiente de extinção	0.014(2)

*descrição cristalográfica completa em Anexo.

7 – (2E)-1-(2'-hidroxi-4',6'-dimetoxifenil)-3-(3-clorofenil)-2-propen-1-ona. ¹H RMN (CDCl₃) δ 3.84 (s, 3H, OCH₃), 3.93 (s, 3H, OCH₃), 5.97 (s, 1H, H3'), 6.11 (s, 1H, H5'), 7.33-7.35 (m, 3H, H4, H5, H6), 7.57 (s, 1H, H2), 7.68 (d, 1H, J = 15.6 Hz, Hα), 7.87 (d, 1H, J = 15.6 Hz, Hβ), 13.95 (s, 1H, OH). ¹³C RMN (CDCl₃) δ 55.89 (OCH₃), 56.19 (OCH₃), 91.58 (C5'), 94.02 (C3'), 106.50 (C1'), 126.88 (Cα), 128.09 (C6), 129.10 (C2), 130.07 (C4), 130.35 (C5), 135.06 (C3), 137.68 (C1), 140.70 (Cβ), 162.73 (C2'), 166.68 (C6'), 168.68 (C4'), 192.51 (C=O). IV ν_{max}/cm⁻¹ 3451 (OH), 1624, 1215 (C=O), 1029 (C-O), 1576 (C=C), 2936, 1439, 977, 909, 822 (Ar) (KBr). Anal. Calc. C₁₇H₁₅ClO₄: C 64.06, H 4.74. Exp.: C 64.61, H 5.39.

8 – (2E)-1-(2'-hidroxi-3'-bromo-4',6'-dimetoxifenil)-3-(2,6-dimetoxifenil)-2-propen-1-ona. ¹H RMN (CDCl₃) δ 3.91 (s, 6H, OCH₃), 3.96 (s, 6H, OCH₃), 6.04 (s, 1H, H5'), 6.57 (d, 2H, J = 8.4 Hz, H3, H5), 7.28 (t, 1H, H4), 8.29 (d, 1H, J = 15.6 Hz, Hα), 8.34 (d, 1H, J = 15.6 Hz, Hβ), 14.65 (s, 1H, OH). ¹³C RMN (acetone-d₆) δ 55.72 (2 OCH₃), 56.06 (OCH₃), 56.32 (OCH₃), 88.35 (C5'), 94.76 (C3'), 104.21 (C1', C3, C5), 112.81 (C1), 129.11 (Cα), 132.35 (C4), 134.85 (Cβ), 160.81 (C2, C6), 162.35 (C6'), 162.91 (C2'), 166.31 (C4'), 205.56 (C=O). IV ν_{max}/cm⁻¹ 3442, 2941, 1616, 1552, 1325, 1253, 1193, 916, 782 (KBr). Anal. Calc. C₁₉H₁₉BrO₆: C 53.92, H 4.52. Exp.: C 53.67, H 4.44.

9 – (2E)-1-(2'-hidroxi-3'-bromo-4',6'-dimetoxifenil)-3-(4-butoxifenil)-2-propen-1-ona. ¹H RMN (CDCl₃) δ 0.98 (t, 3H, -CH₃), 1.47-1.60 (m, 2H, -CH₂CH₃), 1.75-1.81 (m, 2H, -CH₂CH₂CH₃), 3.98 (s, 3H, OCH₃), 3.99 (s, 3H, OCH₃), 4.01 (t, 2H, -OCH₂-), 6.06 (s, 1H, H5'), 6.91 (d, 2H, J = 8.4 Hz, H3, H5), 7.54 (d, 2H, J = 8.4 Hz, H2, H6), 7.75 (d, 1H, J = 15.6 Hz, Hα), 7.83 (d, 1H, J = 15.6 Hz, Hβ), 14.96 (OH). ¹³C RMN (acetone-d₆) δ 13.42 (CH₃), 19.18 (-CH₂CH₃), 31.28 (-CH₂CH₂CH₃), 56.25 (OCH₃), 67.86 (-OCH₂-), 88.37 (C5'), 94.61 (C3'), 104.43 (C1'), 115.19 (C3, C5), 124.46 (Cα), 128.04 (C1), 130.71 (C2, C6), 143.72 (Cβ), 160.02 (C4), 168.46 (C2'), 168.82 (C6'), 176.12 (C4'), 198.07 (C=O). IV ν_{max}/cm⁻¹ 3450, 2945, 1615, 1554, 1221, 963 (KBr). Anal. Calc. C₂₁H₂₃BrO₅: C 57.94, H 5.33. Exp.: C 57.27, H 5.27.

10 – (2E)-1-(2'-hidroxi-3'-bromo-4',6'-dimetoxifenil)-3-(4-nitrofenil)-2-propen-1-ona. ¹H NMR (CDCl₃) δ 3.94 (s, 3H, OCH₃), 3.97 (s, 3H, OCH₃), 6.03 (s, 1H, H5'), 7.61 (d, 2H, J = 8.0 Hz, H2, H6), 7.74 (d, 1H, J = 16.0 Hz, Hα), 7.93 (d, 1H, J = 16.0 Hz, Hβ), 8.24 (d, 2H, J = 8.0 Hz, H3, H5), 14.73 (s, 1H, OH). ¹³C NMR (CDCl₃) δ 55.74 (OCH₃), 56.32 (OCH₃), 86.69 (C5'), 91.63 (C3'), 106.55 (C1'), 109.77 (C3, C5), 123.78 (Cα), 126.66 (C2, C6), 128.82 (C1), 131.03 (Cβ), 150.47 (C4), 161.92 (C6'), 162.62 (C2'), 162.68 (C4'), 203.27 (C=O). IR ν_{max}/cm⁻¹ 3450, 2943, 1600, 1509, 1345, 1093, 976, 852 (KBr). Anal. Calcd for C₁₇H₁₄BrNO₆: C 50.02, H 3.46, N 3.43. Found: C 49.57, H 3.02, N 4.53.

11 – (2E)-1-(2'-hidroxi-3'-bromo-4',6'-dimetoxifenil)-3-(2-chlorofenil)-2-propen-1-ona. ¹H RMN (CDCl₃) δ 3.98 (s, 3H, OCH₃), 4.04 (s, 3H, OCH₃), 6.21 (s, 1H, H5'), 7.29-7.32 (m, 2H, H4, H5), 7.43 (d, 1H, H3), 7.67 (d, 1H, H6), 7.83 (d, 1H, *J* = 15.2 Hz, H α), 8.18 (d, 1H, *J* = 15.2 Hz, H β), 14.67 (s, 1H, OH). ¹³C RMN (acetone-d₆) δ 56.85 (OCH₃), 57.08 (OCH₃), 87.80 (C5'), 92.80 (C3'), 106.00 (C1'), 127.72 (C α), 128.60 (C5), 130.22 (C6), 131.06 (C3), 131.62 (C4), 134.33 (C2), 136.21 (C1), 139.49 (C β), 162.90 (C2'), 163.00 (C6'), 163.93 (C4'), 193.25 (C=O). IV $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3451, 2935, 1617, 1551, 1211, 1122, 966, 766 (KBr). Anal. Calc. C₁₇H₁₄BrClO₄: C 51.35, H 3.55. Exp.: C 51.45, H 3.58.

12 – (2E)-1-(2'-hidroxi-3'-bromo-4',6'-dimetoxifenil)-3-(4-metoxifenil)-2-propen-1-ona. ¹H RMN (CDCl₃) δ 3.86 (s, 3H, OCH₃), 3.97 (s, 3H, OCH₃), 3.99 (s, 3H, OCH₃), 6.07 (s, 1H, H5'), 6.93 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, H3, H5), 7.56 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, H2, H6), 7.79 (d, 1H, *J* = 16.4 Hz, H α), 7.89 (d, 1H, *J* = 16.4 Hz, H β), 14.81 (OH). ¹³C RMN (acetone-d₆) δ 55.17 (OCH₃), 56.25 (OCH₃), 56.37 (OCH₃), 88.34 (C5'), 94.76 (C3'), 106.66 (C1'), 114.70 (C3, C5), 124.61 (C α), 128.10 (C1), 130.68 (C2, C6), 143.59 (C β), 162.17 (C4), 162.92 (C2', C6'), 163.28 (C4'), 205.72 (C=O). IV $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3443, 1615, 1557, 1220, 1177, 824 (KBr). Anal. Calc. C₁₈H₁₇BrO₅: C 54.98, H 4.36. Exp.: C 51.95, H 4.46.

13 - (2E)-1-(2'-hidroxi-3'-bromo-4',6'-dimetoxifenil)-3-(2-carboxifenil)-2-propen-1-ona. ¹H RMN (acetone-d₆) δ 3.79 (s, 3H, OCH₃), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 6.00 (s, 1H, H5'), 7.64 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz, H4), 7.64 (d, 1H, *J* = 16.0 Hz, H α), 7.79 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H6), 7.87 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz, H5), 7.87 (d, 1H, *J* = 16.0 Hz, H β), 7.92 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H3), 14.23 (COOH), 14.57 (OH). ¹³C RMN (CDCl₃) δ 55.75 (OCH₃), 56.33 (OCH₃), 86.69 (C5'), 91.83 (C3'), 109.77 (C1'), 123.77 (C6), 124.22 (C α), 126.66 (C4), 128.81 (C2), 131.03 (C3), 135.08 (C β), 137.75 (C5), 139.68 (C1), 150.47 (C6'), 181.92 (C2'), 162.68 (C4'), 183.95 (COOH), 203.26 (C=O). IV $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3441, 2942, 2640, 1627, 1559, 1216, 1125, 964, 781 (KBr). Anal. Calc. C₁₈H₁₅BrO₆: C 53.09, H 3.71. Exp.: C 49.08, H 3.71.

5.2. Testes em células de melanoma (B16-F10)

Os estudos *in vitro* da bioatividade das chalconas em células de melanoma da linhagem B16-F10, foram realizados no Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), pelo grupo de pesquisas coordenado pela Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa, e também fizeram parte da dissertação de mestrado da Msc. Andréia F. Navarini.

Foram estudados os efeitos citotóxicos das hidroxichalconas, por meio do ensaio de viabilidade celular (teste do MTT). Os compostos que apresentaram citotoxicidade estatisticamente significativa foram avaliados quanto à toxicidade em células não-

tumorais (linhagem VERO) e quanto à forma de morte celular, pela técnica de fragmentação nuclear. Os compostos que não foram significativamente tóxicos para as células VERO e induziram a morte celular por apoptose, foram avaliados quanto à atividade dependente de concentração (Figura 10).

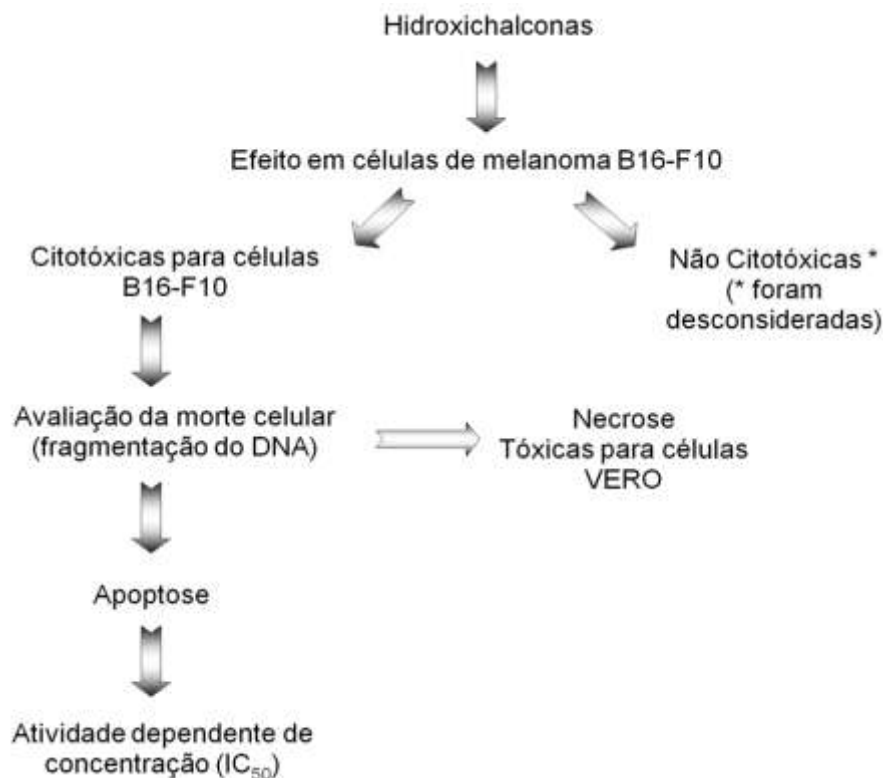


Figura 10: Esquema dos testes realizados com os compostos em células de melanoma B16F10 e células VERO.

5.2.1 Cultura de células

Foram utilizadas linhagens celulares de melanoma, B16-F10, de origem murina e células não-tumorais, fibroblastos de rim de macaco (VERO). As células B16-F10 foram obtidas da American Type Culture Cell (ATCC) e as células VERO, da Associação Técnico-Científica Paul Ehrlich (APABCAM, Rio de Janeiro, Brasil). As células foram mantidas em garrafas plásticas de cultura, contendo meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina, 10mM HEPES, pH 7.4, em estufa umidificada a 37°C e com 5% de CO₂. Antes da realização de todos os experimentos, o número de células viáveis foi

avaliado pelo método de Azul de Trypan (Freshney, 1987), e a contagem realizada em câmara de Neubauer.

5.2.2 Tratamento das células

Os compostos foram dissolvidos em uma solução de DMSO 10mM e armazenados em ambiente com temperatura de 4°C a 8°C. Essas soluções estoque foram diluídas em meio de cultura para atingir as concentrações de 10 a 200µM nos experimentos. As células B16-F10 e as células VERO foram incubadas em placas de 12, 24 ou 96 poços, dependendo do procedimento experimental, mantidas por um período de 3h em estufa úmida, a 37°C, com 5% de CO₂, antes do tratamento com os compostos, para que pudessem aderir à placa, exceto no experimento para verificação da adesão celular. Após a adição dos compostos, as células permaneceram no ambiente acima citado por um período de 6 a 72 horas, conforme o experimento.

Foram utilizados controles de células sem tratamento e com tratamento de DMSO, diluído em meio de cultura, na mesma proporção utilizada para dissolver os compostos.

5.2.3 Ensaio de viabilidade celular (teste do MTT)

A viabilidade celular foi analisada pelo método do MTT (brometo de dimetiazol difeniltetrazólio). As células B16-F10, 1×10^5 , e células VERO, 1×10^5 , foram incubadas por 24h, em triplicata, com os compostos, em placas de 96 poços; 2×10^4 células B16-F10 foram incubadas por 48h e 1×10^4 células B16-F10, por 72h. Depois de decorrido o tempo de incubação, o meio de cultura foi retirado e acrescentado um novo meio e, então, o MTT (0,25µg/µL) foi adicionado, seguido de incubação por 3h, a 37°C. O meio de cultura foi retirado, o precipitado formazan foi dissolvido com uma solução ácida de isopropanol (isopropanol com HCL 0,04 N) e a absorbância foi medida a 540nm, com o uso de um leitor de microplacas (Organon Teknika, Belgium). A densidade óptica, obtida do grupo controle, células sem tratamento, foi considerada como 100% de células viáveis.

5.2.4 Análise de apoptose pelo método de fragmentação nuclear

As células, 5×10^5 , foram incubadas com os compostos, em placas de 24 poços, na concentração de $100\mu\text{M}$, mantidas por 24 horas, a 37°C , com 5% de CO_2 , em estufa umidificada. As células foram lavadas duas vezes com PBS gelado. Posteriormente foram lisadas com tampão de lise (10mM EDTA, 50mM Tris-HCl pH 8.0, 0.25% NP-40, 0.5 mg/mL proteinase K) a 50°C , por 2h. O DNA foi precipitado com 2,5 vol. de etanol-NaCl overnight, a 25°C . As amostras foram, então, centrifugadas a $12.000g$, por 30 minutos. O *pellet* foi lavado duas vezes com etanol a 70%, gelado, secado à temperatura ambiente, dissolvido em tampão (10mM Tris-HCl pH 8.0, 0,1mM EDTA), contendo 0,6 g/mL de RNase A e incubado a 37°C , por 1 hora.

A concentração do DNA extraído de cada amostra foi determinada espectrofotometricamente (Sambrook e Russell, 2001). As amostras foram diluídas a 1:100 em água destilada; a absorbância foi medida em 260nm; a concentração de DNA foi calculada pela equação: Concentração DNA (mg/mL) = (Abs/ ϵ) x diluição. O coeficiente de extinção (ϵ) foi considerado igual a 20. As bases nitrogenadas da dupla fita de DNA apresentam uma absorção máxima no comprimento de onda de 260nm. Neste comprimento de onda, o coeficiente de extinção igual a 20 indica que o DNA, em uma concentração de 1mg/mL, terá uma absorbância ($A_{260\text{nm}}$) igual a 20. A relação entre a concentração do DNA e a absorbância ($A_{260\text{nm}}$) é linear até o valor de 2,0.

A fragmentação do DNA foi analisada por eletroforese, em gel de agarose a 1%, e corado com $1\mu\text{L}$ de brometo de etídio (1g/100mL). A corrida foi realizada a 200V, por 10 minutos, em tampão TAE (Tris - ácido acético – EDTA). Foram aplicados $2\mu\text{g}$ de DNA de cada amostra. Os géis foram fotografados sob iluminação ultravioleta de 320nm (Hoefer-MacroVue UV-20), utilizando-se um sistema de fotodocumentação de géis (Doc-Print®).

5.2.5 Determinação da curva dependente de concentração

Para determinar a curva dependente de concentração, 1×10^5 células foram incubadas, por 24h, com os compostos em concentrações crescentes (0, 25, 50, 100, 150 e $200\mu\text{M}$); para a curva de 48 horas, foram incubadas 2×10^4 células com os compostos em concentrações crescentes (0, 10, 20, 30 e $50\mu\text{M}$); para a curva de 72h, foram incubadas 1×10^4 células com os compostos em concentrações crescentes (0, 2.5; 5, 10,

20 e 40 μM). Todas as incubações foram feitas em estufa umidificada, a 37°C, com 5% CO_2 , seguido do ensaio do MTT.

A IC_{50} , concentração que inibe 50% do crescimento celular, foi calculada em 48 e 72 horas, através das curvas dependentes de concentração, por regressão linear.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Síntese das hidroxichalconas

As hidroxichalconas foram obtidas a partir da condensação aldólica entre a acetofenona e diferentes aldeídos, em meio básico, utilizando metanol como solvente, agitação magnética e temperatura ambiente por 24 horas.

Primeiramente, ocorre a etapa de desprotonação, onde a base remove um hidrogênio alfa ácido da molécula de cetona para formar o íon enolato, estabilizado por ressonância. Através de ataque nucleofílico, o íon enolato ataca a carbonila de uma molécula de aldeído formando um íon alcóxido (intermediário tetraédrico). A protonação do íon alcóxido gerou o produto de condensação e regenera o catalisador básico.

A formação da enona conjugada ocorre por desidratação, que pode ser catalisada por base ou por ácido. Neste caso, em condições básicas, um hidrogênio ácido é abstraído da posição alfa para resultar em um íon enolato, que elimina o grupo de saída $-\text{OH}$, formando a chalcona. Em condições ácidas, seria formado o enol, o grupo $-\text{OH}$ seria protonado e a água, eliminada.

As chalconas **1**, **3-6** (derivadas do 1 e do 2-naftaldeído) foram obtidas com o intuito de verificar a influência de grupo hidrofóbico e volumoso no anel B na atividade destes compostos; chalconas **2** e **7** (derivadas da xantoxilina), para avaliar a influência de substituintes metóxi no anel A além da hidroxila, bem como, observar a importância dos substituintes elétron-doadores e elétron-aceptores no anel B; e as chalconas de **8** a **13** (derivadas da bromo-xantoxilina) para verificar quanto a atividade é afetada com a adição de um átomo de bromo no anel A e da mesma forma, observar a importância dos substituintes elétron-doadores e elétron-aceptores no anel B.

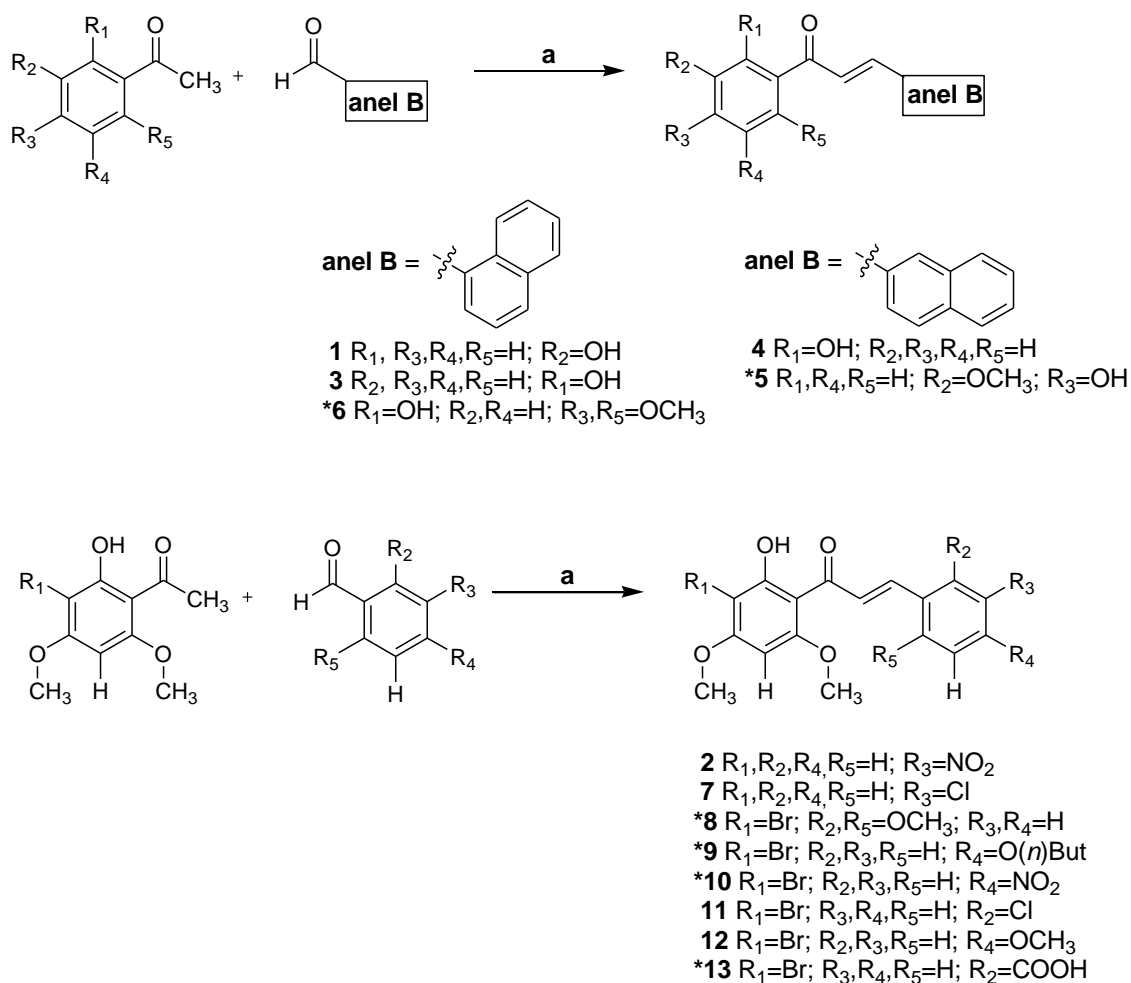


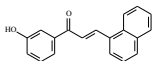
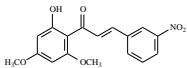
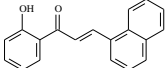
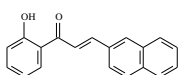
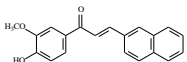
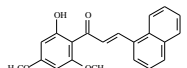
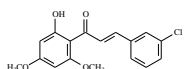
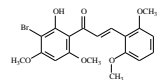
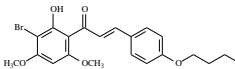
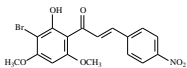
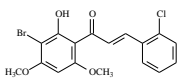
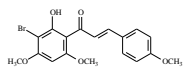
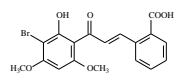
Figura 11. Síntese de hidroxichalconas. (a = 1. KOH/MeOH, 24h, t.a.; 2. HCl (aq))
*inéditas.

Os rendimentos e pontos de fusão estão apresentados na Tabela 2, os baixos rendimentos obtidos para algumas estruturas desta série de chalconas pode ser devido à formação de subproduto cíclico causado pela reação intramolecular entre a hidroxila (ou metoxila) do anel A na posição 2 e a dupla ligação do composto, levando à aurona correspondente; dados da literatura confirmam esta possibilidade reacional (Barros, 2004).

Através da análise dos espectros de RMN de 1H é possível observar que as chalconas sintetizadas possuem configuração *E* ($J_{H\alpha-H\beta} = 14-17$ Hz). Ressaltamos que alguns valores de ponto de fusão de compostos não inéditos sintetizados neste trabalho não foram encontrados na literatura, provavelmente porque a maioria destas moléculas existem comercialmente, pois informações referentes a elas são encontradas em bancos de dados disponíveis na internet quando utilizamos o *SciFinder* como ferramenta de busca, no entanto, não estão disponíveis todos os dados destes compostos, pois não é de

interesse das indústrias informar todas as características de seus produtos, geralmente comercializados em miligramas apenas para ensaios de *binding*. Devido a isso, estão apresentados nas Tabelas 2 e 5 os números de registro no CHEMCATS encontrados para cada molécula.

Tabela 2. Rendimentos e pontos de fusão das hidroxichalconas

Composto	Estrutura	Rendimento (%)	P.F. (°C) Exp.	P.F. (°C) Lit.	Referência/ CHEMCATS
1		51	174-175	**	186507-14-2
2		51	170-171	171-172	Boeck <i>et al.</i> , 2005
3		57	106-108	**	80687-05-4
4		66	135-137	146-148	Liu <i>et al.</i> , 2003
5		39	166-168	*	-
6		50	116-117	*	-
7		36	104-106	**	108979-34-6
8		42	193-194	*	-
9		47	172-173	*	-
10		42	230-231	*	-
11		62	209-211	210-212	Boeck, 2005
12		40	194-196	191-192	Chang, 1962
13		59	230	*	-

CHEMCATS = número de registro no CAS, obtido através do SciFinder. * Composto inédito. **P.F. não encontrado na literatura.

6.2 Citotoxicidade das chalconas em células tumorais, células não-tumorais e análise do DNA

Em busca de novos compostos com atividade citotóxica para células de melanoma B16-F10, realizou-se uma triagem das hidroxichalconas sintetizadas. Em cada experimento efetuou-se um controle apenas com o DMSO, nas mesmas concentrações utilizadas para dissolver os compostos. Estes resultados não foram significativamente diferentes do controle das células sem tratamento. Dessa forma, está representado nos gráficos apenas o controle das células (sem tratamento) (Figura 12).

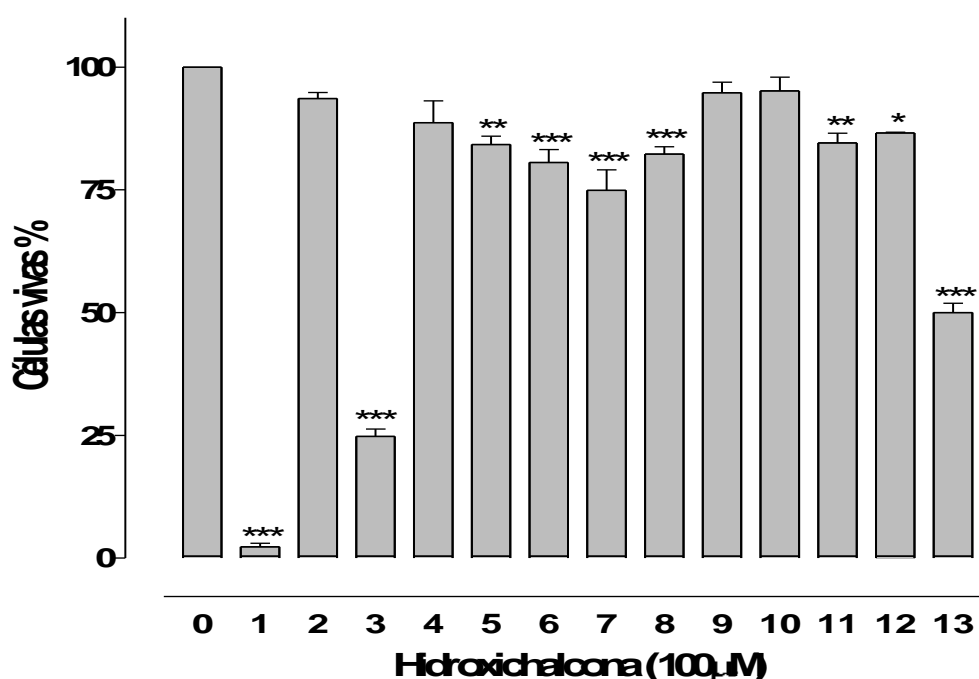


Figura 12: Efeito citotóxico das hidroxichalconas em células B16-F10.

Nota: as células, 1×10^5 , foram incubadas com as hidroxichalconas, por 24h, e a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo controle (células sem tratamento) foi considerada como 100% de viabilidade celular. Cada ponto representa a média \pm E.P.M. (n=3). Um valor de * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com o controle, usando ANOVA, seguido de teste *t* de Bonferroni.

Os compostos **1**, **3** e **13** apresentaram maiores efeitos citotóxicos nas células B16-F10, reduzindo a viabilidade celular em $97.7 \pm 0.7\%$, $75.2 \pm 1.5\%$ e $50 \pm 1.9\%$, respectivamente. Os compostos **5**, **6**, **7**, **8**, **11** e **12** reduziram a viabilidade celular em $15.8 \pm 1.7\%$, $19.4 \pm 2.6\%$, $25.1 \pm 4.2\%$, 17.7 ± 1.5 , $15.4 \pm 2\%$ e 13.4 ± 0.13 , respectivamente (Figura 12). As demais estruturas apresentaram baixa ou nenhuma atividade citotóxica para essa linhagem celular.

Sabzevari e col. (2004) observaram a importância da presença do grupo hidroxila no anel A e/ou no anel B das chalconas para a citotoxicidade destas e descreveram que uma maior quantidade de hidroxilas no anel A tende a diminuir o efeito citotóxico dessas chalconas. As chalconas testadas neste experimento apresentam apenas uma hidroxila no anel A, o que pode estar sendo responsável pela maior citotoxicidade desses compostos. Além do mais, a única hidroxila presente no anel A das hidroxichalconas **1** e **3** somada aos substituintes naftalênicos no anel B, pode estar sendo responsável pela maior atividade destes dois compostos em comparação com a chalcona **13**.

Na Figura 13, é possível observar a toxicidade das hidroxichalconas **1**, **3**, e **13** sobre as células VERO. A porcentagem de morte foi de $82.5 \pm 2.5\%$, $39.4 \pm 1.8\%$ e $30.4 \pm 1,0\%$, respectivamente, comparada com o grupo controle (100% de células viáveis). A viabilidade das células VERO foi significativamente maior que a das células de melanoma, mostrando que a morte das células tumorais, induzida pelas hidroxichalconas, foi mais evidente (Tabela 3).

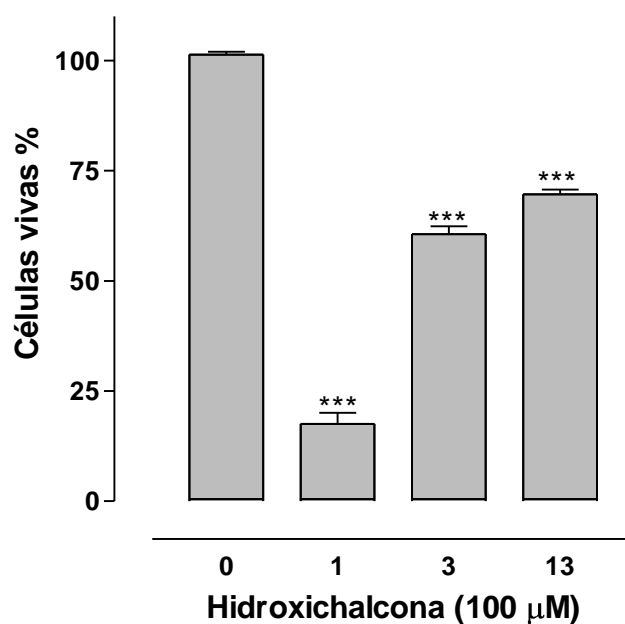


Figura 13: Efeito citotóxico das hidroxichalconas **1**, **3** e **13** em células VERO (não tumorais).

Tabela 3: Comparação da viabilidade das células B16-F10 e das células VERO tratadas com hidroxichalconas.

Hidroxichalconas	B16-F10 (% viabilidade celular)	Vero (% viabilidade celular)	valor <i>p</i>
1	2.3 ± 0.7	17.6 ± 2.5	< 0.0003
3	24.8 ± 1.5	60.6 ± 1.8	< 0.0001
13	49.9 ± 1.9	69.7 ± 1.0	< 0.0001

Nota: o valor de *p* foi determinado usando o Student *t* test.

Devido à atividade citotóxica das hidroxichalconas **1**, **3** e **13** nas células B16-F10, e a menor toxicidade nas células não tumorais, foi prosseguido com a análise do DNA, através da eletroforese em gel de agarose. Foi verificado que as hidroxichalconas **1** e **3** causaram fragmentação do DNA das células B16-F10, com o surgimento de bandas características da morte celular por apoptose, enquanto que a hidroxichalcona **13** não fragmentou o DNA, o que caracteriza a morte celular por necrose (Figura 13).

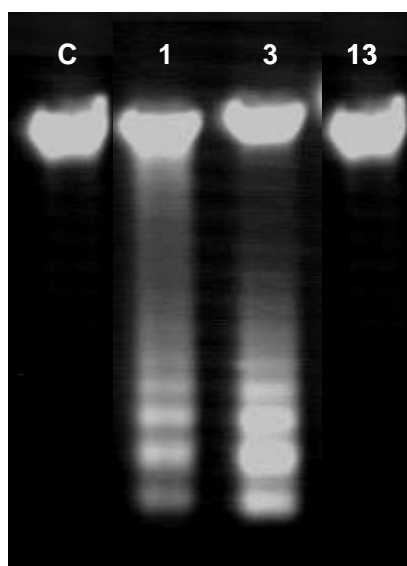


Figura 14: Fragmentação do DNA induzida por hidroxichalconas em células B16-F10. Nota: as células, 5×10^5 , foram incubadas com os compostos **1**, **3** e **13**, por 24h, nas respectivas IC_{50} de $57\mu M$, $63\mu M$ e $123\mu M$, sendo representados na figura pelos respectivos números e por C - controle (células sem tratamento).

Apoptose ou morte celular programada é um mecanismo que controla a proliferação celular (Ghobrial *et al.*, 2005). A principal característica da apoptose é a fragmentação do DNA por DNases que atacam as regiões de ligação da dupla fita de DNA, ocorrendo a clivagem internucleossomal e a conseqüente formação de fragmentos de 180-200 pares de base (Wyllie, 1980).

Estudos citam as chalconas hidroxiladas como indutoras de apoptose em várias linhagens celulares (Kobori *et al.*, 1999; Iwashita *et al.*, 2000; Won *et al.*, 2005). Entretanto, a maioria dos trabalhos é focada em alvos específicos, não mostrando se a toxicidade ocorreu através de apoptose.

No desenvolvimento de agentes antitumorais contra o melanoma, uma das características mais importantes que o composto pode ter é a capacidade de promover a morte celular por apoptose, devido à fraca resposta dessas células aos estímulos apoptóticos (Kluza *et al.*, 2002). Assim, uma alternativa promissora para impedir o desenvolvimento de metástases em melanoma maligno, pode ser através do desenvolvimento de novas terapias antitumorais que tenham como alvo terapêutico as vias apoptóticas.

6.2.1 Atividade das hidroxichalconas dependente de concentração – IC₅₀

Para obtenção dos valores das IC₅₀, foi analisada a influência de diferentes concentrações das hidroxichalconas para a citotoxicidade das células de melanoma B16-F10, nos tempos de 24, 48 e 72 horas de incubação (Figura 15).

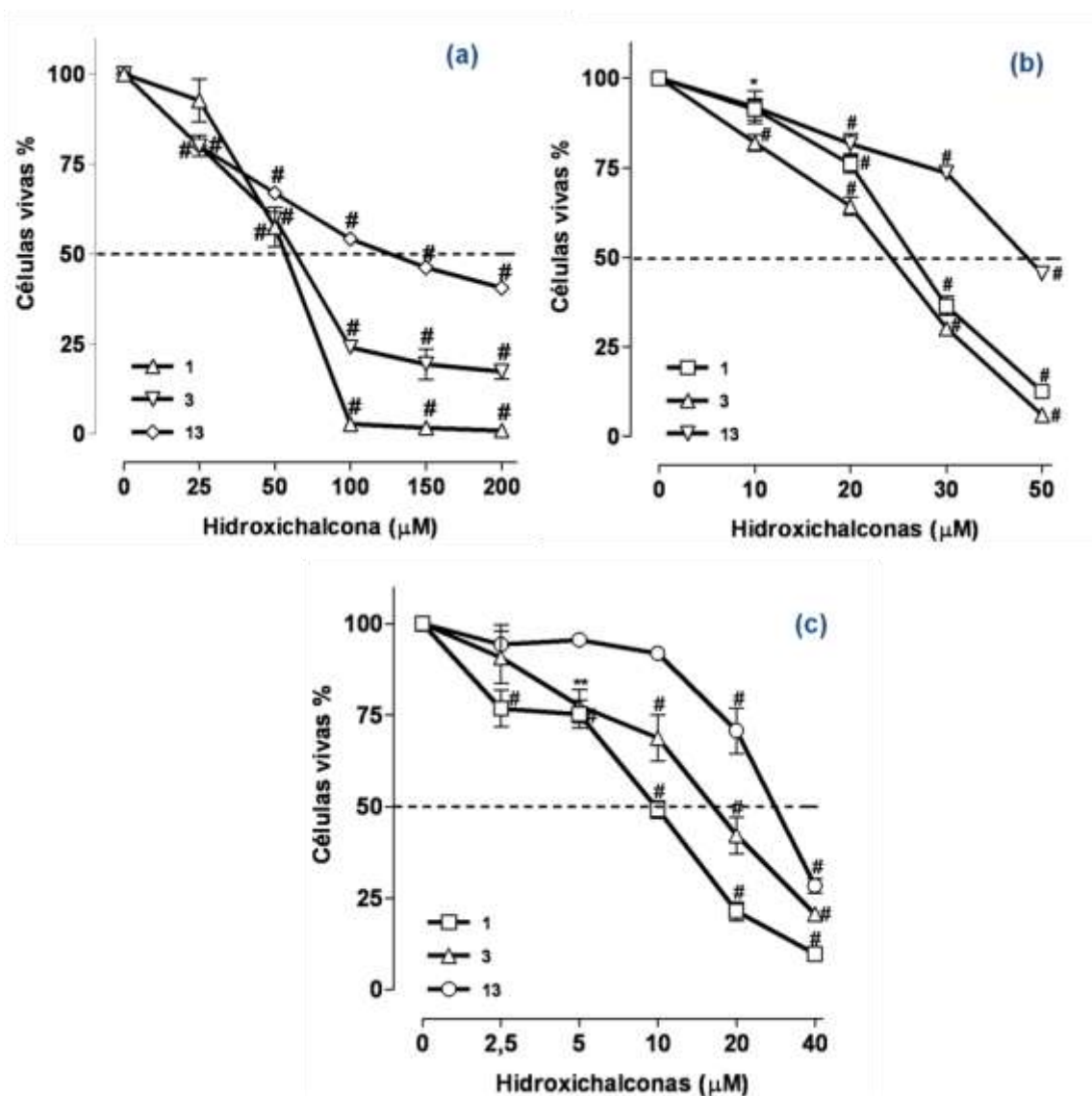


Figura 15: Atividade das hidroxichalconas dependente de concentração em células B16-F10, em (a) 24h; (b) 48h e (c) 72h.

As chalconas **1**, **3** e **13** causaram morte celular de maneira dependente de concentração. Os valores da IC_{50} desses compostos, em 24h, foram $57\mu\text{M}$, $63\mu\text{M}$ e $123\mu\text{M}$, respectivamente (Tabela 4).

Em 48 horas foram utilizadas menores concentrações das hidroxichalconas, pois o tempo de exposição a esses compostos foi maior. Os valores das IC_{50} das hidroxichalconas **1**, **3** e **13**, em 48h, foram $30\mu\text{M}$, $28\mu\text{M}$ e $50\mu\text{M}$, respectivamente, diminuindo aproximadamente para a metade os valores das IC_{50} obtidos em 24h.

Em 72h de incubação os valores da IC_{50} das hidroxichalconas **1**, **3** e **13** foram $12\mu\text{M}$, $17\mu\text{M}$ e $30\mu\text{M}$, respectivamente. Como observado na tabela 4, o composto **1** se apresenta com maior atividade em 24 e 72 horas de incubação, sendo o mais ativo.

Tabela 4: Valores de IC₅₀ das hidroxichalconas **1**, **3** e **13** em 24, 48 e 72 horas de incubação, nas células de melanoma B16-F10.

Hidroxichalconas	IC ₅₀ (μ M) 24h	IC ₅₀ (μ M) 48h	IC ₅₀ (μ M) 72h
1	57	30	12
3	63	28	17
13	123	50	30

Com o objetivo de ampliar o estudo da relação estrutura-atividade biológica dos compostos e, levando em consideração que a grande maioria das substâncias deve seus efeitos à sua ligação específica a uma biomacromolécula ou alvo molecular (Yunes, 2001), podemos destacar que um possível mecanismo de ação esteja envolvido com a GSH (γ -glutamilcisteinilglicina), que é um tripeptídeo linear, constituído por três aminoácidos: glicina, ácido glutâmico e cisteína, e é o mais abundante antioxidante celular dos mamíferos (Figura 16).

O grupo tiol da cisteína é o local ativo responsável pelas propriedades bioquímicas da GSH, e age como um nucleófilo celular que tem como função reagir com eletrófilos gerados em consequência do processo metabólico, que envolve compostos endógenos e xenobióticos (Lash, 2006).

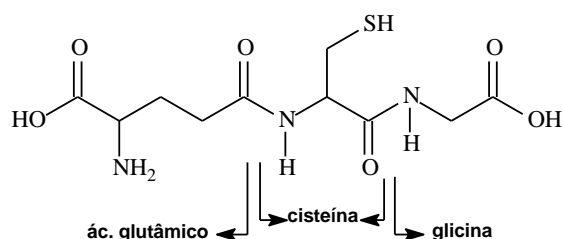


Figura 16: Estrutura da glutationa (GSH).

Os radicais fenoxil, característica pró-oxidante das hidroxichalconas, podem facilmente oxidar a glutationa, levando-a de sua forma reduzida (GSH) para a oxidada (GSSG), ou também, quando a GSH não é oxidada, pode ocorrer a conjugação desta com a chalcona, por adição à ligação α,β -insaturadas ou à carbonila (Esquema 1).

Numerosos estudos *in vitro* indicam que polifenóis encontrados em plantas podem efetivamente participar de processos que possam ter implicações anti-carcinogênicas e anti-aterogênicas. Entre estes processos, o mais evidente é a

capacidade antioxidante destes compostos atribuída ao poder redutor do grupo hidroxila aromático, que reduz radicais livres reativos e produz o radical fenoxila estabilizado por ressonância (Cerqueira *et al.*, 2007).

Esquema 1. GSH (reduzida) + HO-chalcona → GSSG (oxidada) + ⁻O-chalcona

As células de melanoma B16-F10 possuem uma alta concentração de glutathione intracelular, e este fator é relacionado à resistência dessas células à quimioterapia e à radioterapia. Assim a depleção de GSH tem sido descrita como uma potente estratégia para a sensibilização das células tumorais (Benlloch *et al.*, 2005). Dentre os mecanismos prováveis de atuação das hidroxichalconas em células de melanoma, a depleção da GSH parece ser uma das mais prováveis.

7 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

- Dos 13 compostos estudados neste capítulo, 6 são estruturas inéditas;
- Dentre as hidroxichalconas testadas, as que apresentaram maior efeito citotóxico para as células de melanoma, menor efeito citotóxico para as células não-tumorais e indução da morte celular por apoptose, foram as estruturas **1**, **3** e **13**;
- Atribui-se a citotoxicidade das hidroxichalconas **1**, **3** e **13** às hidroxilas no anel A aromático, que têm fundamental importância para esses compostos. Já a presença de outros substituintes no composto **13** parece ter diminuído o efeito citotóxico dessa chalcona;
- Os compostos **1**, **3** e **13** demonstraram causar a morte celular de forma dependente de concentração, com valores de IC₅₀ de 12 µM, 17 µM e 30 µM, respectivamente, para o tempo de 72 horas de incubação;
- Um mecanismo proposto para a ação destes compostos pode ser através da oxidação da cisteína presente na GSH, provocada pelas hidroxilas das chalconas, e/ou a conjugação da dupla ligação ou da carbonila presente nestes compostos com a glutatona na sua forma reduzida.

CAPÍTULO II:

IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS INIBIDORES DE PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASE A (PtpA) DE *Mycobacterium tuberculosis* – ATIVIDADE BIOLÓGICA, ESTUDO DO MECANISMO DE INIBIÇÃO E MODELAGEM MOLECULAR

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Tuberculose

A tuberculose (TB) é, primariamente, uma infecção das vias aéreas causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis* e, segundo o último relatório da Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que esta doença vitime cerca de dois milhões de pessoas a cada ano (WHO, 2008). Embora potencialmente curativo, o tratamento da tuberculose apresenta diversas limitações, entre elas cita-se: (i) falta de adesão do paciente aos longos regimes prescritos; (ii) desenvolvimento de resistência às diferentes classes de antimicrobianos; (iii) toxicidade e inúmeros efeitos adversos (Gelperina *et al.*, 2005; Ruiz-Manzano *et al.*, 2008).

O tratamento convencional contra a tuberculose envolve o emprego de três diferentes tipos de antibacterianos administrados via oral em regimes múltiplos de seis a nove meses. Dentre os fármacos utilizados encontram-se a rifampicina, a isoniazida e a pirazinamida (Figura 17). Combinações múltiplas são necessárias para o sinergismo terapêutico e para a prevenção do surgimento de resistência aos antimicrobianos. Entretanto, a ingestão de três comprimidos diários ocasiona problemas relacionados à falta de adesão ao tratamento, principal causa da falha terapêutica e do surgimento de casos de resistência. Estes fatores despertam o interesse no desenvolvimento de uma única forma farmacêutica que contenha a associação da tríade de fármacos e que proporcione uma liberação localizada e prolongada dos mesmos; isto diminuiria a dose administrada, o número de ingestões diárias para manutenção da concentração terapêutica e, conseqüentemente, dos efeitos adversos associados. Atualmente, a

associação dos fármacos em uma única forma farmacêutica não se encontra disponível no mercado devido a problemas de instabilidade e degradação da rifampicina na presença de isoniazida (Panchagnula *et al.*, 2004).

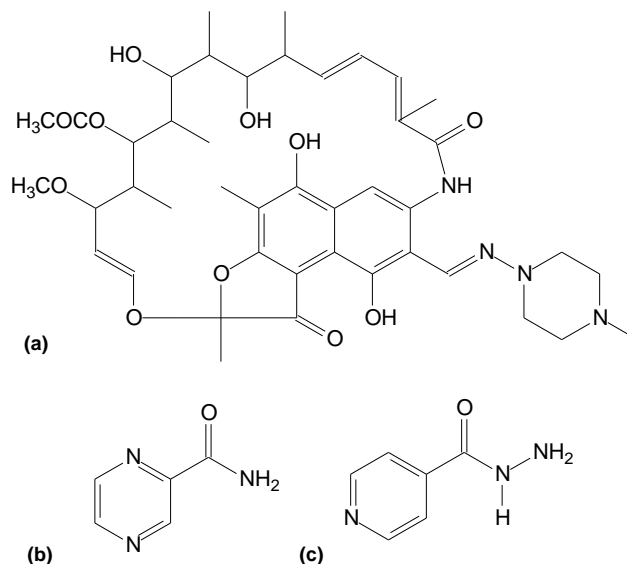


Figura 17: Estrutura química da (a) rifampicina; (b) pirazinamida; (c) isoniazida.

Na década passada, observaram-se muitos avanços no entendimento dos processos metabólicos e intracelulares da *M. tuberculosis* (Mtb), culminado na publicação da seqüência completa do seu DNA genômico (Cole *et al.*, 1998). Estudos comprovaram também que a virulência desta bactéria está associada ao seu mecanismo de invasão celular no hospedeiro, e que a intercomunicação entre a bactéria e os macrófagos é essencial para sua sobrevivência *in vivo* (Hestvick *et al.*, 2003). O conhecimento da biologia molecular desta micobactéria como um todo, permite desenvolver estratégias para a síntese de compostos que possam agir em novos alvos, através de mecanismos de ação diferentes dos fármacos já existentes.

2.2. Chalconas e tuberculose

Inúmeras chalconas têm exibido atividade biológica contra várias doenças negligenciadas, entre elas, malária (Ni *et al.*, 2004; Dimmock *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1995) e leishmaniose (Boeck *et al.*, 2006; Bergmann *et al.*, 2004; Lunardi *et al.*, 2003), porém, poucos estudos foram realizados com chalconas em tuberculose.

Um dos trabalhos publicados nesta área foi realizado por Lin e col. (2002), o qual apresenta várias chalconas e análogos de chalconas com inibição da atividade de *M. tuberculosis H37Rv*. Os resultados desta pesquisa revelaram que as chalconas com um grupo 2-hidroxil no anel A e grupo 3-iodo ou 3-cloro no anel B (Figura 18) mostraram alta atividade inibitória do crescimento bacteriano (90 e 92% de inibição, respectivamente) numa concentração de 12,5 µg/mL (Lin *et al.*, 2002). Os autores sugerem que a correlação estrutural entre os compostos mais ativos é devido à presença de substituintes que fazem ligação hidrogênio no anel A, enquanto que no anel B prevalece a hidrofobicidade.

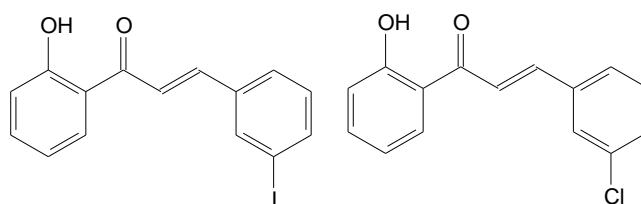


Figura 18: Estrutura das chalconas bioativas em *M. tuberculosis H37Rv*.

Fonte: Lin e col. (2002)

Neste mesmo estudo, foram comparadas as atividades em Mtb de flavanonas e flavonas, análogos estruturais das chalconas. Os resultados mostraram que as chalconas são muito mais ativas que as demais, pelo fato das flavanonas e flavonas terem maior restrição rotacional, devido aos dois anéis aromáticos terminais estarem no mesmo plano (Lin *et al.*, 2002).

2.3 Inibidores de proteínas de importância na medicina

Fármacos que agem como inibidores enzimáticos são muito importantes na terapêutica; alguns exemplos estão apresentados no Quadro 1.

A busca de novos inibidores, especialmente os seletivos para uma enzima específica, ou que ajam em alguma nova enzima envolvida na rota de sinalização celular de um determinado organismo é um dos objetivos atuais das pesquisas em proteômica.

Substância ativa (Medicamento Referência)	Enzima alvo	Classe terapêutica
Ácido acetil salicílico (Aspirina®)	Ciclooxigenase (COX-1 e COX-2)	Anti-inflamatório
Captopril (Capoten®)	Enzima conversora de angiotensina (ECA)	Antihipertensivo
Desipramina (Norpramina®)	Monoamino oxidase (MAO)	Antidepressivo
Citrato de sildenafila (Viagra®)	Enzima fosfodiesterase tipo 5 (PDE5)	Tratamento de disfunção erétil
Zidovudina (Retrovir®)	Transcriptase reversa de HIV	Terapia da AIDS
Aciclovir (Zovirax®)	DNA polimerase viral	Tratamento de herpes
Imatinib (Gleevec®)	Tirosina quinase BCR-ABL	Anticancer
Penicilinas (Benzetacil®)	Transpeptidase bacteriana	Antibacteriano
Omeprazol (Losec®)	ATPase bomba de próton	Terapia de úlceras

Quadro 1: Exemplos de inibidores enzimáticos utilizados como medicamentos.

Fonte: Adaptado de Patrick, 2005.

2.4 MPtpA - proteína tirosina fosfatase A de *M. tuberculosis*

A *Mtb* apresenta mecanismos de sobrevivência muito complexos que lhe permitem enfrentar o ambiente hostil que encontra dentro dos macrófagos humanos (Brown *et al.*, 1969; Sturgill-Koszycki *et al.*, 1996), sendo capaz de ativar dentro deles sinais específicos capazes de alterar sua função. Resultados obtidos com outras bactérias patogênicas sugerem que a ação de fosfatases, em particular tirosina fosfatases (PTPs), teriam um papel importante na determinação da patogenicidade das micobactérias, interferindo com a sinalização celular do macrófago mediada por fosforilação/defosforilação de fosfotirosinas (Koul *et al.*, 2000; Bakal e Davies, 2000; Cozzone *et al.*, 2004). Por exemplo, *Yersinia pseudotuberculosis* secreta uma PTP

(YopH) que é uma enzima essencial para a sobrevivência da bactéria nas células do hospedeiro (Black e Bliska, 1997). YopH é secretada pela bactéria no meio extracelular e seu alvo é a superfície interna dos macrófagos, onde desfosforila proteínas envolvidas na ação bactericida.

A análise do genoma da Mtb revelou a presença de dois genes MPtpA e MPtpB, fosfotirosinas fosfatases de baixo peso molecular (Cole *et al.*, 1998). Estas duas enzimas têm sido expressadas como proteínas recombinantes, apresentando atividade em proteínas fosfotirosina, porém sendo inativas em proteínas serina e treonina-fosforiladas (Koul *et al.*, 2000). Desde então, e devido à falta de tirosinas quinases no genoma de Mtb, sugere-se que o papel dessas tirosinas fosfatases não seja regular o estado de fosforilação de proteínas da bactéria, mas sim modular proteínas tirosinas fosforiladas do hospedeiro.

Até 2005 não se conhecia nenhum inibidor para tirosinas fosfatases de Mtb; os pioneiros nestes estudos foram Manger e col. (2005) que testaram, em MPtpA, produtos naturais como estevastatinas, roseofilinas e prodigiosinas, que apresentaram valores de IC₅₀ entre 8,8 e 28,7 μM.

Madhurantakam e col. (2007) identificaram os análogos de fosfato molibdato, ortovanadato e tungstato de sódio como inibidores reversíveis de MPtpA, cujos valores de IC₅₀ foram 24,5; 28,0 e 30,8 μM, respectivamente.

Outro trabalho desenvolvido neste sentido (Grundner *et al.*, 2007) buscava inibidores seletivos para MPtpB. Os autores publicaram uma molécula, (oxalylamino-methylene)-thiophene sulfonamide (OTMS), com atividade de 0,44 μM de inibição desta proteína, mostrando especificidade e seletividade para PtpB frente à outras PTPs humanas.

Um estudo recente provou que a inativação da PtpA atenua o crescimento de Mtb em macrófagos humanos. Este estudo identificou o VPS33B, um regulador de membrana de fusão, como um substrato desta proteína (Bach *et al.*, 2008). Foi demonstrado que a PtpA consegue ultrapassar a membrana celular do hospedeiro, onde interage com a proteína citoplasmática VPS33B inibindo fagossomos-lisossomos de fusão, um processo associado à infecções de Mtb.

Estes resultados são suportados por outra pesquisa (Teitelbaum *et al.*, 1999), que sugere que proteínas que não excedam 70kDa conseguem transpor a membrana da micobactéria, contendo fagossomos. Associando estas pesquisas aos estudos que indicam micobactérias livres no citoplasma de macrófagos (Stamm, 2003), ao fato da

PtpA possuir 18 kDa, comprovam-se os dados de Bach e col. (2008). Assim, foi provado que a PtpA é essencial para a persistência intracelular de Mtb e direciona à um possível alvo para o desenvolvimento de novos fármacos contra esta bactéria.

2.5. Cinética enzimática

Estudos de cinética enzimática são freqüentemente empregados para determinação das propriedades de um inibidor. Há duas formas nas quais os inibidores podem afetar uma reação enzimática: (i) *inibidor reversível* – pode ligar-se à enzima e ser liberado em seguida, deixando-a em sua condição original; e (ii) *inibidor irreversível* - reage com a enzima produzindo uma proteína que deixa de ser enzimaticamente ativa de tal forma que a enzima original não pode ser regenerada (Patrick, 2005).

Dentre os inibidores reversíveis, duas classes podem ser diferenciadas com base na enzima à qual se ligam, os *inibidores competitivos* e os *não-competitivos*. Os primeiros podem ligar-se ao sítio ativo e bloquear o acesso do substrato à ele. A segunda classe inclui inibidores que se ligam à enzima em um sítio diferente do sítio ativo e, como resultado da ligação, provocam uma mudança na estrutura da enzima; assim, o substrato ainda pode ligar-se ao sítio ativo, mas a enzima não pode catalisar a reação (Campbell e Farrel, 2006).

O mecanismo catalítico da superfamília de enzimas PTPs tem sido extensivamente estudado (Puhl, 2007). Estas proteínas apresentam no seu sítio ativo a sequência de aminoácidos: C(X)₅R(S/T) (Figura 19).

```

1  MSDPLHVTFV CTGNICRSPM AEKMFAQQLR HRGLGDAVRV TSAGTGNWHV GSCADERAAG
61 VLRANGYP TDHRAAQVGT EH LAADLLVALD RNHARLLRQL GVEAARVRML RSFDPRSGTH
121 ALDVEDPYYG DHSDFEVFA VIESALPGLH DWVDERLARN GPS

```

Figura 19: Estrutura primária da MptpA exibindo a sequência de aminoácidos conservada no sítio ativo característica das PTPs (letras sublinhadas).

Fonte: Madhurantakam e col., 2008.

Modificações covalentes de proteínas por fosforilação e desfosforilação reversíveis são mecanismos essenciais para o controle das funções celulares. Uma ampla variedade de processos celulares, como divisão, diferenciação e desenvolvimento celular são controlados por sinalização molecular obtida através de cascatas de

fosforilação/defosforilação de proteínas (Hunter, 1995; Tonks e Neel, 1996). PTPases revertem o efeito de tirosinas quinase pela defosforilação de substrato celular de resíduos de proteína tirosina (Hunter, 1995).

Estudos estruturais com PTPases têm demonstrado que o íon fosfato é circundado por uma cisteína e uma asparagina catalíticas que estabilizam o fosfato através de ligação hidrogênio, passando por um intermediário cisteinil-fosfato (Zhang, 1994). Cisteínas agem como nucleófilos e o íon tiolato forma ligação covalente com o grupo fosfato do substrato da proteína (Figura 20).

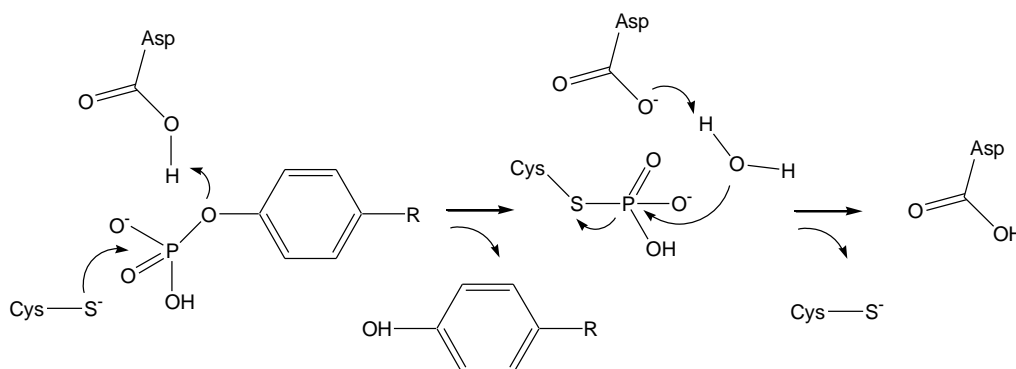


Figura 20: Hidrólise de resíduos de aminoácidos fosforilados em duas etapas, com a formação de um intermediário tio-fosforilado.

Fonte: Adaptado de Pannifer e col. (1998).

2.6. Modelagem Molecular – Docking de proteínas

As estratégias de planejamento de candidatos a novos fármacos fundamentam-se no conhecimento prévio do processo fisiológico envolvido no surgimento da doença alvo e na seleção de um alvo macromolecular adequado. O alvo molecular (ex. proteína, DNA ou RNA) pode ter a sua estrutura tridimensional (3D) conhecida ou não, fato que auxilia na escolha das estratégias de planejamento (Klebe, 2006).

Os grandes avanços da genômica e proteômica, bem como, a evolução de técnicas como a cristalografia de raios X e ressonância magnética nuclear (RMN), proporcionam um aumento significativo no número de alvos moleculares que possuem suas estruturas 3D disponíveis no *Banco de Dados de Proteínas* (PDB) (Westbrook *et al.*, 2003). O conhecimento da estrutura do alvo macromolecular permite o planejamento racional de inibidores enzimáticos, ou de antagonistas de receptores através de estratégia de *planejamento baseado na estrutura do receptor* (SBDD).

A docagem molecular é um dos principais métodos de SBDD empregados em química medicinal, que foi introduzida no início da década de 80, tendo contribuído

significativamente na fase de otimização de compostos líderes em relação a uma série de propriedades, como potência e afinidade, além de algumas propriedades farmacocinéticas (Moitessier *et al.*, 2008).

Esta técnica consiste na predição da conformação bioativa de uma micromolécula (ligante) no sítio de ligação de uma macromolécula, seguida da avaliação (pontuação) e classificação do modo de ligação proposto (Guido *et al.*, 2008).

O processo de docagem molecular pode ser dividido em duas etapas principais: (i) modelagem do modo de ligação de moléculas no sítio de interação (predição da conformação bioativa) e (ii) predição da afinidade do ligante pelo sítio. A primeira etapa é considerada a etapa mais simples e robusta do processo, no qual os programas utilizam diferentes métodos de amostragem que atribuem flexibilidade à molécula do ligante. A segunda etapa avalia e classifica o modo de interação entre a macro e a micromolécula através de funções de pontuação, envolvendo: *campos de força*; *funções empíricas* - ajuste teórico dos dados experimentais; e *funções baseadas no conhecimento* - dados estatísticos da interação do complexo (Wang *et al.*, 2003).

OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Os objetivos gerais deste capítulo são: (i) avaliação da atividade biológica de duas séries de chalconas derivadas do 1 e do 2-naftaldeído, frente a enzima tirosina fosfatase A (PtpA) de *Mycobacterium tuberculosis*; (ii) determinação do mecanismo de inibição dos compostos ativos; (iii) construção de modelos de interação dos compostos bioativos com a enzima-alvo para compreensão das bases estruturais relacionadas com a potência inibitória.

3.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar a atividade residual da PtpA na presença das chalconas;
2. Determinar a potência inibitória (valor de IC_{50}) dos compostos bioativos;
3. Realizar estudos de relação estrutura-atividade dos inibidores;
4. Determinar as constantes cinéticas (K_M , V_{max}) da PtpA (na presença e ausência dos inibidores);
5. Determinar a constante de inibição (K_i) e mecanismo de ação dos inibidores mais promissores;
6. Criar modelos de interação ligante-proteína através de modelagem molecular, que forneçam dados estruturais úteis para guiar a síntese de novos derivados mais potentes e seletivos.

4 JUSTIFICATIVA

As tirosinas fosfatases são consideradas alvos terapêuticos importantes pelo seu papel como reguladores chave da sinalização celular e sua implicação em várias doenças humanas, como diabetes e câncer. Mais recentemente, seu estudo também está voltado para tuberculose. Uma estratégia no desenvolvimento dos inibidores enzimáticos é baseada na obtenção de compostos que simultaneamente atinjam o sítio ativo e sejam seletivos, interagindo com resíduos de aminoácidos.

Seguindo uma linha promissora para a obtenção de agentes inibidores da proteína tirosina fosfatase A de *M. tuberculosis* e, considerando que nos últimos anos tem sido verificado interesse especial pelas classes de compostos derivados de metabólitos secundários isolados de plantas, ou mesmo de seus análogos sintéticos, o estudo de chalconas tem se mostrado muito promissor como nova alternativa de inibidores, principalmente por serem moléculas de baixo peso molecular, interagindo de forma mais eficiente com a proteína, e de relativa facilidade de obtenção.

O controle da TB, priorizada por várias organizações da área da saúde, como a OMS, a Aliança Global para o Desenvolvimento de fármacos contra TB e o setor privado, além dos esforços atuais na identificação e otimização de novos compostos complementados com as informações da área de genômica/proteômica, provam a necessidade de unir esforços para o desenvolvimento da pesquisa nessa área.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Síntese dos compostos

Para a preparação dos compostos **1**, **3** e **14-30** utilizou-se um balão de reação de 100 ml de uma boca. Colocou-se o 1-naftaldeído (ou o 2-naftaldeído) (2 mmol), a acetofenona (2 mmol) e metanol (15 ml). Dissolveu-se os reagentes sob agitação magnética e em seguida adicionou-se lentamente KOH 50% v/v (10 ml). Deixou-se a reação sob agitação magnética, à temperatura ambiente, por 24 horas. Após este período, adicionou-se água destilada à reação, o que provocou a precipitação dos compostos, e acidificou-se a mesma com ácido clorídrico 10%, para neutralização do meio. Filtrou-se em funil de Büchner, verificou-se a pureza por CCD e as chalconas foram recristalizadas em diclorometano, tendo sua precipitação forçada com hexano.

A caracterização dos compostos foi feita conforme descrito no Capítulo 1 – Material e Métodos. De acordo com os procedimentos descritos, os dados espectroscópicos das estruturas **14-30** estão apresentados abaixo.

14 – (2E)-1-(2',5'-dimetoxifenil)-3-(1-naftil)-2-propen-1-ona. ^1H RMN (CDCl_3) δ 3.88 (s, 3H, OCH₃), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 6.96 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, H_{4'}), 7.06 (dd, $J = 8,0$ Hz, 1H, H₄), 7.49-7.59 (m, 5H, H₃, H₅, H₆, H₇, H₈), 7.85 (d, 1H, $J = 7,2$ Hz, H_{3'}), 7.89 (d, 1H, $J = 16,0$ Hz, H α), 7.89 (s, 1H, H_{6'}), 8.24 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, H₂), 8.50 (d, 1H, $J = 16,0$ Hz, H β). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ 56.12 (OCH₃), 56.72 (OCH₃), 113.60 (C_{3'}), 114.72 (C_{6'}), 119.71 (C_{4'}), 123.85 (C α), 125.40 (C_{1'}), 125.72 (C₁₀), 126.45 (C₃), 127.06 (C₉), 128.96 (C₅), 129.69 (C₄), 129.86 (C₈), 130,72 (C₆), 132.01 (C₂), 132.85 (C₇), 133.96 (C₁), 140.20 (C β), 152.97 (C_{5'}), 153.90 (C_{2'}), 192.45 (C=O). IV $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 1657 (C=O), 1588 (C=C), 1223, 1043 (C-O), 2947, 1493, 977, 807, 787 (KBr) Anal. Calc. C₂₁H₁₈O₃: C 79.23, H 5.70. Exp.: C 79.24, H 6.11.

15 - (2E)-1-(4'-metoxifenil)-3-(1-naftil)-2-propen-1-ona. ^1H RMN (CDCl_3) δ 3.89 (s, 3H, OCH₃), 7.00 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, H_{3'}, H_{5'}), 7.50-7.61 (m, 3H, H₃, H₆, H₇), 7.64 (d, 1H, $J = 15.2$ Hz, H α), 7.88-7.93 (m, 3H, H₄, H₅, H₈), 8.10 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, H_{2'}, H_{6'}), 8.27 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H₂), 8.66 (d, 1H, $J = 15.2$ Hz, H β). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ 55.77 (OCH₃), 114.14 (C_{3'}, C_{5'}), 123.84 (C α), 124.83 (C₁₀), 125.22 (C₃), 125.69 (C₉),

126.51 (C5), 127.15 (C4), 128.96 (C8), 130.83 (C6, C1'), 131.16 (C2', C6'), 132.00 (C2), 132.88 (C7), 133.97 (C1), 141.18 (C β), 163.74 (C4'), 188.77 (C=O). IV $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 1649, 1306 (C=O), 1597 (C=C), 1251, 1013 (C-O), 2928, 2830, 1174, 839, 799 (KBr). Anal. Calc. C₂₀H₁₆O₂: C 83.31, H 5.59. Exp: C 83.14, H 6.01.

16 – (2E)-1-(3'-nitrofenil)-3-(1-naftil)-2-propen-1-ona. ¹H RMN (CDCl₃) δ 7.54-7.58 (m, 3H, H3, H6, H7), 7.63 (d, 1H, J = 15.6 Hz, H α), 7.73 (dd, 1H, H3'), 7.91 (d, 1H, J = 8.0 Hz, H4), 7.96-7.98 (m, 2H, H5, H8), 8.25 (d, 1H, J = 8.4 Hz, H2), 8.40 (d, 1H, J = 7.6 Hz, H2'), 8.45 (d, 1H, J = 8.4 Hz, H4'), 8.77 (d, 1H, J = 15.6 Hz, H β), 8.89 (s, 1H, H6'). ¹³C RMN (CDCl₃) δ 123.26 (C α), 123.51 (C10), 123.59 (C3), 125.69 (C9, C6'), 126.71 (C4), 127.40 (C5), 127.49 (C8), 129.13 (C6), 130.21 (C4'), 131.79 (C3'), 131.92 (C2), 132.02 (C7), 134.01 (C1), 134.41 (C2'), 139.70 (C1'), 143.84 (C β), 148.68 (C5'), 187.99 (C=O). IV $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 1658 (C=O), 1590 (C=C), 1518, 1341, 974 (N-O), 3073, 1430, 1038, 782, 695 (Ar) (KBr). Anal. Calc. C₁₉H₁₃NO₃: C 75.24, H 4.32, N 4.62. Exp: C 75.25, H 4.78, N 4.86.

17 – (2E)-1-(4'-bromofenil)-3-(1-naftil)-2-propen-1-ona. ¹H RMN (CDCl₃) δ 7.53-7.62 (m, 3H, H3, H6, H7), 7.66-7.69 (m, 3H, H3', H5', H4), 7.90-7.96 (m, 3H, H α , H5, H8), 7.91 (d, 2H, J = 7.2 Hz, H2', H6'), 8.25 (dd, 1H, J = 8.0 Hz, H2), 8.69 (dd, 1H, J = 15.6 Hz, H β). ¹³C RMN (CDCl₃) δ 123.65 (C α), 124.25 (C10), 125.41 (C3), 125.68 (C9), 126.62 (C4), 127.33 (C5), 128.27 (C6), 129.05 (C8), 130.35 (C4'), 131.30 (C2'), 131.99 (C6'), 132.24 (C3', C5'), 132.38 (C7), 133.98 (C1), 137.12 (C1'), 142.56 (C β), 189.40 (C=O). IV $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 1651, 1349 (C=O), 1588 (C=C), 3047, 1061, 994, 778, 727 (Ar) (KBr). Anal. Calc. C₁₉H₁₃BrO: C 67.67, H 3.89. Exp: C 67.47, H 4.01.

18 – (2E)-1-(4'-nitrofenil)-3-(1-naftil)-2-propen-1-ona. ¹H RMN (CDCl₃) δ 7.53-7.66 (m, 3H, H3, H6, H7), 7.55 (d, 1H, J = 15,6 Hz, H α), 7.91-7.99 (m, 3H, H4, H5, H8), 8.21 (d, 2H, J = 8.4 Hz, H2', H6'), 8.23 (d, 1H, H2), 8.38 (d, 2H, J = 8.4 Hz, H3', H5'), 8.73 (d, 1H, J = 15.6 Hz, H β). ¹³C RMN (CDCl₃) δ 123.24 (C α), 123.46 (C10), 123.88 (C3'), 124.18 (C5'), 125.47 (C3), 125.65 (C9), 127.54 (C4), 128.71 (C5), 129.15 (C8), 129.74 (C6), 131.53 (C2), 131.84 (C2', C6'), 133.79 (C7), 141.08 (C1), 143.26 (C β), 143.90 (C1'), 188.20 (C=O). IV $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 1683 (C=O), 1595 (C=C), 1519, 1341, 849

(N-O), 3041, 1102, 1013, 775, 699 (Ar) (KBr). Anal. Calc. C₁₉H₁₃NO₃: C 75.24, H 4.32, N 4.62. Exp: C 75.10, H 4.78, N 4.84.

19 – (2E)-1-(fenil)-3-(1-naftil)-2-propen-1-ona. ¹H RMN (CDCl₃) δ 7.51-7.62 (m, 6H, H4', H3', H5', H3, H6, H7), 7.64 (d, 1H, *J* = 15,6 Hz, Hα), 7.95-7.89 (m, 3H, H4, H5, H8), 8.09 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz, H2', H6'), 8.26 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz, H2), 8.68 (d, 1H, *J* = 15,6 Hz, Hβ). ¹³C RMN (CDCl₃) δ 123.75 (Cα), 124.91 (C10), 125.35 (C3), 125.70 (C9), 126.56 (C5), 127.25 (C4), 128.85 (C5', C3'), 128.94 (C2', C6'), 129.01 (C8), 131.08 (C6), 132.00 (C2), 132.61 (C7), 133.15 (C4'), 133.97 (C1), 138.40 (C1'), 142.02 (Cβ), 190.58 (C=O). IV *v*_{max}/cm⁻¹ 1657, 1339 (C=O), 1594 (C=C), 3012, 1436, 1007, 775, 688 (KBr). Anal. Calc. C₁₉H₁₄O: C 88.34, H 5.46. Exp: C 88.52, H 5.98.

20 – (2E)-1-(3',4',5'-trimetoxifenil)-3-(1-naftil)-2-propen-1-ona. ¹H RMN (CDCl₃) δ 3.95 (s, 3H, OCH₃), 3.96 (s, 6H, OCH₃), 7.33 (s, 2H, H2', H6'), 7.52-7.57 (m, 4H, H3, H4, H6, H7), 7.89-7.92 (m, 2H, H5, H8), 7.94 (d, 1H, *J* = 15,0 Hz, Hα), 8.26 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz, H2), 8.66 (d, 1H, *J* = 15,0 Hz, Hβ). ¹³C RMN (CDCl₃) δ 56.63 (OCH₃), 61.27 (OCH₃), 106.34 (C6', C1'), 123.74 (Cα), 124.76 (C1-), 125.34 (C3), 125.68 (C9), 126.61 (C5), 127.26 (C4), 129.04 (C8), 131.07 (C6), 131.97 (C1'), 132.70 (C2), 133.69 (C1), 133.96 (C7), 141.98 (C4'), 142.73 (Cβ), 153.43 (C2', C5'), 189.33 (C=O). IV *v*_{max}/cm⁻¹ 1652 (C=O), 1577 (C=C), 1231 (C-O), 2931, 1499, 1454, 988, 788 (KBr). Anal. Calc. C₂₂H₂₀O₄: C 75.84, H 5.79. Exp: C 74.34, H 6.246.

21 – (2E)-1-(2',4'-dimetoxifenil)-3-(1-naftil)-2-propen-1-ona. ¹H RMN (CDCl₃) δ 3.88 (s, 3H, OCH₃), 3.92 (s, 3H, OCH₃), 6.52 (s, 1H, H3'), 6.60 (dd, 1H, *J* = 8,0 Hz, H5'), 7.48-7.59 (m, 3H, H3, H6, H7), 7.60 (d, 1H, *J* = 15,6 Hz, Hα), 7.81-7.90 (m, 4H, H4, H6', H5, H8), 8.28 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, H2), 8.52 (d, 1H, *J* = 15,6 Hz, Hβ). ¹³C RMN (CDCl₃) δ 55.82 (OCH₃), 56.01 (OCH₃), 98.88 (C3'), 105.45 (C5'), 114.55 (C1'), 124.02 (Cα), 125.24 (C10), 125.71 (C3), 125.95 (C5), 126.39 (C9, C4), 126.95 (C6, C8), 128.89 (C2), 130.13 (C6'), 130.40 (C7), 133.29 (C1), 139.10 (Cβ), 164.15 (C2'), 169.20 (C4'), 188.96 (C=O). IV *v*_{max}/cm⁻¹ 1647 (C=O), 1599 (C=C), 1251, 1017 (C-O), 2938, 1460, 965, 828, 776 (KBr). Anal. Calc. C₂₁H₁₈O₃: C 79.23, H 5.70. Exp: C 78.72, H 5.99.

22 - (2E)-1-(2',5'-dimetoxifenil)-3-(2-naftil)-2-propen-1-ona. ^1H RMN (CDCl_3) δ 3.83 (s, 3H, *o*-OCH₃), 3.89 (s, 3H, *m*-OCH₃), 6.97 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H4'), 7.06 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H3'), 7.23 (s, 1H, H6'), 7.51-7.53 (m, 2H, H6, H7), 7.53 (d, 1H, $J = 16.0$ Hz, H α), 7.75 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H3), 7.81 (d, 1H, $J = 16.0$ Hz, H β), 7.83-7.88 (m, 3H, H4, H5, H8), 7.99 (s, 1H, H1). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ 55.89 (*o*-OCH₃), 56.56 (*m*-OCH₃), 109.77 (C6'), 113.42 (C3'), 114.40 (C4'), 119.17 (C1'), 123.76 (C α), 126.68 (C3), 127.07-127.23 (C6, C7), 127.78 (C5), 128.63 (C8), 129.73 (C1), 130.51 (C4), 132.66 (C10), 133.36 (C9), 134.27 (C2), 143.46 (C β), 152.58-153.64 (C2', C5'), 192.48 (C=O). IR $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 1644 (C=O), 1570 (C=C), 1336, 1130 (C-O), 3012, 2946, 2837, 1508, 1227, 1005, 693 (Ar) (KBr). Anal. Calc. C₂₁H₁₈O₃: C 79.23; H 5.70; Exp: C 79.69, H 6.00.

23 - (2E)-1-(4'-metoxifenil)-3-(2-naftil)-2-propen-1-ona. ^1H RMN (CDCl_3) δ 3.88 (s, 3H, OCH₃), 6.98 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, H2', H6'), 7.49-7.51 (m, 2H, H3, H4), 7.64 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, H α), 7.79-7.87 (m, 4H, H5, H6, H7, H8), 7.94 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, H β), 8.00 (s, 1H, H1), 8.07 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, H3', H5'). ^{13}C RMN (CDCl_3) δ 55.74 (*p*-OCH₃), 114.11 (C3', C5'), 122.22 (C3), 123.95 (C α), 126.96 (C6), 127.49 (C7), 128.02 (C1), 128.84 (C5), 128.90 (C2', C6'), 130.65 (C8), 131.08 (C4), 131.39 (C1'), 132.80 (C10), 133.61 (C9), 134.52 (C2), 144.26 (C β), 163.68 (C4'), 188.88 (C=O). IR $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 1651, 1215 (C=O), 1597 (C=C), 1257, 1013 (C-O), 3053, 1506, 1417, 1114, 1013, 981, 817, 744 (Ar) (KBr). Anal. Calc. C₂₀H₁₆O₂: C 83.31, H 5.59. Exp: C 83.08, H 6.06.

24 - (2E)-1-(3'-nitrofenil)-3-(2-naftil)-2-propen-1-ona. ^1H RMN (DMSO-d_6) δ 7.55-7.58 (m, 2H, H6, H7), 7.87 (dd, 1H, $J = 8.0$ Hz, H5'), 7.95 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, H α), 7.95-7.99 (m, 2H, H3, H4), 8.13 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, H β), 8.15 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, H5, H8), 8.36 (s, 1H, H1), 8.47 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H6'), 8.62 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, H4'), 8.84 (s, 1H, H2'). ^{13}C RMN (DMSO-d_6) δ 122.40 (C3), 123.55 (C α), 125.18 (C6'), 127.56 (C6), 128.04 (C5), 128.44 (C1, C7), 129.20 (C8), 129.32 (C4), 131.30 (C4'), 132.01 (C5'), 132.80 (C10), 133.58 (C9), 134.79 (C2), 135.44 (C2'), 139.47 (C1'), 146.26 (C β), 148.92 (C3'), 188.21 (C=O). IR $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 1656, 1206 (C=O), 1599 (C=C), 1525, 1344 (NO₂), 3082, 1472, 1433, 971, 814, 752 (Ar) (KBr). Anal. Calc. C₁₉H₁₃NO₃: C 75.24, H 4.32, N 4.62. Exp: C 74.76, H 4.78, N 4.84.

25 - (2E) 1-(4'-bromofenil)-3-(2-naftil)-2-propen-1-ona. ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 7.57-7.59 (m, 2H, H6, H7), 7.80 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, H3', H5'), 7.91 (d, 1H, $J = 16.0$ Hz, H α), 7.94-7.80 (m, 4H, H3, H4, H5, H8), 8.05 (d, 1H, $J = 16.0$ Hz, H β), 8.13 (d, $J = 8.8$ Hz, H2', H6'), 8.35 (s, 1H, H1). ^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ 122.68 (C3, C α), 125.14 (C6), 127.56 (C7), 128.27 (C1), 128.45 (C5), 129.28 (C4, C8), 131.32 (C2', C6'), 131.66 (C4'), 132.60 (C3', C5'), 132.94 (C9, C10), 133.64 (C2), 137.28 (C1'), 145.30 (C β), 190.15 (C=O). IV $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 1656, 1208 (C=O), 1592 (C=C), 3053, 986, 819 (Ar) (KBr). Anal. Calc. C₁₉H₁₃BrO: C 67.67, H 3.89. Exp: C 67.59, H 4.31.

26 - (2E)-1-(4'-nitrofenil)-3-(2-naftil)-2-propen-1-ona. ^1H RMN (CDCl₃) δ 7.54-7.58 (m, 3H, H3, H6, H7), 7.59 (d, 2H, $J = 16.0$ Hz, H α), 7.86-7.91 (m, 3H, H4, H5, H8), 8.02 (d, 2H, $J = 16.0$ Hz, H β), 8.06 (s, 1H, H1), 8.18 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, H2', H6'), 8.37 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, H3', H5'). ^{13}C RMN (CDCl₃) δ 121.58 (C3), 123.69 (C α), 124.12 (C3', C5'), 127.23 (C6), 128.06 (C7, C1), 129.00 (C5), 129.20 (C4, C8), 129.66 (C2', C6'), 131.64 (C10), 131.98 (C9), 133.53 (C2), 147.17 (C1', C β), 150.47 (C4'), 189.21 (C=O). IV $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 1655, 1200 (C=O), 1583 (C=C), 1516, 1346, 841 (N=O), 3068, 1030, 989, 816, 757, 697 (Ar) (KBr). Anal. Calc. C₁₉H₁₃NO₃: C 75.24, H 4.32, N 4.62. Exp: C 74.34, H 4.82, N 4.82.

27 - (2E)-1-(fenil)-3-(2-naftil)-2-propen-1-ona. ^1H RMN (CDCl₃) δ 7.51-7.55 (m, 3H, H3', H4', H5'), 7.59 (d, 2H, $J = 7.2$ Hz, H2', H6'), 7.65 (d, 1H, $J = 16.0$ Hz, H α), 7.78-7.89 (m, 4H, H5, H6, H7, H8), 7.98 (d, 1H, $J = 16.0$ Hz, H β), 8.02 (s, 1H, H1), 8.07 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, H3, H4). ^{13}C RMN (CDCl₃) δ 122.42 (C3), 123.92 (C α), 127.03 (C6), 127.64 (C7), 128.07 (C1), 128.79 (C5), 128.90 (C4, C8), 128.98 (C3', C5'), 130.92 (C2', C6'), 132.63 (C10), 133.04 (C9), 133.61 (C4'), 134.63 (C2), 138.54 (C1'), 145.16 (C β), 190.73 (C=O). IV $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 1656, 1214 (C=O), 1594 (C=C), 3054, 1441, 1011, 857, 821, 775 (Ar) (KBr). Anal. Calc. C₁₉H₁₄O: C 88.34, H 5.46. Exp: C 88.11, H 5.84.

28 - (2E) 1-(3',4',5'-trimetoxifenil)-3-(2-naftil)-2-propen-1-ona. ^1H RMN (CDCl₃) δ 3.95 (s, 3H, OCH₃), 3.96 (s, 3H, OCH₃), 3.97 (s, 3H, OCH₃), 7.32 (s, 2H, H2', H6'), 7.53-7.55 (m, 2H, H3, H4), 7.60 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, H α), 7.82-7.89 (m, 4H, H5, H6, H7, H8), 7.99 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, H β), 8.04 (s, 1H, H1). ^{13}C RMN (CDCl₃) δ 56.66 (*m*-OCH₃), 61.27 (*p*-OCH₃), 106.29 (C2', C6'), 122.04 (C3), 123.86 (C α), 127.06 (C6),

127.67 (C7), 128.06 (C1, C5), 128.89 (C4), 128.98 (C8), 130.98 (C1'), 132.58 (C10), 133.59 (C9), 133.84 (C2), 134.60 (C4'), 145.14 (C β), 153.40 (C3', C5'), 189.47 (C=O). IV $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 1656 (C=O), 1582 (C=C), 1230 (C-O), 2834, 1502, 1458, 1411, 996, 813 (Ar) (KBr). Anal. Calc. C₂₂H₂₀O₄: C 75.84, H 5.79. Exp: C 75.42, H 5.82.

29 - (2E)-1-(3',4'-dimetoxifenil)-3-(2-naftil)-2-propen-1-ona. ¹H RMN (CDCl₃) δ 3.97 (s, 3H, OCH₃), 3.98 (s, 3H, OCH₃), 6.94 (d, 1H, H6'), 7.50-7.53 (m, 2H, H6, H7), 7.65 (s, 1H, H1), 7.67 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, H α), 7.73 (d, 1H, H5'), 7.81-7.87 (m, 4H, H3, H4, H5, H8), 7.95 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, H β), 8.02 (s, 1H, H2'). ¹³C RMN (CDCl₃) δ 56.31 (*m*- e *p*-OCH₃), 110.23 (C5'), 111.04 (C2'), 121.99 (C α), 123.30 (C6'), 123.93 (C3), 126.97 (C6), 127.52 (C5), 128.02 (C7), 128.90 (C4, C8), 130.70 (C1), 131.60 (C1'), 132.78 (C10), 133.61 (C9), 134.52 (C2), 144.29 (C β), 149.50 (C3'), 153.52 (C4'), 188.76 (C=O). IV $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 1652 (C=O), 1583 (C=C), 1261, 1021 (C-O), 3008, 2935, 2841, 1510, 1448, 1415, 975, 920, 844, 810 (Ar) (KBr). Anal. Calc. C₂₁H₁₈O₃: C 79.23, H 5.70. Exp: C 79.06, H 6.14.

30 - (2E)-1-(2',4',6'-trimetoxifenil)-3-(2-naftil)-2-propen-1-ona. RMN ¹H (CDCl₃) δ 3,78 (s, 6H, OCH₃), 3,87 (s, 3H, OCH₃), 6,18 (s, 2H, H3', H5'), 7,07 (d, 1H, $J = 16,4$ Hz, H α), 7,48-7,55 (m, 4H, H3, H6, H7, H β), 7,70 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, H4), 7,81-7,83 (m, 2H, H5, H8), 7,90 (s, 1H, H1). RMN ¹³C (CDCl₃) δ 55,71 (*p*'-OCH₃), 56,19 (*o*'-OCH₃), 91,01 (C3', C5'), 112,11 (C1'), 124,09 (C α), 126,86 (C3), 127,39 (C6), 128,00 (C7), 128,75 (C1), 128,80 (C5), 129,49 (C8), 130,49 (C4), 132,83 (C10), 133,55 (C9), 134,45 (C2), 144,49 (C β), 159,14 (C2', C6'), 162,68 (C4'), 194,53 (C=O). IV $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 1639, 1206 (C=O), 1588 (C=C), 1231, 1027 (C-O), 3002, 2945, 2845, 1622, 1605, 1459, 1415, 1083, 980, 859, 826 (Ar) (KBr).

5.2 Atividade biológica - Ensaio de inibição da MPtpA

Os testes da avaliação de inibição enzimática foram realizados no Departamento de Bioquímica da UFSC, tendo como coordenador o Prof. Dr. Hernán Terenzi, utilizando metodologia já descrita (Grundner *et al.*, 2007), através de espectrofotometria no UV-VIS feita em leitor de placas de 96 poços, com o intuito de obter o perfil de atividade de todas as chalconas e posteriormente analisar o comportamento desses

compostos frente à enzima MPtpA, em diferentes concentrações, para obtenção dos valores de IC_{50} dos compostos mais ativos, bem como, realizar estudos cinéticos para obtenção do valor de K_i , K_M e V_{max} .

5.2.1. MPtpA: expressão e purificação

O vetor de expressão pET28a (QIAGEN) contendo o gene da proteína PtpA de *Mycobacterium tuberculosis*, foi cedido pelo Ph.D. Pedro M. Alzari - Institut Pasteur-Paris. Este vetor foi inserido em *Escherichia coli* BL21(DE3) para produzir proteínas recombinantes contendo uma cauda com 6 histidinas. Foram incubadas por 16 horas (*overnight*) em 10 mL de meio Luria-Bertani (LB) contendo $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de canamicina a 37°C . Para a expressão da proteína, 0,5 mL de cultura *overnight* foram transferidas para 500 mL de meio LB e incubadas a 37°C com agitação (140 rpm) até a fase de crescimento exponencial, correspondente a uma densidade ótica de 0,6-0,8 a 600 nm. Para a indução da síntese da proteína de interesse foi adicionado 0,5 mM de isopropil- β -D-tiogalactopiranoside (IPTG). As culturas foram incubadas *overnight* a 15°C e então recolhidas por centrifugação a $5.000 \times g$ por 30 min; o sedimentado foi resuspenso em tampão *lysis* (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,5 M NaCl, 10 mM imidazol, 10% glicerol) contendo inibidores de proteases (Amersham Biosciences). As células foram então lisadas por sonicação em gelo (Fisher Scientific Model 60 Sonic Dismembrator) e depois centrifugadas a $12.000 \times g$ por 1 h, a 4°C . As proteínas recombinantes *His-tag* foram purificadas a partir do *His-tag* por IMAC (Cromatografia de afinidade por metal imobilizado) (Porath, 1992). Desta forma, o sobrenadante foi incubado por 40 min a temperatura ambiente sob agitação com 3 mL de *Chelating Sepharose Fast Flow* (GE Healthcare), previamente ativada com 0,1 M CuSO_4 e equilibrada em tampão *lysis*. As proteínas que não se ligaram foram removidas com três tampões de lavagens (W1, W2, W3) de 5 volumes de coluna tampão *lysis* contendo 10 mM, 20 mM, and 30 mM de imidazol, respectivamente. A proteína recombinante ligada na resina foi então eluída em 5 volumes de coluna (VC) do tampão *lysis* contendo 300 mM de imidazol. A pureza das frações foi analisada através de gel SDS-PAGE e as frações contendo proteína pura foram reunidas e dializadas a 4°C , em 4 etapas por 2 horas contra o tampão de diálise (tampão D), com concentrações decrescentes de imidazol (150 mM, 75 mM, 35 mM e sem imidazol). O último tampão (tampão D) contém 20 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 20% glicerol, 5 mM DTT. As proteínas foram concentradas por

ultrafiltração usando membrana porosa de 10 kDa (Amicon Ultra-15 Millipore) e armazenado a -20°C . A concentração da proteína foi determinada por ensaio de Bradford usando albumina soro bovina como padrão (Bradford, 1976). Um passo adicional de purificação por gel filtração foi feita em um sistema AKTA Basic system (GE Healthcare): volumes de 5 mL de proteína dializada (5 mg) foram injetadas na coluna preparativa Superdex 200 16/60 (GE Healthcare) previamente lavada e equilibrada no tampão D; a proteína foi eluída com 2 VC do tampão D; as frações contendo PtpA recombinante foram associadas, concentradas por centrifugação suplementada com 50 mM DTT de concentração final e armazenadas a -20°C .

5.2.2. Medidas da atividade residual de MPtpA

Os ensaios com MPtpA foram feitos em placas de 96 poços contendo 5 μL do composto diluído ou solvente (100 % DMSO) em cada poço, 25 mM Tris-HCl [pH 8.0], 20 mM Imidazol [pH7.0], 40 mM DTT e 40 mM *p*-nitrophenilfosfatote [pNPP], seguidos pela adição de 2 μL de PtpA recombinante (1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), na ordem para começar a reação. A absorbância foi medida em espectrômetro de placas ELISA (TECAN), por 20 minutos a 37°C (a 410 nm com leituras a cada 2 minutos). Controles negativos foram feitos na ausência de enzima, e controles positivos na presença de enzima com DMSO 100% no lugar do composto. O percentual de atividade foi calculado pela média de dois experimentos feitos em triplicata.

5.2.3. Determinação dos valores de IC_{50} dos compostos

O potencial de inibição das moléculas foi determinado através do cálculo do valor de IC_{50} (concentração inibitória necessária para cada inibidor diminuir em 50% a atividade da enzima original). Os valores de IC_{50} foram determinados graficamente usando concentrações crescentes de inibidor *versus* % inibição (5 concentrações foram testadas). A atividade enzimática é expressa em valores de percentual de atividade residual comparada ao controle sem inibidor. Os dados experimentais foram analisados com o programa SigmaPlot 9.0 e os valores de IC_{50} determinados através do método regressão linear de melhor ajuste.

5.2.4. Cinética enzimática

Os valores de K_i , V_{max} , K_M e a determinação do mecanismo de inibição dos compostos foram determinados graficamente utilizando concentrações crescentes de substrato pNPP (9 concentrações foram testadas). Para a construção do gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk foram utilizados os valores correspondente ao inverso da concentração de pNPP pelo inverso do valor de velocidade. Os dados experimentais foram analisados com o programa SigmaPlot 9.0 e os valores das constantes cinéticas determinados através do métodos de regressão linear de melhor ajuste.

5.3. Modelagem Molecular

Os estudos de docagem molecular foram realizados no Laboratório de Química Medicinal e Computacional do Instituto de Física de São Carlos - USP, em colaboração com o Dr. Rafael V. C. Guido e o Prof. Dr. Adriano D. Andricopulo.

As estruturas 3D dos inibidores foram geradas com o módulo Sketcher inserido na plataforma SYBYL 7.3 (Tripos Inc., St. Louis, MO). Os modelos de interação foram gerados com o programa FlexX (Rarey *et al.*, 1996) e a análise e visualização dos modelos foram realizadas com o programa Pymol 0.99 (DeLano Scientific, San Carlos, CA).

Os dados cristalográficos de MPtpA foram usados como alvo molecular para as simulações de docking. Atualmente, estão depositadas no *Banco de Dados de Proteína* - PDB duas estruturas da MPtpA: (i) em complexo com uma molécula de glicerol no sítio de ligação (PDB ID, 1U2Q - 2,5 Å de resolução); (ii) em complexo com um íon cloro no sítio de ligação (PDB ID, 1U2P - 1,9 Å de resolução). Além da resolução, ambas as estruturas diferem entre si. Esta última foi a estrutura utilizada para os estudos de docagem molecular devido a melhor resolução (Figura 21).

O sítio de ligação utilizado nos estudos de docagem molecular envolveu todos os aminoácidos presentes no interior de uma esfera de 10Å de raio em torno do íon cloro contido no sítio ativo da enzima. Foram gerados 30 experimentos para cada molécula, obtendo-se ao final, a energia total para cada molécula.

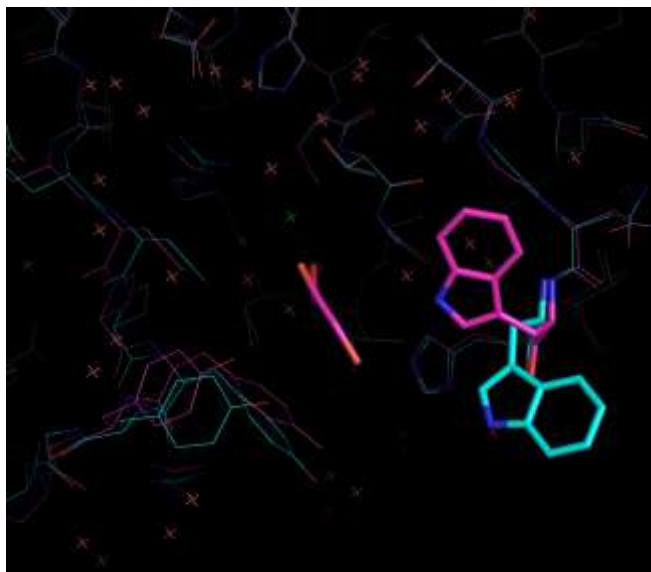


Figura 21: Sobreposição das duas únicas estruturas de MPTpA depositadas no PDB (em azul a estrutura de 1,9Å e em rosa a estrutura de 2,5 Å)

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Síntese das naftilchalconas

Neste capítulo foram estudadas 22 chalconas (5 inéditas) obtidas a partir da reação de condensação aldólica entre diferentes acetofenonas e 1 ou 2-naftaldeído (Figura 22).

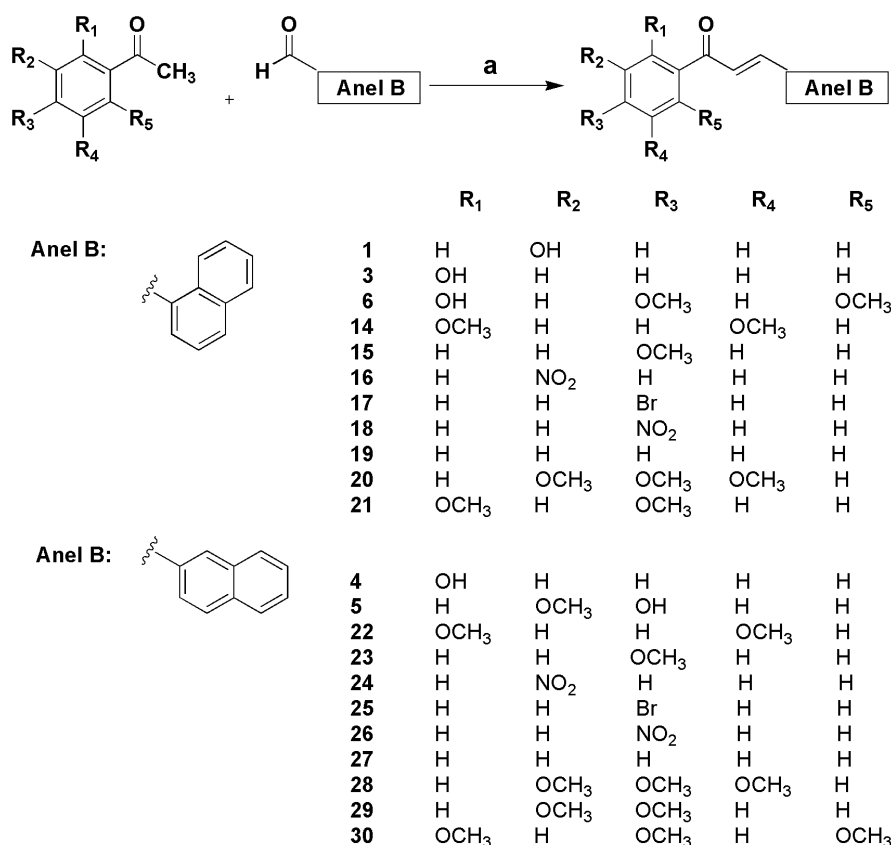
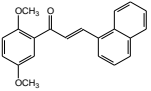
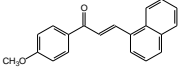
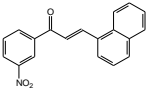
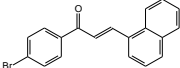
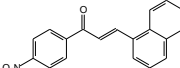
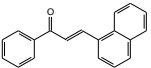
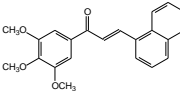
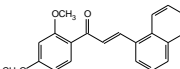
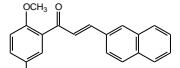
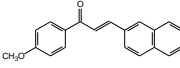
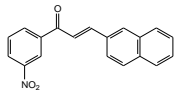
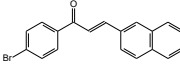
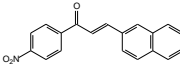
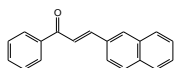
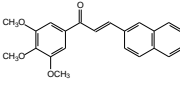
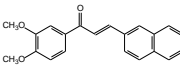
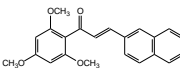


Figura 22: Síntese dos possíveis inibidores de MPtpA. (a = 1. KOH/MeOH, 24h, t.a.; 2. HCl_(aq))

A síntese e caracterização dos compostos derivados do 1-naftaldeído (**1**, **3**, **6**, **14**-**21**) foram descritas em meu trabalho de conclusão de curso (Mascarello, 2006), e os derivados do 2-naftaldeído (**4**, **5**, **22**-**30**) descritos na dissertação de Louise D. Chiaradia (Chiaradia, 2006). Os rendimentos e pontos de fusão estão apresentados na Tabela 5. Os compostos **1**, **3**, **4**, **5** e **6** foram caracterizados no Capítulo I, por isso não constam na tabela.

Tabela 5. Rendimentos (%) e pontos de fusão (°C) das naftilchalconas.

Composto	Estrutura	Rendimento (%)	P.F. (°C) Exp.	P.F. (°C) Lit.	Referência/ CHEMCATS
14		65	89-90	90-91	Gutteridge <i>et al.</i> , 2007
15		58	89-91	**	119206-75-6
16		54	151-153	*	-
17		63	110-111	**	403706-55-8
18		57	144-146	*	-
19		65	81-82	**	80674-36-8
20		70	132-133	*	-
21		59	114-115	116	Vibhute <i>et al.</i> , 1986
22		83	121-123	121-122	Gutteridge <i>et al.</i> , 2007
23		90	173-175	**	56412-57-8
24		71	149-151	*	-
25		88	186-188	192-193	Jacobs <i>et al.</i> , 1951
26		73	206-208	**	57115-09-0
27		95	152-154	**	42299-50-3
28		97	131-132	**	184579-53-1
29		96	168-170	*	-
30		88	139-141	145-146	Batt <i>et al.</i> , 1993

CHEMCATS = número de registro no CAS. *Composto inédito. **P.F. não encontrado na literatura.

6.2 Triagem biológica e determinação do valor de IC₅₀

O gene da proteína tirosina fosfatase foi subclonado a partir do DNA genômico da *M. tuberculosis*, e o vetor expressão pET28a-PtpA foi usado para produzir proteínas recombinantes, como previamente descrito. Ensaio iniciais foram realizados com uma única concentração de cada composto (25 µM) para identificarmos o potencial destes como inibidores da PtpA (Manger *et al.*, 2005) e os resultados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Atividade da MPtpA na presença de 25µM das chalconas.

Composto	Atividade da PtpA (% ± erro)	Composto	Atividade da PtpA (% ± erro)
1	79,5±9	20	102±1
3	24±15	21	80±10
4	74,6±7	22	42,5±7
5	61±23	23	81,5±13
6	84,4±8	24	84±3
14	54±7	25	89,2±6
15	82,4±7	26	89±1
16	88±6	27	88±33
17	75±17	28	109±6
18	82±5	29	31,5±18
19	62,7±4	30	104±13

Nota: O erro foi calculado pela média de dois experimentos feitos em triplicata.

Na Tabela 7 podemos observar que os compostos **3**, **5**, **14**, **22** e **29** mostraram importante inibição da MPtpA. Os resultados obtidos indicam que grupos que aumentam a densidade eletrônica (metoxila ou hidroxila) no anel A, afetam a atividade da enzima, provocando um decréscimo da atividade da enzima nestes percentuais: 61,0%; 54,0%; 42,5%; 31,5% e 24,0%, respectivamente, para os compostos **5**, **14**, **22**, **29** e **3**, numa concentração de 25µM de composto.

Naftilchalconas com substituintes no anel A, como 2-hidroxi-4,6-dimetoxi (composto **6**), e grupos que diminuem a densidade eletrônica, como bromo, cloro e nitro

(compostos **16**, **17**, **18**, **24**, **25** e **26**), apresentaram uma baixa inibição da atividade da PtpA.

Os compostos com grupos naftil no anel B e com três grupos metoxila (**20** e **28**), sem substituintes (**19** e **27**) ou com somente um grupo metoxil ou hidroxil no anel A (**1**, **4**, **15** e **23**), não mostraram redução satisfatória na atividade da PtpA, com exceção da chalcona **3**. Isso pode ser devido a algum efeito estérico no sítio catalítico da enzima, impedindo a interação dos compostos com os resíduos de aminoácidos contidos nele. Na continuação, serão apresentados os estudos de modelagem molecular realizados, para verificar a interação das moléculas com o sítio ativo da enzima.

Para podermos analisar esta relação entre os substituintes que aumentam a densidade eletrônica do anel A, e o grupo 1 ou 2-naftil no anel B, bem como, avaliar o potencial destes compostos, foram feitos novos bioensaios, para determinação da potência inibitória dos mais ativos (variando a concentração dos compostos de 5 a 60 μM) e os resultados estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Valor de IC_{50} dos compostos mais ativos em PtpA de *M. tuberculosis*, ensaiados nas concentrações entre 5 a 60 μM .

Naftilchalcona	Anel A	Anel B	$\text{IC}_{50\pm\text{erro}}(\mu\text{M})$
5	2-OCH ₃ -4-OH	2-naftil	53,7 \pm 1,3
3	2-OH	1-naftil	50,2 \pm 2,1
14	2,5-OCH ₃	1-naftil	39,5 \pm 1,1
29	3,4-OCH ₃	2-naftil	23,1 \pm 1,6
22	2,5-OCH ₃	2-naftil	8,4 \pm 0,9

Nota: O erro foi calculado pela média de dois experimentos feitos em triplicata.

Os valores apresentados na Tabela 7 mostram a atividade das chalconas com grupo 1 ou 2-naftil como anel B e substituintes elétron-doadores no anel A (OH e/ou OCH₃). Podemos observar que o efeito inibitório foi maior quando os substituintes foram 2,5-dimetoxi no anel A e 2-naftil no anel B, com um IC_{50} de 8,4 μM (composto **22**). O composto **29**, também com duas metoxilas no anel A (3,4-dimetoxi) e 2-naftil como anel B, apresentou valor de IC_{50} de 23,1 μM . Estes resultados indicam que o grupo 2-naftil no anel B parece ser muito importante para reduzir a atividade da MPtpA, quando associado à posição ideal das metoxilas no anel A.

Já o composto **14**, que tem igualmente duas metoxilas no anel A, nas posições 3 e 4 e como anel B o grupo 1-naftil, apresentou moderada atividade contra a enzima,

com um valor de IC_{50} de $39,5\mu M$. Provavelmente o padrão de substituição do anel B (1-naftil), comparado aos compostos mais ativos, esteja causando esta diminuição da atividade da molécula.

A moderada atividade observada para a chacona **3** (IC_{50} de $50,2\mu M$), pode ser devida à presença do grupo hidroxil que, pelo fato de ser um grupo menor que o grupo metoxil, poderia estar perdendo (ou enfraquecendo) alguma ligação hidrogênio no sítio catalítico da enzima, bem como, pela presença do grupo 1-naftil, no anel B, que parece não fazer interações tão fortes quanto o grupo 2-naftil.

Pela análise da relação estrutura-atividade das moléculas estudadas, podemos observar que a conformação e a hidrofobicidade, principalmente do anel B, são fatores fundamentais na inibição da PtpA, mas a presença de substituintes que aumentem a densidade eletrônica do anel A (como os grupos metoxila e hidroxila), que podem fazer ligações hidrogênio com resíduos de aminoácidos, parece também ser necessária para a atividade das chalconas, concordando com os estudos de Lin e col. (2002).

A partir dos resultados dos compostos, as três chalconas mais ativas (**14**, **22** e **29**) foram ensaiadas para determinação do seu mecanismo de inibição.

6.2.1 Estudos Cinéticos – Determinação do mecanismo

A determinação do mecanismo de inibição é extremamente útil na integração entre os métodos experimentais e computacionais (Guido *et al.*, 2008). Nos estudos de docagem molecular esta informação é utilizada na determinação do sítio de ligação dos compostos bioativos e para auxiliar a interpretação do modo de interação proposto pelos modelos.

Estudamos o modo de inibição das naftilchalconas, através da seleção dos três compostos mais ativos (**14**, **22** e **29**), seguindo o mesmo método utilizado para a determinação do percentual de inibição e valor de IC_{50} , porém com variações da concentração do substrato pNPP. Os valores de velocidade de reação foram expressos como atividade específica da proteína ($\mu mol\ pNP\ min^{-1}\ mg^{-1}$) e a concentração de pNPP em mM. Os resultados desta análise estão apresentados nas figuras 23, 24 e 25 para os compostos **14**, **22** e **29**, respectivamente.

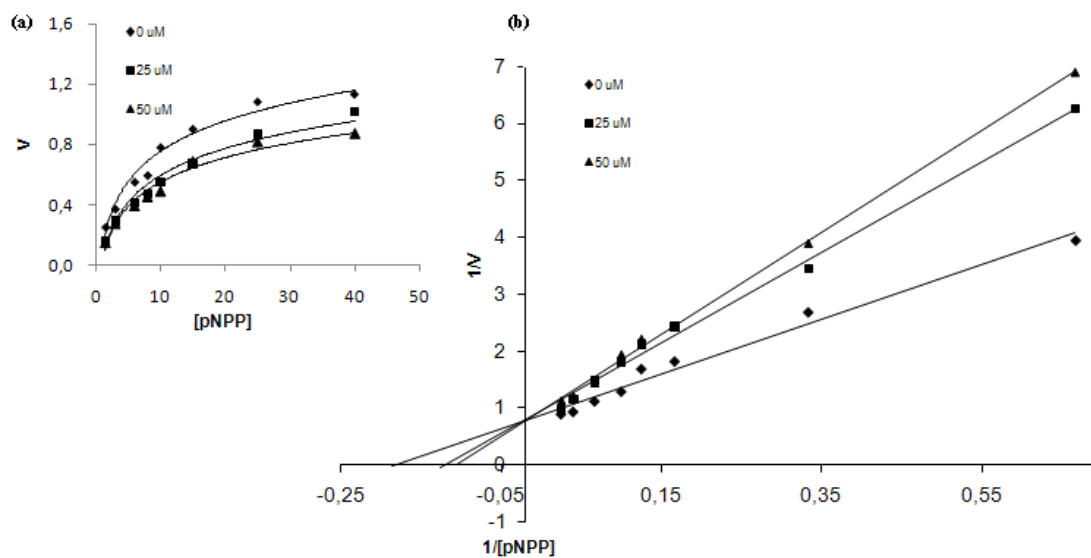


Figura 23: Análise cinética da inibição da PtpA. (a) Gráfico Michaelis-Menten e (b) gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk para o composto 14.

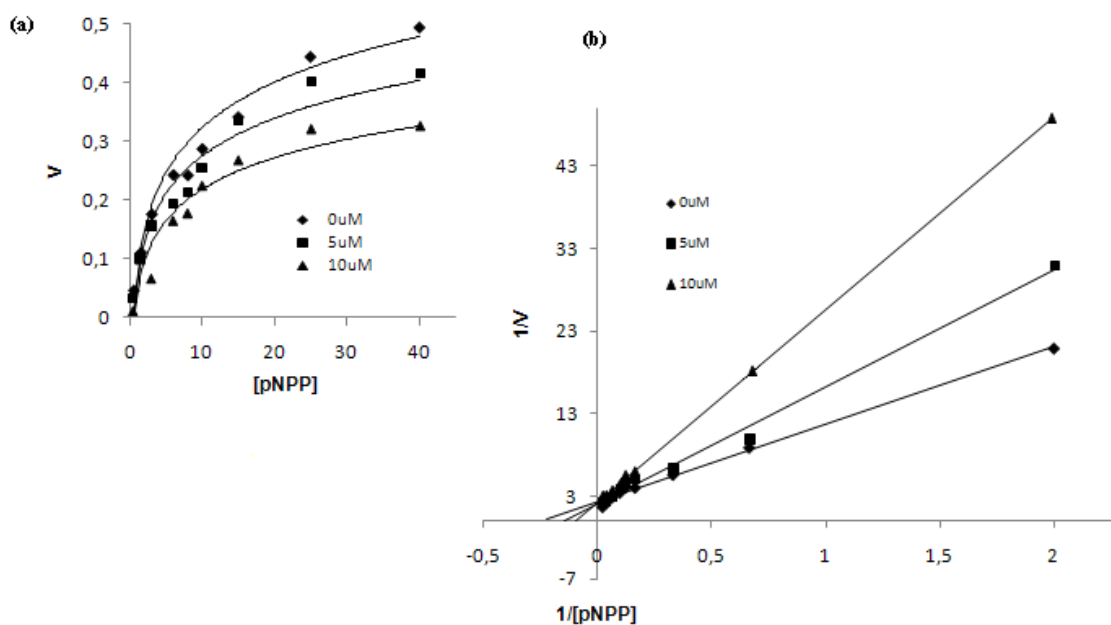


Figura 24: Análise cinética da inibição de PtpA. (a) Gráfico Michaelis-Menten e (b) gráfico duplo recíproco de Lineweaver-Burk para o composto 22.

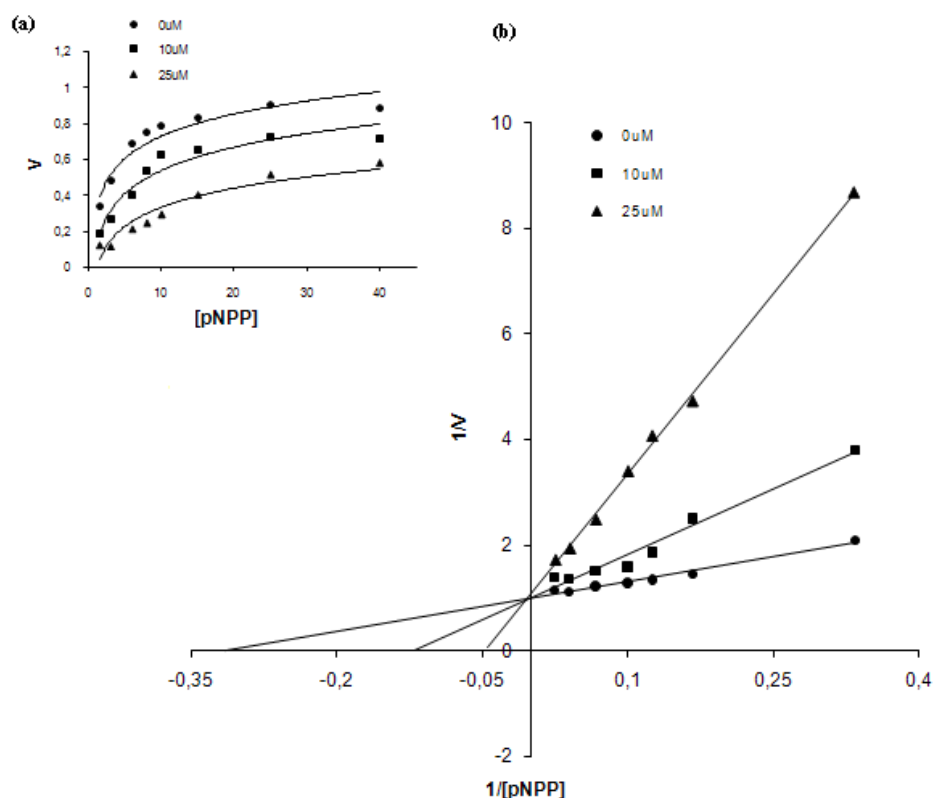


Figura 25: Análise cinética da inibição de PtpA. (a) Gráfico Michaelis-Menten e (b) gráfico duplo recíproco de Lineweaver-Burk para o composto **29**.

A curva de Michaelis-Menten nos mostra que em baixas concentrações de substrato a velocidade de reação aumenta proporcionalmente à concentração do substrato. Já em altas concentrações a taxa se mantém constante e se aproxima da velocidade máxima, que é independente da concentração de substrato. Isso reflete uma situação onde existe mais substrato presente do que sítio ativo viável.

Através dos gráficos 23(a), 24(a) e 25(a) obtidos, a taxa de saturação e liberação de fosfato sugere um mecanismo enzimático clássico de Michaelis-Menten para estes compostos. Isso é consistente com as propriedades cinéticas de outras PTPs para o substrato comumente usado, *p*-nitrofenilfosfato (pNPP) (Zhang *et al.*, 1992; Guo *et al.*, 2002).

O gráfico de Lineweaver-Burk é obtido pelo recíproco da curva de Michaelis-Menten e é usado para determinar o mecanismo de inibição de um composto bioativo (ex. competitivo, não-competitivo ou incompetitivo). A velocidade de reação é medida com respeito a variação da concentração de substrato, na presença e ausência de inibidor. Através dos gráficos de Lineweaver-Burk 23(b), 24(b) e 25(b), podemos confirmar que o mecanismo de inibição que esta família de moléculas apresenta é

competitivo, isto porque, a inclinação das retas com o inibidor muda em relação à reta sem inibidor; da mesma forma a intersecção em x também muda, mas a intersecção em y não.

Sendo assim, a V_{\max} fica inalterada, mas o K_M aumenta; logo, mais pNPP é necessário para chegar a uma determinada velocidade na presença de composto do que em sua ausência. Os parâmetros cinéticos V_{\max} , K_M e K_i (Esquema 2) foram determinados através das curvas obtidas pela medida de velocidade para as diferentes concentrações de substrato e estão apresentados na Tabela 8.

Esquema 2. $1/V = K_M/V_{\max} \cdot 1/[S] + 1/V_{\max}$ (equação 1)

$K_M^{(c/[I])} = K_M^{(s/[I])} (1 + [I]/K_i)$ (equação 2)

Tabela 8. Parâmetros cinéticos experimentais de Michaelis-Menten, V_{\max} , K_M e K_i de MPtpA e o substrato pNPP para os compostos **14**, **22** e **29**.

Naftilchacona	[I] (μM)	V_{\max} ($\mu\text{mol pNP min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	K_M (mM)	K_i (mM)
14	0	1,146	4,202	-
	25	1,050	7,559	0,025
	50	1,048	8,523	0,040
29	0	1,010	3,115	-
	10	0,991	8,308	0,008
	25	0,923	12,34	0,011
22	0	0,853	4,001	-
	5	0,938	6,627	0,006
	10	0,867	10,132	0,005

Nota: a atividade catalítica foi determinada em 410nm a 37°C. Cada experimento foi feito em triplicata.

Os valores das constantes de Michaelis (K_M) aumentam na presença de concentrações crescentes de inibidor, quando comparadas ao K_M da MPtpA sem inibidores, indicando um decréscimo na interação substrato-enzima. Somados a isto, os valores extremamente próximos obtidos para V_{\max} comprovam uma inibição competitiva entre o substrato pNPP e os inibidores estudados.

Valores da constante de inibição, K_i , foram calculados a partir dos valores de K_M obtidos na presença/ausência de concentrações de inibidor. Os valores obtidos de K_i são

muito menores que os valores de K_M , indicando que a MPtpA parece ter uma maior afinidade pelas naftilchalconas estudadas do que pelo substrato pNPP.

De posse dos gráficos obtidos e dos parâmetros cinéticos, podemos afirmar que os compostos estudados apresentam mecanismo de inibição competitiva, e isto valida a seqüência dos estudos com docking na proteína através de métodos computacionais de Modelagem Molecular para identificarmos os tipos de interação no sítio ativo do receptor, bem como, buscar a possível correlação entre os parâmetros obtidos com os valores de IC_{50} destas moléculas.

6.2.2 Modelagem Molecular - Estudos de docagem molecular dos compostos bioativos

Os modelos de interações construídos pelo programa computacional FlexX (Figura 26), apresentam os três inibidores estudados sobrepostos: **14** (rosa), **22** (azul) e **29** (amarelo), destacando os resíduos de aminoácidos que fazem ligação hidrogênio com os substituintes do anel A das chalconas.

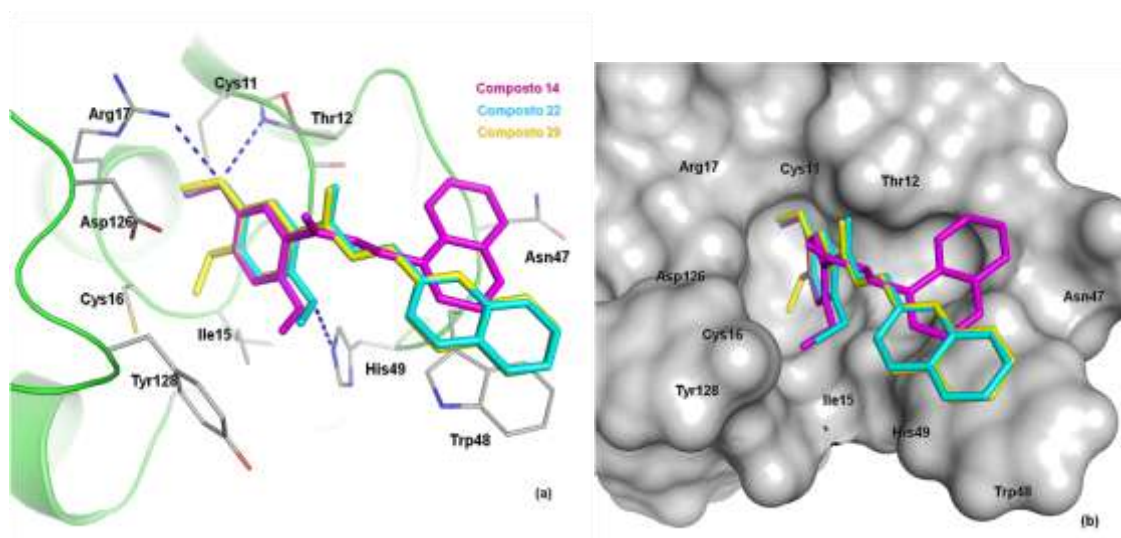


Figura 26: Modelo de interação das naftilchalconas bioativas no sítio ativo da MPtpA, (a) estrutura da proteína destacando a cadeia principal dos resíduos de aminoácidos. As ligações hidrogênio estão ilustradas como linhas tracejadas azuis; (b) estrutura da proteína com densidade sólida (composto **14** – rosa; composto **22** – azul; composto **29** – amarelo).

Analisando os modelos de interações propostos na Figura 25 podemos observar que os substituintes do anel A dos compostos **14** ($IC_{50} = 39,5 \mu M$) e **22** ($IC_{50} = 8,4 \mu M$) estabelecem três ligações hidrogênio com o sítio ativo da MPtpA: (i) entre a metoxila na

posição *meta* e a cadeia lateral do resíduo Arg17 e (ii) NH cadeia principal da Thr12, e (iii) entre a metoxila em posição *orto* e a cadeia lateral da His49. Já o composto **29** ($IC_{50} = 23,1 \mu M$) faz somente duas ligações de hidrogênio (entre a metoxila em posição *meta* e os resíduos Arg17 e Thr12). O substituinte metoxila na posição *para* do anel A orienta o grupo CH_3 num pequeno bolsão hidrofóbico formado pelas cadeias laterais dos resíduos Cys16 e Ile15.

Os substituintes 2-naftil das chalconas **22** e **29** interagem com a cadeia lateral do resíduo Trp48 através de interações do tipo empilhamento de elétrons- π (do inglês *π -stacking*). Já o composto **14**, que apresenta o substituinte 1-naftil não estabelece eficientemente este tipo de interação, sugerindo uma justificativa para a diminuição da potência deste composto.

O entendimento das interações proteína-ligante é essencial para o desenho de novos inibidores com potência melhorada, e isto pôde ser comprovado pela estrutura de docking gerado para o composto mais ativo, **22** (Figura 27). Adicionalmente, os resultados obtidos concordam com o ambiente químico do sítio de ligação da PtpA, podendo ser um guia para modificações estruturais e para o desenho de novos inibidores seletivos desta enzima.

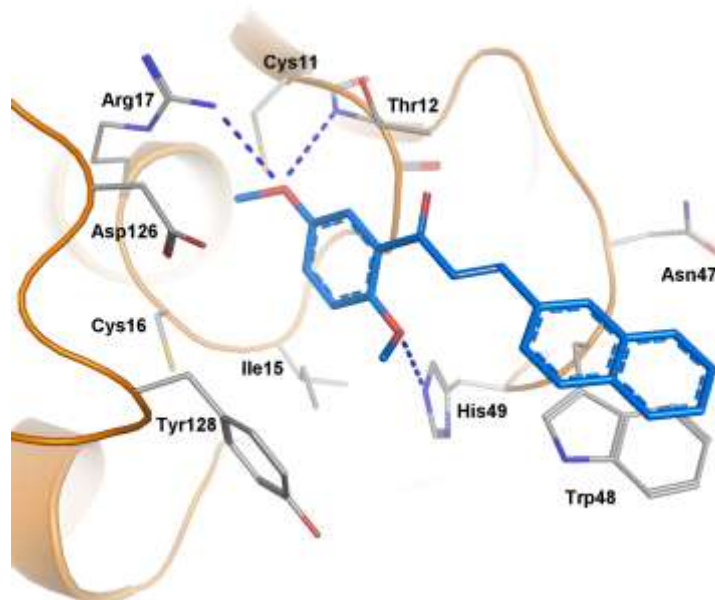


Figura 27: Modo de ligação proposto pelo programa FlexX da MtpA com o composto **22** (azul); destacando as duas ligações hidrogênio com a metoxila em posição *meta*, e uma ligação hidrogênio para a metoxila em posição *orto* do anel A.

7 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

- Dos 22 compostos estudados neste capítulo, 5 são estruturas inéditas;
- Dentre as naftilchalconas testadas, as que apresentaram melhor inibição da MPtpA foram as estruturas **14**, **29** e **22**, com IC₅₀ de 39,5; 23,1 e 8,4μM, respectivamente.
- De acordo com os estudos cinéticos, o mecanismo de ação destes compostos frente à PtpA é a inibição competitiva;
- Foi analisado o modelo molecular da MptpA obtido pelo método de docagem molecular para o entendimento da interação de naftilchalconas com esta enzima. Os modelos moleculares foram avaliados considerando propriedades eletrostáticas e estéricas do complexo ligante-proteína.
- Os resultados obtidos concordam com o ambiente químico do sítio de ligação da PtpA, podendo ser um guia para modificações estruturais e para o desenho de novos inibidores potentes e seletivos desta enzima.
- Através da integração dos resultados de modelagem molecular com os dados experimentais foi possível identificar os compostos **14**, **22** e **29** como novos inibidores da PtpA de *M. tuberculosis*.

8 CONCLUSÕES

Como conclusões deste trabalho, podemos destacar que, dos 30 compostos sintetizados, 11 são estruturas inéditas, bem como, suas atividades em células B16F10 de melanoma e em proteína tirosina fosfatase A de *M. tuberculosis*:

(i) Foram identificadas três estruturas, as hidroxichalconas **1**, **3** e **13**, que mostraram-se promissoras no tratamento *in vitro* de células de melanoma; o composto **1** foi o mais ativo, com IC₅₀ de 12 µM; e os compostos **1** e **3** induziram a morte celular por apoptose, que é a morte celular programada e desejada para o organismo; estes dois compostos possuem em comum na estrutura apenas uma hidroxila livre no anel A e o grupo 1-naftil como anel B. Considerando a resistência das células tumorais aos fármacos já disponíveis e os efeitos indesejáveis causados pelos mesmos, a perspectiva destes estudos é avaliar mecanismos de ação mais específicos, ainda não elucidados.

(ii) Outros três compostos, as naftilchalconas **14**, **22** e **29**, inibiram a MPtpA de forma competitiva; o composto **22** foi o mais ativo, com IC₅₀ de 8,4 µM; em comum, estes compostos possuem duas metoxilas no anel A e o grupamento 1 ou 2-naftil como anel B; através de docagem molecular para o complexo ligante-proteína podemos destacar ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas do tipo π *stacking* entre estes compostos e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo, que ocorrem mais fortemente e em maior quantidade com o composto **22**, podendo justificar sua maior atividade. Como perspectivas, podemos citar a co-cristalização da proteína com os inibidores; ensaios de inibição enzimática com as enzimas MPtpB e PTPs humanas no intuito de provar a seletividade e especificidade destes inibidores; e ensaios de bioatividade *in vitro* em *M. tuberculosis*, visando à invasão no macrófago.

9 BIBLIOGRAFIA

AMARAL, A. T.; MONTANARI, C. A. Química Medicinal: 25 anos de planejamento racional de fármacos. **Química Nova**, 25(1), 39-44, 2002.

ANTO, R. J.; SUKUMARAN, K.; KUTTAN, G.; RAO, M. N. A.; SUBBARAJU, V.; KUTTAN, R. Anticancer and antioxidant activity of synthetic chalcones and related compounds. **Cancer Letters**, 97, 33-37, 1995.

BACH, H.; PAPA VINASASUNDARAM, K. G.; WONG, D.; HMAMA, Z.; AV-GAY, Y. Mycobacterium tuberculosis Virulence Is Mediated by PtpA Dephosphorylation of Human Vacuolar Protein Sorting 33B, **Cell Host & Microbe** 3, 316–322, 2008.

BAGHERI, M. e SAFAI, B. Cutaneous malignancies of keratinocytic origin. **Clinical Dermatology**, 19, 244-252, 2001.

BAKAL, C. J.; DAVIES, J. E. No longer an exclusive club: eukaryotic signalling domains in bacteria. **Trends in Cell Biology**, 10(1), 32-38, 2000.

BARREIRO, E. J. A importância da síntese de fármacos na produção de medicamentos. **Química Nova**, 14(3), 179-188, 1991.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; ARAÚJO JR., J. X. O Uso de Matérias-Primas Vegetais para a Síntese de Fármacos. In: SIMÕES, C. M. O.; et al. (orgs). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Florianópolis: Editora da UFSC, Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2001. Cap. 8. p. 127-138.

BARROS, A. I. R. N. A.; SILVA, A. M. S.; ALKORTA, I.; ELGUERO, J. Synthesis, experimental and theoretical NMR study of 2'-hydroxychalcones bearing a nitro substituent on their B ring. **Tetrahedron**, 60(31), 6513-6521, 2004.

BATT, D. G.; GOODMAN, R.; JONES, D. G.; KERR, J. S.; MANTEGNA, L. R.; MCALLISTER, C.; NEWTON, R. C.; NURNBERG, S.; WELCH, P. K.; COVINGTON, B. 2'-Substituted Chalcone Derivatives as Inhibitors of Interleukin-1 Biosynthesis. **Journal of Medicinal Chemistry**, 36, 1434-1442, 1993.

BENLLOCH, M.; ORTEGA, A. *et al.* Acceleration of glutathione efflux and inhibition of β -glutamyltranspeptidase sensitive metastatic B16 melanoma cells to endothelium-induced cytotoxicity. **The Journal of Biological Chemistry**, 280(8), 6950-6959, 2005.

BERGMANN, B. R.; TORRES DOS SANTOS, E. C.; YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V.; BOECK, P. Preparation of chalcones for the treatment of parasitic diseases. Brasil **PI 0204079-4**, 2004. 40 pp.

BLACK, D. S.; BLISKA, J. B. Identification of p130Cas as a substrate of Yersinia YopH (Yop51), a bacterial protein tyrosine phosphatase that translocates into mammalian cells and targets focal adhesions. **EMBO Journal**, 16(10), 2730-2744, 1997.

BLOMBERG, B.; RIEDER, H. L.; ENARSON, D. A. Kristian Andvord's impact on the

understanding of tuberculosis epidemiology. **The international journal of tuberculosis and lung disease: the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease**, 6(7), 557-9, 2002.

BOECK, P. **Obtenção de Moléculas com Potencial Terapêutico a partir de Compostos Naturais e Sintéticos**. Florianópolis, 2005. 117 p. Tese de Doutorado em Química – Programa de Pós-Graduação em Química, UFSC.

BOECK, P.; LEAL, P. C. *et al.* Antifungal activity and studies on mode of action of novel xanthoxylone-derived chalcones. **Archive der Pharmazie**, 338(2-3), 87-95, 2005.

BOECK, P.; FALCÃO, C. A. B. *et al.* Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 14, 1538-1545, 2006.

BOWEN, P. J.; ROBINSON, T. P.; EHLERS, T.; GOLDSMITH, D.; ARBISER, J. **WO 2001046110**. 2001. 90 p.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72(1-2), 248-54, 1976.

BROWN, C. A.; DRAPER, P.; HART, P. D. Mycobacteria and lysosomes: a paradox. **Nature**, 221(5181), 658-60, 1969.

CALIXTO, J. B. **Estudo Farmacológico Pré-clínico de Plantas Mediciniais**. In: Yunes, R. A.; Calixto, J. B. (ed.). **Plantas Mediciniais: sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos, 2001. Cap. 3, p. 78.

CALIXTO, J. B. **Estudo Farmacológico Pré-clínico de Plantas Mediciniais**. In: Yunes, R. A.; Calixto, J. B. (ed.). **Plantas Mediciniais: sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos, 2001. Cap. 3, p. 78.

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

CAMPBELL, M. K. e FARREL, S. O. **Bioquímica**. 3ed, Thomsom, 2006, 158-159 p.

CARVALHO, A. C.; GIUGLIANI, R. *et al.* Melanoma hereditário: prevalência de fatores de risco em um grupo de pacientes no Sul do Brasil. **Brazilian Annals of Dermatology**, 79(1), 53-60, 2004.

CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. **Estudo Químico de Plantas Mediciniais Orientado para a Análise Biológica. Obtenção, Determinação e Modificação Estrutural de Compostos Bioativos**. In: Yunes, R. A.; Calixto, J. B. (ed.). **Plantas Mediciniais: sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos, cap. 2, p. 59-69, 2001.

CECHINEL-FILHO, V.; VAZ, Z. R.; ZUNINO, L.; CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. Synthesis of xanthoxylone derivatives with antinociceptive and antiedematogenic activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 31, 833-839, 1996.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G. E OHARA, A. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova** [online]. 30(2), pp. 441-449, 2007.

CHANG, Chin-Te. Reaction of 5,7-dialkoxyflavanone and related compounds with N-bromosuccinimide. **Taiwan Kexue**, 16, 117-26, 1962.

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

CHIARADIA, L. D., **Obtenção de chalconas sintéticas com potencial atividade biológica**. Florianópolis, 2006. 199p. Dissertação de Mestrado em Química – Programa de pós graduação em Química, UFSC.

COLE, S. T.; BROSCHE, R.; *et al.* Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence, **Nature** 393, 537–544, 1998.

Comciencia, 2001. Disponível em: <<http://www.comciencia.br/reportagens/farmacos/farma08.htm>>. Acesso em: 10/05/2008.

COZZONE, A. J.; GRANGEASSE, C.; DOUBLET, P.; DUCLOS, B. Protein phosphorylation on tyrosine in bacteria. **Archives of Microbiology**, 181(3), 171-181, 2004.

DE WATERBEEMD, H. V. Quantitative Approaches to Structure-Activity Relationships. In: Wermuth, C. G. (org.). **The Practice of Medicinal Chemistry**. San Diego: Academic Press Inc., 1996. Cap. 19. p. 367-389.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach**. Cichester: John Wiley & Sons, 1997. p.136.

DIMMOCK, J. R.; ELIAS, D. W.; BEAZELY, M. A.; KANDEPU, N. M. Bioactivities of Chalcones. **Current Medicinal Chemistry**, 6, 1125-1149, 1999.

DOMINGUEZ, J. N.; LEON, C. *et al.* Synthesis and antimalarial activity of sulfonamide chalcone derivatives. **Farmaco**, 60(4), 307-11, 2005.

DYE, C.; SCHEELE, S.; DOLIN, P.; PATHANIA, V.; RAVIGLIONE, M. C. Consensus statement. Global burden of tuberculosis : estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. **Journal of the American Medical Association**, 282(7), 677-86, 1999.

EWEND, M. G.; CAREY, L. A. *et al.* Treatment of melanoma metastases in the brain. **Seminars in Surgical Oncology**, 12(6), 429-435, 1996.

FRANK, L.; MEYSKENS, J. *et al.* Redox Regulation in Human Melanocytes and melanoma. **Pigment Cell Research**, 14, 148-154, 2001.

FRESHNEY, R. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique**. New York, Alan

R. Liss, Inc., 1987, p.117.

GELPERINA, S.; KISICH, K.; ISEMAN, M. D. The potential advantages of nanoparticle drug delivery systems in chemotherapy of tuberculosis. **Am. J. Respir. Crit. Care. Med.** 172(12), 1487-90, 2005.

GHOBRIAL, I. M.; WITZIG, T. E. *et al.* Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. **Cancer Journal for Clinicians**, 55, 178-194, 2005.

GRAY-SHOPFER, V.; Wellbrock, C. *et al.* Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, 445, 851-857, 2007.

GRUNDNER, C.; PERRIN, D.; HOOFT Van HUIJSDUIJNEN, R.; SWINNEN, D.; GONZALEZ, J.; GEE, C. L.; WELLS, T. N.; ALBER, T. Structural Basis for Selective Inhibition of Mycobacterium tuberculosis Protein Tyrosine Phosphatase PtpB. **Structure**, 15(4), 499-509, 2007.

GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G.; MONTANARI, C. A.; ANDRICOPULO, A. Structural basis for selective Inhibition of Trypanosomatic Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: Molecular Docking and 3D QSAR Studies, **Journal Chemical Informatic Modeling**, 48, 918-929, 2008.

GUO, X.L.; KUI, S.; WANG, F.; LAWRENCE, D.S.; ZHANG, Z.Y. Probing the molecular basis for potent and selective protein-tyrosine phosphatase 1B inhibition. **J. Biol. Chem.** 277, 41014–41022, 2002.

GUTTERIDGE, C. E.; VO, J. V.; TILLET, C. B.; VIGILANTE, J. A.; DETTMER, J. R.; PATTERSON, S. L.; WERBOVETZ, K. A.; CAPERS, J.; NICHOLS, D. A.; BHATTACHARJEE, A. K.; GERENA, L. Antileishmanial and antimalarial chalcones: synthesis, efficacy and cytotoxicity of pyridinyl and naphthalenyl analogs. **Medicinal Chemistry**, 3(2), 115-119, 2007.

HANAHAHAN e WEINBERG R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, 100, 57-70, 2000.

HESTVIK, A.L.; HMAMA, Z.; AV-GAY, Y. Kinome analysis of host response to mycobacterial infection: A novel technique in proteomics. **Infect Immunology** 71, 5514–5522, 2003.

HODEK, P.; TREFIL, P. *et al.* Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. **Chemico-Biological Interactions**, 139, 1-21, 2002.

HUNTER, T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signalling. **Cell** 80, 225–236, 1995.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. www.inca.gov, acesso em 20 nov. 2008.

IWASHITA, K.; KOBORI, M. *et al.* Flavonoids inhibit cell growth and induce apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 64, 1813-1820, 2000.

JACOBS, T. L.; SINGER, S. The rearrangement of aryl-substituted propynes to allenes. **Contribution from the Department of Chemistry**, University of California, 19, 475-481, 1951.

KLEBE, G. Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations. **Drug Discovery Today**, 2006, 11, 580.

KLUZA, J.; LANSIAUX, A. Induction of apoptosis in HL-60 leukemia and B16 melanoma cells by the acronycine derivative S23906-1. **Biochemical Pharmacology**, 63, 1443-1452, 2002.

Kobori, M.; Iwashita, K. *et al.* Phloretin-induced apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells and HL60 human leukemia cells. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 63(4), 719-725, 1999.

KOSKA, J.; SPASSOV, V. Z.; MAYNARD, A. J.; NIC AUSTIN, L. Y.; FLOOK, P. K.; VENKATACHALAM, C. M. Fully Automated Molecular Mechanics Based Induced Fit Protein-Ligand Docking Method. **Journal Chemical Informatic Modeling** 48, 1965-1973, 2008.

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

KRAMMER, A.; KIRCHHOFF, P. D.; JIANG, X.; VENKATACHALAM, C. M.; Waldman, M. LigScore: a novel scoring function for predicting binding affinities. **Journal Molecular Graphics Modeling** 23, 395-407, 2005.

LASH, L. H. Mitochondrial glutathione transport; physiological, pathological and toxicological implications. **Chemico-Biological Interactions**, 163, 1-2, 54-67, 2006.

LEBLANC, R.; DICKSON, J.; BROWN, T.; STEWART, M.; PATI, H. N.; VANDERVEER, D.; ARMAN, H.; HARRIS, J.; PENNINGTON, W.; HOLT, H. L. JR.; LEE, M. Synthesis and cytotoxicity of epoxide and pyrazole analogs of the combretastatins. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 13, 6025-6034, 2005.

LEE, M. L.; TOMSU, K. *et al.* Duration of survival for disseminated malignant melanoma: results of a meta-analysis. **Melanoma Research**, 10, 81, 154-160, 2000.

LI, R.; KENYON, G. L.; COHEN, F. E.; CHIEN, X.; GONG, B.; DOMINGUEZ, J.; DAVISON, E.; KURZBAN, G.; MILLER, R. E.; NUZUM, E. O.; ROSENTHAL, P.; MCKERROW, J. H. *In vitro* Antimalarial Activity of Chalcones and Their Derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, 38, 5031-5037, 1995.

LI, J. T.; YANG, W. Z.; WANG, S. X.; LI, S. H.; LI, T.S. improved synthesis of chalcones under ultrasond irradiation. **Ultrasonics Sonochemistry**, 9, 237-239, 2002.

LIN, Y-M.; Zhou, Y.; FLAVIN, M. T.; ZHOU, L-M.; NIE, W.; CHEN, F-C. Chalcones and Flanoids as Anti-Tuberculosis Agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry** 10, 2795-2802, 2002.

LIU, M.; WILAIRAT, P. *et al.* Structure-activity relationships of antileishmanial and antimalarial chalcones. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 11, 2729-2738, 2003.

LUI, P.; CASHIN, R. *et al.* Treatments for metastatic melanoma: Synthesis of evidence from randomized trials. **Cancer Treatment**, 1, 1-16, 2007.

LUNARDI, F.; GUZELA, M.; RODRIGUES, A. T.; CORRÊA, R.; EGERMANGRICH I.; STEINDEL, M.; GRISARD, E. C.; ASSREUY, J.; CALIXTO, J. B.; SANTOS, A. R. S. Trypanocidal and Leishmanicidal Properties of substitution-Containing Chalcones. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, 47(4), 1449-1451, 2003.

MADHURANTAKAM, C.; CHAVALI, V. R. M.; DAS, K. A. Analyzing the catalytic mechanism of MptpA: A low molecular weight protein tyrosine phosphatase from *Mycobacterium tuberculosis* through site-directed mutagenesis. **Proteins**, 71, 706-714, 2008.

MANGER, M.; SCHECK, M.; PRINZ, H.; VON KRIES, J. P.; LANGER, T.; SAXENA, K.; SCHWALBE, H.; FUERSTNER, A.; RADEMANN, J.; WALDMANN, H. **ChemBioChem**. 6, 1749-1753, 2005.

MASCARELLO, A. **Síntese e Avaliação da atividade anti-leishmania de chalconas derivadas do 1-naftaldeído**. Florianópolis, 2006. 52p. Trabalho de Conclusão de Curso – Química, UFSC.

MIDDLETON, M. R.; GROB, J. J. *et al.* Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. **J. of Clin. Onc.**, 18, 158-166, 2000.

MITESSIER, N., ENGLEBIENNE, O., LEE, D., LAWANDI, J, CORBEIL, C. R. Towards the development of universal, fast and highly accurate docking/scoring methods: a long way to go. **Brazilian Journal Pharmacology**. 2008, 153, S1.

NAM, N. H.; KIM, Y. *et al.* Cytotoxic 2',5' dihydroxychalcones with unexpected antiangiogenic activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 38, 179-187, 2003.

NAVARINI, A. L.; FRITZEN, M.; CHIARADIA, L. D.; YUNES, R. A.; SILVA, M. C. DA; CRECZYNSKI-PASA, T. B. **Ação de chalconas sobre células de melanoma (B16F10)**. Florianópolis, 2006. Anais da 58ª Reunião Anual da Sociedade para o Progresso da Ciência.

NI, L.; MENG, C. Q. *et al.* Recent advances in therapeutic chalcones. **Expert Opinion**, 14(12), 1669-1691, 2004.

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

PANCHAGNULA, R.; AGRAWAL, S.; ASHOKRAJ, Y.; VARMA, M.; SATEESH, K.; BHARDWAJ, V.; BEDI, S.; GULATI, I.; PARMAR, J.; KAUL, C. LAL; BLOMBERG, B.; FOURIE, B.; ROSCIGNO, G.; WIRE, R.; LAING, R.; EVANS, P.; MOORE, T. Fixed dose combinations for tuberculosis: Lessons learned from clinical, formulation and regulatory

perspective. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, 26(9), 703-721, 2004.

PANNIFER, A. D. B.; FLINT, A. J.; TONKS, N. K.; BARFORD, D. Visualization of the cysteinyl-phosphate intermediate of a protein-tyrosine phosphatase by x-ray crystallography. **Journal of Biological Chemistry**. 273(17), 10454-10462, 1998.

PATRICK, G. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. 3ed, New York: Oxford University Press Inc, 2005, 345p; 213 p.

PORATH, J. Immobilized metal ion affinity chromatography. **Protein Expression and Purification**, 3(4), 263-81, 1992.

PUHL, A. A.; GRUNINGER, R. J.; GREINER, R.; JANZEN, T. W.; MOSIMANN, S. C.; SELINGER, L. B. Kinetic and structural analysis of a bacterial protein tyrosine phosphatase-like myo-inositol polyphosphatase. **Protein Science** 16(7), 1368-1378, 2007.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

RAREY, M.; KRAMER, B.; LENGAUER, T.; KLEBE, G. A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. **Journal of Molecular Biology** 261(3), 470-489, 1996.

RUIZ-MANZANO, J.; BLANQUER R.; CALPE J. L.; CAMINERO J. A.; CAYLÀ J.; DOMÍNGUEZ J.A.; GARCÍA J. M.; VIDAL R. Diagnosis and Treatment of Tuberculosis. **Arch Bronconeumol**. 44(10), 551-566, 2008.

SABZEVARI, O.; GALATI, G. *et al.* Molecular cytotoxic mechanisms of anticancer hydroxychalcones. **Chemico-Biological Interactions**, 148, 57-67, 2004.

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

SHIH, H.; PICKWELL, G. V. *et al.* Differential effects of flavonoid compounds on tumor promoter-induced activation of the human CYP1A2 enhancer. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 372, 287-294, 2000.

SOENGAS, M. S. e LOWE, S. W. Apoptosis and melanoma chemoresistance. **Oncogene**, 22, 3138-3151, 2003.

SOMASUNDAR, P.; RIGGS, D. R. *et al.* Inhibition of melanoma growth by hemocyanin occurs via early apoptotic pathways. **The American Journal of Surgery**, 190, 713-716, 2005.

SORGATO, S.; BONETTI, A. N.; CHIARADIA, L. D.; YUNES, R. A.; NUNES, R. J.; SILVA, M. C. S. DA; CRECZYNSKI-PASA, T. B. **Citotoxic Effect of Synthetic Chalcones on Lymphoblastic Leukemia Cells L-1210**. São Paulo, 2005. IV São Paulo Research Conference Cancer Today: From Molecular Biology to Treatment. Applied Cancer Research

– Supplement, p. 157.

STAMM, L. M.; MORISAKI J. H.; GAO L. Y.; JENG R. L.; MCDONALD, R. L.; ROTH R.; TAKESHITA S.; HEUSER J.; WELCH M. D.; BROWN E. J. *Mycobacterium marinum* escapes from phagosomes and is propelled by actin-based motility, **Journal of Experimental Medicine** 198, 1361–1368, 2003.

STURGILL-KOSZYCKI, S.; SCHAIBLE, U.; RUSSELL, D. G. Mycobacterium-containing phagosomes are accessible to early endosomes and reflect a transitional state in normal phagosome biogenesis. **EMBO Journal**, 15(24), 6960-6968, 1996.

TARHINI, A. A. e AGARWALA, S. S. Cutaneous melanoma: available therapy for metastatic disease. **Dermatologic Therapy**, 19, 19-25, 2006.

TARHINI, A. A. e AGARWALA, S. S. Management of brain metastases in patients with melanoma. **Current Opinion in Oncology**, 16, 161-166, 2004.

TEITELBAUM, R.; CAMMER M.; MAITLAND M. L.; FREITAG N. E.; CONDEELIS J.; BLOOM B. R. *Mycobacterial infection* of macrophages results in membrane-permeable phagosomes, **Proceedings of the National Academy of Science USA** 15190–15195, 1999.

TONKS, N. K., E NEEL B. G. From form to function: signaling by protein tyrosine phosphatases. **Cell** 87, 365–368, 1996.

TOPLISS, J. G. Utilization of Operational Schemes for Analog Synthesis in Drug Design. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 10, 1006-1011, 1972.

VIBHUTE, Y. B.; JAGDALE, M. H. Infrared studies of some 5:6-benzochalcones. **Acta Ciencia Indica**, Chemistry, 12(4), 223-7, 1986.

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

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Pharmaceutics and phytotherapics: the need for development of the industry of phytopharmaceutics and phytotherapics in Brazil. **Quimica Nova**, 24(1), 147-152, 2001.

YUNES, R. A.; HEIZEN, V. F.; CECHINEL-FILHO, V.; LAZZAROTTO, M. From the manual method of Topliss to a modified quantitative method. **Arzneimittel Forschung Drug Research**, 52(2), 125-132, 2002.

WANG, R., LU, Y., WANG, S. Comparative Evaluation of 11 Scoring Functions for Molecular Docking. **Journal Medicinal Chemistry** 2003, 46, 2287.

WATERMAN, P. G.; MOLE, S. **Analysis of Phenolic Plant Metabolites**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, p. 11, 1994.

WERMUTH, C. G. **The Practice of Medicinal Chemistry**, 968 pp. San Diego: Academic Press Inc., 1996.

WESTBROOK, J., FENG, Z., CHEN, L., YANG, H., BERMAN, H. M. The Protein Data Bank and structural genomics. **Nucleic Acids Res.** 2003, 31, 489.

WHO - World Health Organization. Disponível em: <[http: www.who.int/cancer](http://www.who.int/cancer)>, acesso em 20 nov. 2008.

WON, S. J.; LIU, C. T. *et al.* Synthetic chalcones as potential anti-inflammatory and cancer chemopreventive agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 40(1), 103-12, 2005.

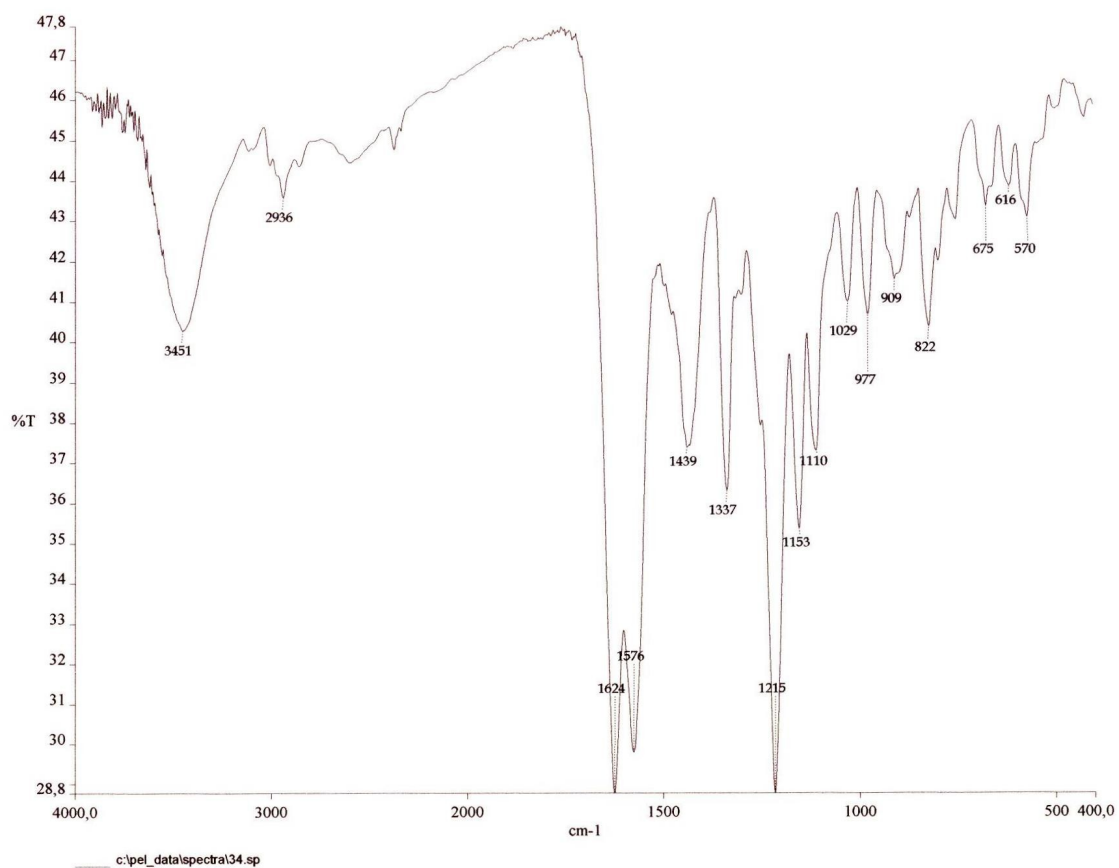
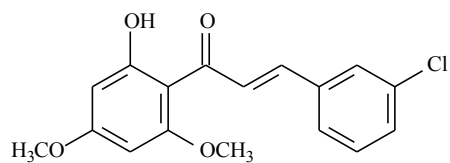
WYLLIE, A. H. Glucorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. **Nature**, 284, 555-556, 1980.

ZHANG, Z.; CLEMENS, J.; SCHUBERT, H.; STUCKEY, J.; FISCHER, M.; HUME, D.; SAPER, M.; DIXON, J. Expression, purification, and physicochemical characterization of a recombinant Yersinia protein tyrosine phosphatase. **Journal of Biological Chemistry** 267, 23759–23766, 1992.

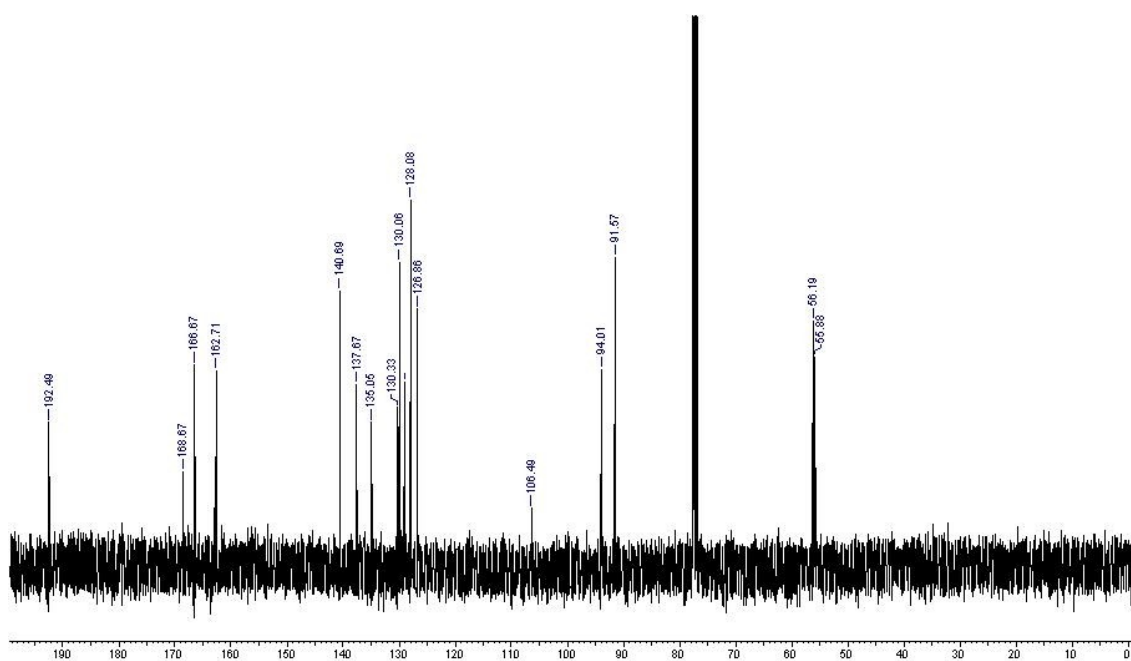
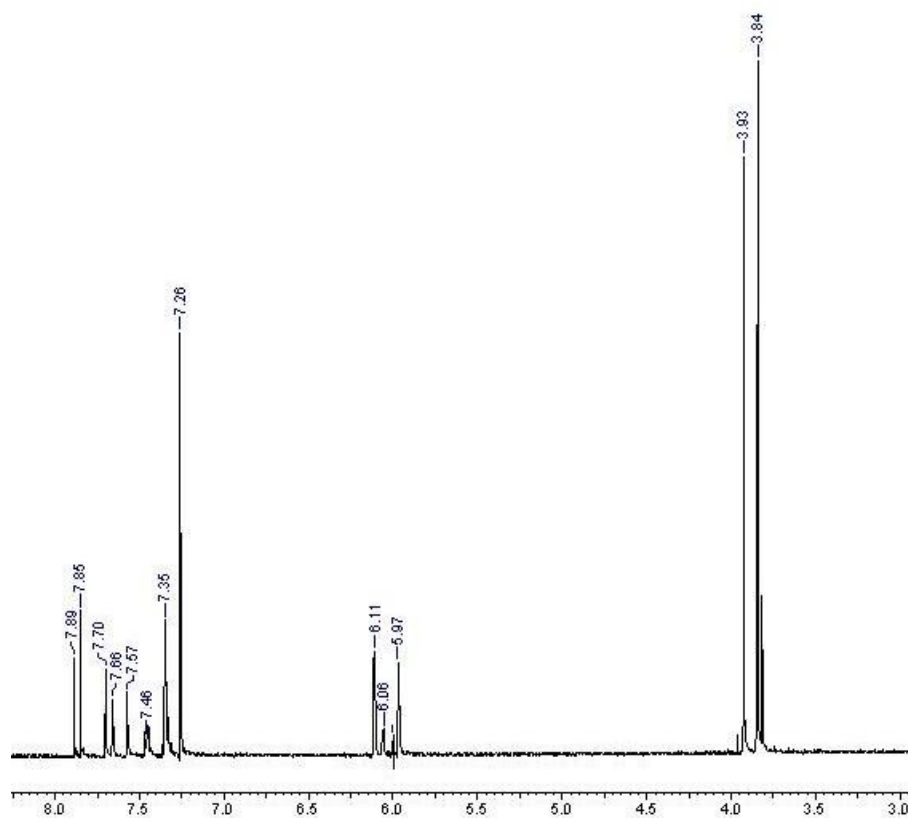
ZHANG, Z., HARMS, E., VAN ETTEN, R. L. Asp¹²⁹ of low molecular weight protein tyrosine phosphatase is involved in leaving group protonation. **Journal of Biological Chemistry**, 269, 25947-25950, 1994.

ZUANAZZI, J. A. S. Flavonóides. In: Simões, C. M. O.; *et al.* (orgs). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3ed. Florianópolis: Ed. da UFSC, Porto Alegre: Ed. da UFRGS. Cap. 23, p. 499-526, 2001.

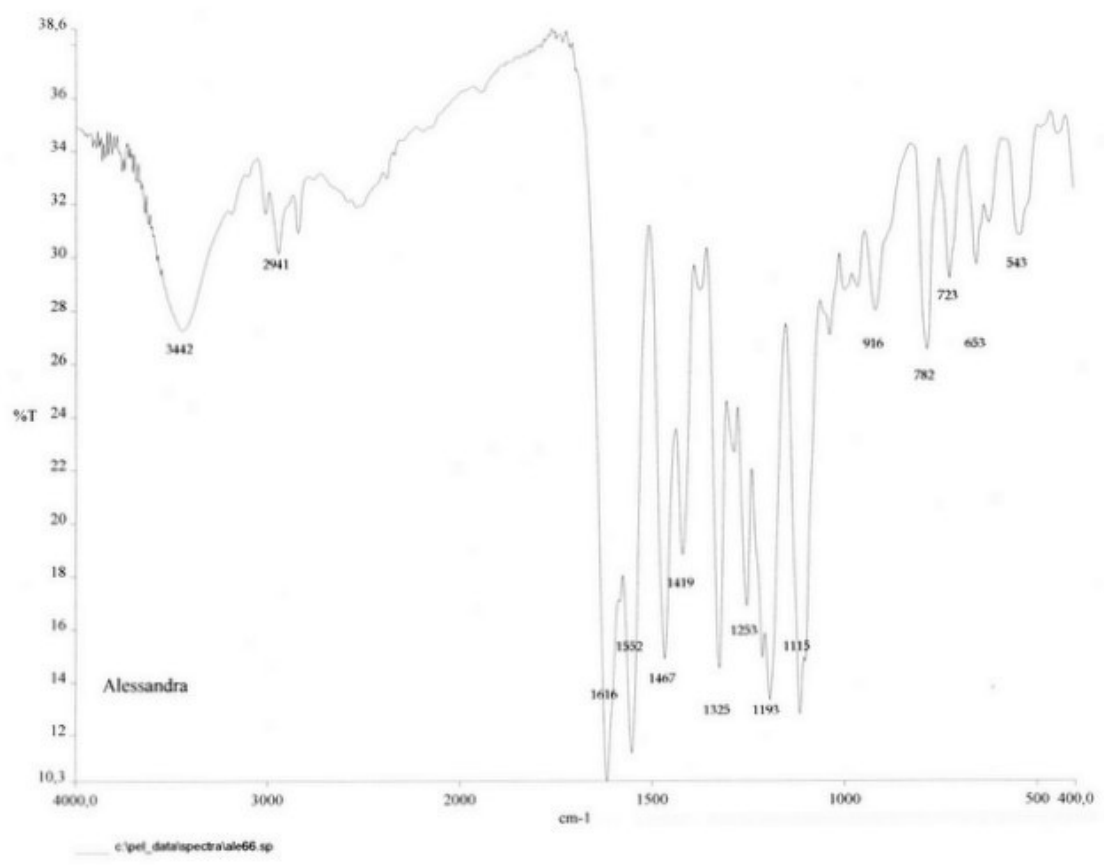
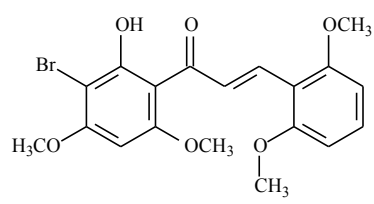
ANEXO A - Espectros de ^1H e ^{13}C RMN, IV e raio-X



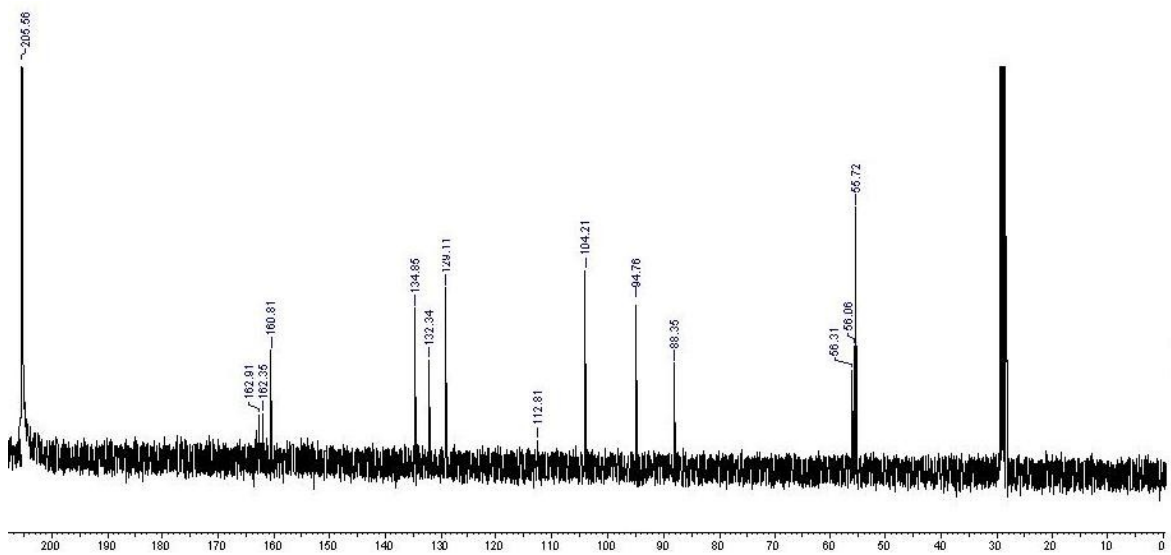
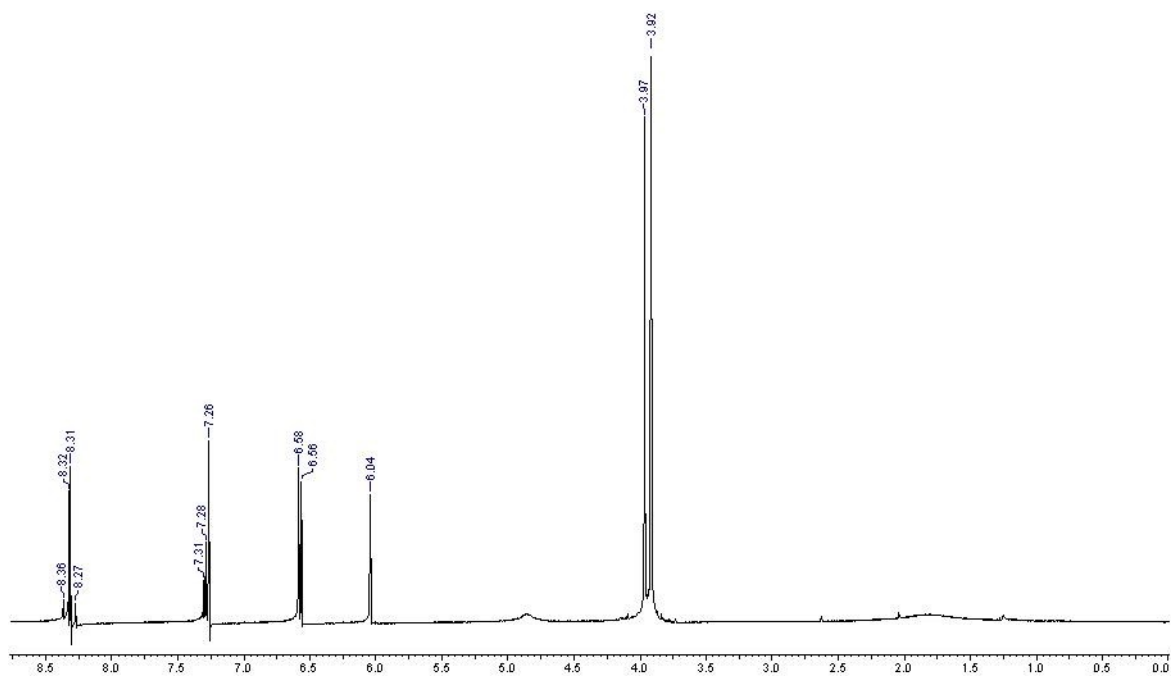
Espectro de IV do composto 7



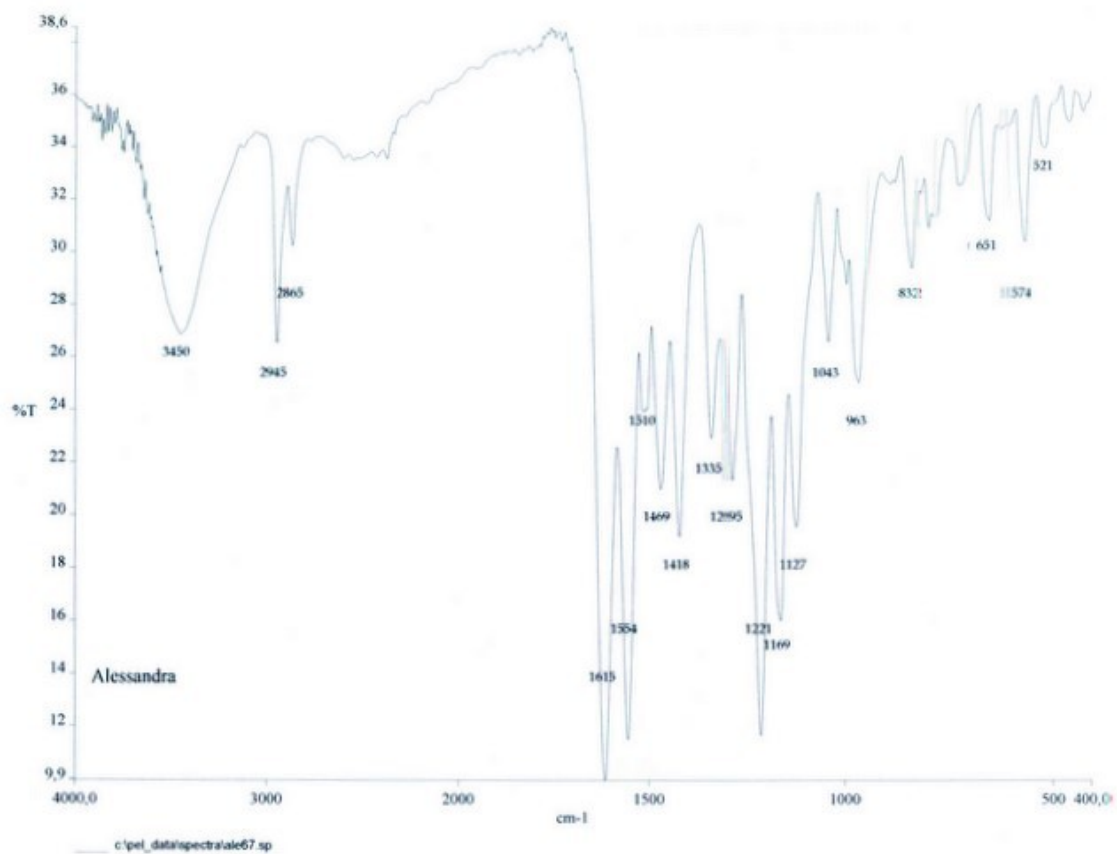
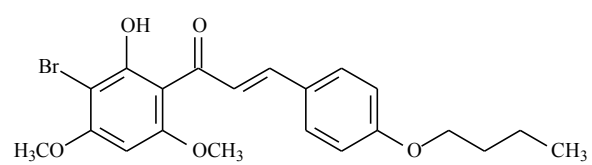
Espectros de ^1H e ^{13}C RMN (ppm) do composto 7



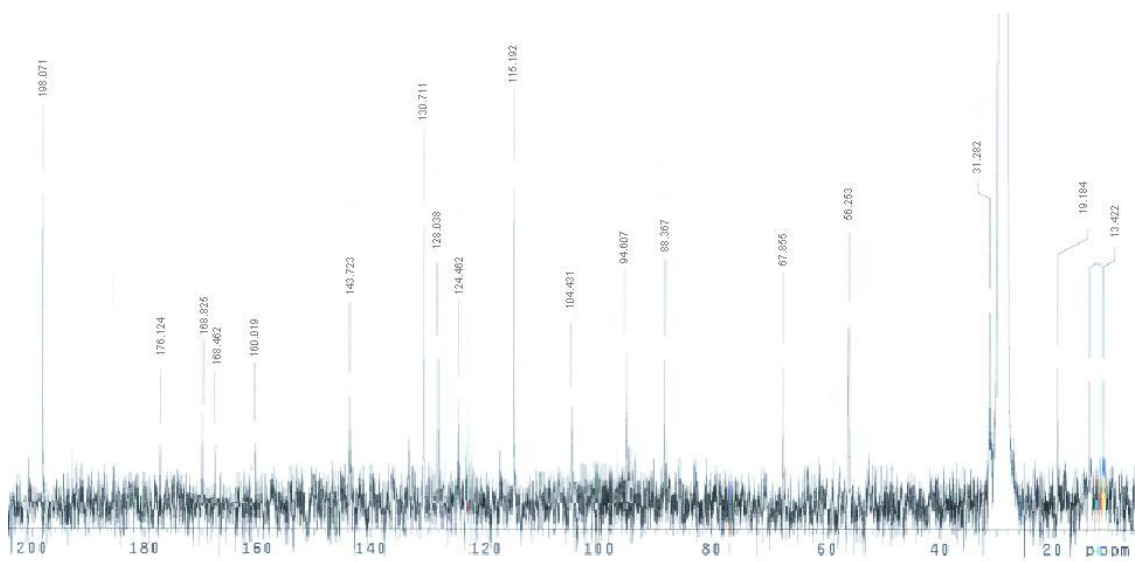
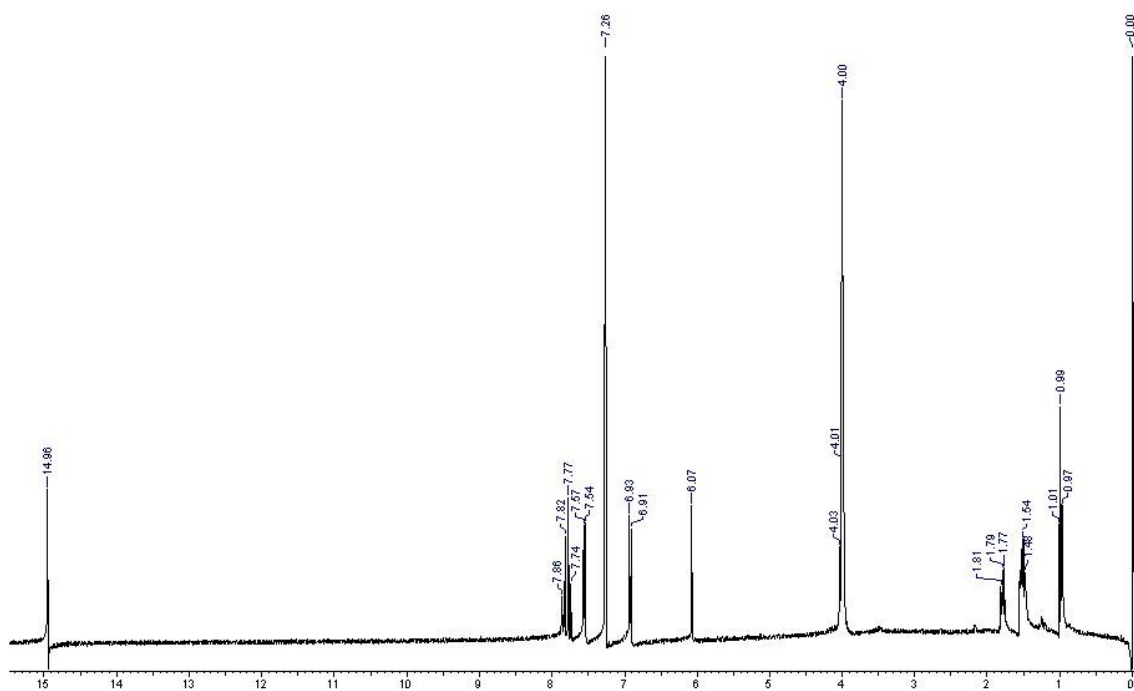
Espectro de IV do composto 8



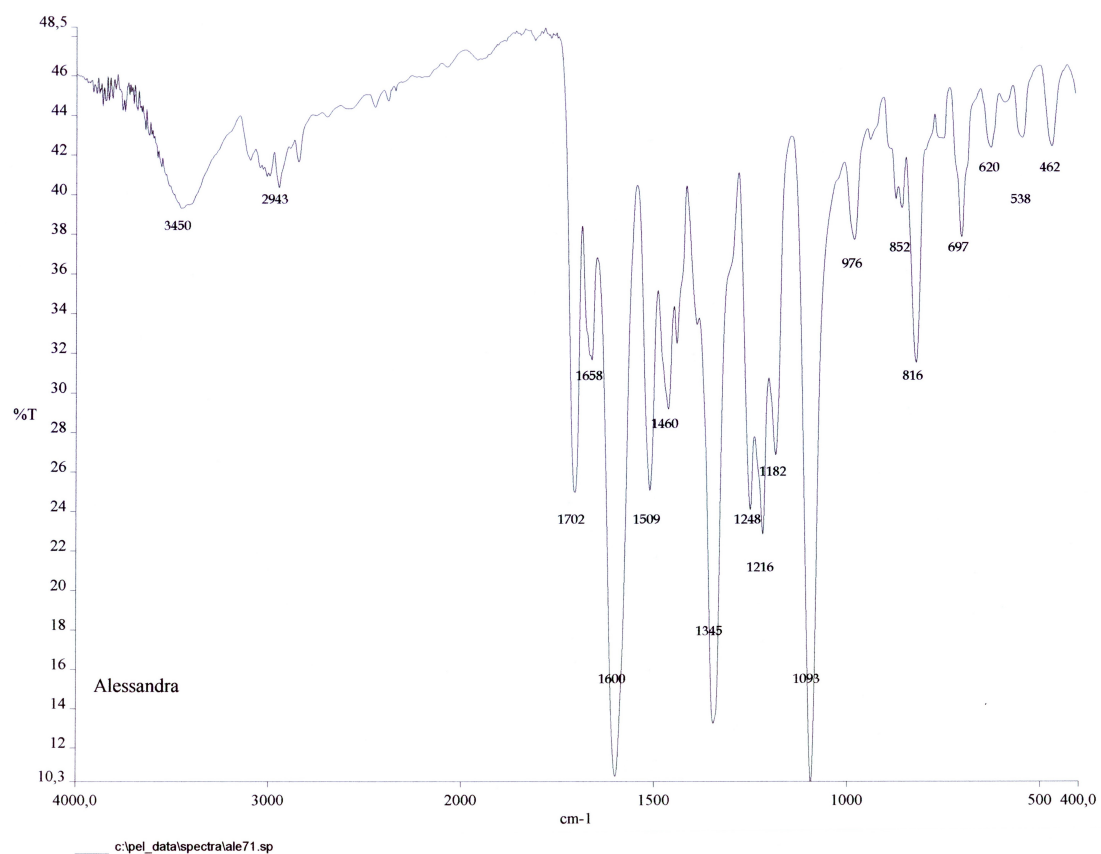
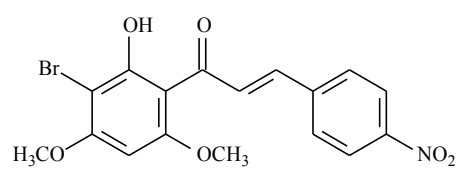
Espectros de ^1H e ^{13}C RMN (ppm) do composto **8**



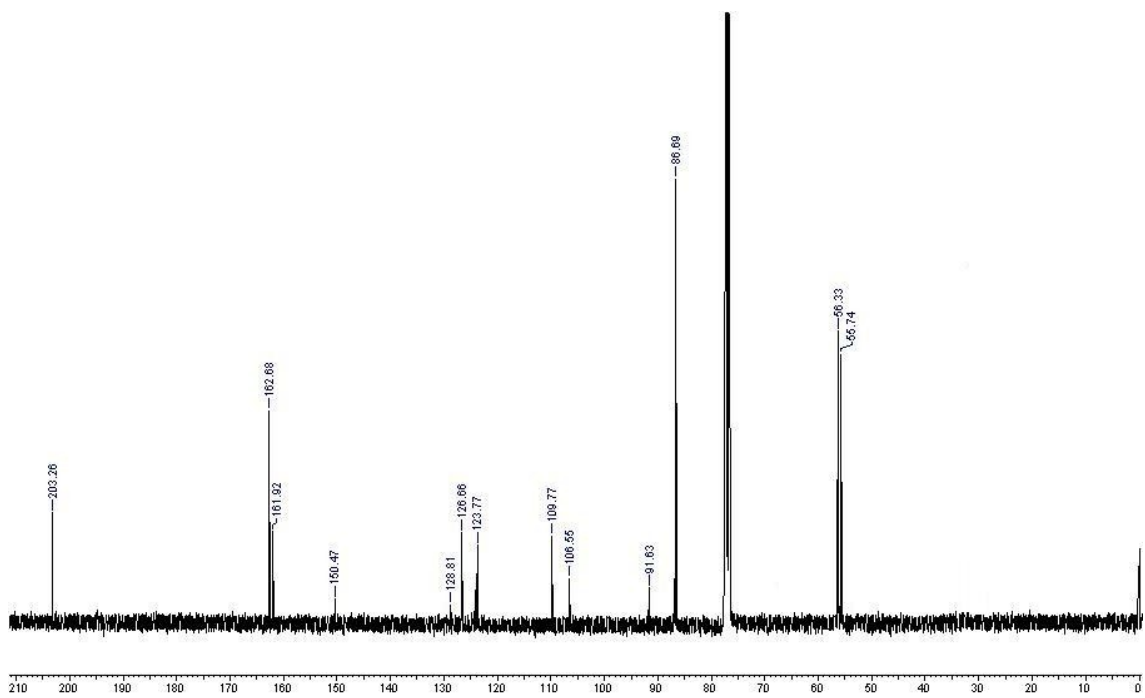
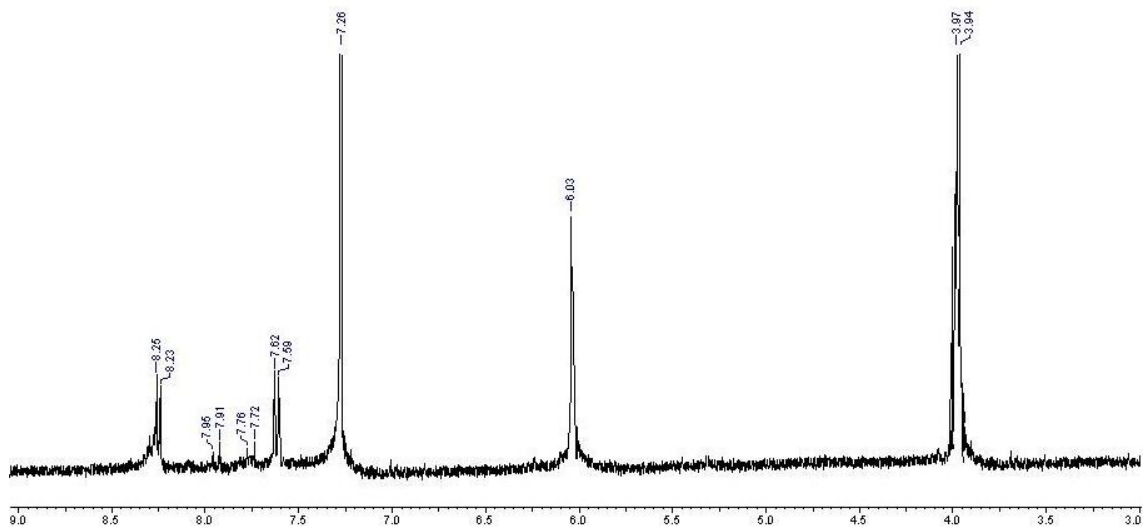
Espectro de IV do composto 9



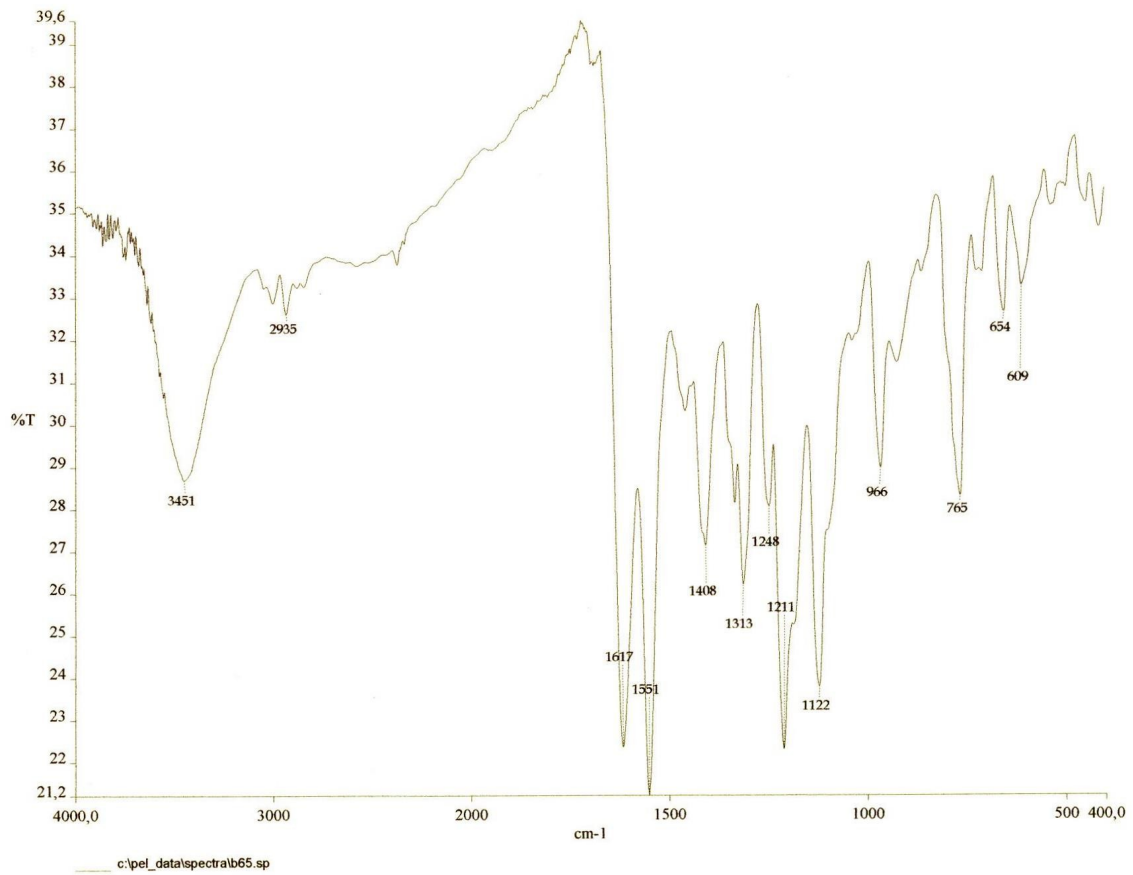
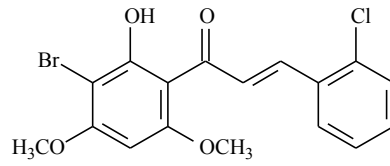
Espectros de ¹H e ¹³C RMN (ppm) do composto **9**



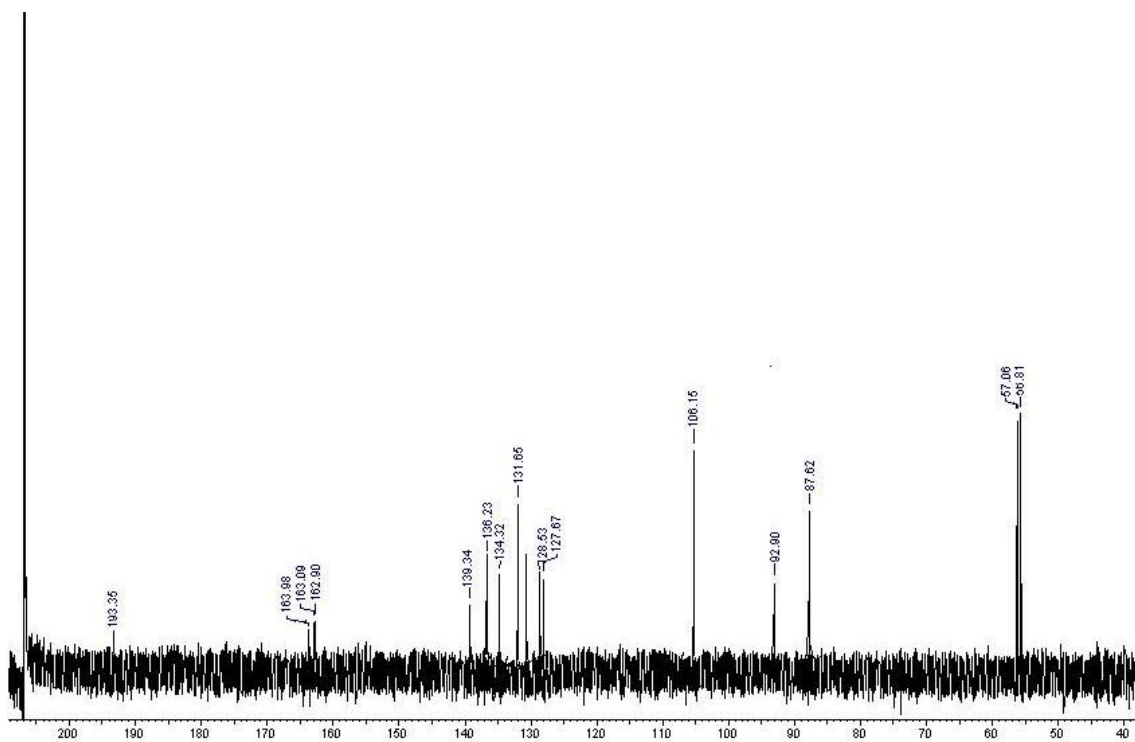
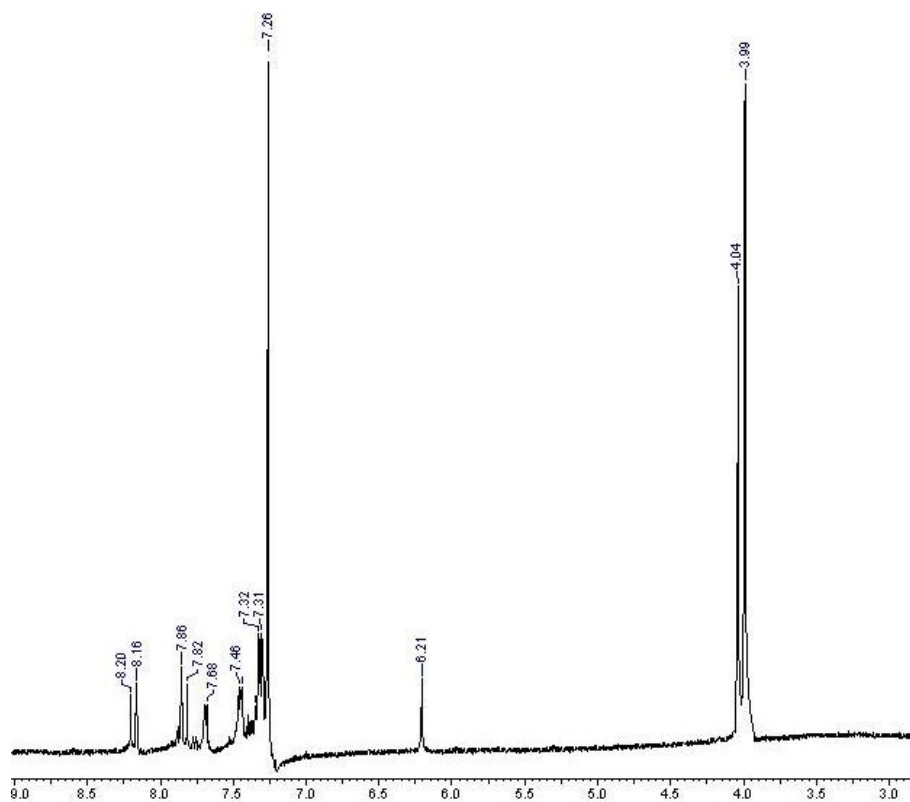
Espectro de IV do composto 10



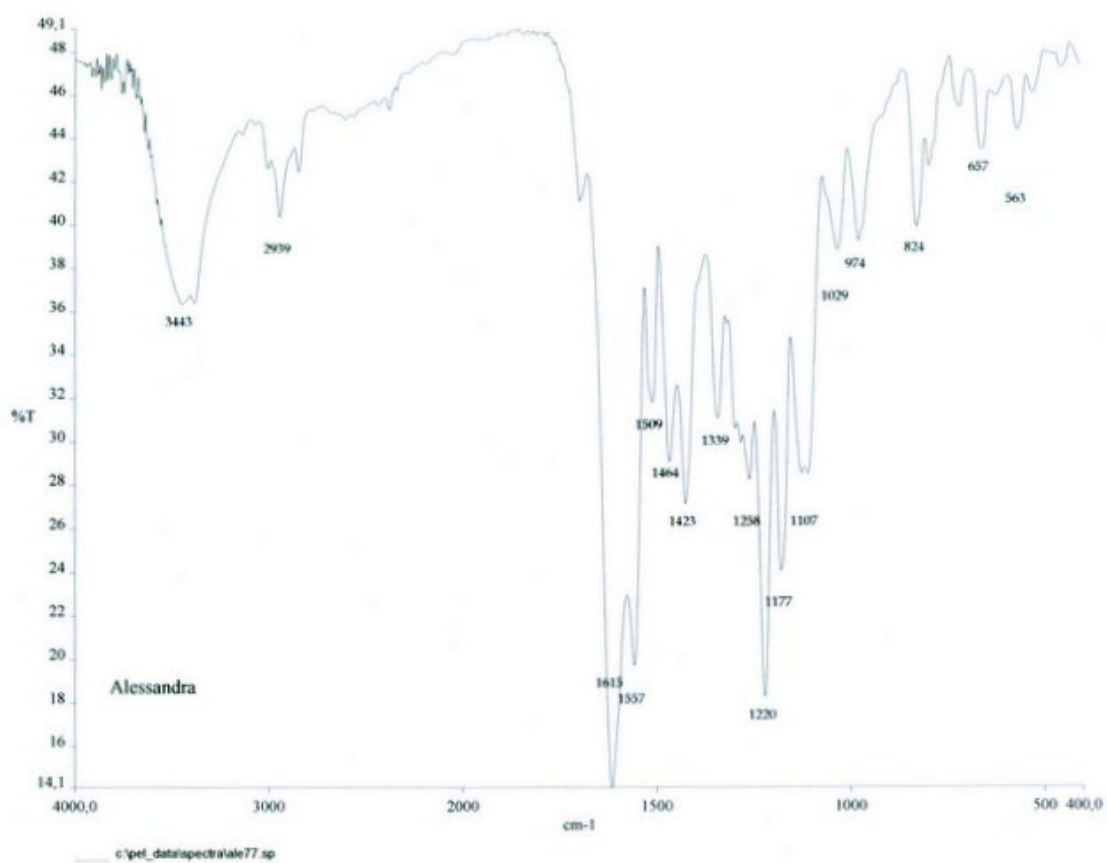
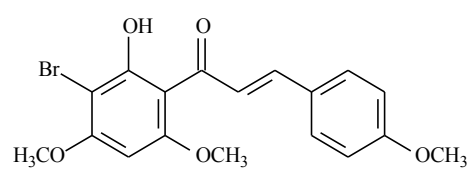
Espectros de ^1H e ^{13}C RMN (ppm) do composto 10



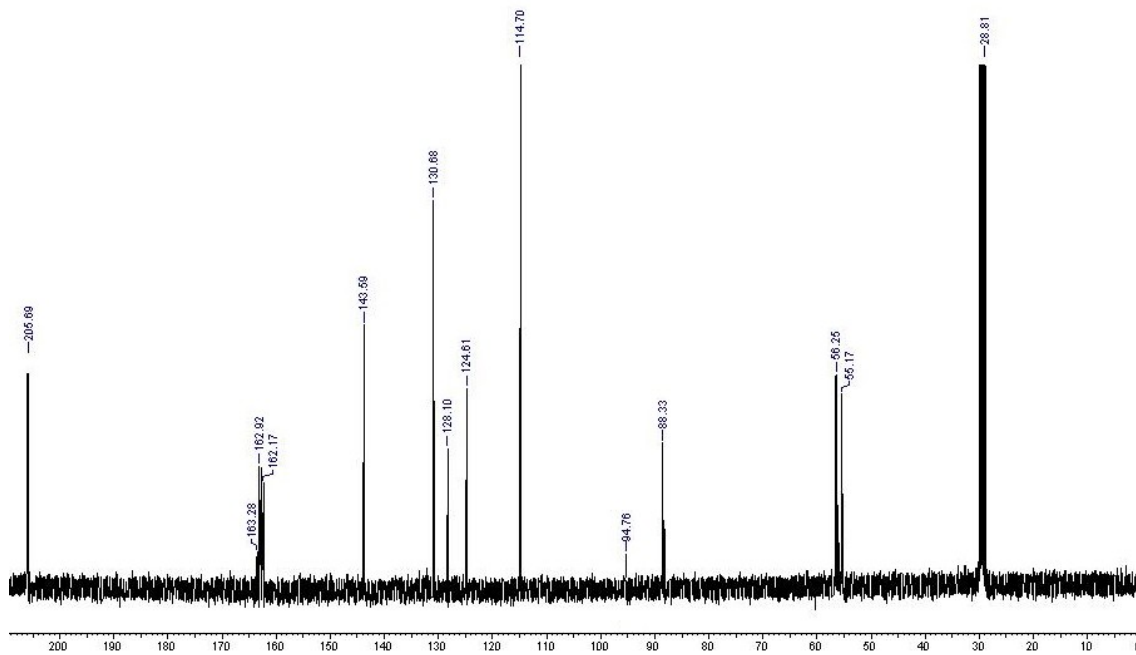
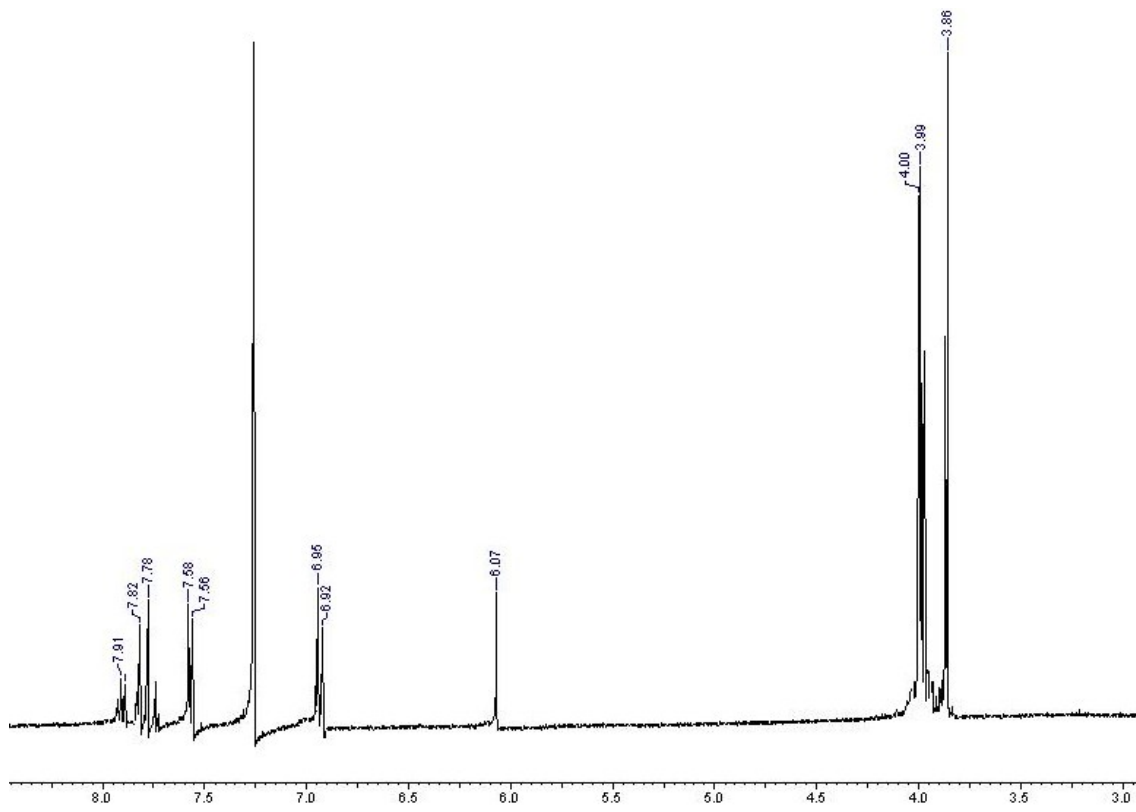
Espectro de IV do composto **11**



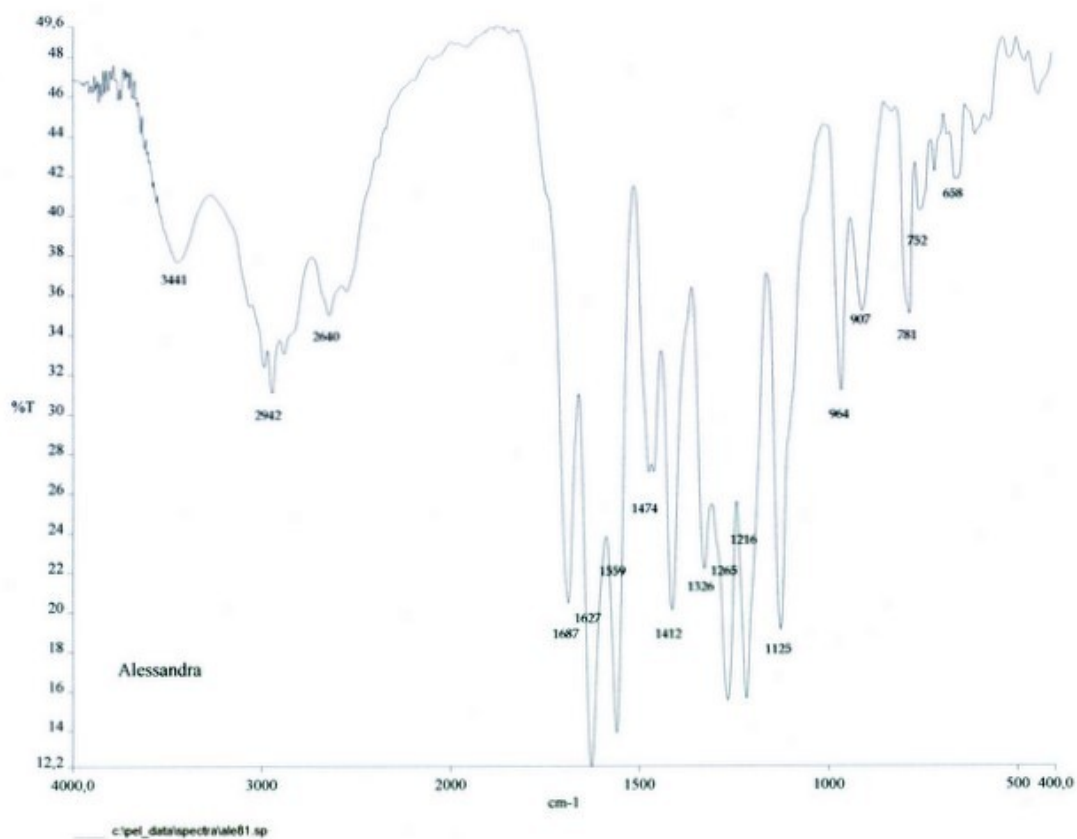
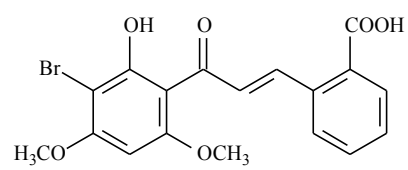
Espectros de ¹H e ¹³C RMN (ppm) do composto 11



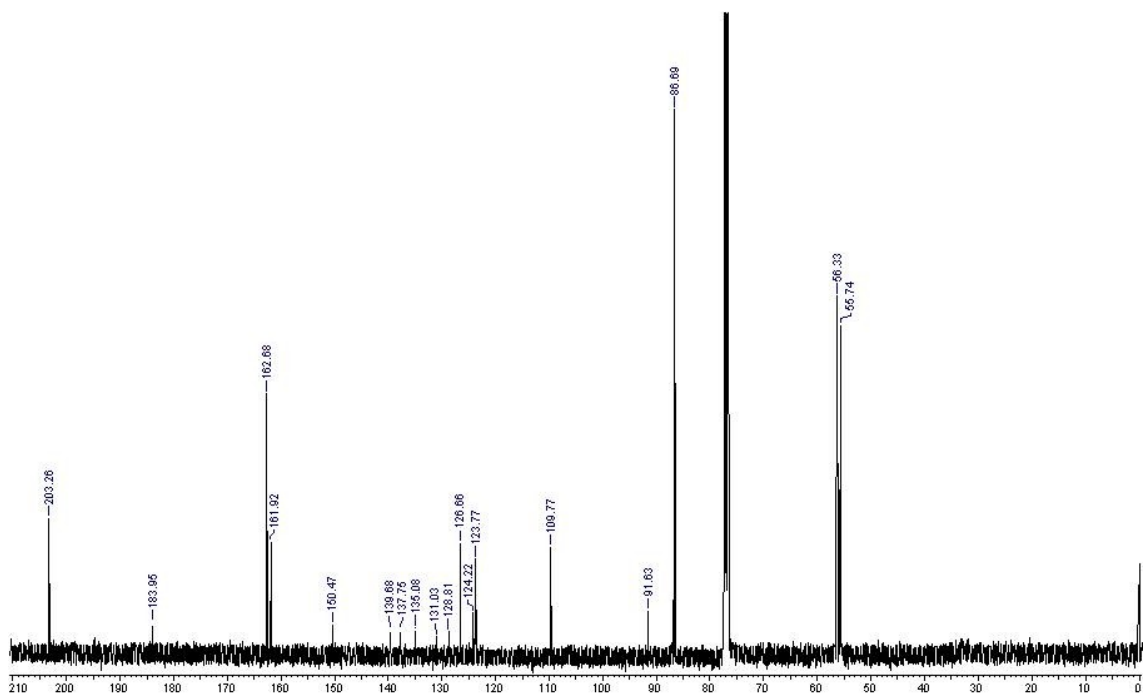
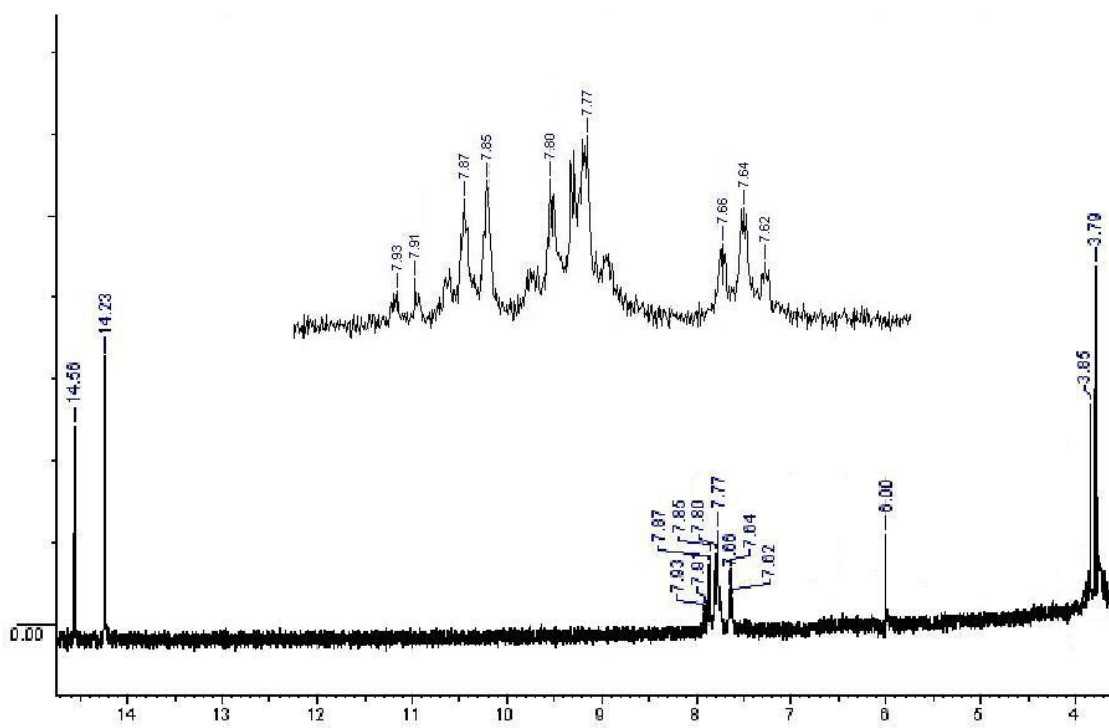
Espectro de IV do composto **12**



Espectros de ^1H e ^{13}C RMN (ppm) do composto **12**



Espectro de IV do composto 13



Espectros de ¹H e ¹³C RMN (ppm) do composto 13



Original article

Hydroxychalcones induce apoptosis in B16-F10 melanoma cells via GSH and ATP depletion

Andréia Lilian Formento Navarini^{a,1}, Louise Domeneghini Chiaradia^{b,1}, Alessandra Mascarello^{b,1}, Márcio Fritzen^a, Ricardo José Nunes^b, Rosendo Augusto Yunes^b, Tânia Beatriz Creczynski-Pasa^{a,*}

^a Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Campus Trindade, CEP 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

^b Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade, CEP 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 April 2008

Received in revised form 31 July 2008

Accepted 4 September 2008

Available online 19 September 2008

Keywords:

Hydroxychalcones

Melanoma

Antitumoral

Apoptosis

GSH

ATP

ABSTRACT

Searching for leading compounds of new drugs for cancer therapy, we studied the toxicity of 13 hydroxychalcones never tested before toward melanoma cell line (B16-F10). The compounds were obtained by aldolic condensation between aldehydes and hydroxylated acetophenones, in alkaline conditions. Three of them showed cytotoxicity to the cell line. Two of them induced mitochondrial GSH and ATP depletion and promoted cell death through apoptosis in melanoma cells. One of the compounds induced cell death through necrosis but did not significantly decrease the intracellular mitochondrial GSH and ATP levels in melanoma cells. The results suggest that the predominant factor for the activity is the molecule shape, and secondarily the number of hydroxyl groups.

© 2008 Published by Elsevier Masson SAS.

1. Introduction

Malignant melanoma is a highly lethal disease, and the incidence and mortality associated to this kind of cancer are increasing worldwide. Currently, between 2 and 3 millions non-melanoma skin cancers and 132.000 melanoma skin cancers occur globally each year [1]. Many factors predispose an individual to skin cancer including personal and family histories of the disease and geographic location [2]. The metastasis and growth of tumors depend on the cell capability to migrate, implant, adhere and penetrate into the membrane, reaching the blood vessel and the tissue [3,4]. Selected B16 murine cell lines (B16-F10 and B16-F1) showed a different metastatic potential: the F10 line colonized the lungs more efficiently than F1; the F10 cell line was

the most invasive and also the most virulent in the subcutaneous implantation model [3].

Among the drugs exerting anticancer activity against malignant melanoma, dacarbazine has been extensively used, however, with response rates of 11–25% and with short survival time. Thus, the development of chemotherapy agents against malignant melanoma is justified [5].

Chalcones are essential intermediate compounds in the flavonoid biosynthesis in plants. Naturally occurring chalcones are mainly in hydroxylated form and several reports have documented their biological properties [6]. Many studies have demonstrated antitumoral [7–11], anti-inflammatory [12], antibacterial [13], anti-ulcerogenic [14], antioxidant [6,15], antimalarial [16] and anti-leishmaniosis [16,17] activities for hydroxychalcones, aside from other pharmacological effects. Concerning antitumoral activity, Kobori et al. [7] described that the 2',4',6,4-tetrahydroxydihydrochalcone (phloretin) induced cell death by apoptosis in B16 mouse melanoma 4A5 and in HL-60 human leukaemia cell lines. Iwashita et al. [9] showed that the isoliquiritigenin (2',4',4-trihydroxychalcone) and butein (2',4',3,4-tetrahydroxychalcone) inhibited cell proliferation and induced apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells; also, Hsu et al. [11] described that isoliquiritigenin induced apoptosis and blocked the cell cycle progression in Hep G2 (human hepatoma cells). For new antitumoral molecules it is very important to demonstrate cell toxicity through apoptosis. The

Abbreviations: DNA, deoxyribonucleic acid; mDNA, mitochondrial DNA; ATP, adenosine triphosphate; GSH, glutathione; GSSG, oxidized glutathione; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; NMR, nuclear magnetic resonance spectroscopy; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; PBS, phosphate-buffered saline; DMSO, dimethylsulfoxide; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; DTNB, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid); NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate.

* Corresponding author. Tel.: +55 48 3721 8057; fax: +55 48 3721 5642.

E-mail addresses: taniac@hu.ufsc.br, taniacbcp@gmail.com (T.B. Creczynski-Pasa).

¹ These authors contributed equally to this study.

death through apoptosis is characterized by nuclear condensation that induces DNA fragmentation caused by endonucleolytic cleavage of genomic DNA [18]. The apoptosis or programmed cell death is a mechanism to control the cell proliferation, thus the resistance of malignant cell to apoptosis is hallmark of cancer and constitutes an important clinical problem [19].

The mitochondria is responsible for the production of 80–90% of ATP needed for cell respiration and survival and play an important role in the pro- and anti-apoptotic stimuli [20]. Skulachev [21] showed the inter-relations between bioenergetic processes and programmed death phenomena, and concluded that ATP is required for certain steps of apoptosis and necrosis. Usually the malfunctioning of mitochondria results in strong decrease in the initial cellular content of ATP, however, in some cases the apoptosis is accompanied by the increase of ATP concentration at early stages followed by a decrease at final stage. The energy production is also affected by mitochondrial glutathione (GSH) depletion. Changes in mitochondrial GSH content have also been related with apoptosis regulation, cell differentiation and growth [22,23].

The objective of this research is based on the fact that melanoma cells have a relatively poor response to the apoptotic stimulus, [24] and that solid tumor cells develop resistance to antineoplastic drugs and that multidrug resistance is a major cause of chemotherapy failures by human malignancies [25]. The B16-F10 melanoma cell line has high metastatic potential, and in general does not respond easily to cytotoxic agents. Thus, in this work we studied and characterized the murine B16-F10 melanoma cell death via apoptosis, induced by hydroxychalcones. The results suggest that the principal causes were mitochondrial GSH and ATP depletion. An analysis of the structure was performed to find out a relationship between the cytotoxic effects.

2. Chemistry

Thirteen hydroxychalcones were prepared by aldolic condensation as presented in Fig. 1. Chalcones **1**, **3** and **6** are derived from

1-naphthaldehyde; chalcones **4** and **5** are derived from 2-naphthaldehyde, in order to observe the influence of hydrophobic and voluminous groups in the B-ring in the activity of the hydroxychalcones. Chalcones **2** and **7** are derived from xanthoxyline (2-hydroxy-4,6-dimethoxyacetophenone), to evaluate the influence of two methoxyl groups in the A-ring beyond the presence of a hydroxyl group and to observe the influence of the aldehydes substituted with electron donors or electron acceptor groups; chalcones **8–13** are derived from monobromide xanthoxyline (2-hydroxy-3-bromo-4,6-dimethoxychalcone), to verify how much the activity would be affected by the addition of bromide in the A-ring and to observe the influence of the electron donor or electron acceptor substituents in the B-ring on the activity of the compounds. The obtained yields were between 36% and 66%.

The structures of the compounds **5**, **6**, **8**, **9**, **10** and **13**, (new compounds), were confirmed by chemical identification data: ^1H NMR, ^{13}C NMR, IR and elemental analysis. For chalcone **1**, the corresponding peak of the hydroxyl group does not appear because probably during analysis the hydroxyl group was exchanged with a deuterated hydrogen atom of the chloroform, the solvent used. ^1H NMR spectra revealed that all structures were geometrically pure and configured *E* ($J_{\text{H}\alpha\text{-H}\beta} = 15.2\text{--}16.4$ Hz).

3. Biological results and discussion

Initially, a selection of the hydroxychalcone toxicity for melanoma B16-F10 cells was done. The compounds **1**, **3** and **13** reduced cell viability by $97.7 \pm 0.7\%$, $75.2 \pm 1.5\%$ and $50 \pm 1.9\%$, respectively, when compared with the control (non-treated cells) (Fig. 2). All other chalcones presented a non-significant effect at the tested concentration. A total of $100 \mu\text{M}$ was chosen as maximal concentration because much higher doses do not normally reach the blood plasma [26,27] and we are looking for compounds with high activity (low IC_{50}) which could eventually be used in the future as a drug for chemotherapy with very low to no side effects.

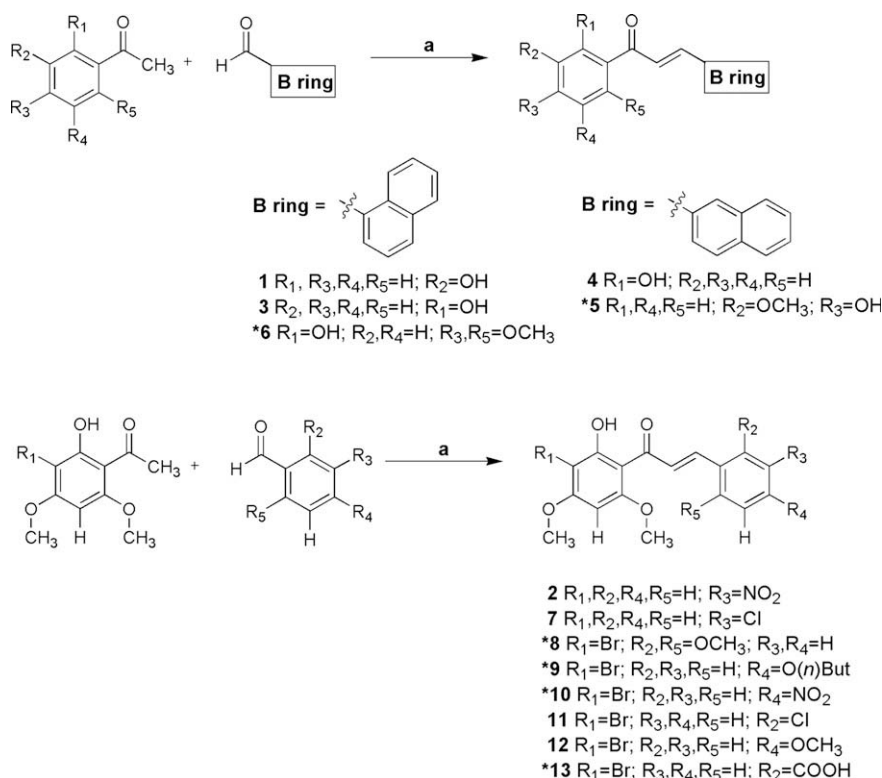


Fig. 1. Synthesis of chalcones. The reaction consists of an aldolic condensation as described in Section 4 (a) methanol, KOH 50%, r.t., 24 h. *New compounds.

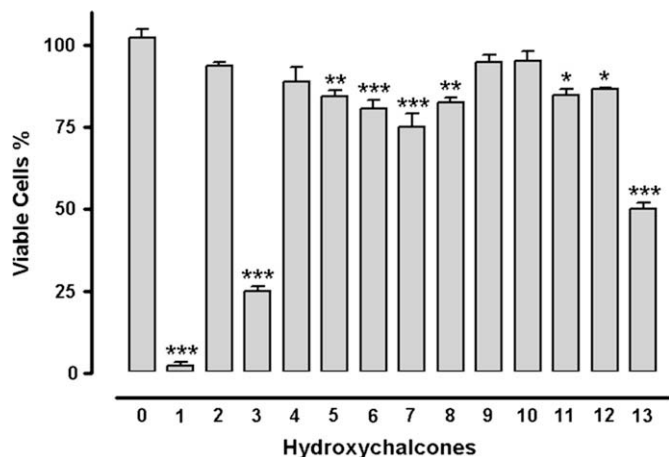


Fig. 2. Toxicity of hydroxychalcones for B16-F10 cell line. The cells (1×10^5) were incubated with 100 μM of the compounds, for 24 h. The cell viability was monitored through MTT assay. Optical density of control groups (C) was taken as 100% of cell viability. Each point represents the mean \pm S.E.M. of three experiments in triplicates. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ compared to control groups.

Recently, Cabrera et al. [10] have investigated the relation between the structure of some chalcones, flavonones and flavones and their activity against human kidney carcinoma cells TK-40, human mammary adenocarcinoma cells MCF-7 and human colon adenocarcinoma cells HT-29. In general, no cytotoxic selectivity between the different cellular lines was observed. However, in the same substituted series the activity decreased following the sequence chalcones > flavonones > flavones. Some other requirements for activity are the presence of the hydroxyl group that has hydrogen bond donor capability and the presence of the conjugated enone group, since the compounds lose their activity when changed to an aldol structure.

The importance of the presence of a hydroxyl substituent was demonstrated previously by Sabzevari et al. [8] via measurements of the cytotoxic activity of 12 hydroxylated chalcones toward K562 leukaemia or melanoma cells. They observed that an increase in the number of hydroxyl groups on an aromatic ring decreases the pK_a value of the first hydroxyl group suggesting that chalcones with lower pK_a values are less toxic to hepatocytes. However, it should be noted that the arrangement of the hydroxyl groups on the A-ring or B-ring plays a crucial role in determining the mechanism of cytotoxicity toward isolated rat hepatocytes. Thus, if the hydroxyl group is in *ortho* position the chalcone can be metabolized to a quinone intermediate which could react with cell nucleophile and deplete GSH.

In this case, the importance of the hydroxyl group in A-ring for activity is apparent as can be observed in chalcones **1** and **3**. However, this activity is conditioned by the conformation of the molecule as observed with chalcones **4** and **5** where the B-ring consists of 1-naphthyl or 2-naphthyl groups. This is also observed with chalcone **6** where the presence of a methoxyl group in position 6 also changes the conformation of the molecule. This detail may also explain the lack of strong activity of chalcones **2**, **7–12**, xanthoxylone derivatives. The presence of a methoxy group in position 6 should give a steric effect forcing the carbonyl group out of the plane of the A-ring and then decrease the hydrogen bond strength with the 2-hydroxyl groups. This conformation change appears to be important to maintain the activity of these compounds. Chalcone **13** with a carboxyl substituent in B-ring exhibits a good activity that may be explained by the probable formation of a nine-membered ring between this group and the carbonyl group. Thus, the planarity and the rigidity of the molecular structure seem to be important factors to the activity in these cases.

We further investigated the cytotoxic effect of the more active compounds which were **1**, **3** and **13** and the IC_{50} values were

determined from concentration–response curve, which are $12 \pm 0.7 \mu\text{M}$, $17 \pm 1.5 \mu\text{M}$ and $30 \pm 1.9 \mu\text{M}$, respectively (Fig. 3).

In order to elucidate the mechanism of death of B16-F10 cells induced by hydroxychalcones we investigated if these compounds could induce DNA fragmentation, a biochemical marker of apoptosis [28]. The lanes (B and C) that correspond to the DNA of the cells incubated with compounds **1** and **3**, respectively, showed fragmented DNA distributed in bands with defined sizes, characteristic of DNA fragmentation by apoptosis (Fig. 4). The lanes that correspond to the DNA from the cells incubated without hydroxychalcones (A) as well as the lane which corresponds to DNA from cells incubated with hydroxychalcone **13** (D), showed uniform chromatin. Since the hydroxychalcone **13** induced cell death (Fig. 1), it seems to be through another mechanism, not apoptosis.

The mitochondria is a central organelle involved in apoptosis, with the capacity to directly activate the execution pathways [29] a process in which ATP is directly involved. Thus, the compounds were incubated with the cells and the ATP depletion profile was analyzed. The hydroxychalcones **1** and **3** decreased the ATP content of the melanoma cells in a concentration-dependent manner (Fig. 5B); the amount of ATP depletion was higher than the percentage of cell death (Fig. 5A). The cell death through apoptosis can be a consequence of cell energy loss, caused by the compounds [31]. Possibly the hydroxychalcone **13** induced cell death through necrosis, since DNA breakage induced by this compound is not characteristic of apoptosis (Fig. 4). However, it did not significantly alter the ATP intracellular content of melanoma cells as expected for death induced by necrosis. These results are in part, in accordance with the data from the literature by Hu et al. [30] which demonstrated that INGCPBD induces apoptosis in human melanoma through a mitochondrial dysfunction. Sabzevari et al. [8] suggested that the cytotoxic activity of the phloretin, isoliquiritigenin, and of 10 other hydroxylated chalcones, toward K562 leukaemia or melanoma cells are due to their ability to mitochondrial uncoupling. Cao et al. [29] also detected the induction of apoptosis through mitochondrial hyperpolarization and mtDNA

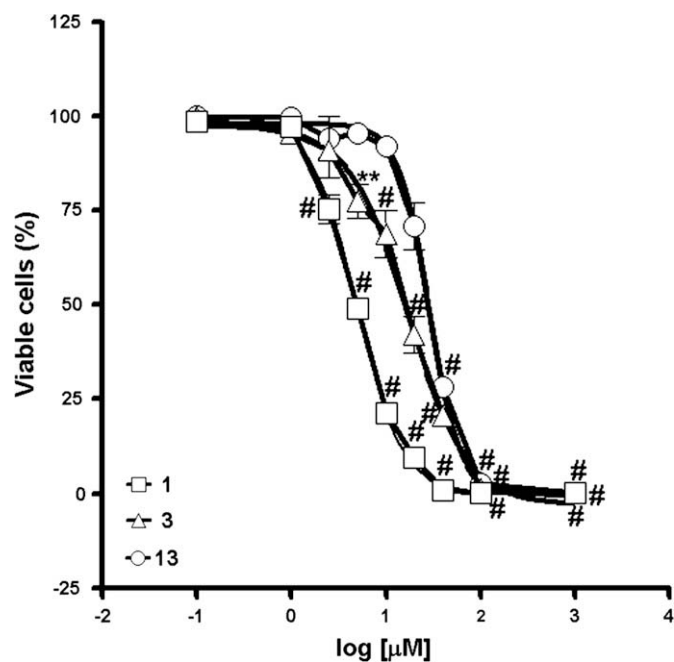


Fig. 3. Concentration–response curves of hydroxychalcones **1**, **3** and **13** on B16-F10 cell line. The cells (1×10^4) were incubated with the compounds (0–40 μM) for 72 h. Optical density of control groups was taken as 100% of cell viability. Each bar represents the mean \pm S.E.M. of three experiments. ** $P < 0.01$ and # $P < 0.001$ compared to control groups.

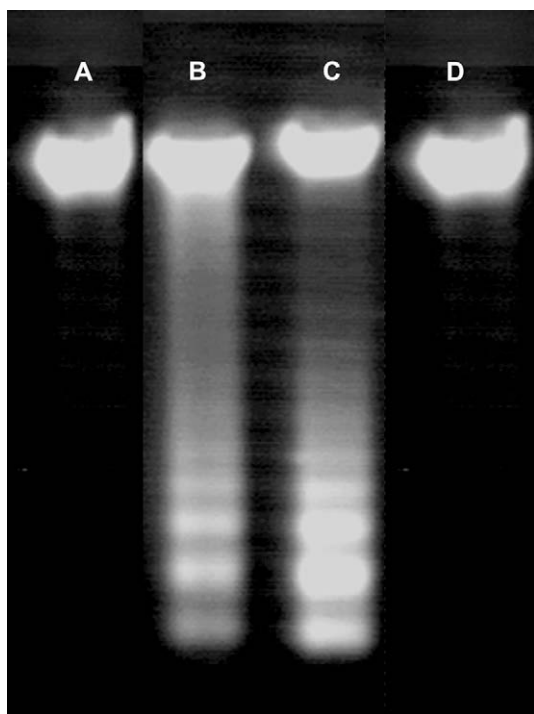


Fig. 4. DNA fragmentation of B16-F10 cells induced by hydroxychalcones. The cells (5×10^5) were incubated for 24 h with: 0 μM , Lane A – Control; Lane B – 12 μM of compound **1**; Lane C – 17 μM of compound **3**; Lane D – 30 μM of compound **13** (IC_{50} concentrations for cell toxicity).

damage in human hepatoma G2 cells by curcumin. Garland and Halestrap [22] also showed that the depletion of intracellular ATP, by ATPase mitochondrial uncoupling capabilities, induced cell death through apoptosis, exhibiting DNA fragmentation in cell lines pro-B interleukin-3 (IL-3)-dependent.

We further analyzed a possible effect of hydroxychalcones on mitochondria function measuring mitochondrial GSH content in melanoma cells after incubation with the compounds. Fig. 6 shows that the compounds **1** and **3** reduced the amount of mitochondrial GSH after 24 h of incubation, this reduction may be related to ATP depletion induced by these compounds. Kachadourian and Day [32] showed that low GSH content in the mitochondria of human lung epithelial cells A549, treated with 2',5'-hydroxychalcone was related to mitochondrial dysfunction. The GSH, present in mitochondria, plays an important role in the control of reactive oxygen species generation, in the integrity of mitochondrial membranes, release of proapoptotic factors and in the modulation of cell death by several pathways [33]. Moreover, the GSH in mitochondria protects the integrity of mitochondrial components, thus playing a determinant role in response to apoptosis.

The hydroxychalcones **1** and **3** may be considered promising molecules, based on the fact that mitochondrial GSH and ATP depletion cause mitochondrial dysfunction and the rapid growth of tumor cells is highly energy dependent.

In summary, 13 hydroxychalcones were synthesized, and **1**, **3** and **13** exhibited effective cytotoxicity against melanoma B16-F10 cells. Compound **1** was the most active, with an IC_{50} value of 12 μM . Compounds **1** and **3** induced cell apoptosis, suggested to occur through mitochondrial GSH and ATP depletion. Compound **13** did not induce cell death through apoptosis nor did it induce ATP depletion. The main similarity between chalcones **1** and **3** is the presence of a unit of 1-naphthyl at B-ring. The higher activity of compound **1** seems to be due to the free hydroxyl group at A-ring. This is an interesting compound since it occurs naturally on the chalcones in this same position [34].

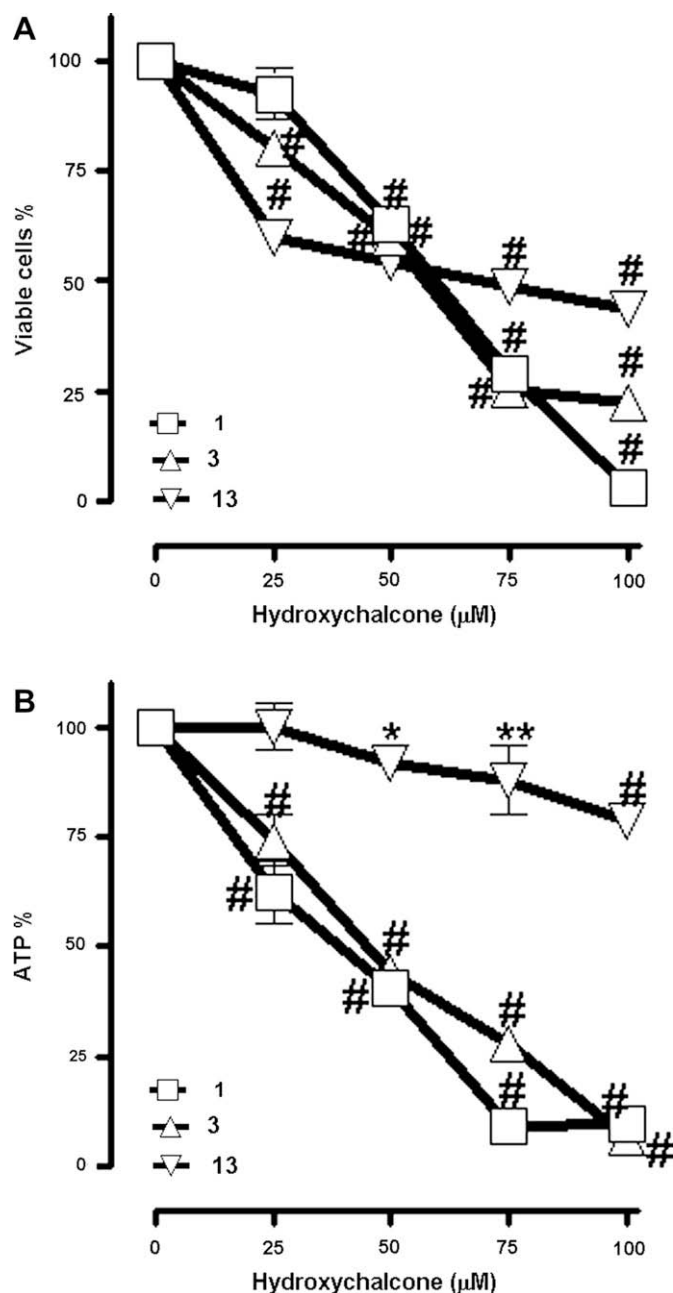


Fig. 5. Effect of hydroxychalcones **1**, **3** and **13** on ATP amounts, compared to cytotoxic effect, in B16-F10 cells. The cells (1×10^5) were incubated with the compounds (0–100 μM) for 24 h to analyze the cell viability (A). 3×10^5 cells were incubated with the compounds at the same concentrations for 24 h, for ATP concentration measurements (B). Each bar represents the mean \pm S.E.M. of three experiments in triplicate. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and # $P < 0.001$ compared to control groups.

Compounds **1** and **3** were selected to continue the research. Further studies are being developed by our group to elucidate the mechanism of action. The analyses of the molecule structures suggest that the predominant factor for activity is the molecule shape, and secondarily, the number of hydroxyl groups in the chalcone.

4. Experimental

4.1. Preparation of the compounds

The compounds were prepared by aldolic condensation. All reagents used were obtained commercially (Merck, Sigma–Aldrich),

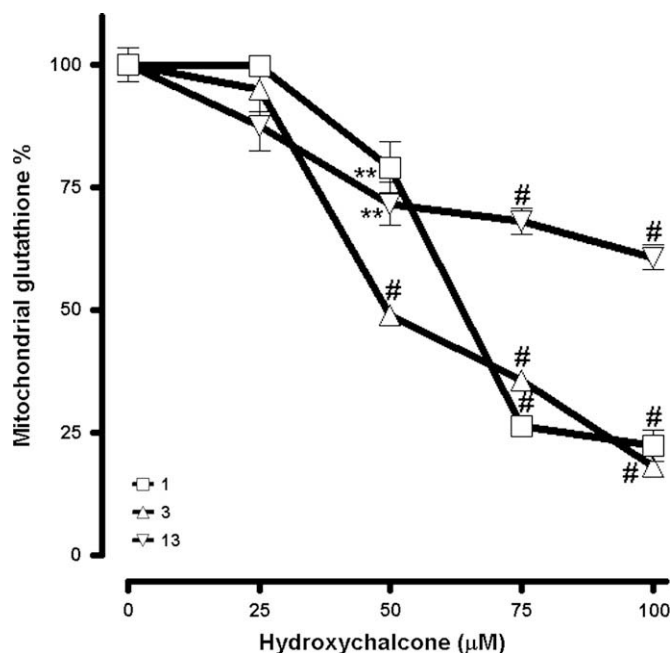


Fig. 6. Effect of hydroxychalcones **1**, **3** and **13** on mitochondrial GSH content. The cells (3×10^5) were incubated with the compounds (0–100 μM) for 24 h. Mitochondrial glutathione (GSH + GSSG) was measured using the glutathione reductase method, as described in Section 4. Each bar represents the mean \pm S.E.M. of three experiments in triplicate. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ compared to control groups.

except the xanthoxyline (2-hydroxy-4,6-dimethoxyacetophenone) and the monobromide xanthoxyline (2-hydroxy-3-bromo-4,6-dimethoxychalcone), that were prepared as previously described [35]. All chalcones were prepared by magnetic agitation of hydroxylated acetophenone (2 mmol), methanol (30 mL), KOH 50% w/v (5 mL) and the corresponding aldehyde (2 mmol), at room temperature for 24 h. Distilled water and chloric acid 10% were added in the reaction for total precipitation of the compounds. The compounds were then obtained by vacuum filtration and later recrystallized in dichloromethane and hexane. The chalcones **1**, **3**, **4**, **7** and **12** were previously cited, respectively, by Hollinshead [36], Subbanwad and Vibhute [37], Liu et al. [16], Hsu et al. [38] and by Bora et al. [39]. The compounds **2** and **11** were described by Boeck and co-workers [17] and the structures **5**, **6**, **8–10** and **13** are new chalcones.

4.2. Physico-chemical data of the compounds

The purified chalcones were obtained in yields between 36% and 66%. The structures were identified using melting points (m.p.), infrared spectroscopy (IR), ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR), and to the unpublished ones, also elementary analyses. Melting points were determined with a Microquímica MGAPF-301 apparatus and are uncorrected. IR spectra were recorded with an Abb Bomen FTLA 2000 spectrometer on KBr disks. NMR (^1H and ^{13}C NMR) were recorded on Varian Oxford AS-400 (400 MHz), using tetramethylsilane as an internal standard. Elementary analyses were obtained with a CHNS EA 1110. Percentages of C and H were in agreement with the product formula (within $\pm 0.4\%$ of theoretical values to C). The purity of the synthesized chalcones was analyzed by thin-layer chromatography (TLC) using Merck silica pre-coated aluminum plates 200 μm in thickness with several solvent systems of different polarities. Compounds were visualized with ultraviolet light ($\lambda = 254$ and 360 nm) and using sulfuric anisaldehyde solution followed by heat as developing agent and purified by recrystallization from hexane

and dichloromethane. ^1H NMR spectra revealed that all the structures were geometrically pure and configured *E* ($J_{\text{Hz-H}\beta} = 15.2$ –16.4 Hz).

4.3. Physico-chemical data of synthesized compounds

4.3.1. (2E)-1-(3'-Hydroxyphenyl)-3-(1-naphtyl)-2-propen-1-one

Yellow solid, m.p. 174–175. ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.10 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H4'), 7.40 (dd, 1H, H5'), 7.51–7.65 (m, 5H, H3, H4, H6, H7, H2'), 7.60 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, H α), 7.90 (d, 2H, H5, H8), 7.94 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H6'), 8.26 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H2), 8.67 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, H β). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 115.07 (C2'), 120.22 (C4'), 120.32 (C6'), 123.41 (C α), 124.97 (C2), 125.56 (C3), 125.89 (C8), 126.52 (C6), 127.30 (C7), 129.07 (C4), 130.08 (C5), 130.93 (C5'), 132.01 (C9), 132.34 (C10), 134.16 (C1), 139.91 (C1'), 140.39 (C β), 158.06 (C3'), 189.09 (C=O). IR $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3176, 1642, 1351, 1571, 1273, 1475, 1172, 962, 772, 707 (KBr). Anal. Calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{O}_2$: C 83.19, H 5.14. Found: C 83.42, H 5.21. Yield: 51%.

4.3.2. (2E)-1-(2'-Hydroxy-4',6'-dimethoxyphenyl)-3-(3-nitrophenyl)-2-propen-1-one

Orange solid, m.p. 171–172 °C. ^1H NMR (CDCl_3) δ 3.85 (s, 3H, OCH₃), 3.94 (s, 3H, OCH₃), 5.98 (s, 1H, H5'), 6.12 (s, 1H, H3'), 7.74 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, H α), 7.84–7.88 (m, 2H, H4, H5), 7.98 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, H β), 8.22 (d, 1H, $J = 7.75$ Hz, H6), 8.46 (s, 1H, H2), 14.09 (s, 1H, OH). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 55.56 (OCH₃), 55.82 (OCH₃), 91.37 (C5'), 93.84 (C3'), 106.20 (C1'), 122.08 (C2), 123.99 (C4), 129.78 (C α), 130.51 (C5), 134.01 (C6), 137.43 (C1), 138.68 (C β), 148.71 (C3), 162.45 (C2'), 166.45 (C6'), 168.46 (C4'), 191.78 (C=O). IR $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 1640, 4580 (KBr). Anal. Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{NO}_6$: C 62.00, H 4.59, N 4.59. Found: C 62.08, H 4.26. Yield: 51%.

4.3.3. (2E)-1-(2'-Hydroxyphenyl)-3-(1-naphtyl)-2-propen-1-one

Yellow solid, m.p. 106–108 °C. ^1H NMR (CDCl_3) δ 6.97 (dd, 1H, $J = 7.4$ Hz, H5'), 7.06 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H3'), 7.51–7.62 (m, 4H, H3, H6, H7, H4'), 7.76 (d, 1H, $J = 15.2$ Hz, H α), 7.90–7.99 (m, 4H, H6', H4, H5, H8), 8.29 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H2), 8.79 (d, 1H, $J = 15.2$ Hz, H β), 12.88 (s, 1H, OH). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 118.93 (C3'), 119.17 (C5'), 122.99 (C α), 123.67 (C2), 125.59 (C8), 125.68 (C1'), 126.67 (C3), 127.41 (C6), 129.07 (C4, C5), 130.00 (C9, C6'), 131.48 (C10), 136.74 (C1, C4'), 142.66 (C β), 163.93 (C2'), 194.12 (C=O). IR $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3451, 1635, 1351, 1576, 1203, 1015, 3047, 1435, 1162, 972, 760 (KBr). Anal. Calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{O}_2$: C 83.19, H 5.14. Found: C 83.88, H 5.18. Yield: 57%.

4.3.4. (2E)-1-(2'-Hydroxyphenyl)-3-(2-naphtyl)-2-propen-1-one

Yellow solid, m.p.: 135–137 °C (lit. p.f.: 146–148 °C)¹³². ^1H NMR (CDCl_3) δ 6.96 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H3'), 7.03–7.10 (m, 1H, H5'), 7.48–7.54 (m, 3H, H3, H4, H4'), 7.75 (d, 1H, $J = 16.0$ Hz, H α), 7.78–7.89 (m, 5H, H5, H6, H7, H8, H6'), 7.93 (d, 1H, $J = 16.0$ Hz, H β), 8.04 (s, 1H, H1), 12.89 (s, 1H, OH). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 118.89 (C3'), 120.41 (C5'), 121.93 (C3), 123.89 (C α), 125.65 (C1'), 126.80 (C6), 127.13 (C7), 127.33 (C1), 128.40 (C5), 129.08 (C8), 129.94 (C4), 131.39 (C6'), 132.31 (C10), 133.57 (C9), 134.78 (C2), 136.65 (C4'), 145.79 (C β), 163.86 (C2'), 193.91 (C=O). IR $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3195 (OH), 1689 (C=O), 1568 (C=C), 3046, 1482, 1432, 1021, 985, 819, 752 (Ar) (KBr). Anal. Calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{O}_2$: C 83.19, H 5.14. Found: C 82.04, H 5.18. Yield: 66%.

4.3.5. (2E)-1-(3'-Methoxy-4'-hydroxyphenyl)-3-(2-naphtyl)-2-propen-1-one

Light yellow solid, m.p.: 166–168 °C. ^1H NMR (CDCl_3) δ 4.01 (s, 3H, OCH₃), 6.10 (s, 1H, OH), 7.02 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H5'), 7.29 (s, 1H, H2'), 7.52–7.54 (m, 1H, H6'), 7.66–7.72 (m, 3H, H3, H6, H7), 7.83 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, H α), 7.80–7.87 (m, 3H, H4, H5, H8), 7.97 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, H β), 8.05 (s, 1H, H1). ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 56.37 (m-OCH₃), 110.74 (C2'), 114.05 (C5'), 121.99 (C3), 123.96 (C α), 126.97

(C6'), 127.51 (C6), 128.03 (C7), 128.85 (C1), 128.91 (C8), 130.68 (C4, C5), 131.33 (C1'), 132.81 (C10), 133.63 (C9), 134.54 (C2), 144.30 (Cβ), 147.15 (C4'), 150.64 (C3'), 188.74 (C=O). IR $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3265 (OH), 1643, 1202 (C=O), 1280, 1025 (C–O), 1563 (C=C), 2950, 2835, 1522, 1445, 970, 844, 816, 779 (Ar) (KBr). Anal. Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{O}_3$: C 78.93, H 5.30. Found: C 78.86, H 5.76. Yield: 39%.

4.3.6. (2E)-1-(2'-Hydroxy-4',6'-dimethoxyphenyl)-3-(1-naphthyl)-2-propen-1-one

Yellow solid, m.p. 116–117 °C. ^1H NMR (CDCl_3) δ 3.85 (s, 3H, OCH₃), 3.92 (s, 3H, OCH₃), 5.98 (s, 1H, H3'), 6.14 (s, 1H, H5'), 7.50–7.61 (m, 3H, H3, H6, H7), 7.83–7.92 (m, 3H, H4, H5, H8), 7.97 (d, 1H, $J = 15.2$ Hz, H α), 8.31 (d, 1H, H2), 8.61 (d, 1H, $J = 15.2$ Hz, H β), 12.83 (OH). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 55.87 (OCH₃), 56.15 (OCH₃), 91.54 (C5'), 94.03 (C3'), 101.63 (C1'), 124.00 (C α), 125.39 (C2), 125.71 (C8), 126.46 (C3), 127.03 (C6), 128.93 (C7), 130.46 (C4), 130.55 (C5), 132.02 (C9), 133.32 (C10), 133.99 (C1), 139.49 (Cβ), 162.79 (C2'), 166.55 (C6'), 168.68 (C4'), 192.79 (C=O). IR $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3450, 1627, 1341, 1571, 1215, 1109, 1440, 1153, 975, 810, 768 (KBr). Anal. Calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_4$: C 75.43, H 5.43. Found: C 75.66, H 5.94. Yield: 58%.

4.3.7. (2E)-1-(2'-Hydroxy-4',6'-dimethoxyphenyl)-3-(3-chlorophenyl)-2-propen-1-one

Yellow solid, m.p.: 104–106 °C. ^1H NMR (CDCl_3) δ 3.84 (s, 3H, OCH₃), 3.93 (s, 3H, OCH₃), 5.97 (s, 1H, H3'), 6.11 (s, 1H, H5'), 7.33–7.35 (m, 3H, H4, H5, H6), 7.57 (s, 1H, H2), 7.68 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, H α), 7.87 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, H β), 13.95 (s, 1H, OH). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 55.89 (OCH₃), 56.19 (OCH₃), 91.58 (C5'), 94.02 (C3'), 106.50 (C1'), 126.88 (C α), 128.09 (C6), 129.10 (C2), 130.07 (C4), 130.35 (C5), 135.06 (C3), 137.68 (C1), 140.70 (Cβ), 162.73 (C2'), 166.68 (C6'), 168.68 (C4'), 192.51 (C=O). IR $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3451 (OH), 1624, 1215 (C=O), 1029 (C–O), 1576 (C=C), 2936, 1439, 977, 909, 822 (Ar) (KBr). Anal. Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{ClO}_4$: C 64.06, H 4.74. Found: C 64.61, H 5.39. Yield: 36%.

4.3.8. (2E)-1-(2'-Hydroxy-3'-bromo-4',6'-dimethoxyphenyl)-3-(2,6-dimethoxyphenyl)-2-propen-1-one

Orange solid, m.p. 193–194 °C. ^1H NMR (CDCl_3) δ 3.91 (s, 6H, OCH₃), 3.96 (s, 6H, OCH₃), 6.04 (s, 1H, H5'), 6.57 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, H3, H5), 7.28 (t, 1H, H4), 8.29 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, H α), 8.34 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, H β), 14.65 (s, 1H, OH). ^{13}C NMR (acetone- d_6) δ 55.72 (2CH₃), 56.06 (OCH₃), 56.32 (OCH₃), 88.35 (C5'), 94.76 (C3'), 104.21 (C1', C3, C5), 112.81 (C1), 129.11 (C α), 132.35 (C4), 134.85 (Cβ), 160.81 (C2, C6), 162.35 (C6'), 162.91 (C2'), 166.31 (C4'), 205.56 (C=O). IR $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3442, 2941, 1616, 1552, 1325, 1253, 1193, 916, 782 (KBr). Anal. Calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{BrO}_6$: C 53.92, H 4.52. Found: C 53.67, H 4.44. Yield: 42%.

4.3.9. (2E)-1-(2'-Hydroxy-3'-bromo-4',6'-dimethoxyphenyl)-3-(4-butoxyphenyl)-2-propen-1-one

Yellow solid, m.p. 172–173 °C. ^1H NMR (CDCl_3) δ 0.98 (t, 3H, –CH₃), 1.47–1.60 (m, 2H, –CH₂CH₃), 1.75–1.81 (m, 2H, –CH₂CH₂CH₃), 3.98 (s, 3H, OCH₃), 3.99 (s, 3H, OCH₃), 4.01 (t, 2H, –OCH₂–), 6.06 (s, 1H, H5'), 6.91 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, H3, H5), 7.54 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, H2, H6), 7.75 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, H α), 7.83 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, H β), 14.96 (OH). ^{13}C NMR (acetone- d_6) δ 13.42 (CH₃), 19.18 (–CH₂CH₃), 31.28 (–CH₂CH₂CH₃), 56.25 (OCH₃), 67.86 (–OCH₂–), 88.37 (C5'), 94.61 (C3'), 104.43 (C1'), 115.19 (C3, C5), 124.46 (C α), 128.04 (C1), 130.71 (C2, C6), 143.72 (Cβ), 160.02 (C4), 168.46 (C2'), 168.82 (C6'), 176.12 (C4'), 198.07 (C=O). IR $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3450, 2945, 1615, 1554, 1221, 963 (KBr). Anal. Calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{BrO}_5$: C 57.94, H 5.33. Found: C 57.27, H 5.27. Yield: 47%.

4.3.10. (2E)-1-(2'-Hydroxy-3'-bromo-4',6'-dimethoxyphenyl)-3-(4-nitrophenyl)-2-propen-1-one

Yellow solid, m.p. 230–231 °C. ^1H NMR (CDCl_3) δ 3.94 (s, 3H, OCH₃), 3.97 (s, 3H, OCH₃), 6.03 (s, 1H, H5'), 7.61 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz,

H2, H6), 7.74 (d, 1H, $J = 16.0$ Hz, H α), 7.93 (d, 1H, $J = 16.0$ Hz, H β), 8.24 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, H3, H5), 14.73 (s, 1H, OH). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 55.74 (OCH₃), 56.32 (OCH₃), 86.69 (C5'), 91.63 (C3'), 106.55 (C1'), 109.77 (C3, C5), 123.78 (C α), 126.66 (C2, C6), 128.82 (C1), 131.03 (Cβ), 150.47 (C4), 161.92 (C6'), 162.62 (C2'), 162.68 (C4'), 203.27 (C=O). IR $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3450, 2943, 1600, 1509, 1345, 1093, 976, 852 (KBr). Anal. Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{BrNO}_6$: C 50.02, H 3.46, N 3.43. Found: C 49.57, H 3.02, N 4.53. Yield: 42%.

4.3.11. (2E)-1-(2'-Hydroxy-3'-bromo-4',6'-dimethoxyphenyl)-3-(2-chlorophenyl)-2-propen-1-one

Light yellow solid, m.p. 210–212 °C. ^1H NMR (CDCl_3) δ 3.98 (s, 3H, OCH₃), 4.04 (s, 3H, OCH₃), 6.21 (s, 1H, H5'), 7.29–7.32 (m, 2H, H4, H5), 7.43 (d, 1H, H3), 7.67 (d, 1H, H6), 7.83 (d, 1H, $J = 15.2$ Hz, H α), 8.18 (d, 1H, $J = 15.2$ Hz, H β), 14.67 (s, 1H, OH). ^{13}C NMR (acetone- d_6) δ 56.85 (OCH₃), 57.08 (OCH₃), 87.80 (C5'), 92.80 (C3'), 106.00 (C1'), 127.72 (C α), 128.60 (C5), 130.22 (C6), 131.06 (C3), 131.62 (C4), 134.33 (C2), 136.21 (C1), 139.49 (Cβ), 162.90 (C2'), 163.00 (C6'), 163.93 (C4'), 193.25 (C=O). IR $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3450, 2934, 1618, 1557, 1216, 1125, 965, 788 (KBr). Anal. Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{BrClO}_4$: C 51.35, H 3.55. Found: C 51.45, H 3.58. Yield: 62%.

4.3.12. (2E)-1-(2'-Hydroxy-3'-bromo-4',6'-dimethoxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)-2-propen-1-one

Yellow solid, m.p. 144–146 °C. ^1H NMR (CDCl_3) δ 3.86 (s, 3H, OCH₃), 3.97 (s, 3H, OCH₃), 3.99 (s, 3H, OCH₃), 6.07 (s, 1H, H5'), 6.93 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, H3, H5), 7.56 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, H2, H6), 7.79 (d, 1H, $J = 16.4$ Hz, H α), 7.89 (d, 1H, $J = 16.4$ Hz, H β), 14.81 (OH). ^{13}C NMR (acetone- d_6) δ 55.17 (OCH₃), 56.25 (OCH₃), 56.37 (OCH₃), 88.34 (C5'), 94.76 (C3'), 106.66 (C1'), 114.70 (C3, C5), 124.61 (C α), 128.10 (C1), 130.68 (C2, C6), 143.59 (Cβ), 162.17 (C4), 162.92 (C2', C6'), 163.28 (C4'), 205.72 (C=O). IR $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3443, 1615, 1557, 1220, 1177, 824 (KBr). Anal. Calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{BrO}_5$: C 54.98, H 4.36. Found: C 51.95, H 4.46. Yield: 40%.

4.3.13. (2E)-1-(2'-Hydroxy-3'-bromo-4',6'-dimethoxyphenyl)-3-(2-carboxyphenyl)-2-propen-1-one

Yellow solid, m.p. 230 °C. ^1H NMR (acetone- d_6) δ 3.79 (s, 3H, OCH₃), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 6.00 (s, 1H, H5'), 7.64 (t, 1H, $J = 8.0$ Hz, H4), 7.64 (d, 1H, $J = 16.0$ Hz, H α), 7.79 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H6), 7.87 (t, 1H, $J = 8.0$ Hz, H5), 7.87 (d, 1H, $J = 16.0$ Hz, H β), 7.92 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H3), 14.23 (COOH), 14.57 (OH). ^{13}C NMR (acetone- d_6) δ 57.25 (OCH₃), 57.74 (OCH₃), 88.12 (C5'), 94.78 (C3'), 106.14 (C1'), 124.40 (C α), 126.49 (C6), 130.09 (C4), 130.73 (C2), 132.61 (C3), 134.88 (C5), 135.66 (C1), 136.76 (Cβ), 156.72 (C6'), 165.62 (C2'), 166.90 (C4'), 180.67 (COOH), 206.97 (C=O). IR $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3441, 2942, 2640, 1627, 1559, 1216, 1125, 964, 781 (KBr). Anal. Calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{BrO}_6$: C 53.09, H 3.71. Found: C 49.08, H 3.71. Yield: 59%.

4.4. Biological assays

4.4.1. Reagents

Tissue culture media and fetal bovine serum were purchased from CULTILAB (São Paulo, Brazil), penicillin/streptomycin were purchased from GIBCO (Grand Island, NY, USA), isopropanol was purchased from Merck (Darmstadt, Germany), 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). The luciferin–luciferase kit was purchased from Bio-Orbit® (Turku, Finland).

4.4.2. Cell culture

Murine B16-F10 melanoma cell lines were obtained from American Type Culture Cell (ATCC). The cells were cultured in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin and 10 mM

HEPES. The cell cultures were maintained at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere and pH 7.4. Once the cells reached 90% of confluence, a cell suspension was obtained by trypsinization. In all experiments, viable cells were checked in the beginning of the experiment by Trypan Blue exclusion.

4.4.3. Cytotoxicity

The cytotoxic effect of synthetic hydroxychalcones was evaluated using an MTT assay. Briefly, 1×10^4 cells/well were incubated for 72 h at 37 °C, in triplicate, with compounds dissolved in DMSO (0.1% final concentration) and diluted with culture medium to their final concentrations, in 96-well microplates. After the incubation time, the cells were washed with new culture medium and 10 μ L MTT (5 mg/mL) were added followed by 3 h of incubation at 37 °C. The precipitated formazan was dissolved in 100 μ L of acid isopropanol solution (isopropanol containing HCl 0.04 M) and the absorbance was measured at 540 nm using microwell system reader (Organon Teknika, Belgium). The cells were incubated with the hydroxychalcones in a concentration range of 0–40 μ M, following with MTT assay. The IC₅₀ values (a concentration that produces 50% reduction of viable cell number) were calculated from the concentration–response curves. The cell viability was checked in the beginning of experiment by Trypan Blue exclusion.

4.4.4. DNA fragmentation analysis by gel electrophoresis

Briefly, 5×10^5 cells/well were incubated for 24 h with compounds dissolved in DMSO (0.1% final concentration) and diluted with culture medium to final concentrations (the IC₅₀ for cell viability of each compound). To isolate DNA fragments, the cells were harvested and washed twice with cold phosphate-buffered saline (PBS). Cell pellets were then incubated in a lyses buffer containing EDTA 10 mM, Tris–HCl 50 mM, at pH 8.0, NP-40 – 0.25%, proteinase K 0.5 g/L at 50 °C for 2 h. The DNA was then precipitated with 2.5 vol of ethanol–NaCl at –25 °C overnight and dried in air. After washing with ice-cold 70% ethanol, the pellets were then dissolved in TE buffer containing Tris–HCl 10 mM, at pH 8.0, EDTA 1 mM and RNase A 0.6 mg/mL and incubated at 37 °C for 1 h. DNA solutions were then separated in agarose gels 1.5%, stained with ethidium bromide and visualized by 2UV Transilluminator (MacroVue UV-20 Hoefer) for ladder formation.

4.4.5. Bioluminescent assay for ATP

The amount of intracellular ATP was determined by bioluminescent assay measuring the light output of the luciferin–luciferase reaction. Approximately 3×10^5 cells were incubated in the presence of hydroxychalcones at different concentrations then pelleted and extracted with 40 μ L of trichloroacetic acid 1.25%. The cell extracts were kept on ice for 30 min and neutralized with 20 μ L of Tris–acetate 1 M, at pH 7.5. After centrifugation, the supernatants were diluted with the same buffer ($\times 4$) and used for ATP quantification.

4.4.6. Mitochondrial glutathione measurement

Mitochondria enriched preparation was obtained by centrifugation [40]. Total glutathione (GSH + GSSG, reduced and disulphide forms, respectively) was measured through the glutathione reductase method [41]. Approximately 3×10^5 cells were washed in PBS and homogenized in a buffer containing Tris–sacrose 10 mM/250 mM, resuspended in 100 μ L chilled Milli-Q water containing EDTA 1 mM and sonified for 10 s. Then, 20 μ L of each homogenate were transferred to a 96-well plate followed by addition of 180 μ L of the reaction medium containing DTNB 75 μ M; NADPH 120 μ M, glutathione reductase 1 U/mL and EDTA 10 mM in phosphate buffer 100 mM, at pH 7.4. A standard curve was made with GSH (0.001–1 μ M). The absorbance was measured immediately and then every minute during 5 min at 412 nm using a Microwell Systems

(Organon Teknika). Values were expressed as percentage of control GSH values.

4.4.7. Statistical analysis

The statistical program GraphPad Prism® 4.0 Windows (GraphPad software, Inc., San Diego, CA, 2003) [42] was used to calculate the IC₅₀ and the statistical significance. The results were presented as mean \pm S.E.M. of triplicates from three independent experiments. Statistical significance was assessed by ANOVA followed by Bonferroni's *t*-test, *p* values <0.05 were taken as statistically significant.

Acknowledgments

This research was supported by grants and fellowships from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Pessoal de Nível Superior) and FAPESC (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Santa Catarina). This work is part of the thesis of Andréia L.F. Navarini and Alessandra Mascarello, who are M.Sc. students in Pharmacy and Chemistry, respectively. We would like to thank the Department of Chemistry and the Hospital of the Universidade Federal de Santa Catarina for some facilities.

References

- [1] WHO. World Health Organization, Available at: <www.who.int/cancer>, Accessed in 30 March 2008.
- [2] L.Y. Xu, J. Koo, *Int. J. Dermatol.* 45 (2006) 1275–1283.
- [3] I.J. Fidler, *Cancer Res.* 38 (1978) 2651–2660;
- [4] I.J. Fidler, *Cancer Res.* 35 (1975) 218–224.
- [5] Z.F.O. Freitas, E.G. Rodrigues, V. Oliveira, A.K. Carmona, L.R. Travassos, *Melanoma Res.* 14 (2004) 333–344.
- [6] M.F. Avril, S. Aamdal, J.J. Grob, A. Hauschild, P. Mohr, J.J. Bonerandi, M. Weichenthal, K. Neuber, T. Bieber, K. Gilde, V.G. Porta, J. Fra, J. Bonneterre, P. Saiag, D. Kamanabrou, H. Pehamberger, J. Suflarsky, J.L.G. Larriba, A. Scherrer, Y. Menu, *J. Clin. Oncol.* 22 (2004) 1118–1125.
- [7] L.M. Ni, C.Q. Meng, J.A. Sikorski, *Expert Opin. Ther. Pat.* 14 (2004) 1669–1691.
- [8] M. Kobori, K. Iwashita, H. Shinmoto, T. Tsushida, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63 (1999) 719–725.
- [9] O. Sabzevari, G. Galati, M.Y. Moridani, A. Siraki, P.J.O. Brien, *Chem. Biol. Interact.* 148 (2004) 57–67.
- [10] K. Iwashita, M. Kobori, K. Yamaki, T. Tsushida, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64 (2000) 1813–1820.
- [11] M. Cabrera, M. Simoens, G. Falchi, M.L. Lavaggi, O.E. Piro, E.E. Castellano, A. Vidal, A. Azqueta, A. Monge, A.L. Ceráin, G. Sagrera, G. Seoane, H. Cerecetto, M. González, *Bioorg. Med. Chem.* 15 (2007) 3356–3367.
- [12] Y.L. Hsu, P.L. Kuo, C.C. Lin, *Life Sci.* 77 (2005) 279–292.
- [13] Y.C. Liu, C.W. Hsieh, C.C. Wu, B.S. Wung, *Life Sci.* 80 (2007) 1420–1430.
- [14] Y.M. Lin, Y. Zhou, M.T. Flavin, L.M. Zhou, W. Nie, F.C. Chen, *Bioorg. Med. Chem.* 10 (2002) 2795–2802.
- [15] K. Yamamoto, H. Kakegawa, H. Ueda, H. Matsumoto, T. Sudo, T. Miki, T. Satoh, *Planta Med.* 58 (1992) 389–393.
- [16] C. Zhan, J. Yang, *Pharmacol. Res.* 53 (2006) 303–309.
- [17] M. Liu, P. Wilairat, S.L. Croft, A.L. Tan, M.L. Go, *Bioorg. Med. Chem.* 11 (2003) 2729–2738.
- [18] P. Boeck, C.A.B. Falcão, P.C. Leal, R.A. Yunes, V. Cechinel, E.C. Torres-Santos, B. Rossi-Bergamann, *Bioorg. Med. Chem.* 14 (2006) 1538–1545.
- [19] S.W. Lowe, H.E. Ruley, T. Jacks, D.E. Housman, *Cell* 74 (1993) 957–967.
- [20] I.M. Ghobrial, T.E. Witzig, A.A. Adjei, *CA Cancer J. Clin.* 55 (2005) 178–194.
- [21] N. Dias, C. Bailly, *Biochem. Pharmacol.* 70 (2005) 1–12.
- [22] V.P. Skulachev, *Apoptosis* 11 (2006) 473–485.
- [23] J.M. Garland, A. Halestrap, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 4680–4688.
- [24] L.H. Lash, *Chem. Biol. Interact.* 163 (2006) 54–67.
- [25] J. Kluzza, A. Lansiaux, N. Watzet, M.P. Hildebrand, S. Léonce, A. Pierré, J.A. Hickman, C. Bailly, *Biochem. Pharmacol.* 63 (2002) 1443–1452.
- [26] T. Ozben, *FEBS Lett.* 580 (2006) 2903–2909.
- [27] P. Cos, M. Calomme, J.B. Sindambiwe, T. De Bruyne, K. Cimanga, L. Pieters, A.J. Vlietinck, D. Vanden-Berghe, *Planta Med.* 67 (2001) 515–519.
- [28] P. Cos, P. Rajan, I. Vedernikova, M. Calomme, L. Pieters, A.J. Vlietinck, K. Augustyns, A. Haemers, D. Vanden Berghe, *Free Radic. Res.* 36 (2002) 711–716.
- [29] A.H. Wyllie, J.F. Kerr, A.R. Currie, *Int. Rev. Cytol.* 68 (1980) 251–306.
- [30] J. Cao, Y. Liu, L. Jia, H.M. Zhou, Y. Kong, G. Yang, L.P. Jiang, Q.J. Li, L.F. Zhong, *Free Radic. Biol. Med.* 43 (2007) 968–975.
- [31] W.P. Hu, H.S. Yu, P.J. Sung, F.Y. Tsai, Y.K. Shen, L.S. Chang, J.J. Wang, *Chem. Res. Toxicol.* 20 (2007) 905–912.
- [32] K.M. Regula, K. Ens, L.A. Kirshenbaum, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 35 (2003) 559–567.
- [33] R. Kachadourian, B.J. Day, *Free Radic. Biol. Med.* 41 (2006) 65–76.

- [33] C. Garcia-Ruiz, J.C. Fernández-Checa, *Gastroenterol. Hepatol.* 3 (2006) 3–6.
- [34] K.B.G. Torrsell (Ed.), *Natural Product Chemistry*, Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm, 1997.
- [35] V.F. Cechinel, Z.R. Vaz, L. Zunino, J.B. Calixto, R.A. Yunes, *Eur. J. Med. Chem.* 31 (1996) 833–839.
- [36] S.P. Hollinshead, *Tetrahedron Lett.* 51 (1996) 9157–9160.
- [37] G.R. Subbanwad, Y.B. Vibhute, *Asian J. Chem.* 5 (1993) 352–357.
- [38] K.K. Hsu, M. Hung, F.C. Chen, *Taiwan Kexue* 13 (1959) 92–94.
- [39] U. Bora, G. Bose, M.K. Chaudhuri, S.S. Dhar, R. Gopinath, A.T. Khan, B.K. Patel, *Org. Lett.* 2 (2000) 247–249.
- [40] J.B. Schenkman, D.L. Cinti, *Methods Enzymol.* 52 (1978) 83–89.
- [41] F. Tietze, *Anal. Biochem.* 27 (1969) 502–522.
- [42] H.J. Motulsky, A. Christopoulos (Eds.), *GraphPad Software Inc.*, 2003, pp. 257–275.



Synthetic chalcones as efficient inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase PtpA

Louise Domeneghini Chiaradia^{a,†}, Alessandra Mascarello^{a,†}, Marcela Purificação^b, Javier Vernal^b, Marlon Norberto Sechini Cordeiro^a, María Emilia Zenteno^b, Andréa Villarino^b, Ricardo José Nunes^a, Rosendo Augusto Yunes^a, Hernán Terenzi^{b,*}

^a Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

^b Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Campus Trindade, CEP: 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 August 2008

Revised 25 September 2008

Accepted 29 September 2008

Available online 5 October 2008

Hernán Terenzi dedicates this paper to the memory of his mentor, colleague and friend, Pr. Mario Zakin – Institut Pasteur – Paris.

Keywords:

Chalcones
Tuberculosis
PtpA

ABSTRACT

In the search for lead compounds for new drugs for tuberculosis, the activity of 38 synthetic chalcones were assayed for their potential inhibitory action towards a protein tyrosine phosphatase from *Mycobacterium tuberculosis* – PtpA. The compounds were obtained by aldolic condensation between aldehydes and acetophenones, under basic conditions. Five compounds presented moderate or good activity. The structure–activity analysis reveals that the predominant factor for the activity is the molecule planarity/hydrophobicity and the nature of the substituents.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Mycobacterium tuberculosis is responsible for tuberculosis infection, and the emergence in recent years of multi-resistant strains has made it a serious challenge in terms of international public health. Annually 10 million new cases of tuberculosis appear and about two million people die each year as a consequence of the disease.¹

As generally described for intracellular pathogens, mycobacterial infection promotes the secretion of proteins by the pathogen, especially phosphatases, which contribute to the disease installation. For instance, *M. tuberculosis* secretes PI3P-phosphatase which inhibits phagosomal maturation²; *Yersinia pseudotuberculosis*, once in the host cell, releases phosphatase YopH, which inhibits bacterial phagocytosis by dephosphorylation of Cas and other focal adhesion proteins.^{3,4} Similarly, the phosphatase SptP of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, is directly responsible for the reversal of the actin cytoskeletal changes induced after bacteria internalization into non-phagocytic cells.⁵

Tyrosine phosphatases (PTPs) constitute a family of closely related key regulatory enzymes that, in conjunction with protein-tyrosine kinases, control the state of tyrosine phosphorylation in

a cellular context. Phosphotyrosine appears as a critical cell-signaling element and PTP activity is essential to control appropriate responses.⁶ *M. tuberculosis* has two phosphotyrosine phosphatases (PTPs), PtpA and PtpB,⁷ and has no tyrosine kinase genes annotated in its genome sequence database,⁸ suggesting that the targets of these two phosphatases may be present in the host cell, and involved in host–pathogen interactions.

It was recently demonstrated that PtpA is secreted by *M. tuberculosis* in infected human macrophages,⁹ and it was also very elegantly shown that VPS33B, a regulator of membrane fusion, is a PtpA substrate. This target, VPS33B, when dephosphorylated by PtpA inhibits phagosome–lysosome fusion, a process arrested in mycobacterial infections. Considered together, these data, demonstrate that PtpA is essential for mycobacterial intracellular persistence, emerging as a promising target for therapeutic intervention.

Chalcones are essential intermediate compounds in flavonoid biosynthesis in plants. Several reports have documented active biological properties of natural and synthetic chalcones.^{10,11} Many studies have demonstrated antileukemic,^{12,13} antitumoral,^{14–20} antiinflammatory,^{21,22} anti-ulcerogenic,²³ antioxidant,^{14,24,25} anti-malarial,²⁶ antileishmaniosis^{26,27} and hypotensive²⁸ activities for chalcones, besides other pharmacological effects. Chalcones are also cited as being antibacterial,²⁹ including *M. tuberculosis*, by Lin et al.,³⁰ however, no information on the target of action of the com-

* Corresponding author. Tel.: +55 48 3721 6919; fax: +55 48 3721 9672.

E-mail address: hterenzi@ccb.ufsc.br (H. Terenzi).

† These authors contributed equally to this work.

pounds is available. Nayyar and Jain (2005) cited chalcones as agents with chemotherapeutic potential against *M. tuberculosis*.³¹

The main objective of this study is the search for a specific inhibitor of the protein tyrosine phosphatase PtpA. We synthesized and characterized 38 synthetic chalcones, which were assayed in vitro using a recombinant purified PtpA from *M. tuberculosis*.

The chalcones were prepared by aldolic condensation as shown in Figure 1. Chalcones **1** and **2** are derived from xanthoxyline; chal-

cones of the series **3** are derived from 2,4,6-trimethoxyacetophenone; chalcones of the series **4** are derived from 1-naphthaldehyde; chalcones of the series **5** are derived from 2-naphthaldehyde; and the chalcones of the series **6** are derived from 3,4-methylenedioxybenzaldehyde; the obtained yields were between 36% and 97% (Table 1).

The structures of all compounds, including those still not published (**4c**, **4f**, **4l**, **5c**, **5i**, **6i** and **6c**), were confirmed by chemical

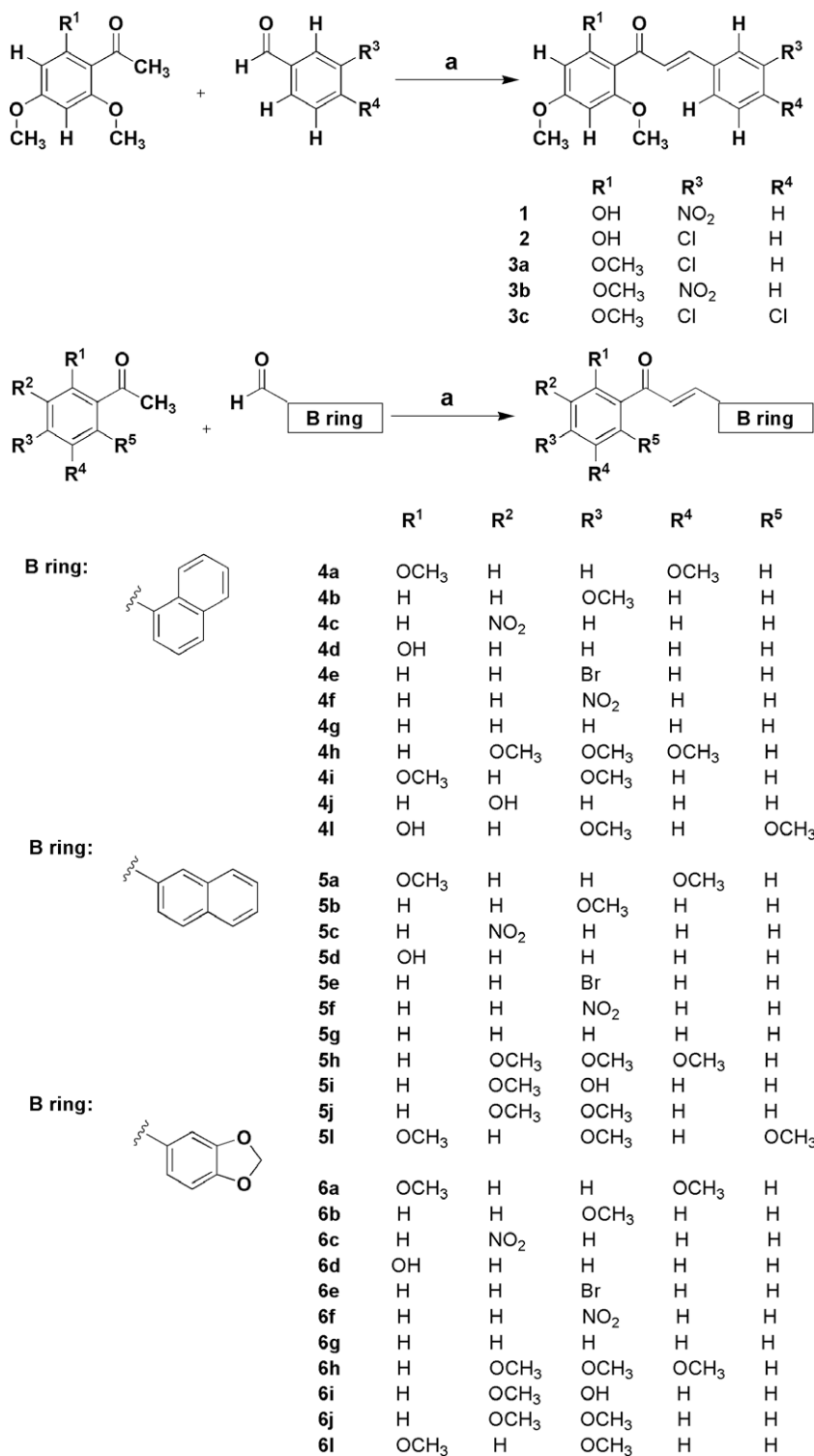


Figure 1. Synthesis of the chalcones. (a) Methanol, KOH 50%, rt, 24 h.

Table 1

Yields of the synthesis and activity of the *Mycobacterium tuberculosis* PtpA in the presence of 25 μM of the chalcones.

Chalcone	Yield (%)	Activity of the enzyme PtpA (% \pm error)	Chalcone	Yield (%)	Activity of the enzyme PtpA (% \pm error)
1	51	92 \pm 15	5d	66	74.6 \pm 7
2	36	87 \pm 21	5e	88	89.2 \pm 6
3a	91	98 \pm 5	5f	73	89 \pm 1
3b	43	100 \pm 4	5g	95	88 \pm 33
3c	89	99 \pm 12	5h	97	109 \pm 6
4a	65	54 \pm 7	5i	39	61 \pm 23
4b	58	82.4 \pm 7	5j	96	31.5 \pm 18
4c	54	88 \pm 6	5l	88	104 \pm 13
4d	57	24 \pm 15	6a	74	91.3 \pm 9
4e	63	75 \pm 17	6b	77	94 \pm 4
4f	57	82 \pm 5	6c	40	74 \pm 12
4g	65	62.7 \pm 4	6d	62	103 \pm 7
4h	70	102 \pm 1	6e	76	86 \pm 10
4i	59	80 \pm 10	6f	85	80.5 \pm 17
4j	51	79.5 \pm 9	6g	66	103 \pm 8
4l	58	84.4 \pm 8	6h	88	82.4 \pm 7
5^a	83	42.5 \pm 7	6i	47	80 \pm 23
5b	90	81.5 \pm 13	6j	72	99 \pm 10
5c	71	84 \pm 3	6l	95	91.9 \pm 12

identification data using ^1H NMR, ^{13}C NMR, IR and elementary analysis.

The PtpA coding region was subcloned from *M. tuberculosis* genomic DNA, and the expression vector pET28a-PtpA was used to produce recombinant His-tagged protein as previously described.³²

Initial assays were performed with a single compound concentration (25 μM) to assess the potential of the compounds as inhibitors.³³ The activity of PtpA in vitro in the presence of the compounds was determined as previously described³⁴ and is shown in Table 1.

It can be observed from Table 1 that compounds **4a**,³⁷ **4d**,³⁶ **5a**,³⁹ **5i**³⁵ and **5j**³⁸ show important inhibitory activity towards PtpA. The data given in Table 1 indicate that the change in the substituent of the phenyl A ring affects the activity of the enzyme. When the B ring is substituted for 1 or 2-naphthyl groups, the compounds generally show potential bioactivity, such as **5i**, **4a**, **5a**, **5j** and **4d**, decreasing the relative activity of the enzyme to 61.0%, 54.0%, 42.5%, 31.5% and 24.0%, respectively, at a chalcone final concentration of 25 μM . We can observe a relationship, between the substituents that increase the electronic density of the A ring, such as methoxyl, and a 1 or 2-naphthyl group in the B ring. To assess the activity of these compounds, further assays were carried out and their IC_{50} values in relation to mycobacterial PtpA (5–60 μM of compound) were established and are given in Table 2.

Chalcones where the B ring is 3,4-methylenedioxy (all series **6**) and chalcones with electron acceptor substituents in the B ring (**1**, **2**, **3a**, **3b** and **3c**), or groups that decrease the electronic density of the A ring, such as bromo, chloro and nitro (compounds **1**, **2**, **3a**, **3b**, **3c**, **4c**, **4e**, **4f**, **5c**, **5e**, **5f**, **6c**, **6e** and **6f**), present a low inhibition of PtpA activity.

The compounds with the phenyl B-ring substituted for naphthyl groups and with three methoxyl groups (**4h**, **5l** and **5h**), without substituents (**4g** and **5g**) or with only one methoxyl or hydroxyl group in the A ring (**4b**, **4j**, **5b** and **5d**), did not show satisfactory reduction of the activity of PtpA, with the exception of **4d**. Compounds that exhibit similar changes in the molecule due to the substituents in position 2 and 6 of the A ring (**4l** and **5l**) also exhibit low PtpA inhibitory activity.

In Table 2 the activity of chalcones when the B ring is a naphthyl group and two electron-donors substituents are present in the A ring is depicted. We now observed that the inhibitory effect is considerably increased. Highest inhibitory activity was achieved when

Table 2

IC_{50} of the compounds more actives against *Mycobacterium tuberculosis* PtpA, assayed in concentrations of 5–60 μM .

Chalcone	Ring A	Ring B	IC_{50} (μM \pm error)
5i	2-OCH ₃ -4-OH	2-Naphtyl	53.7 \pm 1.3
4d	2-OH	1-Naphtyl	50.2 \pm 2.1
4^a	2,5-OCH ₃	1-Naphtyl	39.5 \pm 1.1
5j	3,4-OCH ₃	2-Naphtyl	23.1 \pm 1.6
5a	2,5-OCH ₃	2-Naphtyl	8.4 \pm 0.9

the substituents were 2,5-dimethoxy in the A ring and 2-naphthyl in the B ring, with an excellent IC_{50} of 8.4 μM (compound **5a**). Compound **5j** also with two methoxy groups in the A ring (3,4-dimethoxy) and a 2-naphthyl group in the B ring, had an IC_{50} value of 23.1 μM . These results permit us to observe that the substitution of the phenyl group for 2-naphthyl group in the B ring, seems to be a predominant factor to reduce the activity of PtpA, when associated with the ideal position of the methoxyl groups in the A ring. Compound **4a**, which has two methoxyl groups in A ring, and the phenyl group substituted by 1-naphthyl group as B ring, had relatively moderate activity against the enzyme, with an IC_{50} value of 39.5 μM . The moderate activity observed for compound **4d**, with an IC_{50} value of 50.2 μM , may be due to the presence of the hydroxyl group in the A ring that may eventually mediate hydrogen bonding with the enzyme.

On analyzing the relationships between structure and activity it was observed that the position and nature of the substituents in A ring, probably the hydrophobicity or planarity of the naphthyl groups in B rings are predominant factors to inhibition of PtpA. The presence of substituents that increase the electronic density of the A ring appear to be necessary for the activity of the chalcones.

In summary, from the 38 assayed chalcones, the synthetic compound, **5a** is highly effective against *M. tuberculosis* PtpA and **4a**, **4d**, **5i** and **5j** are moderately effective. These results encourage us to elucidate the possible binding mode of these compounds to PtpA.

Acknowledgments

This research was supported by grants and fellowships from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), MCT, FAPESC and CAPES (Coordenação de Pessoal de Nível Superior). This work is part of the theses of L.D. Chiaradia and A. Mascarello, who are doctoral and master's students in chemistry. We like to thank the Universidade Federal de Santa Catarina, Department of Chemistry and Department of Biochemistry for the equipment facilities.

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.bmcl.2008.09.105](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.09.105).

References and notes

- Maher, D.; Raviglione, M. *Clin. Chest Med.* **2005**, *26*, 167.
- Hestvik, A. L.; Hmama, Z.; Av-Gay, Y. *Infect. Immun.* **2003**, *71*, 5514.
- Ivanov, M. I.; Stuckey, J. A.; Schubert, H. L.; Saper, M. A.; Bliska, J. B. *Mol. Microbiol.* **2005**, *55*, 1346.
- Black, D. S.; Bliska, J. B. *EMBO J.* **1997**, *16*, 2730.
- Fu, Y.; Galan, J. E. *Nature* **1999**, *401*, 293.
- Bishop, A. C.; Zhang, X. Y.; Lone, A. M. *Methods* **2007**, *42*, 278.
- Zhang, Z. Y. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 416.
- Cole, S. T.; Brosch, R.; Parkhill, J.; Garnier, T.; Churcher, C.; Harris, D.; Gordon, S. V.; Eiglmeier, K.; Gas, S.; Barry, C. E., 3rd; Tekalia, F.; Badcock, K.; Basham, D.; Brown, D.; Chillingworth, T.; Connor, R.; Davies, R.; Devlin, K.; Feltham, T.; Gentles, S.; Hamlin, N.; Holroyd, S.; Hornsby, T.; Jagels, K.; Krogh, A.

- McLean, J.; Moule, S.; Murphy, L.; Oliver, K.; Osborne, J.; Quail, M. A.; Rajandream, M. A.; Rogers, J.; Rutter, S.; Seeger, K.; Skelton, J.; Squares, R.; Squares, S.; Sulston, J. E.; Taylor, K.; Whitehead, S.; Barrell, B. G. *Nature* **1998**, *393*, 537.
- Bach, H.; Papavinasundaram, K. G.; Wong, D.; Hmama, Z.; Av-Gay, Y. *Cell Host Microbes* **2008**, *3*, 316.
 - Dimmock, J. R.; Elias, D. W.; Beazely, M. A.; Kandepu, N. M. *Curr. Med. Chem.* **1999**, *6*, 1125.
 - Ni, L.; Meng, Q. C.; Sikorski, J. A. *Expert Opin. Ther. Patents* **2005**, *14*, 1669.
 - Saydam, G.; Aydin, H. H.; Sahin, F.; Kucukoglu, O.; Erციyas, E.; Terzioglu, E.; Buyukkececi, F.; Omay, S. B. *Leuk. Res.* **2003**, *27*, 57.
 - Rao, Y. K.; Fang, S. H.; Tzeng, Y. M. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 2679.
 - Go, M. L.; Wu, X.; Liu, X. L. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 483.
 - Won, S. J.; Liu, C. T.; Tsao, L. T.; Weng, J. R.; Ko, H. H.; Wang, J. P.; Lin, C. N. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 103.
 - Takahashi, T.; Baba, M.; Nischino, H.; Okuyama, T. *Cancer Lett.* **2006**, *231*, 319.
 - LeBlanc, R.; Dickson, J.; Brown, T.; Stewart, M.; Pati, H. N.; VanDerveer, D.; Arman, H.; Harris, J.; Pennington, W.; Holt, H. L.; Lee, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 6025.
 - Cabrera, M.; Somoens, M.; Falchi, G.; Lavaggi, M. L.; Piro, O. E.; Castellano, E. E.; Vidal, A.; Azqueta, A.; Monge, A.; Ceràin, A. L.; Sagrera, G.; Seoane, G.; Cerecetto, H.; González, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 3356.
 - Kachadourian, R.; Day, B. J. *Free Radic. Biol. Med.* **2006**, *41*, 65.
 - Hsu, Y. L.; Kuo, P. L.; Lin, C. C. *Life Sci.* **2005**, *77*, 279.
 - Liu, Y. C.; Hsieh, C. W.; Wu, C. C.; Wung, B. S. *Life Sci.* **2007**, *80*, 1420.
 - Ko, H. H.; Tsao, L. T.; Yu, K. L.; Liu, C. T.; Wang, J. P.; Lin, C. N. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 105.
 - Yamamoto, K.; Kakegawa, H.; Ueda, H.; Matsumoto, H.; Sudo, T.; Miki, T.; Satoh, T. *Planta Med.* **1992**, *58*, 389.
 - Anto, R. J.; Sukumran, K.; Kuttan, G.; Rao, M. N. A.; Subbaraju, V.; Kuttan, R. *Cancer Lett.* **1995**, *97*, 33.
 - Zhan, C.; Yang, J. *Pharmacol. Res.* **2006**, *53*, 303.
 - Liu, M.; Wilairat, P.; Croft, S. L.; Tan, A. L. C.; Go, M. L. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 2729.
 - Boeck, P.; Falcão, C. A. B.; Leal, P. C.; Yunes, R. A.; Cechinel, V.; Torres-Santos, E. C.; Rossi-Bergamann, B. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 1538.
 - Ogawa, H.; Okada, Y.; Kamisako, T.; Baba, K. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2007**, *34*, 238.
 - Pappano, N. B.; Puig de Centorbi, O.; Debattista, N. B.; Calleri de Milan, C.; Borkowski, E. J.; Ferretti, F. H. *Rev. Argent. Microbiol.* **1985**, *17*, 27.
 - Lin, Y. M.; Zhou, Y.; Flavin, M. T.; Zhou, L. M.; Nie, W.; Chen, F. C. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 2795.
 - Nayyar, A.; Jain, R. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 1873.
 - Purificação, M.; Razzera, G.; Terenzi, H.; Villarino, A., unpublished work.
 - Manger, M.; Scheck, M.; Prinz, H.; von Kries, J. P.; Langer, T.; Saxena, K.; Schwalbe, H.; Fuerstner, A.; Rademann, J.; Waldmann, H. *Chem. Bio Chem.* **2005**, *6*, 1749.
 - Measurement of phosphatase activity and inhibition:* The phosphatase assays were carried out in 96-well plates containing 5 μ l of diluted compound or solvent (100% DMSO) in each well. After dilution in PtpA buffer (25 mM bis Tris-HCl [pH 8.0], 20 mM Imidazol [pH7.0], 40 mM DL-dithiothreitol, 40 mM p-nitrophenyl phosphate [pNPP]), 2 μ l of recombinant PtpA (1.0 μ g/ μ l) diluted in PtpA buffer was added in order to start the reaction. After 20 min at 37 °C, the absorbance was measured (at 410 nm with readings every 2 min) on an ELISA plate spectrophotometer (TECAN). Negative controls were performed in the absence of enzyme, and positive controls were carried out in the presence of enzyme with DMSO 100% in place of the compound. The percentage of activity was calculated by the average of two experiments carried out in triplicate, and also the IC₅₀ values were determined in triplicate in two independent experiments.
 - Compound 4a** – (2E)-1-(2',5'-dimethoxyphenyl)-3-(1-naphthyl)-2-propen-1-one. Yellow solid, mp 89–90 °C. ¹H NMR (CDCl₃) δ 3.88 (s, 3H, OCH₃), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 6.96 (d, 1H, J = 8.2 Hz, H_{4'}), 7.06 (dd, J = 8.0 Hz, 1H, H₄), 7.49–7.59 (m, 5H, H₃, H₅, H₆, H₇, H₈), 7.85 (d, 1H, J = 7.2 Hz, H_{3'}), 7.89 (d, 1H, J = 16.0 Hz, H α), 7.89 (s, 1H, H_{6'}), 8.24 (d, 1H, J = 8.0 Hz, H₂), 8.50 (d, 1H, J = 16.0 Hz, H β). ¹³C NMR (CDCl₃) δ 56.12 (OCH₃), 56.72 (OCH₃), 113.60 (C_{3'}), 114.72 (C_{6'}), 119.71 (C_{4'}), 123.85 (C α), 125.40 (C_{1'}), 125.72 (C₁₀), 126.45 (C₃), 127.06 (C₉), 128.96 (C₅), 129.69 (C₄), 129.86 (C₂), 130.72 (C₆), 132.01 (C_{2'}), 132.67 (C₇), 133.96 (C₁), 140.20 (C β), 152.97 (C_{5'}), 153.90 (C_{2'}), 192.45 (C=O). IR ν_{\max} /cm⁻¹ 1657 (C=O), 1588 (C=C), 1223, 1043 (C–O), 2947, 1493, 977, 807, 787 (KBr). Anal. Calcd for C₂₁H₁₈O₃: C, 79.23; H, 5.70. Found: C, 79.24; H, 6.11. Yield: 65%.
 - Compound 4d** – (2E)-1-(2'-hydroxyphenyl)-3-(1-naphthyl)-2-propen-1-one: Yellow solid, mp 106–108 °C. ¹H NMR (CDCl₃) δ 6.97 (dd, 1H, J = 7.4 Hz, H_{5'}), 7.06 (d, 1H, J = 8.4 Hz, H_{3'}), 7.51–7.62 (m, 4H, H₃, H₆, H₇, H_{4'}), 7.76 (d, 1H, J = 15.2 Hz, H α), 7.90–7.99 (m, 4H, H_{6'}, H₄, H₅, H₈), 8.29 (d, 1H, J = 8.4 Hz, H₂), 8.79 (d, 1H, J = 15.2 Hz, H β), 12.88 (s, 1H, OH). ¹³C NMR (CDCl₃) δ 118.93 (C_{3'}), 119.17 (C_{5'}), 122.99 (C α), 123.67 (C₂), 125.59 (C_{1'}), 125.68 (C_{1'}), 126.67 (C₃), 127.41 (C₆), 129.07 (C₄, C₅), 130.00 (C₉, C_{6'}), 131.48 (C₁₀), 136.74 (C₁, C_{4'}), 142.66 (C β), 163.93 (C_{2'}), 194.12 (C=O). IR ν_{\max} /cm⁻¹ 3451, 1635, 1351, 1576, 1203, 1015, 3047, 1435, 1162, 972, 760 (KBr). Anal. Calcd for C₁₉H₁₄O₂: C, 83.19; H, 5.14. Found: C, 83.88; H, 5.18. Yield: 57%.
 - Compound 5a** – (2E)-1-(2',5'-dimethoxyphenyl)-3-(2-naphthyl)-2-propen-1-one. Light yellow, mp 120–121 °C. ¹H NMR (CDCl₃) δ 3.83 (s, 3H, o-OCH₃), 3.89 (s, 3H, m-OCH₃), 6.97 (d, 1H, J = 8.0 Hz, H_{4'}), 7.06 (d, 1H, J = 8.0 Hz, H_{3'}), 7.23 (s, 1H, H_{6'}), 7.51–7.53 (m, 2H, H₆, H₇), 7.53 (d, 1H, J = 16.0 Hz, H α), 7.75 (d, 1H, J = 8.0 Hz, H₃), 7.81 (d, 1H, J = 16.0 Hz, H β), 7.83–7.88 (m, 3H, H₄, H₅, H₈), 7.99 (s, 1H, H₁). ¹³C NMR (CDCl₃) δ 55.89 (o-OCH₃), 56.56 (m-OCH₃), 109.77 (C_{6'}), 113.42 (C_{3'}), 114.40 (C_{4'}), 119.17 (C_{1'}), 123.76 (C α), 126.68 (C₃), 127.07–127.23 (C β , C₇), 127.78 (C₅), 128.63 (C₈), 129.73 (C₁), 130.51 (C₄), 132.66 (C₁₀), 133.36 (C₉), 134.27 (C₂), 143.46 (C β), 152.58–153.64 (C_{2'}, C_{5'}), 192.48 (C=O). IR ν_{\max} /cm⁻¹ 1644 (C=O), 1570 (C=C), 1336, 1130 (C–O), 3012, 2946, 2837, 1508, 1227, 1005, 693 (Ar) (KBr). Anal. Calcd for C₂₁H₁₈O₃: C, 79.23; H, 5.70. Found: C, 79.69; H, 6.00. Yield: 83%.
 - Compound 5i** – (2E)-1-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)-3-(2-naphthyl)-2-propen-1-one: Light yellow solid, mp: 166–168 °C. ¹H NMR (CDCl₃) δ 4.01 (s, 3H, OCH₃), 6.10 (s, 1H, OH), 7.02 (d, 1H, J = 8.0 Hz, H_{5'}), 7.29 (s, 1H, H_{2'}), 7.52–7.54 (m, 1H, H_{6'}), 7.66–7.72 (m, 3H, H₃, H₆, H₇), 7.83 (d, 1H, J = 15.6 Hz, H α), 7.80–7.87 (m, 3H, H₄, H₅, H₈), 7.97 (d, 1H, J = 15.6 Hz, H β), 8.05 (s, 1H, H₁). ¹³C NMR (DMSO-d₆) δ 56.37 (m-OCH₃), 110.74 (C_{2'}), 114.05 (C_{5'}), 121.99 (C₃), 123.96 (C α), 126.97 (C_{6'}), 127.51 (C₆), 128.03 (C₇), 128.85 (C₁), 128.91 (C₈), 130.68 (C₄, C₅), 131.33 (C_{1'}), 132.81 (C₁₀), 133.63 (C₉), 134.54 (C₂), 144.30 (C β), 147.15 (C_{4'}), 150.64 (C_{3'}), 188.74 (C=O). IR ν_{\max} /cm⁻¹ 3265 (OH), 1643, 1202 (C=O), 1280, 1025 (C–O), 1563 (C=C), 2950, 2835, 1522, 1445, 970, 844, 816, 779 (Ar) (KBr). Anal. Calcd for C₂₀H₁₆O₃: C, 78.93; H, 5.30. Found: C, 78.86; H, 5.76. Yield: 39%.
 - Compound 5j** – (2E)-1-(3',4'-dimethoxyphenyl)-3-(2-naphthyl)-2-propen-1-one: Light yellow solid, mp 168–170 °C. ¹H NMR (CDCl₃) δ 3.97 (s, 3H, OCH₃), 3.98 (s, 3H, OCH₃), 6.94 (d, 1H, H_{6'}), 7.50–7.53 (m, 2H, H₆, H₇), 7.65 (s, 1H, H₁), 7.67 (d, 1H, J = 15.6 Hz, H α), 7.73 (d, 1H, H_{5'}), 7.81–7.87 (m, 4H, H₃, H₄, H₅, H₈), 7.95 (d, 1H, J = 15.6 Hz, H β), 8.02 (s, 1H, H_{2'}). ¹³C NMR (CDCl₃) δ 56.31 (m-e p-OCH₃), 110.23 (C_{5'}), 111.04 (C_{2'}), 121.99 (C α), 123.30 (C_{6'}), 123.93 (C₃), 126.97 (C₆), 127.52 (C₅), 128.02 (C₇), 128.90 (C₄, C₈), 130.70 (C₁), 131.60 (C_{1'}), 132.78 (C₁₀), 133.61 (C₉), 134.52 (C₂), 144.29 (C β), 149.50 (C_{3'}), 153.52 (C_{4'}), 188.76 (C=O). IR ν_{\max} /cm⁻¹ 1652 (C=O), 1583 (C=C), 1261, 1021 (C–O), 3008, 2935, 2841, 1510, 1448, 1415, 975, 920, 844, 810 (Ar) (KBr). Anal. Calcd for C₂₁H₁₈O₃: C, 79.23; H, 5.70. Found: C, 79.06; H, 6.14. Yield: 96%.