



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

**OBTENÇÃO DE CHALCONAS HETEROCÍCLICAS VIA
CONDENSAÇÃO DE CLAISEN-SCHMIDT E AVALIAÇÃO DO
SEU POTENCIAL COMO INIBIDORES DA ENZIMA YopH**

BRUNA GRAZIELE VOLTOLINI

Florianópolis
dezembro/2010

Bruna Grazielle Voltolini

**OBTENÇÃO DE CHALCONAS HETEROCÍCLICAS VIA
CONDENSAÇÃO DE CLAISEN-SCHMIDT E AVALIAÇÃO DO SEU
POTENCIAL COMO INIBIDORES DA ENZIMA YopH**

Relatório apresentado ao Departamento de Química
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial da disciplina de
Estágio Supervisionado II (QMC 5512)

Orientador: Dr. Santiago Francisco Yunes
Co-Orientadores: Dr. Ricardo José Nunes
: Dra. Louise Domeneghini Chiaradia

Florianópolis
12/2010

Bruna Grazielle Voltolini

**OBTENÇÃO DE CHALCONAS HETEROCÍCLICAS VIA
CONDENSAÇÃO DE CLAISEN-SCHMIDT E AVALIAÇÃO DO SEU
POTENCIAL COMO INIBIDORES DA ENZIMA YopH**

Profa. Dra. Inês Maria Costa Brighente
Coordenadora de Estágios do Curso de Química-Bacharelado

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Santiago Francisco Yunes
Orientador

Prof. Dr. Ricardo José Nunes
Co-Orientador

Dra. Louise Domeneghini Chiaradia
Co-Orientadora

Prof. Dr. Miguel Soriano Balparda Caro

Prof. Dr. Vanderlei Gageiro Machado

Florianópolis
dezembro/2010

Dedico este trabalho à minha grande família.

Mais do que de palavras, esta página é feita de sentimentos!

Agradeço, carinhosamente:

Aos orientadores Prof. Dr. Santiago Francisco Yunes, Prof. Dr. Ricardo José Nunes e Dra. Louise Domeneghini Chiaradia, pela orientação, apoio e oportunidade.

Aos que colaboraram para que a parte biológica deste trabalho fosse feita, Prof. Dr. Hernán Terenzi e suas alunas Priscila Martins e Ângela Menegatti.

À central de Análises do Departamento de Química da UFSC pelas análises das chalconas.

À banca examinadora: Prof. Dr. Miguel Soriano Balparda Caro e Prof. Dr. Vanderlei Gageiro Machado, por aceitar o convite e pelas sugestões que farão este trabalho melhor.

E à minha grande, enorme, família:

À família do LEAT (Professor Ricardo, Marlon, Louise, Taisa, Alessandra e Professor Rosendo), que me “adotaram”, com muito carinho, nesse quase um ano, e que passaram, ainda mais, a fazer parte da minha vida, compartilhando conversas, dúvidas, refeições, sonos, sonhos, certezas e incertezas e muitas, muitas, mas muitas mesmo, emoções.

À família de amigos, especialmente ao Marlon, Jonas e Luiz, que me acompanharam nesses quatro anos de forma muito divertida, sendo o “truco” do meu dia-a-dia.

À “família da minha família”, tios, tias, primos e primas, que esperam ansiosamente a minha formatura desde o dia em que entrei na faculdade.

À minha “família de casa”, meu papai e minhas três mães (mãe, Tata da Fofa e Babum) que me deram todo o suporte necessário pra agüentar os “dias menos ensolarados”, fazendo da presença, seja pessoalmente ou por mensagens e pelas muitas ligações, um sol a parte e todo especial, que iluminou e aqueceu meus dias.

E a Quem me deu todas essas famílias e oportunidades.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	pag. 6
2	REVISÃO DA LITERATURA	pag.7
2.1	Química medicinal e desenvolvimento de fármacos	pag.7
2.2	Chalconas	pag.10
2.2.1	<i>Síntese de chalconas</i>	pag.11
2.2.2	<i>Chalconas heterocíclicas</i>	pag.13
2.2.3	<i>Atividade biológica de chalconas heterocíclicas</i>	pag.15
2.4	Proteína Tirosina Fosfatase YopH	pag.16
2.5	Peste	pag.17
3	OBJETIVOS	pag.18
3.1	Objetivo geral	pag.18
3.2	Objetivos específicos	pag.18
4	METODOLOGIA	pag.19
4.1	Síntese das chalconas heterocíclicas	pag.19
4.2	Teste biológico	pag.21
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	pag.22
5.1	Discussão da síntese das chalconas	pag.22
5.2	Discussão biológica	pag.37
6	CONCLUSÕES	pag.40
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	pag.41
8	ANEXOS	pag. 45

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	Esquema de Topliss para a otimização de substituintes aromáticos.	pag. 9
FIGURA 2	Núcleo fundamental das chalconas.	pag.11
FIGURA 3	Mecanismo da Condensação de Claisen-Schmidt seguida por desidratação básica.	pag.12
FIGURA 4	Maiores sucessos de vendas da indústria farmacêutica em 2009.	pag.14
FIGURA 5	Cetona aromática padrão da série de chalconas sintetizadas.	pag.15
FIGURA 6	Chalconas com estruturas tiofênicas.	pag.15
FIGURA 7	Estrutura tiofênica análoga a chalconas.	pag.15
FIGURA 8	Esquema de síntese das chalconas heterocíclicas.	pag.22
FIGURA 9	Cristais obtidos para os compostos H16, H24 e H29, respectivamente.	pag.25
FIGURA 10	Espectro de RMN ¹ H da chalcona H1.	pag.27
FIGURA 11	Espectro de RMN ¹ H da chalcona H29.	pag.28
FIGURA 12	Espectro de IV da chalcona H1.	pag.29
FIGURA 13	Espectro de IV da chalcona H2.	pag.30
FIGURA 14	Árvore de Decisão de Toplis, com os valores de porcentagem de inibição das chalconas .	pag.39

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1	Condições Reacionais das sínteses para obtenção das chalconas heterocíclicas.	pag. 20
TABELA 2	Relação de publicações na literatura e número de CAS das chalconas da série H	pag 23
TABELA 3	Rendimento das reações, massa molecular e ponto de fusão dos compostos obtidos.	pag 26
TABELA 4	Dados de RMN de ^1H das chalconas da série H derivadas da 2-acetil-5-cloro-tiofeno	pag. 31
TABELA 5	Dados de RMN de ^1H das chalconas da série H derivadas da 2-acetil-5-cloro-tiofeno	pag. 32
TABELA 6	Dados de RMN de ^1H das chalconas da série H derivadas da 2-acetil-5-cloro-tiofeno	pag. 33
TABELA 7	Dados de RMN de ^1H das chalconas da série H derivadas da 2-acetil-5-cloro-tiofeno	pag. 34
TABELA 8	Dados de RMN de ^1H das chalconas da série H derivadas da 2-acetil-5-cloro-tiofeno	pag. 35
TABELA 9	Dados de IV das chalconas da série H derivadas da 2-acetil-5-cloro-tiofeno	pag. 36
TABELA 10	Porcentagem de inibição da enzima YopH provocada pelas chalconas heterocíclicas, avaliadas em triplicata na concentração de 25 $\mu\text{mol/L}$.	pag. 37

LISTA DE ABREVIATURAS

μL – microlitro

μM – micromol/L

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CDCl₃ – Clorofórmio deuterado

cm - centímetro

DMSO – Dimetil Sulfóxido

DTT – _{DL}-ditiotreitól

Hz – Hertz

IV – Infravermelho

J – constante de acoplamento

LEAT – Laboratório Estrutura e Atividade

m/m – massa/massa

mg – miligrama

MHz – Mega Hertz

mL – mililitro

mM – milimol/L

mmol – milimol

nm – nanômetro

p-NPP – para-nitrofenilfosfato

ppm – parte por milhão

PTP – Proteína Tirosina Fosfatase

q.s.p – quantidade suficiente para

RMN ¹H - Ressonância Magnética Nuclear do isótopo de ¹H

TMS – Tetrametilsilano

YopH – Proteína Tirosina Fosfatase de *Yersinia* spp.

RESUMO

Em busca de compostos que possam se tornar novos medicamentos, desenvolveu-se uma série de vinte chalconas heterocíclicas, contendo o átomo de enxofre no anel ligado à carbonila, que foram sintetizadas pelo método de condensação de Claisen-Schmidt, obtendo-se rendimentos variados de aproximadamente 8 a 93%. Após serem devidamente caracterizadas por IV, RMN de ^1H e ponto de fusão, foi avaliado o potencial inibitório das moléculas frente à enzima YopH, uma proteína tirosina fosfatase secretada pela bactéria *Yersinia pestis*, responsável por causar a Peste Negra. Entre os resultados biológicos, destacaram-se quatro chalconas que apresentaram potencial inibitório maior do que 50% (H6 = 89,1%, H22 = 85,4%, H2 = 68,0% e H12 = 52,9%). A análise das estruturas moleculares das chalconas, na tentativa de se obter uma relação entre a estrutura química e a atividade biológica, evidenciou que não é apenas um fator que determina a atividade dos compostos e sim, possivelmente, um conjunto complexo de interações eletrônicas e estéricas, sendo necessários estudos mais elaborados para um melhor entendimento desse aspecto.

Palavras-chave: chalconas heterocíclicas, atividade biológica, YopH.

1 INTRODUÇÃO

A Peste Negra dizimou um quarto da população da Europa na Idade Média. Esta doença de ordem infecciosa aflige a humanidade desde os tempos mais remotos e embora pareça comum ver notícias sobre a descoberta de um novo medicamento ou sobre o avanço das pesquisas em prol de alguma cura, este é um processo extremamente demorado e custoso, e cujo produto final (o fármaco), certamente, não está ao alcance de toda a população.

Investigadores trabalhando em grupos de pesquisas em universidades (entre eles o LEAT – Laboratório Estrutura e Atividade do Departamento de Química da UFSC), em indústrias farmacêuticas e em institutos de pesquisa de todo o mundo realizam sínteses orgânicas e testes biológicos, na busca por protótipos de novos fármacos, moléculas que, muitas vezes, são extremamente simples, mas que apresentam potencial ação farmacológica e que podem ser empregadas no tratamento de alguma enfermidade.

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

Entretanto, há poucos estudos da ação de chalconas heterocíclicas. Sabendo-se que entre os fármacos comercializados atualmente cerca de 62% são derivados heterocíclicos e que destes, 28% possuem um átomo de enxofre,⁷ chalconas heterocíclicas contendo um átomo de enxofre são consideradas ainda mais promissoras, e recebem atenção especial neste trabalho, que busca por moléculas com atividade inibitória da enzima YopH, um dos fatores de virulência da bactéria *Yersinia pestis*, causadora da peste.

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

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Química medicinal e desenvolvimento de fármacos

As enfermidades como diabetes, hiperglicemia, câncer, infecções bacterianas e doenças negligenciadas (tuberculose, malária, dengue e leishmaniose) afetam milhões de pessoas por ano em todo o mundo.² A fim de diminuir o número de vítimas, várias pesquisas têm sido realizadas à procura de novos fármacos que possam prevenir, tratar ou curar tais doenças. No mundo, cerca de 40 bilhões de dólares são gastos anualmente pelas indústrias farmacêuticas em pesquisas com este objetivo.³

De modo geral, o processo de descoberta de um novo fármaco obedece a várias etapas, que incluem: a descoberta de alvos terapêuticos, o desenho e seleção da molécula líder para o alvo pretendido, a otimização da molécula líder, a escolha da molécula candidata ao desenvolvimento, ensaios clínicos, até, finalmente, ser considerada um medicamento.³ Todo este processo é necessário, mas requer tempo e altos investimentos em inovação.

É conveniente destacar que a busca por novos fármacos pertence não só ao ramo da medicina ou da biologia, mas sim a todas as áreas do conhecimento científico, incluindo a química, e mais especificamente, a química medicinal. Quanto mais estreitas são as colaborações entre os pesquisadores das diferentes áreas, mais rapidamente e consistentemente os objetivos são alcançados.⁴

A química medicinal é o estudo racionalizado das propriedades biológicas e farmacológicas e das relações estrutura-atividade de fármacos.⁵ Segundo Paul Erlich, prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 1908, uma substância química, neste caso um protótipo a fármaco, não funcionará a menos que ela seja capaz de se ligar a um sítio ativo específico.³ Este conceito apesar de ter completado um século, continua válido, o que nos mostra a importância da relação entre estrutura química e atividade biológica.

No início das pesquisas na área da química medicinal, a busca por fármacos resumia-se na busca de novos compostos extraídos de produtos naturais, identificando-se os princípios ativos presentes nas plantas medicinais.⁵ Entretanto, os produtos naturais apresentam grande complexidade estrutural, sendo

caracterizados como “sujos” pelas grandes indústrias, pois muitas vezes os resultados dos ensaios biológicos são difíceis de interpretar devido às impurezas.⁶

Assim, com o passar do tempo, começou-se a sintetizar em laboratório algumas moléculas semelhantes às extraídas das plantas, para se produzir candidatos sintéticos a fármacos, mimetizando as estruturas naturais de efeitos e propriedades já conhecidas.⁵ Derivações dessas moléculas originais também foram produzidas e passou-se a dar destaque aos fármacos sintéticos, pois estes são obtidos, na maioria dos casos, mais facilmente que seus análogos naturais, com maior grau de pureza e com custos inferiores de produção. Essa evolução é bem exemplificada pelo marco histórico no processo de desenvolvimento da indústria farmacêutica mundial, em que grande destaque foi dado à descoberta da salicilina (analgésico e antitérmico) em 1829, a partir da planta *Salix alba*. Dez anos depois, em 1839, através de modificações estruturais, a salicilina gerou o ácido salicílico, que foi novamente modificado e, em 1897, obteve-se o ácido acetilsalicílico, princípio ativo da Aspirina®, um dos fármacos mais vendidos no mundo.³

O aumento da potência, bem como a diminuição de efeitos colaterais e a facilidade relativa de obtenção perante aos produtos naturais, fez com que os produtos sintéticos tomassem conta do mercado farmacêutico mundial. Dados de 2006 afirmam que 6% dos fármacos são derivados de produtos naturais não modificados, 28% de produtos naturais modificados, e 66% de origem sintética (desses, 37% são baseados em estruturas naturais).⁷ No entanto, até em épocas recentes, a descoberta de um novo fármaco, dentre milhares de compostos sintetizados, dependia muito mais da sorte do que de estudos e previsões.⁵ Para se ter uma idéia, Petsko publicou em 1996 que, nos Estados Unidos, para cada fármaco aprovado, uma média de 6300 compostos eram sintetizados e, destes, somente 21 chegavam aos testes de toxicologia subaguda. Dos 21 compostos selecionados, 6 chegavam aos testes em humanos e apenas 2 passavam para os testes clínicos finais, para finalmente um deles ser aceito como fármaco. Todo este processo consome aproximadamente 12,5 anos, representando um custo de US\$ 350 milhões de dólares.⁸

Hoje, no entanto, com os recursos científicos e tecnológicos que se têm à disposição, é possível fazer uma “busca racional” por estruturas que possam vir a ser novos medicamentos.⁵ Assim, atualmente, pode-se ampliar o conceito de

química medicinal, a qual engloba o planejamento racional de substâncias bioativas, envolvendo a síntese ou a modificação de substâncias, o isolamento de princípios ativos naturais, a identificação e elucidação da estrutura, e a descrição das moléculas desde a sua constituição atômica até suas características estruturais quando da(s) interação(ões) com os sistemas biológicos.⁵

Através de cálculos computacionais, por exemplo, pode-se fazer uma previsão sobre que tipo de estrutura pode interagir com o sítio ativo de uma proteína, indicando quem poderia ser um bom candidato a fármaco, e então sintetizar moléculas semelhantes a esse modelo teórico. Porém, nem todas as instituições e laboratórios que fazem pesquisa nessa área têm à disposição esse tipo de recurso, e, principalmente, nem todos os sítios ativos, bem como mecanismos do desenvolvimento das enfermidades, são conhecidos. Assim, a busca por novos fármacos ainda fica restrita a seguir outras ferramentas existentes, como o método de Topliss (Figura 1).⁹

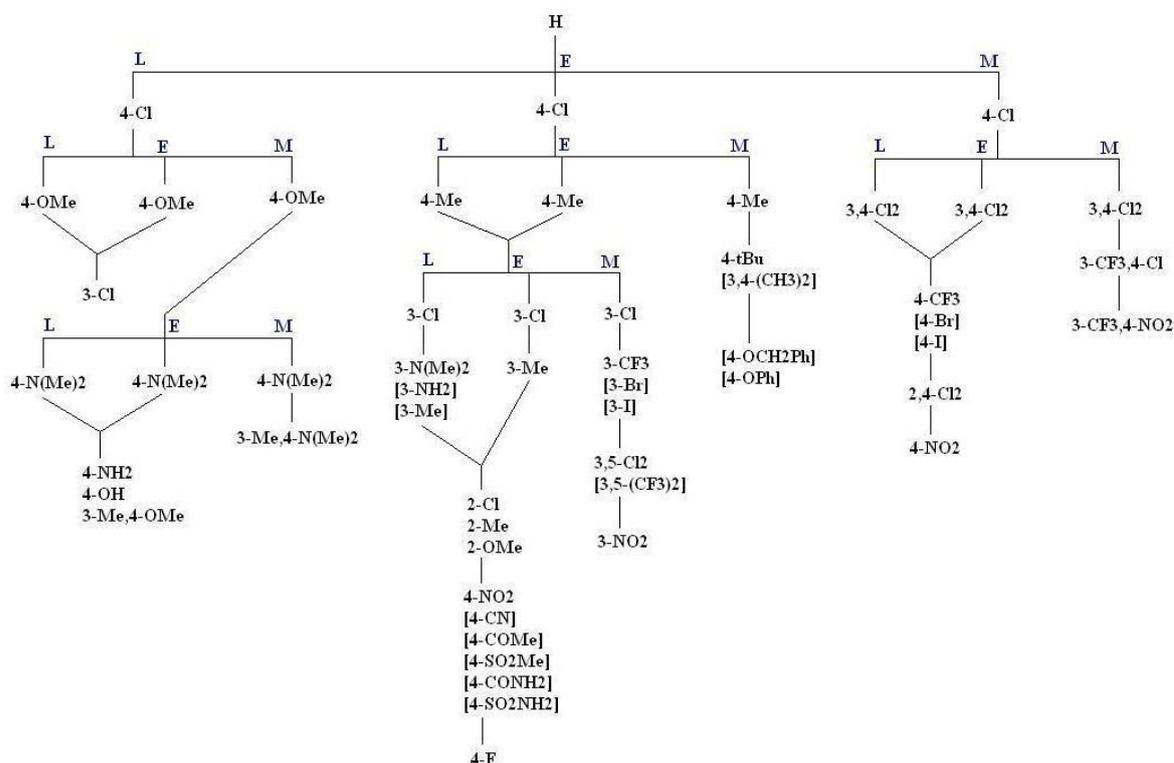


Figura 1. Esquema de Topliss para a otimização de substituintes aromáticos: M, é mais ativo; E, é igualmente ativo; L, é menos ativo que o composto anterior da chave. Os grupos entre colchetes ([]) representam substituintes alternativos. As linhas descendentes indicam substituições sequenciais (Adaptado de Topliss, 1972).

O método de Topliss é um esquema que orienta a síntese de compostos análogos a compostos líderes, pois fornece uma linha básica de substituintes aromáticos que podem ser incorporados a essas moléculas para variação de sua atividade biológica.⁹ Ele define uma sequência de escolhas para as próximas estruturas a serem sintetizadas, comparando a atividade biológica entre essas moléculas. A primeira comparação é feita entre a atividade do primeiro composto (fenílico não substituído) com a da segunda molécula a ser sintetizada de acordo com a Árvore de Decisão de Topliss, o derivado *p*-cloro da molécula anterior. Se o composto sintetizado for biologicamente mais ativo do que a estrutura inicial, deve-se seguir pela direita na primeira linha do esquema. Se for menos ativo, deve-se seguir o caminho da esquerda. E, se for igualmente ativo, a rota a ser seguida é a do meio. Após a escolha do caminho, uma nova molécula deve ser sintetizada utilizando-se o substituinte indicado pelo esquema e, novamente, a comparação deve ser realizada com a estrutura anterior, e um novo caminho deve ser escolhido. A tendência é de que se obtenham compostos biologicamente mais ativos ao final do caminho seguido.⁹

Moléculas como as chalconas podem ser sintetizadas e estudadas com o auxílio dessa ferramenta, para serem avaliadas quanto a suas propriedades biológicas e, como já bem documentado na literatura,^{10,11,12} também utilizadas como protótipos de novos fármacos, pois são normalmente moléculas pequenas e de fácil obtenção por síntese química^{3,6}, que parte de reagentes conhecidos e geralmente envolve apenas uma etapa e resulta em produtos com relativa facilidade de purificação.

2.2 Chalconas

As chalconas podem ser definidas como cetonas α - β -insaturadas, onde tanto a carbonila quanto a porção olefínica estão ligadas a grupamentos aromáticos¹³ (Figura 2). Muitas atividades biológicas desse grupo de compostos são descritas na literatura, e variam de acordo com os dois anéis aromáticos e seus substituintes.^{14,15} Há relatos de atividade antibacteriana, antiviral, antifúngica, antimalárica,

tripanossomicida,¹⁶ anti-leishmania,¹⁷ hipoglicemiante,¹⁸ antioxidante, citotóxica, antitumoral, antileucêmica¹⁹ e anti-inflamatória.^{10,11,12}

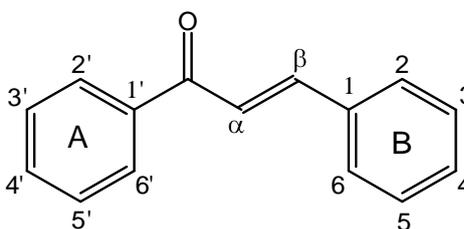


Figura 2. Núcleo fundamental das chalconas.

2.2.1 Síntese de chalconas

Várias metodologias são propostas para a síntese das chalconas, entretanto, a mais simples e comum é através da condensação de Claisen-Schmidt, em que se reage um derivado escolhido da acetofenona com os aldeídos aromáticos apropriados, usando metanol ou etanol como solvente e hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio como catalisador.²⁰ Essa metodologia é considerada bastante versátil e conveniente, embora, em alguns casos, possa resultar em baixos rendimentos.²¹

A reação de formação das chalconas se inicia com a condensação aldólica, que é seguida pela desidratação básica.²⁰ O mecanismo está detalhado na Figura 3. Observa-se que a primeira etapa da reação é a desprotonação da cetona, em que o catalisador básico remove o hidrogênio alfa ácido da molécula para formar um carbânion que é estabilizado por ressonância. Através de um ataque nucleofílico, o carbânion ataca o carbono carbonílico do aldeído, formando um íon alcóxido (intermediário tetraédrico). Esse íon alcóxido, ao ser protonado por um dos hidrogênios da água, gera o produto da condensação e regenera o catalisador básico. A formação da enona conjugada ocorre por desidratação. Nesse caso, em condições básicas, um hidrogênio ácido é abstraído da posição alfa para resultar em um íon enolato, que elimina o grupo de saída –OH, formando a chalcona.

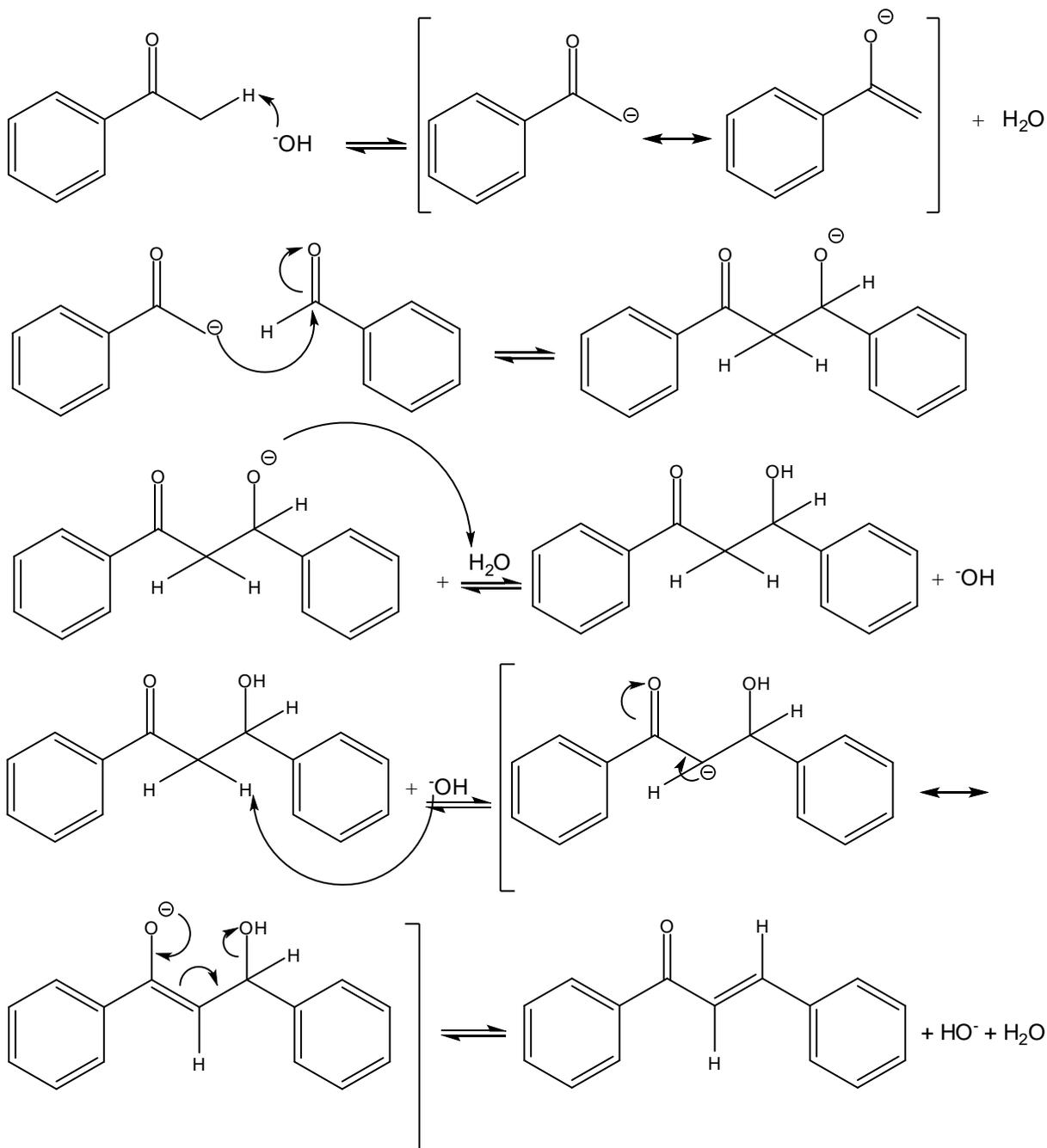


Figura 3. Mecanismo da condensação de Claisen-Schmidt seguida por desidratação básica.

Esta reação de condensação é amplamente citada na literatura como método para obtenção de chalconas.^{4,22,23,14}

Variações dessa metodologia também têm sido descritas, como, por exemplo, com a utilização de ultrassom para acelerar a reação e melhorar os rendimentos^{21,22} e também com a substituição do tradicional catalisador hidróxido por um catalisador

resultante da mistura de fosfato inorgânico e nitrato de sódio, aquecidos a altas temperaturas (900°C).²⁴

Seguindo-se a metodologia clássica de Claisen-Schmidt, mantendo-se o derivado da acetofenona fixo e variando-se o aldeído aromático, de acordo com a Árvore de Decisão de Topliss e suas variações,⁹ pode-se sintetizar uma série de compostos diferentes, porém com estruturas relativamente semelhantes, que poderão ser incorporadas a uma biblioteca de compostos.

As bibliotecas de compostos, ou coleções químicas, contam com centenas, milhares e até milhões de diferentes substâncias (dependendo da biblioteca), e vêm sendo extremamente úteis na busca por novos medicamentos, uma vez que dispor de grande quantidade de estruturas facilita o trabalho teórico na procura de novos protótipos de fármacos, além de auxiliar também nos estudos de correlação entre estrutura química e atividade biológica, que são fundamentais para o aprimoramento das moléculas ativas.⁶

2.2.2 Chalconas heterocíclicas

Menegatti e col. (2001) destacaram que quando se comparam as estruturas dos medicamentos utilizados na clínica, observa-se que 62% destes são derivados heterocíclicos, e dentre estes, 28% possuem um átomo de enxofre e muito outros possuem mais de um heteroátomo presente em suas estruturas químicas.¹ Além disso, Barreiro (2010) destaca que entre os cinco fármacos mais vendidos no mundo em 2009, os chamados *blockbusters* (Lípitor®, Plavix®, Seretide®, Nexium® e Seroquel®) responsáveis por US\$ 43,2 bilhões de dólares em vendas, todos são policíclicos com menos de cinco anéis, 4 são heterocíclicos e 4 possuem anéis aromáticos em sua constituição (Figura 4).²⁵

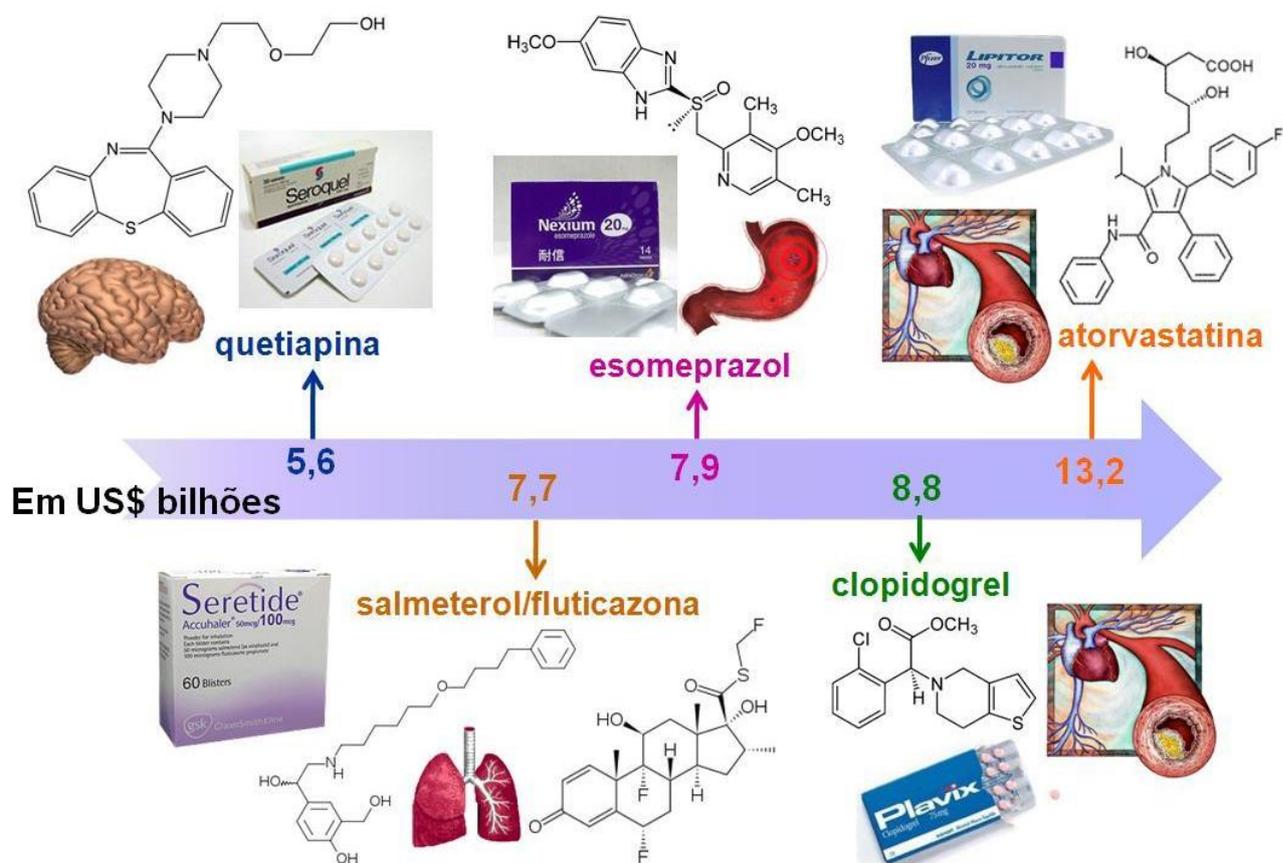


Figura 4. Maiores sucessos de vendas da indústria farmacêutica em 2009. 1° - atorvastatina (Lípor®[®], Pfizer, com vendas de US\$ 13,2 bilhões), previne ataques cardíacos; 2° - clopidogrel (Plavix®[®], Sanofi-Aventis, com vendas de US\$ 8,8 bilhões), previne ataques cardíacos; 3° - esomeprazol (Nexium®[®], Astra-Zeneca, com US\$ 7,9 bilhões), para tratamento de úlceras gastrointestinais; 4° - fluticazona/salmeterol (Seretide®[®], Glaxo-Smith-Kline, com US\$ 7,7 bilhões), para tratamento da asma; 5° - quetiapina (Seroquel®[®], Astra-Zeneca com US\$ 5,6 bilhões), para tratamento de transtorno bipolar, esquizofrenia e depressão. (Fonte: Baseado em Barreiro, 2010).

Sabendo-se disso e de que a estrutura tridimensional única e específica de um fármaco é requisito para sua atividade farmacológica²⁶ e, também, visando complementar a biblioteca de compostos atualmente disponível no grupo de pesquisas Estrutura e Atividade do Departamento de Química da UFSC, laboratório em que este trabalho foi desenvolvido, buscou-se sintetizar uma nova série de chalconas, derivadas do 2-acetil-5-cloro-tiofeno (Figura 5).

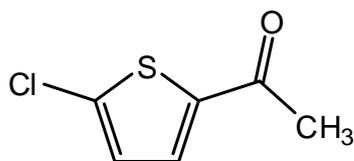


Figura 5. Cetona aromática padrão da série de chalconas sintetizadas.

2.2.3 Atividade biológica de chalconas heterocíclicas

Chalconas contendo um heterociclo com enxofre (Figura 6) são relatadas na literatura por apresentarem potente citotoxicidade frente a várias células humanas cancerosas, atividade potente na inibição de danos oxidativos do DNA, e potentes atividades anti-inflamatória e anti-oxidante.²² Também são citadas como inibidoras da enzima ciclo-oxigenase.²⁷

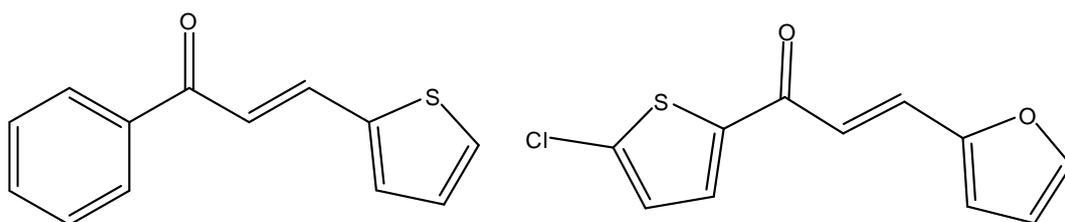


Figura 6. Chalconas com estruturas tiofênicas.

Estruturas análogas a chalconas que contenham esse mesmo anel (Figura 7), têm demonstrado em geral bom efeito inibitório frente a células de leucemia linfoblástica aguda (L1210), carcinoma mamário murino (FM3A), linfoblastos T humanos (Molt/4 e CEM) e carcinoma de colo humano (HeLa).²⁸

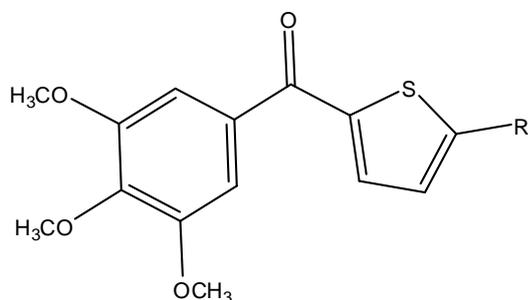


Figura 7. Estrutura tiofênica análoga a chalconas.

Em função desses relatos da literatura que destacam a importância das chalconas e pelos compostos heterocíclicos contendo enxofre estarem presentes em

muitos medicamentos já existentes, neste trabalho foram sintetizadas chalconas heterocíclicas contendo o átomo de enxofre no anel A, as quais tiveram sua atividade biológica avaliada frente a um tipo específico de proteína tirosina fosfatase, a YopH.

2.4 Proteína Tirosina Fosfatase YopH

As proteínas tirosina fosfatases (PTPs) são uma grande família de enzimas (mais de 100) responsáveis pela hidrólise do fosfato ligado a resíduos de tirosina em proteínas. Elas são estruturalmente diversas e controlam variados processos celulares.²⁹ O mau funcionamento da atividade das PTPs humanas, por exemplo, está relacionado com várias doenças, como câncer, desordens neurológicas e diabetes.³⁰

Estudos com bactérias patogênicas revelaram que a ação de fosfatases, em particular PTPs, tem um papel importante na determinação da sua patogenicidade, interferindo na sinalização celular do macrófago.^{31,32,33} Um exemplo é a PTP da *Yersinia pestis*. A patogenicidade das espécies de *Yersinia* é dependente da atividade de uma proteína tirosina fosfatase (PTP), a YopH, que interrompe o processo de sinalização do hospedeiro. A YopH é secretada pela bactéria no meio extracelular e seu alvo são os macrófagos, onde desfosforila proteínas responsáveis pela ação bactericida.³⁴

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

Nesta pesquisa, buscou-se obter uma chalcona heterocíclica, com atividade inibitória da proteína YopH, uma das PTPs conhecidas mais ativas, secretada pela bactéria *Yersinia pestis*, causadora da Peste Negra.^{35,36}

2.5 Peste Negra

A Peste também é conhecida como Peste Negra, devido a um dos momentos mais aterrorizantes da história da humanidade, protagonizado por esta doença, que durante o século 14, dizimou um quarto da população da Europa (cerca de 25 milhões de pessoas).³⁷

A Peste Negra é provocada por uma bactéria, a *Yersinia pestis*, observada principalmente em roedores silvestres, mas que pode afetar seres humanos, ao ser transmitida pela picada de pulgas contaminadas.³⁸

As pessoas infectadas por essa bactéria, após um período de 3 a 7 dias de incubação, começam a demonstrar sintomas que se assemelham aos de uma gripe (aparecimento súbito de febre, calafrios, dor de cabeça, dores pelo corpo e fraqueza). Após este período, evoluem para sonolência, intolerância à luz,³⁷ apatia, vômitos e náuseas.³⁹ Se o paciente não for tratado com altas doses de antibióticos (estreptomicina ou tetraciclina) durante os cinco primeiros dias da infecção, desenvolve-se uma septicemia, que é freqüentemente fatal.⁴⁰

Apesar de muitos considerarem a peste uma doença do passado, ela mantém-se em vários focos naturais na África, Ásia e Américas e atualmente é considerada uma doença reemergente pela Organização Mundial da Saúde, constituindo um problema de Saúde Pública.⁴¹ Em 2003, nove países notificaram 2.118 casos e 182 óbitos, sendo que 98,7% dos casos e 98,9% dos óbitos foram notificados da África.³⁹

Como a erradicação da peste ainda não é possível devido à sua complexidade,⁴¹ buscam-se, cada vez mais, assim como neste trabalho, novas moléculas que possuam atividade biológica frente à sua bactéria causadora, e que possam tornar-se protótipos de novos fármacos para sua cura.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Esta pesquisa tem como objetivo geral a síntese de uma série de chalconas, contendo pelo menos um heterociclo com enxofre, e a avaliação de sua atividade biológica frente à enzima YopH.

3.2 Objetivos específicos

- Sintetizar, através do método de condensação de Claisen-Schmidt, uma série contendo 21 chalconas derivadas da cetona 2-acetil-5-cloro-tiofeno.
- Caracterizar as chalconas sintetizadas através de espectros de absorção no infravermelho, espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H e ponto de fusão.
- Testar o potencial inibitório das chalconas frente à enzima YopH da *Yersinia pestis*.
- Relacionar a estrutura química e a atividade biológica da série de chalconas sintetizadas.

4 METODOLOGIA

4.1 Síntese das chalconas heterocíclicas

Para gerar a série das chalconas sintetizada, a cetona escolhida foi o 2-acetil-5-cloro-tiofeno. Esta cetona foi reagida com diferentes aldeídos (Tabela 1), escolhidos com base na Árvore de Decisão de Topliss e variações do Método de Topliss.⁹

Para as sínteses, utilizou-se a metodologia de condensação de Claisen-Schmidt.

Em um balão de reação de 50 mL, colocou-se 0,5 mmol da cetona (1 equivalente), 0,5 mmol do aldeído (1 equivalente) e metanol (10 mL). A mistura foi mantida sob agitação magnética a temperatura ambiente, e adicionou-se lentamente 5 gotas de KOH de uma solução aquosa 50% m/m, após os reagentes estarem dissolvidos.

O tempo reacional e a quantidade total de KOH adicionados em cada reação estão apresentados na Tabela 1.

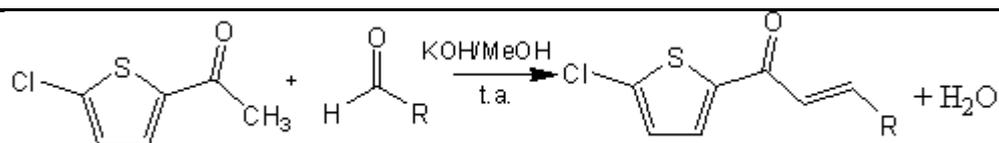
Por se tratar de uma cetona com grupo que pode ser fotossensível (cloro), o balão de reação foi envolvido com papel alumínio em todas as reações e durante todo o processo.

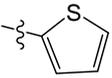
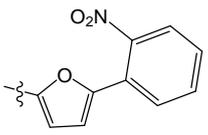
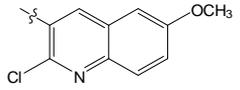
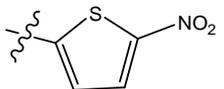
As reações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando-se placas de alumínio com sílica gel 60 GF 254 da Merck, e visualizando-se as mesmas em luz ultravioleta ($\lambda = 254$ e 366 nm). As placas foram reveladas com pulverização de anisaldeído sulfúrico (0,5 mL de anisaldeído, 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, 10 mL de ácido acético glacial e metanol q.s.p. 100 mL).

Após verificar-se o término de cada reação (ausência de pelo menos um dos reagentes na placa da cromatografia), adicionou-se, à reação, água destilada e ácido clorídrico 10%, para neutralização do meio. Os compostos foram obtidos por filtração em vácuo, e novamente avaliados por CCD. As chalconas impuras foram recristalizadas em etanol a quente.

Os reagentes e solventes utilizados neste trabalho foram todos grau PA e das marcas comerciais: Aldrich, Merck, Sigma, Fluka e Vetec.

Tabela 1. Condições reacionais das sínteses para obtenção das chalconas heterocíclicas.



Sigla	Substituinte (R=)	Gotas de KOH	Tempo de reação
H1	fenil	5	30 minutos
H2	4-Cl-fenil	10	8-12 horas
H3	4-OCH ₃ -fenil	10	8-12 horas
H4	4-CH ₃ -fenil	10	8-12 horas
H6	3-NO ₂ -fenil	10	30 minutos
H7	4-F-fenil	10	8-12 horas
H11	2,4,5-triOCH ₃ -fenil	15	30 horas
H12	2,4,6-triOCH ₃ -fenil	10	8-12 horas
H14	3,4-OCH ₂ O-fenil	10	8-12 horas
H15	1-naftil	10	8-12 horas
H16	4-OBu-fenil	10	24 horas
H17	3-OCH ₃ -4-OH-fenil	10	20 horas
H19		20	72 horas
H21		10	8-12 horas
H22		10	6 horas
H23		30/60	3 semanas
H24	2,5-diOCH ₃ -fenil	30	5 dias
H25	3,4-diOCH ₃ -fenil	15	24 horas
H28	4-COOH	10	8-12 horas
H29	2,3,4-OCH ₃	10	48 horas
H30	2,6-OCH ₃	20	48 horas

As análises dos compostos obtidos foram feitas através de espectros de absorção no infravermelho, obtidos através de um espectrômetro Abb Bomen FTLA 2000, utilizando pastilha de KBr; e de espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H (400 MHz) e de ^{13}C (100 MHz), sendo estes realizados em equipamento VARIAN OXFORD AS-400, tendo como referência interna o tetrametilsilano (TMS) ou o próprio solvente. Foi utilizado clorofórmio deuterado (CDCl_3), DMSO deuterado e acetona deuterada como solventes para a realização dos espectros de RMN.

O ponto de fusão não corrigido dos compostos também foi utilizado para a caracterização dos mesmos, sendo determinados em aparelho digital de ponto de fusão, MGAPF-301, Microquímica Equipamento Ltda.

4.2 Testes biológicos

A atividade biológica dos compostos foi testada em parceria com o professor Dr. Hernán Terenzi, do Departamento de Bioquímica da UFSC.

Os compostos caracterizados e puros foram ensaiados biologicamente frente à enzima YopH..

Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços, utilizando uma única concentração dos compostos (25 $\mu\text{mol/L}$), diluídos em DMSO e água MilliQ. A essa solução, foram adicionados 20 μL de tampão imidazol 200 mmol/L e pH 7,0; 10 μL de substrato pNPP (*p*-nitrofenil-fosfato) com concentração de 400 mmol/L ; e completou-se o volume para 198 μL com água MilliQ. Adicionaram-se então 2 μL de YopH 1,0 mg/mL (em tampão Tris 25 mmol/L , pH 8 e DTT 40 mmol/L) para iniciar a reação e, antes de medir-se a atividade, o meio reacional foi incubado a 37°C durante 10 minutos.

As absorbâncias foram obtidas a cada 1 minuto, durante 10 minutos, em leitor de placas de ELISA (TECAN), a 410 nm. A porcentagem de atividade das enzimas foi calculada pela média do experimento feito em triplicata, tendo como controle positivo a ausência de chalconas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Discussão da síntese das chalconas

O esquema geral para as sínteses realizadas está apresentado na Figura 8. Esta reação ocorre através de uma condensação de Claisen-Schmidt, seguida por desidratação em meio básico (conforme mecanismo apresentado na Figura 3).

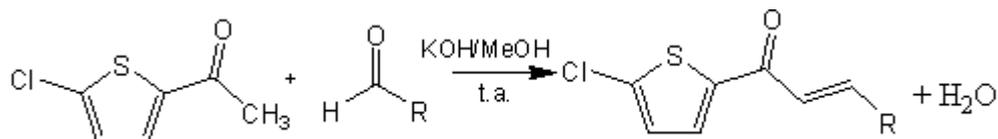


Figura 8. Esquema de síntese das chalconas heterocíclicas.

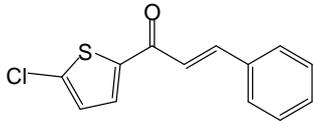
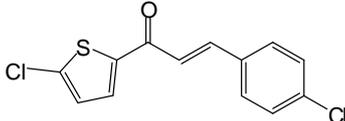
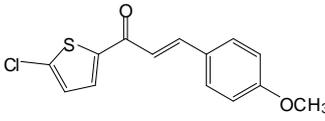
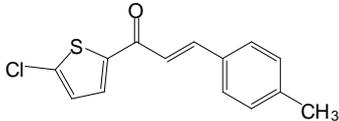
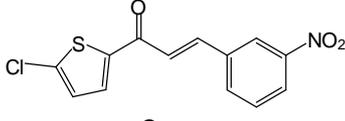
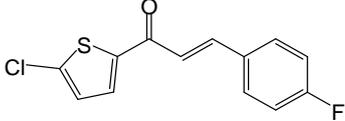
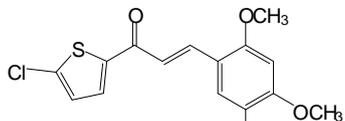
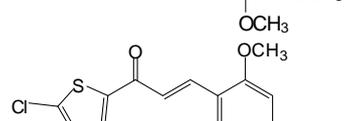
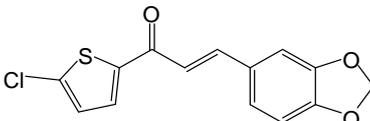
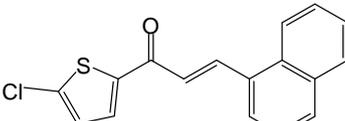
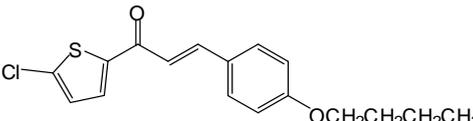
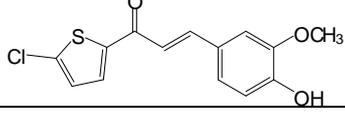
As reações foram realizadas mantendo-se fixa a cetona (2-acetil-5-cloro-tiofeno) e variando-se os aldeídos, que foram escolhidos com base na Árvore de Decisão de Topliss.

Seguindo-se fielmente o método proposto por Topliss, a série deve iniciar-se, obrigatoriamente, com a síntese do derivado do aldeído fenílico não substituído, seguido pelo derivado 4-cloro da molécula anterior. Após esses dois produtos obtidos, a escolha de cada aldeído seguinte é feita após a comparação da atividade biológica das duas últimas moléculas sintetizadas anteriormente.

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

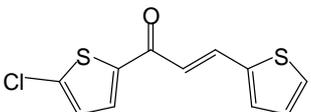
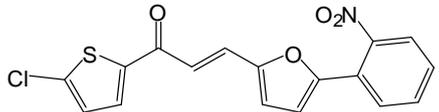
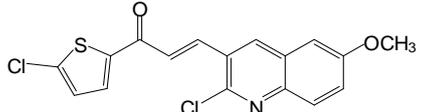
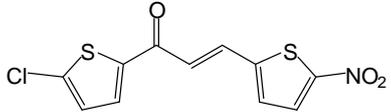
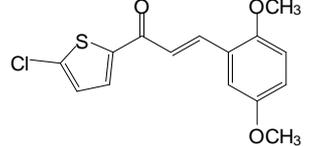
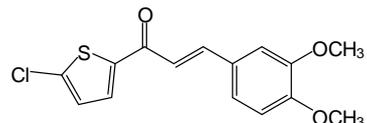
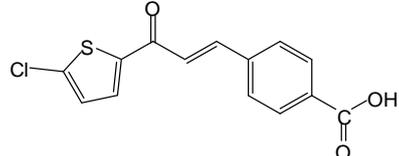
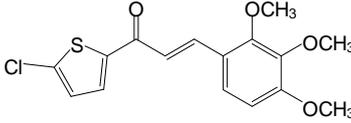
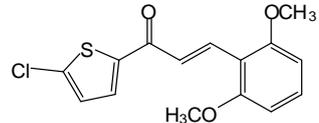
Utilizando-se desses artifícios, foi proposta a síntese de 21 chalconas, sendo 7 delas inéditas, 6 apenas com registro de CAS (consideradas também inéditas por não haver nenhum artigo publicado com estas estruturas) e 8 já descritas na literatura (Tabela 2).

Tabela 2. Relação de publicações na literatura e número de CAS das chalconas da série H

Sigla	Chalcona	Artigos	CAS
H1		1	286956-04-5
H2		2	286956-06-7
H3		1	180298-07-1
H4		0	1001964-80-2
H6		0	879732-57-7*
H7		1*	2069-49-0*
H11		0	1001964-89-1
H12		0	Inédita
H14		0	875868-58-9*
H15		1	101439-40-1*
H16		0	Inédita
H17		0	Inédita

Continua ...

Continua ...

Sigla	Chalcona	Artigos	CAS
H19		2*	103988-73-4*
H21		0	Inédita
H22		1	1253278-27-1
H23		0	Inédita
H24		0	Inédita
H25		1	180298-08-2
H28		0	801248-00-0
H29		0	Inédita
H30		0	258518-36-4*

* Estereoquímica não definida.

Dentre as reações propostas, obteve-se produto (devidamente caracterizado) em 19 reações e um produto (H2) não caracterizado completamente, sendo a reação de formação da H23 a única que não se processou da maneira desejada. Este fato é contrário ao esperado, uma vez que o substituinte do anel B é um grupo retirador de elétrons (NO_2), o que deixa o carbono carbonílico do aldeído mais suscetível ao ataque nucleofílico, e que deveria, portanto, facilitar a reação em

termos eletrônicos. Comparando as estruturas de H23 (não obtida) e H19 (composto obtido, que possui o anel B semelhante ao da H23) e sabendo-se que o impedimento para a reação não é de caráter eletrônico (pois o grupo nitro ativa o aldeído), pode-se então supor que o grupo NO₂ na posição 3 do anel tiofeno provoque algum impedimento estérico impossibilitando que a reação se processe.

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

Entre as chalconas purificadas por recristalização, destacam-se a H16, H24 e H29, que foram obtidas na forma de cristais (Figura 9).



Figura 9 –Cristais obtidos para os compostos H16, H24 e H29, respectivamente.

O rendimento das reações foi variado, de aproximadamente 8 até 93%, como mostra a Tabela 3. Maiores rendimentos (acima de 85%) parecem ser favorecidos com substituintes volumosos no anel B, como observado para as chalconas que possuem 2 anéis aromáticos nesta posição (H21 e H22).

Entre os compostos obtidos com os menores rendimentos estão a H17 e a H28, que podem ter seus rendimentos justificados através do mecanismo da reação, pois para termos a formação do produto de condensação é necessário que o H alfa à carbonila da cetona seja abstraído, para que então ocorra o ataque nucleofílico na carbonila do aldeído. No caso da H17 e H28, isso pode estar acontecendo em

menor proporção, pois parte da base pode estar abstraindo o hidrogênio da hidroxila do aldeído da H17 e o hidrogênio da carboxila do aldeído usado na reação da H28, o que resultaria em uma diminuição da reatividade dos aldeídos frente a um ataque nucleofílico. O baixo rendimento da H6 pode ser devido a perdas durante o processo, devido à recristalização.

O ponto de fusão das moléculas puras foi determinado e também encontra-se na Tabela 3, juntamente com o ponto de fusão reportado na literatura.

Tabela 3. Rendimento das reações, massa molecular e ponto de fusão dos compostos obtidos.

Sigla	MM (g/mol)	Rendimento (%)	pF _{experimental} (°C)	pF da literatura (°C)
H1	248,73	37,3	94,6-96,0	Não reportado
H2	283,18	45,7	155,5-156,6	156,0 ⁴²
H3	278,76	27,0	114,5-115,7	Não reportado
H4	262,76	49,5	130,2-131,5	Não reportado
H6	293,73	10,9	144,4-145,3	Não reportado
H7	266,72	51,1	123,8-124,4	128,0 ⁴³
H11	338,81	52,6	81,9-83,2	Não reportado
H12	338,81	39,7	155,6-157,4	Não reportado
H14	292,74	42,4	155,9-156,9	Não reportado
H15	298,79	71,6	130,7-132,5	Não reportado
H16	320,84	23,6	126,9-127,5	Não reportado
H17	294,76	8,1	148,1-149,8	Não reportado
H19	254,76	59,2	82,7-83,3	100,0-104,0 ⁴³
H21	359,79	93,4	116,2-117,7	Não reportado
H22	364,25	86,8	182,3-184,0	180,0 ⁴⁴
H24	308,79	31,1	79,0-80,4	Não reportado
H25	308,79	22,9	116,7-117,8	Não reportado
H28	292,74	13,0	>300	Não reportado
H29	338,81	23,7	97,3-98,4	Não reportado
H30	308,79	81,9	145,0-146,1	Não reportado

Como pode ser observado na Tabela 3, apenas 4 compostos têm seu ponto de fusão relatado na literatura, sendo que em 3 destes (H2, H7 e H22) o valor obtido

experimentalmente é condizente com o já descrito na literatura, indicando a pureza destes compostos. Para H19, entretanto, o ponto de fusão obtido apresenta grande diferença do reportado, porém, através do espectro de RMN de ^1H , comprovou-se tratar do produto desejado. As demais chalconas não apresentam relato de seu ponto de fusão na literatura, mas como possuem intervalo de fusão menor que 2°C tem-se, também, um indicativo de sua pureza.

Para confirmar a obtenção dos produtos desejados e sua pureza, fez-se análise dos compostos por IV e RMN de ^1H . A Figura 10 apresenta o espectro de RMN de ^1H obtido para a H1, cuja discussão segue abaixo e serviu de base para as demais caracterizações.

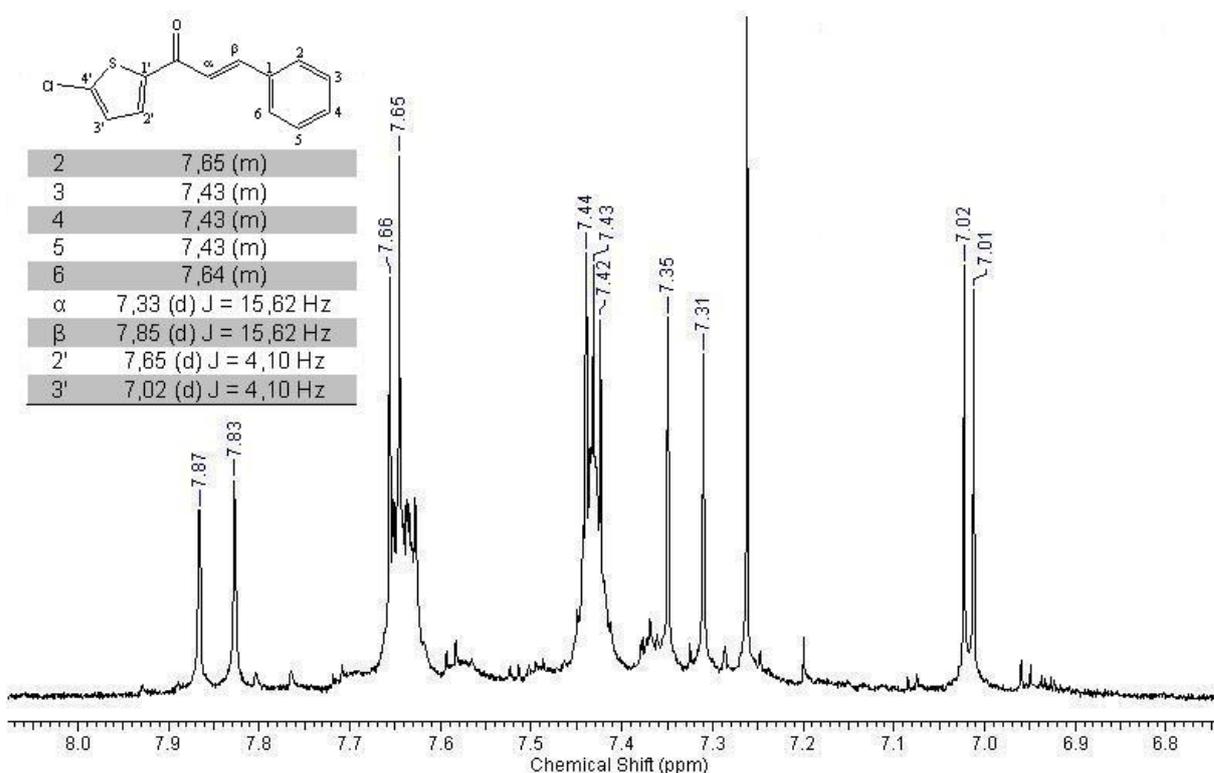


Figura 10. Espectro de RMN (400 MHz) de ^1H da chalcona H1. Deslocamento químico em relação ao TMS. Solvente CDCl_3

Neste espectro podemos observar o sinal do hidrogênio α na forma de um duplete que aparece em, aproximadamente, 7,33 ppm. Já o hidrogênio β aparece um pouco mais deslocado, em 7,85 ppm, também como duplete. Ambos, hidrogênio α e β , aparecem acoplados com J igual a 15,62 Hz, valor esperado para o isômero *E* da chalcona (produto desejado). Outros dois sinais bem característicos desta série de chalconas são os dos hidrogênios 2' e 3' do anel A, que aparecem, respectivamente, em 7,65 ppm e 7,02 ppm, com constante de acoplamento de 4,10

Hz. Os demais sinais presentes no espectro podem ser atribuídos aos hidrogênios do anel B; os cinco hidrogênios apareceram como dois multipletes distintos, tendo deslocamentos de 7,43 (hidrogênios 3, 4 e 5) e 7,65 ppm (hidrogênios 2 e 6).

Estando a chalcona H1 devidamente caracterizada, pôde-se partir para a análise do RMN dos demais compostos. A Figura 11 apresenta o espectro de RMN de ^1H da H29, uma das chalconas inéditas e da qual foram obtidos cristais.

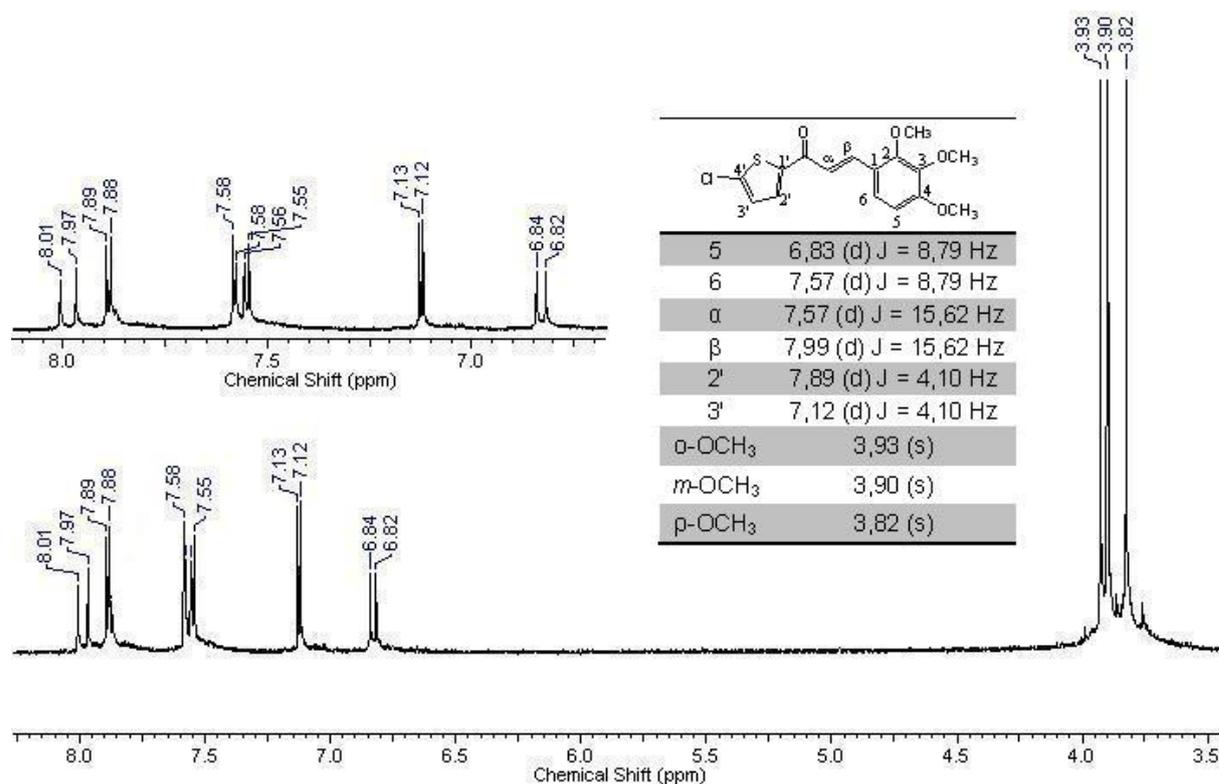


Figura 11. Espectro de RMN (400 MHz) de ^1H da chalcona H29. Deslocamento químico em relação ao TMS. Solvente CDCl_3 + acetona deuterada.

O espectro do composto H29 apresenta o sinal do hidrogênio α em 7,57 ppm e do β em 7,99 ppm, ambos como dupletos acoplados entre si, com $J = 15,62$ Hz. Os hidrogênios do anel tiofênico podem, mais uma vez, ser facilmente identificados (7,89 e 7,12 ppm), uma vez que seus sinais são dupletos com constante de acoplamento de aproximadamente 4 Hz (4,10 Hz para a grande maioria das chalconas obtidas nesta série). Os sinais referentes às metoxilas aparecem em 3,82, 3,90 e 3,93 ppm neste espectro, todas como singletos. Já os hidrogênios do anel B tem seus sinais em 6,83 e 7,57, ambos com $J = 8,79$ Hz.

Analisando os espectros referentes às outras chalconas, observa-se que estes padrões de deslocamento dos sinais se mantêm. De maneira geral, nos espectros de RMN de ^1H obtidos buscou-se identificar, principalmente, os sinais dos

hidrogênios α e β , cujo deslocamento variou de 7,11 a 8,00 ppm para o H α e de 7,76 a 8,30 ppm para o H β , que apresentam-se de forma bem característica, como dois dubletes acoplados entre si com constante de acoplamento em torno de 16 Hz, o que caracteriza o produto obtido em configuração *E*.

Os hidrogênios do anel tiofênico (anel A da chalcona) apresentam valores entre 6,97 e 8,31 ppm e *J* em torno de 4,10 Hz, o que os diferencia facilmente dos hidrogênios do anel B, que possuem constante de acoplamento de aproximadamente 8 Hz. Entre os hidrogênios tiofênicos, H3' é sempre o menos deslocado e H2' o que apresenta o maior deslocamento químico, conforme se observa nos espectros desta série.

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

Os espectros de infravermelho, por sua vez, ajudam a comprovar que houve a formação dos produtos desejados, pois neles aparece uma banda de absorção próxima a 1580 cm⁻¹, característica de C=C conjugada à cetona. Essa banda não existe no IV da cetona e do aldeído usados como reagentes, existindo somente no produto da reação, o que comprova sua formação. Destaca-se no espectro de IV a banda da carbonila da chalcona em ~1650 cm⁻¹, como pode ser observado na Figura 12, que apresenta o espectro de absorção no IV da chalcona H1.

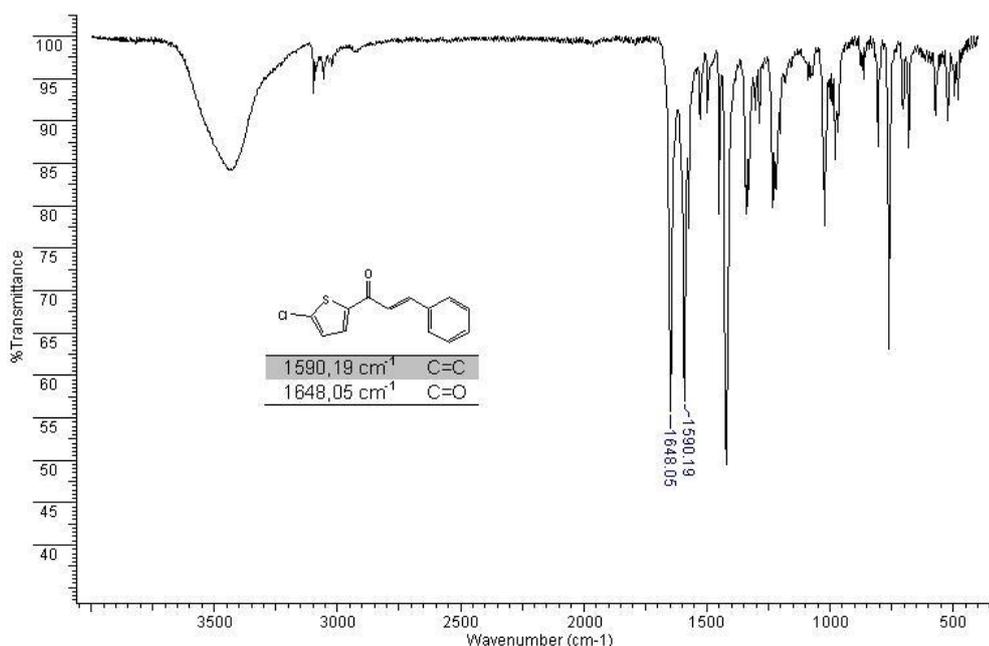


Figura 12. Espectro de IV da chalcona H1.

Em relação à chalcona H2, observa-se claramente sua formação através do espectro de IV (Figura 13), na qual a banda em $1593,08\text{ cm}^{-1}$ indica a formação da ligação C=C conjugada à carbonila. Além disso, seu ponto de fusão experimental não divergiu do da literatura, e assim, considera-se que a chalcona H2 tenha sido obtida, apesar de não possuir seu espectro de RMN de ^1H apresentado nesta pesquisa.

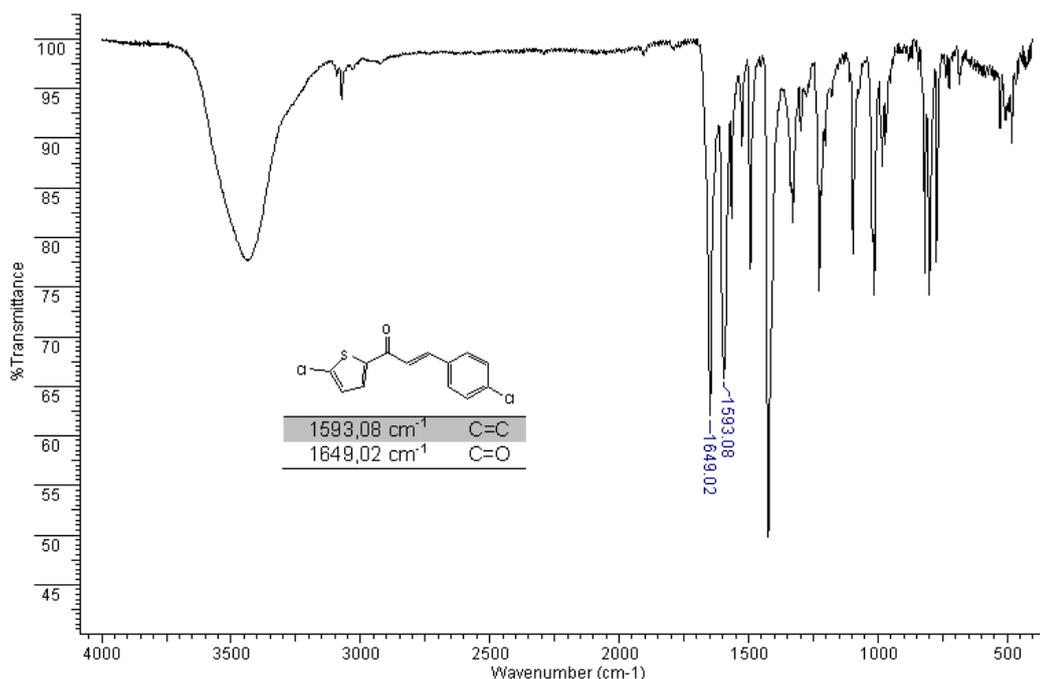


Figura 13. Espectro de IV da chalcona H2.

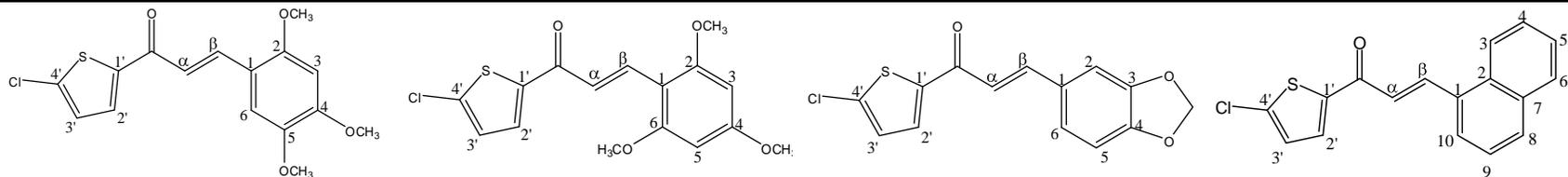
Os demais valores obtidos para os espectros de RMN de ^1H e para o espectro de IV estão relatados nas tabelas abaixo (Tabelas 4 a 9). Os espectros da série de chalconas completa seguem em anexo.

Tabela 4 - Dados de RMN de ^1H das chalconas da série H derivadas da 2-acetil-5-cloro-tiofeno.

^1H	H3	H4*	H6	H7
2	7,60 (d) J = 8,59 Hz	7,54 (d) J = 8,01 Hz	8,51 (s)	7,63 (t) J = 8,00 Hz
3	6,94 (d) J = 8,79 Hz	7,23 (d) J = 8,01 Hz	-	7,12 (t) J = 8,59 Hz
4	-	-	8,28 (dd) J = 7,13/1,07 Hz	-
5	6,94 (d) J = 8,79 Hz	7,23 (d) J = 8,01 Hz	7,63 (t) J = 7,91 Hz	7,12 (t) J = 8,59 Hz
6	7,60 (d) J = 8,59 Hz	7,54 (d) J = 8,01 Hz	7,91 (d) J = 7,42 Hz	7,63 (t) J = 8,00 Hz
α	7,21 (d) J = 15,43 Hz	7,29 (d) J = 15,62 Hz	7,44 (d) J = 15,62 Hz	7,25 (d) J = 15,43
β	7,82 (d) J = 15,43 Hz	7,83 (d) J = 15,62 Hz	7,86 (d) J = 15,62 Hz	7,81 (d) J = 15,43
2'	7,63 (d) J = 4,10 Hz	7,64 (d) J = 4,10 Hz	7,71 (d) J = 4,10 Hz	7,64 (d) J = 4,10 Hz
3'	7,01 (d) J = 4,10 Hz	7,01 (d) J = 4,10 Hz	7,06 (d) J = 4,10 Hz	7,02 (d) J = 4,10 Hz
4-CH ₃	-	2,40 (s)	-	-
4-OCH ₃	3,87 (s)	-	-	-

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

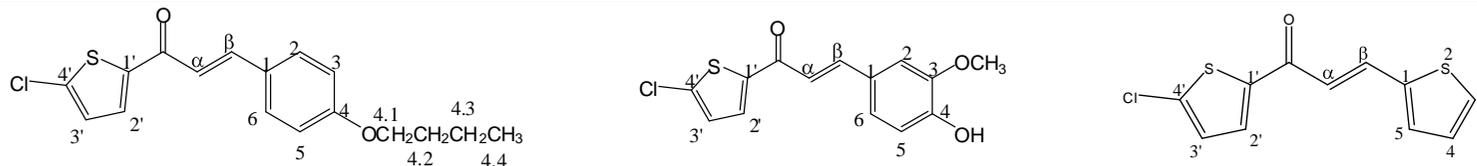
Tabela 5 - Dados de RMN de 1H das chalconas da série H derivadas da 2-acetil-5-cloro-tiofeno.



¹ H	H11	H12	H14	H15
2	-	-	7,26 (s)	-
3	6,52 (s)	6,13 (s)	-	7,44 (d) J = 5,08 Hz
4	-	-	-	7,10 (dd) J = 5,08/4,30 Hz
5	-	6,13 (s)	6,85 (d) J = 8,01 Hz	7,38 (d) J = 4,30 Hz
6	7,09 (s)	-	7,13 (m)	-
α	7,29 (d) J = 16,62 Hz	7,68 (d) J = 15,62 Hz	7,16 (d) J = 15,43 Hz	7,11 (d) J = 15,23 Hz
β	8,10 (d) J = 15,62 Hz	8,27 (d) J = 15,62 Hz	7,76 (d) J = 15,43 Hz	7,93 (d) J = 15,23 Hz
2'	7,62 (d) J = 4,10 Hz	7,57 (d) J = 4,10 Hz	7,62 (d) J = 4,10 Hz	7,63 (d) J = 4,10 Hz
3'	6,99 (d) J = 4,10 Hz	6,97 (d) J = 4,10 Hz	7,01 (d) J = 4,10 Hz	7,01 (d) J = 4,10 Hz
o-OCH ₃	3,96 (s)	3,91 (s)	-	-
m-OCH ₃	3,92 (s)	-	-	-
p-OCH ₃	3,91 (s)	3,87 (s)	-	-
-CH ₂ -	-	-	6,04 (s)	-

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

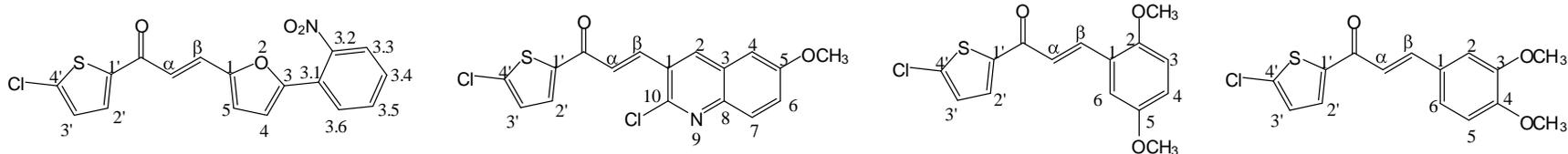
Tabela 6 - Dados de RMN de 1H das chalconas da série H derivadas da 2-acetil-5-cloro-tiofeno.



¹ H	H16	H17	H19*
2	7,63 (d) J = 8,79 Hz	7,11 (d) J = 1,76 Hz	-
3	6,94 (d) J = 8,79 Hz	-	7,44 (d) J = 5,08 Hz
4	-	-	7,10 (dd) J = 5,08/4,30 Hz
5	6,94 (d) J = 8,79 Hz	6,96 (d) J = 7,22 Hz	7,38 (d) J = 4,30 Hz
6	7,63 (d) J = 8,79 Hz	7,23 (s)	-
α	7,33 (d) J = 15,43 Hz	7,17 (d) J = 15,43 Hz	7,11 (d) J = 15,23 Hz
β	7,79 (d) J = 15,43 Hz	7,79 (d) J = 15,43 Hz	7,96 (d) J = 15,23 Hz
2'	7,77 (d) J = 4,10 Hz	7,64 (d) J = 4,10 Hz	7,63 (d) J = 4,10 Hz
3'	7,05 (d) J = 4,10 Hz	7,01 (d) J = 4,10 Hz	7,01 (d) J = 4,10 Hz
<i>m</i> -OCH ₃	-	3,97 (s)	-
4.1	4,03 (t) J = 6,44 Hz	-	-
4.2	2,13 (m)	-	-
4.3	1,51 (ddd) J = 15,86/14,11/7,52 Hz	-	-
4.4	0,99 (t) J = 7,42 Hz	-	-
-OH	-	5,95 (s)	-

δ ppm em relação ao TMS, *Multiplicidade* (J em Hz). Solvente CDCl₃ + acetona deuterada. *Solvente DMSO deuterado

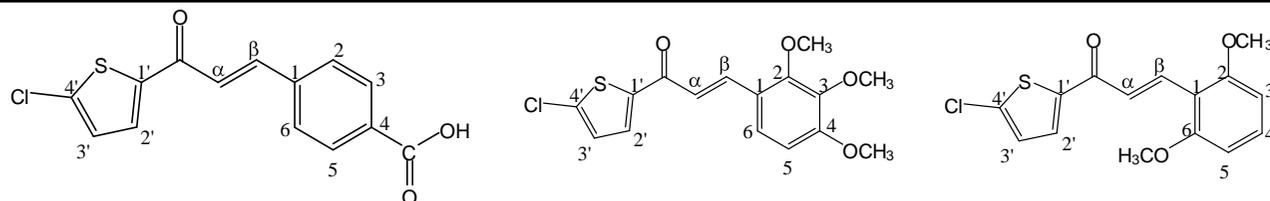
Tabela 7 - Dados de RMN de ^1H das chalconas da série H derivadas da 2-acetil-5-cloro-tiofeno.



^1H	H21	H22*	H24**	H25
2	-	9,10 (s)	-	7,14 (s)
3	-	-	7,45 (m)	-
4	6,81 (s)	7,38 (d) J = 2,73 Hz	7,05 (m)	-
5	6,81 (s)	-	-	6,91 (d) J = 8,40 Hz
6	-	7,53 (dd) J = 9,18/2,73 Hz	7,05 (s)	7,24 (dd) J = 8,40/1,76 Hz
7	-	7,91 (d) J = 9,18 Hz	-	-
α	7,25 (d) J = 15,23 Hz	8,00 (d) J = 15,62 Hz	7,77 (d) J = 15,62 Hz	7,19 (d) J = 15,43 Hz
β	7,55 (d) J = 15,23 Hz	8,07 (d) J = 15,62 Hz	8,14 (d) J = 15,62 Hz	7,80 (d) J = 15,43 Hz
2'	7,67 (d) J = 4,10 Hz	8,30 (d) J = 4,10 Hz	8,04 (d) J = 4,10 Hz	7,65 (d) J = 4,10 Hz
3'	7,02 (d) J = 4,10 Hz	7,46 (d) J = 4,10 Hz	7,23 (d) J = 4,10 Hz	7,01 (d) J = 4,10 Hz
<i>o</i> -OCH ₃	-	-	3,91 (s)	-
<i>m</i> -OCH ₃	-	-	3,82 (s)	3,94 (s)
<i>p</i> -OCH ₃	-	-	-	3,96 (s)
3.3	7,77 (dd) J = 8,01/1,37 Hz	-	-	-
3.4	7,5 (td) J = 1,37/7,71/7,71 Hz	-	--	-
3.5	7,64 (td) J = 7,66/7,66/1,27 Hz	-	-	-
3.6	7,73 (dd) J = 8,01/1,37 Hz	-	-	-
5-OCH ₃	-	3,94 (s)	-	-

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

Tabela 8 - Dados de RMN de ^1H das chalconas da série H derivadas da 2-acetil-5-cloro-tiofeno.



^1H	H28	H29*	H30
2	7,89 (d) J = 8,59 Hz	-	-
3	7,95 (d) J = 8,10 Hz	-	6,59 (d) J = 8,40 Hz
4	-	-	7,31 (d) J = 8,40 Hz
5	7,95 (d) J = 8,10 Hz	6,83 (d) J = 8,79 Hz	6,59 (d) J = 8,40 Hz
6	7,89 (d) J = 8,59 Hz	7,57 (d) J = 8,79 Hz	-
α	7,75 (d) J = 16,00 Hz	7,57 (d) J = 15,62 Hz	7,80 (d) J = 15,82 Hz
β	7,91 (d) J = 16,00 Hz	7,99 (d) J = 15,62 Hz	8,30 (d) J = 15,82 Hz
2'	8,31 (d) J = 4,30 Hz	7,89 (d) J = 4,10 Hz	7,60 (d) J = 4,10 Hz
3'	7,41 (d) J = 4,30 Hz	7,12 (d) J = 4,10 Hz	6,99 (d) J = 4,10 Hz
<i>o</i> -OCH ₃	-	3,93 (s)	3,92 (s)
<i>m</i> -OCH ₃	-	3,90 (s)	
<i>p</i> -OCH ₃	-	3,82 (s)	

δ ppm em relação ao TMS, *Multiplicidade* (J em Hz). Solvente DMSO deuterado. *Solvente CDCl₃ + acetona deuterada

Tabela 9 - Dados de IV das chalconas da série H derivadas da 2-acetil-5-cloro-tiofeno.

Chalcona	Região de absorção de C=O no IV (cm⁻¹)	Região de absorção de C=C no IV (cm⁻¹)
H1	1648,1	1590,2
H2	1649,0	1593,1
H3	1643,2	1587,3
H4	1649,0	1590,2
H6	1655,8	1603,7
H7	1648,1	1585,4
H11	1638,4	1574,8
H12	1637,4	1568,0
H14	1647,1	1577,7
H15	1643,2	1587,3
H16	1639,4	1564,2
H17	1640,3	1569,0
H19	1640,3	1577,7
H21	1647,1	1596,9
H22	1652,9	1604,7
H24	1645,3	1587,7
H25	1644,2	1586,3
H28	1651,9	1596,0
H29	1640,3	1579,6
H30	1643,2	1587,3

5.2. Discussão Biológica

Dezoito dos vinte compostos obtidos foram testados biologicamente quanto a seu potencial inibitório frente à enzima YopH de *Yersinia pestis*. A porcentagem de inibição da YopH conferida pelas chalconas (média das triplicatas), avaliadas na concentração de 25 $\mu\text{mol/L}$, encontra-se na Tabela 10.

Tabela 10. Porcentagem de inibição da enzima YopH provocada pelas chalconas heterocíclicas, avaliadas em triplicata na concentração de 25 $\mu\text{mol/L}$.

Chalcona	% de Inibição	Chalcona	% de Inibição
H1	8,5	H16	22,4
H2	68,0	H17	20,8
H3	14,7	H19	25,6
H4	24,2	H21	24,3
H6	89,1	H22	85,4
H7	25,8	H24	NT
H11	32,6	H25	30,4
H12	52,9	H28	2,5
H14	40,5	H29	NT
H15	31,2	H30	23,4

NT = não testado

Para esta discussão considerar-se-ão como chalconas mais ativas a H6, a H22, a H2 e a H12, que apresentaram maior potencial inibitório da YopH dentre as chalconas testadas (89,1%, 85,4%, 68,0% e 52,9%, respectivamente).

Analisando-se as estruturas dessas moléculas, é possível observar que três delas (H2, H6 e H22) apresentam um grupo retirador de elétrons no anel B, sendo que em dois destes compostos (H2 e H22) o grupo em questão é um halogênio. O fato de haver essa semelhança entre as estruturas sugere que a presença de grupos retiradores de elétrons ligados ao anel B favorece a atividade inibitória da enzima YopH, entretanto, o mesmo não é observado para H7, chalcona que também contém um halogênio como substituinte no anel B, e nem para H28, que apresenta um grupo carboxila na posição 4 do anel B, também retirador de elétrons. Devido a essas

observações, e pela divergência entre a atividade biológica da H2, H6 e da H22 comparadas com a H7 e H28, há indicativos de que o efeito inibitório da YopH não é meramente eletrônico, e sim, possivelmente determinado também por fatores estéricos.

Essa idéia torna-se mais aceitável ao observarmos o composto H12, o quarto composto mais ativos desta série, mas que, entretanto, apresenta 3 grupos doadores de elétrons ligados ao anel B. Porém, entre as demais chalconas com grupos doadores de elétrons no anel B, é possível observar que tanto os compostos monossustituídos (H3, H4 e H16), quanto os dissustituídos (H17, H25 e H30) e o trissustituído (H11), são alguns dos compostos que apresentam percentuais de inibição não significativos frente à YopH.

As chalconas H14, H19, H21 e H22 apresentam em comum estruturas heterocíclicas como anel B. Observando-se os valores de inibição destes compostos, percebe-se que H14 (que contém um heterociclo com dois átomos de oxigênio), H19 e H21 não apresentaram atividade significativa frente à proteína YopH. Porém, a H22 foi um dos compostos mais ativos da série, com atividade inibitória da YopH de 85,4%. Esta chalcona possui um anel heterocíclico nitrogenado condensado a um anel aromático, um grupo retirador e um grupo doador de elétrons, apresentando diversidade química (em termos de estrutura) e possuindo características eletrônicas variadas. A união dessas características parece favorecer a inibição da YopH, demonstrando que não é apenas um fator o determinante para a atividade dos compostos, e sim um conjunto complexo de interações eletrônicas e espaciais.

Essa afirmação pode também ser embasada pelo fato da H15 (que possui o grupo 1-naftil como anel B) e H1 (sem substituintes no anel B) não conferirem atividade inibitória significativa da YopH.

Avaliando os resultados obtidos biologicamente e a Árvore de Decisão de Topliss, é possível relacionar os compostos H1 (H), H2 (4-Cl), H3 (4-OCH₃), H4 (4-CH₃), H6 (3-NO₂) e H7 (4-F), que apresentam monossustituições previstas no método. Observando-se a atividade e as estruturas das chalconas H1 (inibição de 8,5%), H2 (inibição de 68,0%) e H6 (inibição de 89,1%), sugere-se que a ação inibitória da enzima YopH de *Yersinia pestis* segue uma das linhas da Árvore de Decisão de Topliss (Figura 14), a qual tem em sua extremidade o grupo 3-NO₂,

6 CONCLUSÕES

Sintetizou-se uma série de chalconas derivadas da cetona 2-acetil-5-cloro-tiofeno, utilizando-se adaptações no método de Topliss para a escolha dos aldeídos. Os produtos obtidos foram purificados e caracterizados através de RMN de ^1H , IV e ponto de fusão, confirmando a obtenção de 20 chalconas heterocíclicas, dentre 21 sínteses propostas.

As chalconas obtidas foram avaliadas quanto ao seu potencial inibitório frente à enzima YopH, obtendo-se resultados que variaram de 2,5 a 89,1%. Quatro chalconas apresentaram resultados acima de 50% de inibição, sendo: H6 (89,1%), a H22 (85,4%), a H2 (68,0%) e a H12 (52,9%), que apresentaram maior potencial inibitório da YopH dentre as chalconas testadas.

Relacionando-se a estrutura das chalconas ativas com a atividade apresentada, pode-se observar que, para esta série de chalconas os parâmetros que regem a atividade biológica vão além de apenas um possível efeito eletrônico no anel B, sendo determinados também por fatores estéricos. Dentre os compostos monossustituídos, sugere-se que ação inibitória da proteína YopH de *Yersinia pestis* segue uma das linhas centrais da Árvore de Decisão de Topliss, condizente com os resultados experimentais, onde H6 apresentou a melhor atividade inibitória.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MENEGATTI, R.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. A importância da síntese de fármacos. **Cadernos temáticos de Química Nova na escola**. Nº3, maio 2001.
2. WORLD HEALTH STATISTICS 2010 – **World Health Organization**. Disponível em <<http://www.who.int/whosis/whostat/2010/en/index.html>>, acessado em 10 de junho de 2010.
3. CALIXTO, J.B.; JÚNIOR, J.M.S. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: desafios. **Gazeta Médica da Bahia**, 78 (Suplemento 1), 98-106, 2008.
4. CHIARADIA, L. D. **Síntese, Caracterização e REA de Chalconas e de Compostos Heterocíclicos Biologicamente Ativos em Doenças Negligenciadas, Hiperglicemia e Leucemia**. 2010. 536 f. Tese (Doutorado em Química)–Programa de Pós-Graduação em Química, UFSC. Florianópolis, 2010.
5. NOGUEIRA, L. J.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Histórico da evolução da química medicinal e a importância da lipofilia: de Hipócrates e Galeno a Paracelsus e as contribuições de Overton e de Hansch. **Revista Virtual de Química**, 1(3), 227-240, 2009.
6. YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V. Novas perspectivas dos produtos naturais na química medicinal moderna. In: YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V. (orgs.). **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 1 ed. Itajaí: Editora UNIVALI, 2007. Cap 1.
7. NEWMAN, D. J.; GRAGG, G. M.; KINGSTON, D. G. I. Natural products as pharmaceuticals and sources for lead structures. In: **WERMUTH, C. G. (org.). The Practice of Medicinal Chemistry**. 3 ed. Illkirch, France: Elsevier, 2008. Cap. 8, p. 159-186.
8. PETSKO, G. A. For medicinal purposes. **Nature**, 384, 6604,suppl.7-9,1996.
9. TOPLISS, J. G. Utilization of operational schemes for analog synthesis in drug design. **Journal of Medicinal Chemistry**, 15, 1006, 1972.
10. DIMMOCK J R; ELIAS D W; BEAZELY M A; KANDEPU N M. Bioactivities of chalcones. **Current Medicinal Mhemistry**, 6(12), 1125-49, 1999.
11. NI, L.; MENG, C.Q.; SIKORSKI, J.A. Recent advances in therapeutic chalcones. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, 14 (12), 1669-1691, 2004.
12. NOWAKOWSKA, Z. A reiew of anti-inflammatory chalcones. **European Journal of Chemistry**, 42, 125-137, 2007.

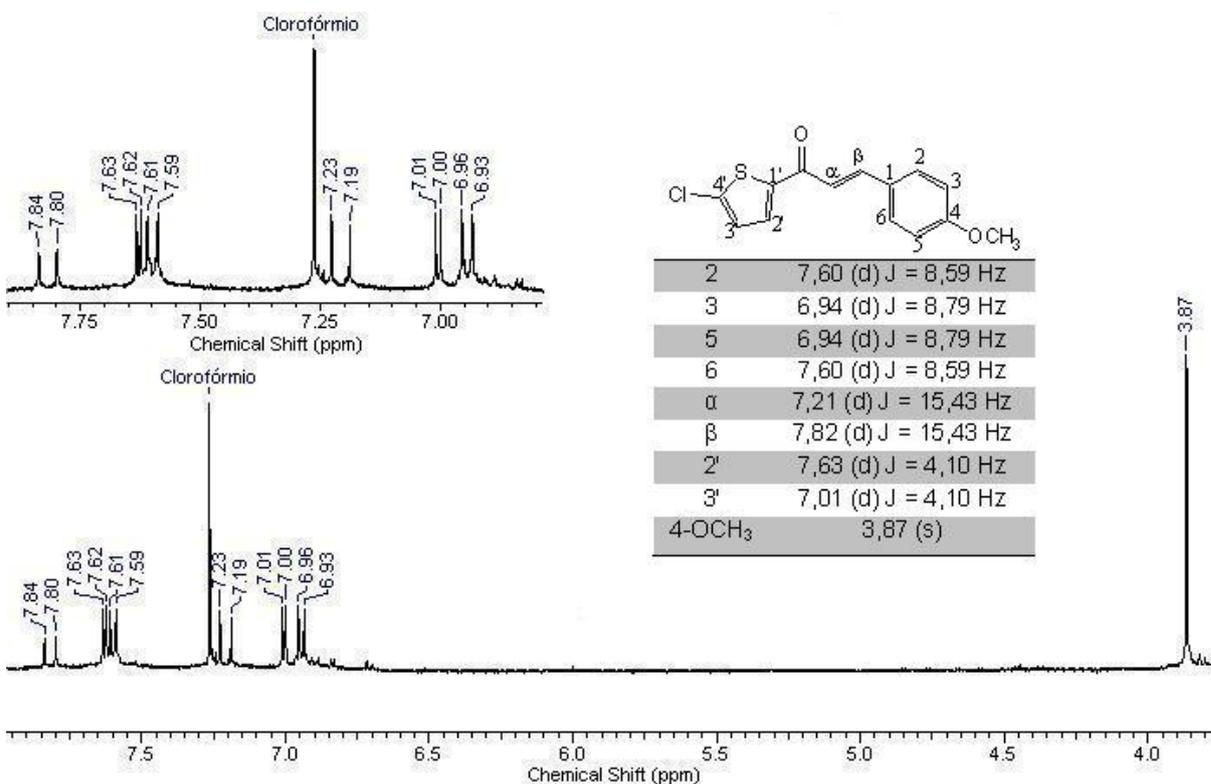
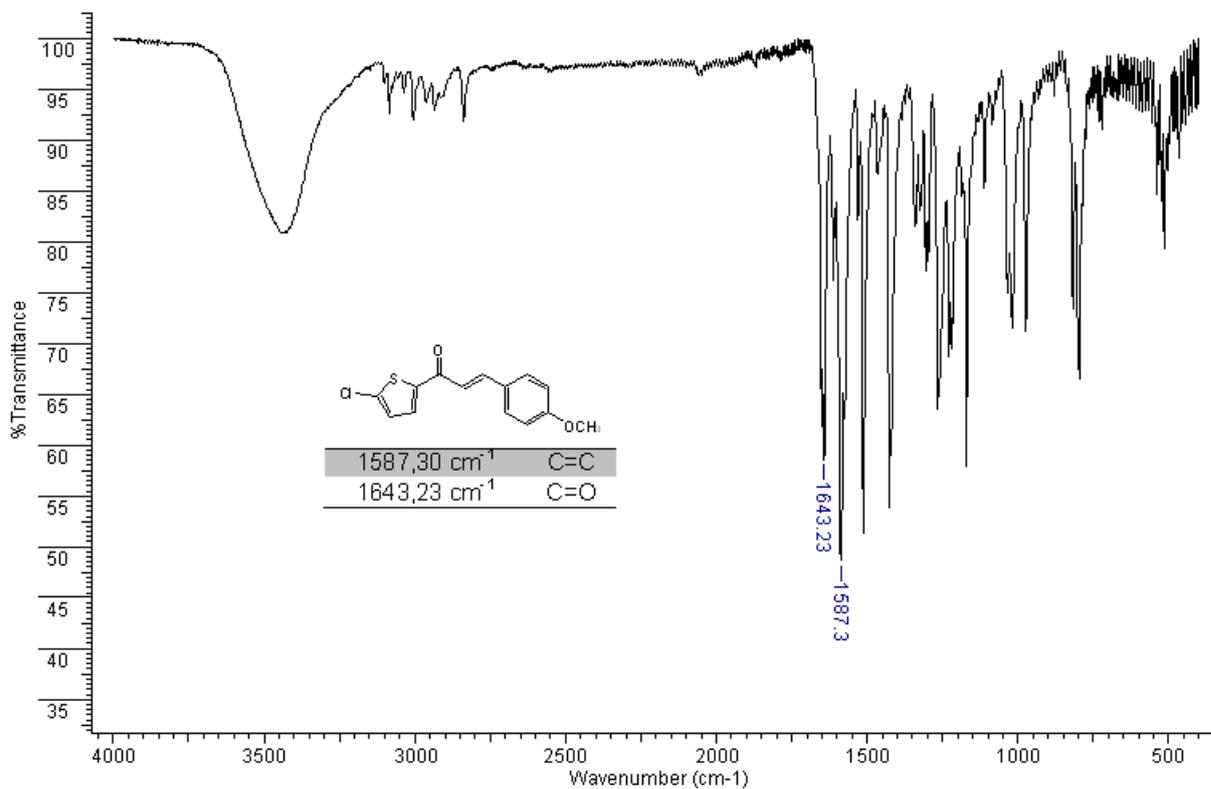
13. WALTER, M. E., CORRÊA R., MONTANARI, C. A., NUNES, R. J. Estudo de QSAR/QSPR de chalconas antinociceptivas. In: REUNIÃO ANUAL DE QUÍMICA ,23.,2000. Poços de Caldas. **Anais da 23ª reunião anual de química**. Poços de Caldas: SBQ, 2000. Disponível em: < <http://www.s bq.org.br/ranteriores/23/resumos/1491-1/index.html>> . Acesso em 07 junho 2010.
14. BATOVSKA, D.; PARUSHEV, S.; STAMBOLIYSKA, B.; TSVETKOVA, I.; NINOVA, M.; NAJDENSKI, H. Examination of growth inhibitory properties of synthetic chalcones for which antibacterial activity was predicted. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 44, 2211-2218, 2009.
15. ÁVILA, H.P.; SMÂNIA, E. F.; MONACHE, F.D.; JÚNIOR, A.S. Structure-activity relationship of antibacterial chalcones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 16, 9790-9794, 2008.
16. BORCHHARDT, D. M.; CHIARADIA, L. D. ; NUNES, R. J. ; OLIVA, G. ; YUNES, R. A. ; ANDRICOPULO, A. D. . Biochemical Evaluation of a Series of Synthetic Chalcone and Hydrazide Derivatives as Novel Inhibitors of Cruzain from *Trypanosoma cruzi*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 21, 142-150, 2010.
17. YUNES, R. A. ; CHIARADIA, L. D. ; LEAL, P. C. ; CECHINEL FILHO, V. ; SANTOS, E. C. T. ; FALCÃO, C. A. B. ; BERGMANN, B. R. . Chalcones as new drugs against Leishmaniasis. **Current Trends in Medicinal Chemistry**, 4, 47-56, 2006.
18. DAMAZIO, R. g. ; ZANATTA, A. P. ; CAZAROLLI, L. H. ; CHIARADIA, L. D. ; MASCARELLO, A. ; NUNES, R. J. ; YUNES, R. A. ; BARRETO SILVA, F. R. M. Antihyperglycemic activity of naphthylchalcones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 45, 1332-1337, 2010.
19. PEDRINI, F. S. ; CHIARADIA, L. D. ; LICINIO, M. A. ; MORAES, A. C. R. ; CURTA, J. C. ; COSTA, A. ; MASCARELLO, A. ; CRECZYNSKI-PASA, T. B. ; NUNES, R. J. ; YUNES, R. A. ; SILVA, M. C. S. da . Induction of apoptosis and cell cycle arrest in L-1210 murine lymphoblastic leukemia cells by (2E)-3-(2-naphthyl)-1-(3-methoxy-4-hydroxy-phenyl)-2-propen-1-one. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 62, 1128-1136, 2010.
20. VOGEL, A. I. **Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry**, 5 ed. New York: John Wiley & Sons, 1989. p.1017.
21. GO, M. L.; WU, X.; LIU, X. L. Chalcones: an update on cytotoxic and chemoprotective properties. **Current Medicinal Chemistry**, 12, 483-499, 2005.
22. CHENG, J.-H.; HUNG, C.-F.; YANG, S.-C.; WANG, J.-P.; WON, S.-J.; LIN, C.-N. Synthesis and cytotoxic, anti-inflammatory, and anti-oxidant activities of 2',5'-dialkoxychalcones as cancer chemopreventive agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 16, 7270-7276, 2008.

23. 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.
24. SEBTI, S.; SOLHY, A.; TAHIR, R.; BOULAAJAJ, S.; MAYORAL, J. A.; FRAILE, J. M.; KOSSIR, A.; OUMIMOUN, H. Calcinated sodium nitrate/natural phosphate: an extremely active catalyst for the easy synthesis of chalcones in heterogeneous media. **Tetrahedron Letters**, 42, 7953-7955, 2001.
25. BARREIRO, J. E., 2010. Introdução à química farmacêutica e medicinal – XVI **Escola de Verão em Química Farmacêutica Medicinal** – UFRJ, 2010 – disponível em <http://www.farmacia.ufrj.br/lassbio/downloads/cursos_semin/XVI_EVQMF/int_qfarmaceutica_parte3.pdf>, acesso em 08 de junho de 2010.
26. YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V. Breve Análise Histórica da Química de Plantas Medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (ed.). **Plantas Medicinais: sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos, 2001. Cap. 1.
27. MONDOL, M.A.M. Antiangiogenic study of two nonsteroidal antiinflammatory compounds using chick chorioallantoic membrane assay. **Journal Medicinal Science**, 6, 609-614, 2006.
28. ROMAGNOLI, R.; BARALDI, P.G.; CARRION, M.D.; CARA, C.L.; CRUSLOPEZ, O.; PRETI, D.; TOLOMEO, M.; GRIMAUDDO, S.; Di CRISTINA, A.; ZONTA, N.; BALZARINI, J.; BRANCALE, A.; SARKAR, T.; HAMEL, E. Design, synthesis, and biological evaluation of thiophene analogues of chalcones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 16, 5367-5376, 2008.
29. AOYAMA, H.; SILVA, T. M. A.; MIRANDA, M. A.; FERREIRA, C. V. Proteínas tirosina fosfatases: Propriedades e funções biológicas. **Química Nova**, 26 (6), 896-900, 2003.
30. BIALY, L.; WALDMANN, H. Inhibitors of protein tyrosine phosphatases: Next-generation drugs? **Angewandte Chemie International Edition**, 44, 2-27, 2005.
31. 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.
32. COZZONE, A. J.; GRANGEASSE, C.; DOUBLET, P.; DUCLOS, B. Protein phosphorylation on tyrosine in bacteria. **Arch Microbiol**, 181, 171-181, 2004.

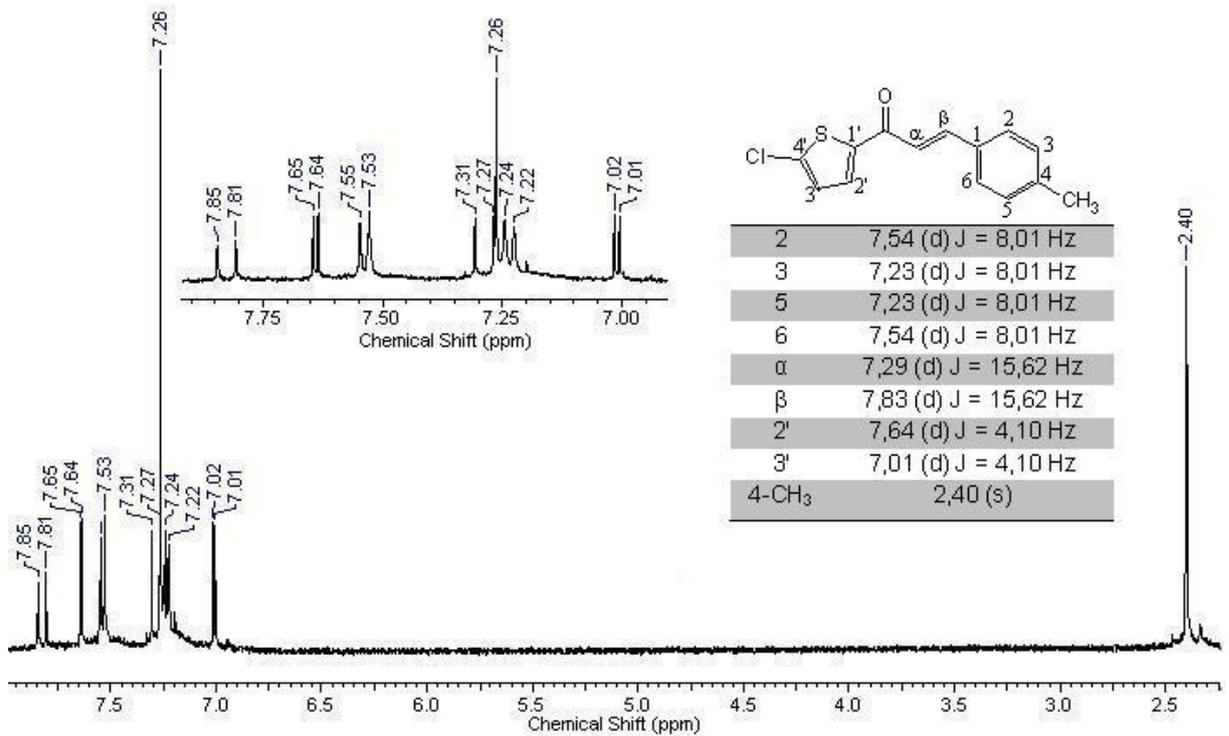
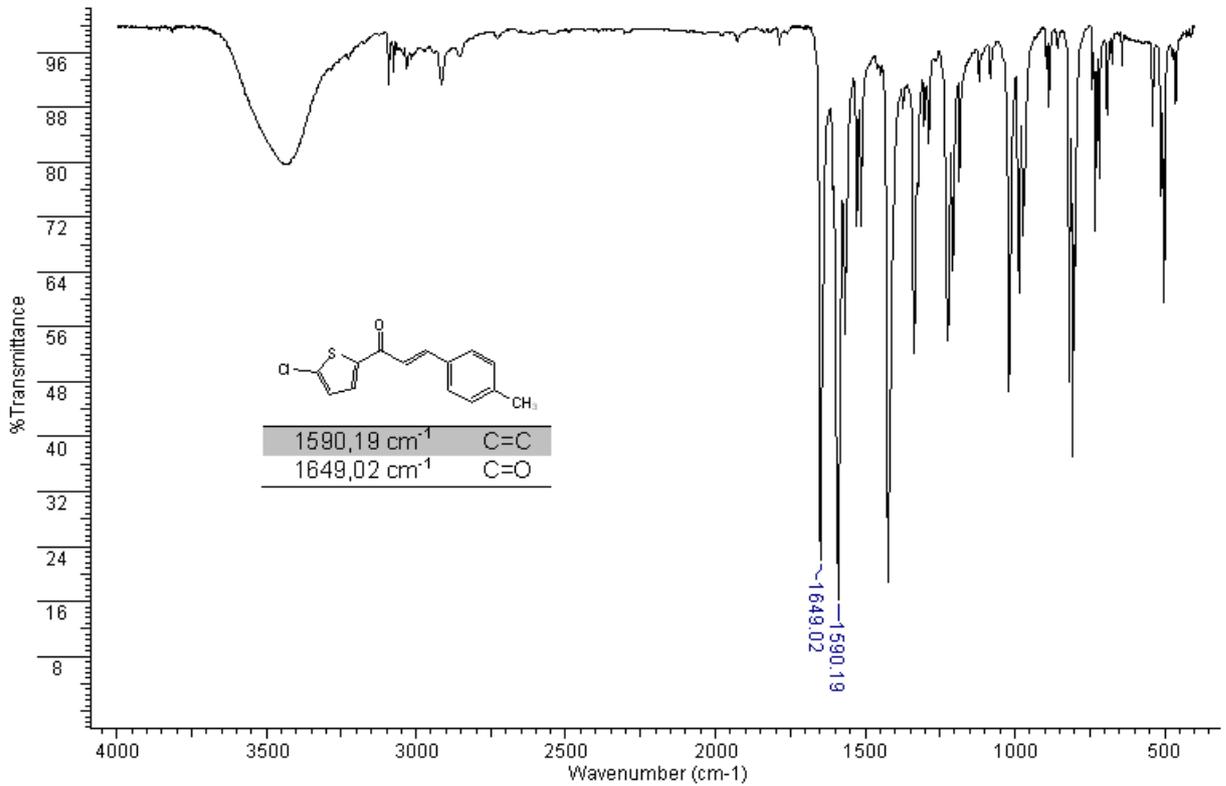
33. BAKAL, C. J.; DAVIES, J. E. No longer an exclusive club: eukaryotic signalling domains in bacteria. **Trends in Cell Biology**, 10, 32-38, 2000.
34. BLACK, D. S.; BLISKA, J. B. Identification of p130^{Cas} as a substrate of Yersinia YopH (Yop51), a bacterial protein tyrosine phosphatase that translocates into mammalian cells and targets focal adhesions. **EMBO Journal**, 16(10), 2730-2744, 1997.
35. VOVK, A. I.; KONONETS, L. A.; TANCHUK, V.Y.; CHERENOK, S.O.; DRAPAILO, A.B.; KALCHENKO, V.I.; KUKHAR, V.P. Inhibition of *Yersinia* protein tyrosine phosphatase by phosphonate derivatives of calixarenes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 20, 483-487, 2010.
36. LIU, F.; HAKAMI, R.M.; DYAS, B.; BAHTA, M.; LOUNTOS, G. T.; WAUGH, D.S.; ULRICH, R.G.; BURKE JR., T.R. A rapid oxime linker-based library approach to identification of bivalent inhibitors of the *Yersinia pestis* protein-tyrosine phosphatase, YopH. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 20, 2813-2816, 2010.
37. Disponível em:
<http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=6&inoid=303>.
Acesso em 15/10/2010.
38. Disponível em:
<http://www.medicinanet.com.br/conteudos/biblioteca/1815/peste.htm>. Acesso em 15/11/2010.
39. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs267/en/> , acesso em 12/10/2010.
40. TITBALL, R. W.; LEARY, S. E. Plague. **British Medical Bulletin**, 54(3), 625-633, 1998.
41. ALMEIDA, A. M. P. de; SOUZA, G. T. de; SANTOS, S.; SILVA, S. C.; PETRIBÚ, M. M. V.; HAVER, P. O.; ARAGÃO, A. I.; TAVARES, C. Contribuição para o diagnóstico de peste. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 40 (1), Uberaba. Jan./Feb. 2007.
42. RYABUKHIN, S.V.; PLASKON, A.S.; DMITRIY, M.; PIPKO, S.E.; SHIVANYUK, A. N. Combinatorial Knoevenagel Reactions. **Journal of Combinatorial Chemistry**, 9(6), 1073-1078, 2007.
43. BUU-HOI, NG.PH.; XUONG, Ng. Dat.; SY, M. Chalcone derivatives of thiophene and their thiosemicarbazones. **Bulletin de la Societe Chimique de France**, 1646-50, 1956.
44. RIZVI, S.U.F.; SIDDIQUI, H.L.; PARVEZ, M.; AHAMAD, M.; SIDDIQUI, W. A.; YASINZAI, M.M. Antimicrobial and Antileishmanial Studies of Novel (2E)-3-(2-Chloro-6-methyl/methoxyquinolin-3-yl)-1-(Aryl)prop-2-en-1-ones. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, 58(3), 301—306, 2010.

8 ANEXOS

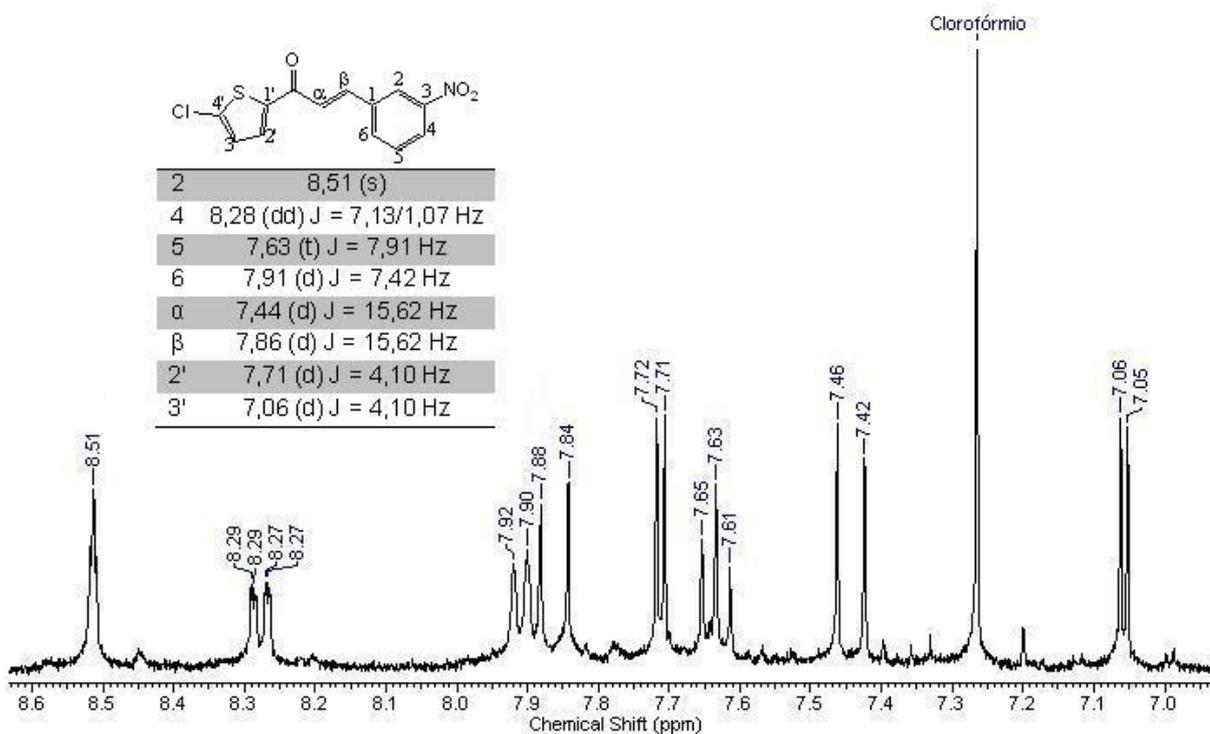
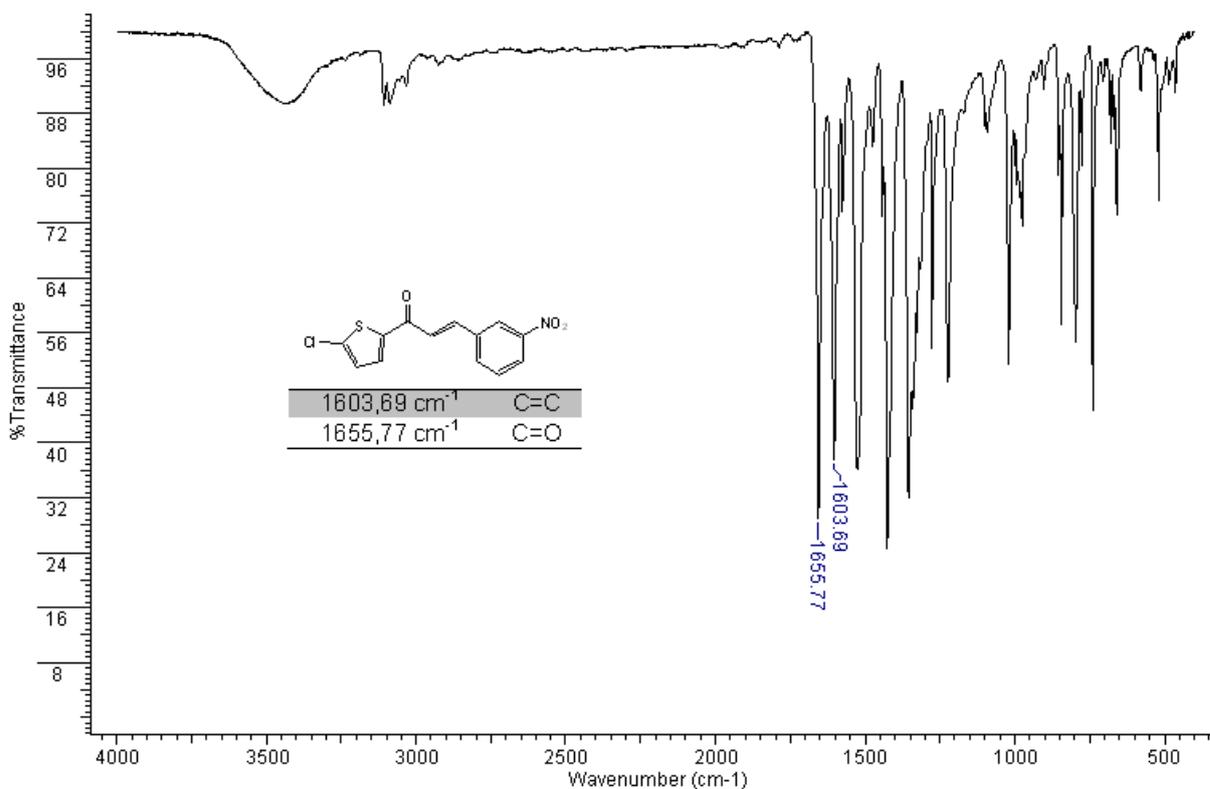
Anexo I – Espectros de absorção no IV e de RMN de ^1H do composto H3.



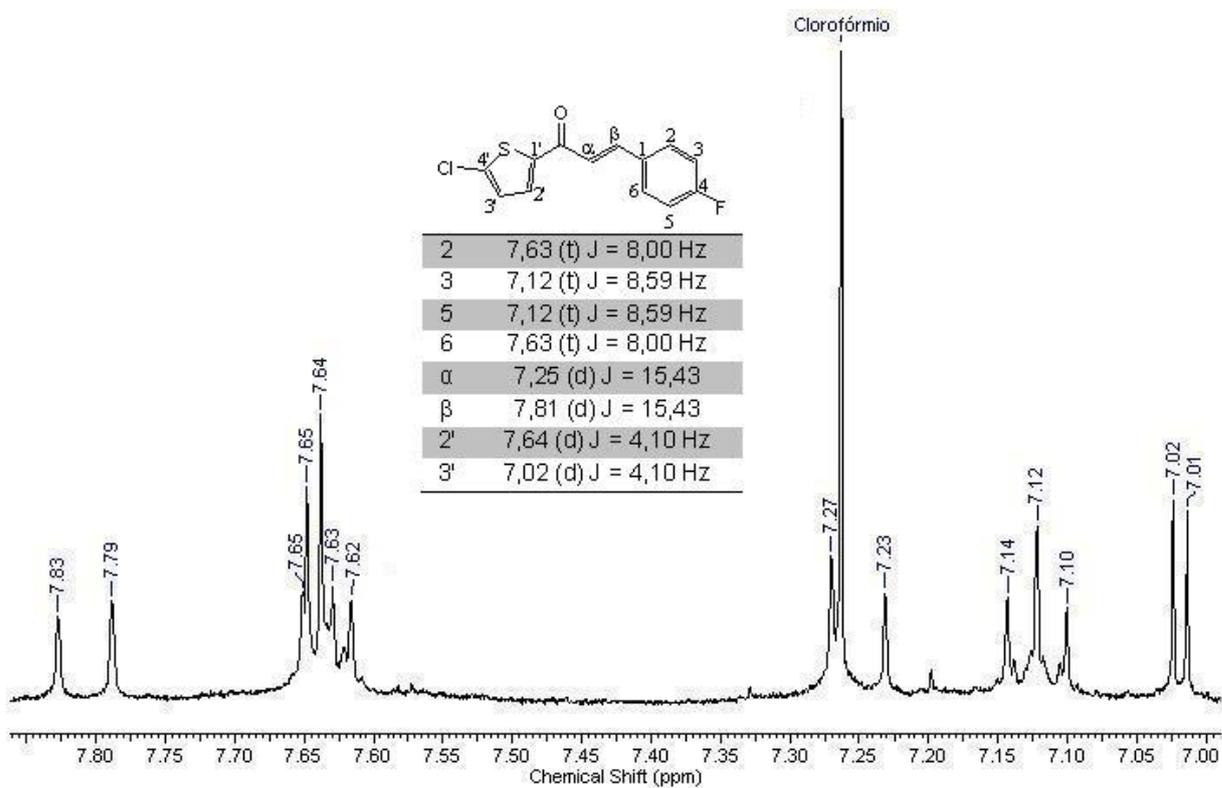
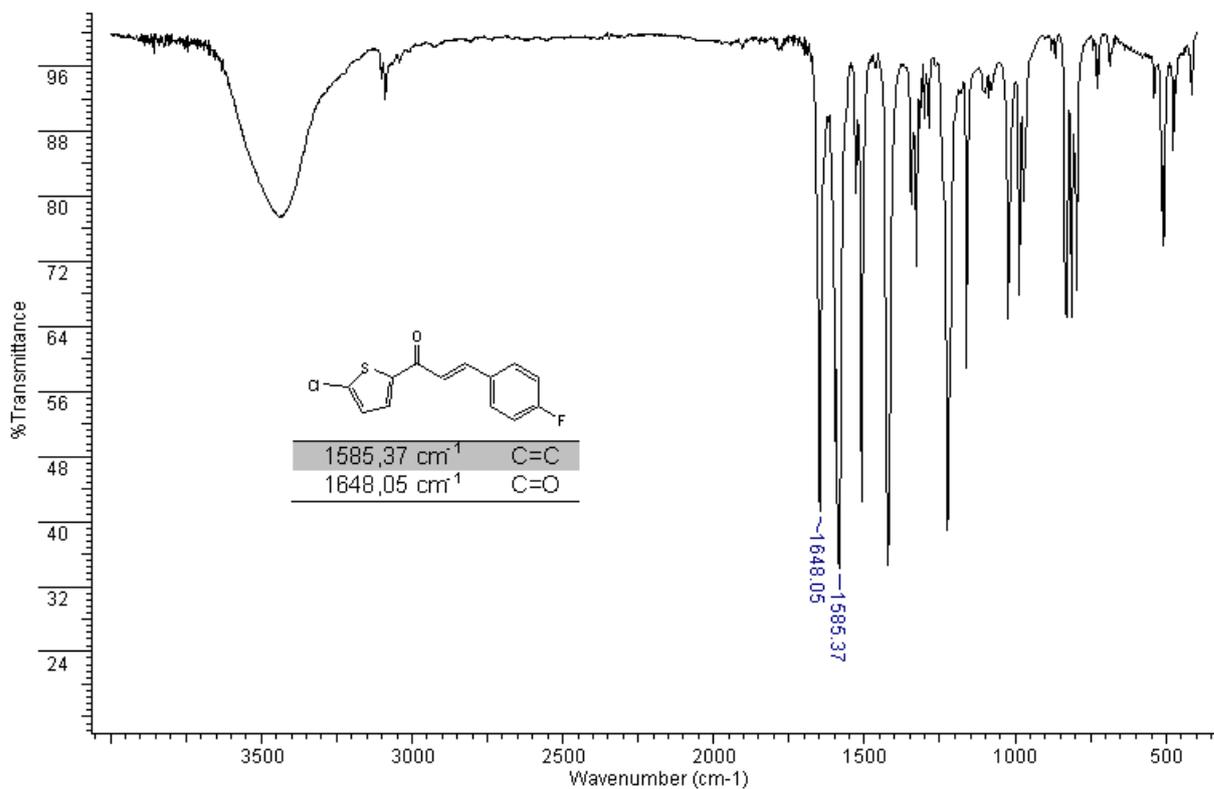
Anexo II – Espectros de absorção no IV e de RMN de ^1H do composto H4.



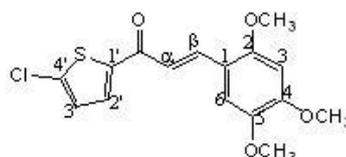
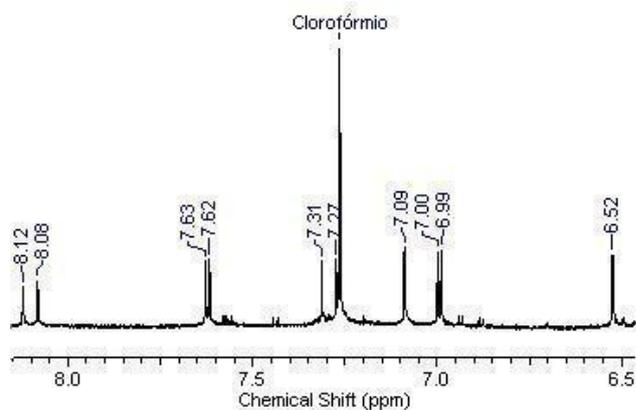
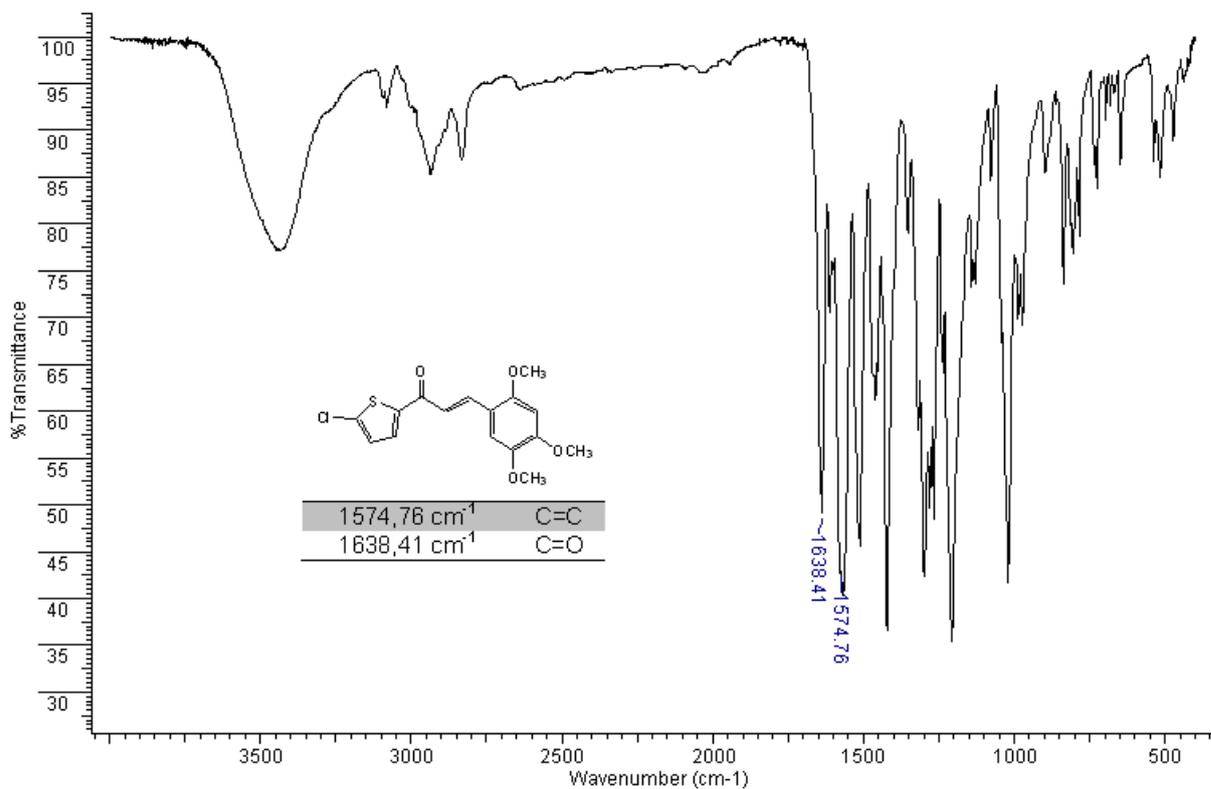
Anexo III – Espectros de absorção no IV e de RMN de ^1H do composto H6.



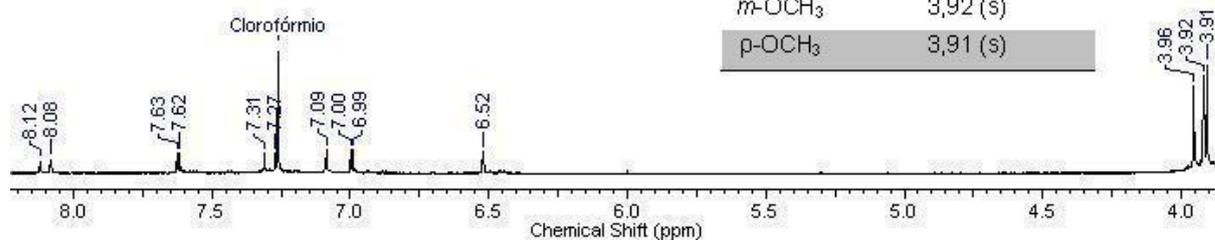
Anexo IV – Espectros de absorção no IV e de RMN de ^1H do composto H7.



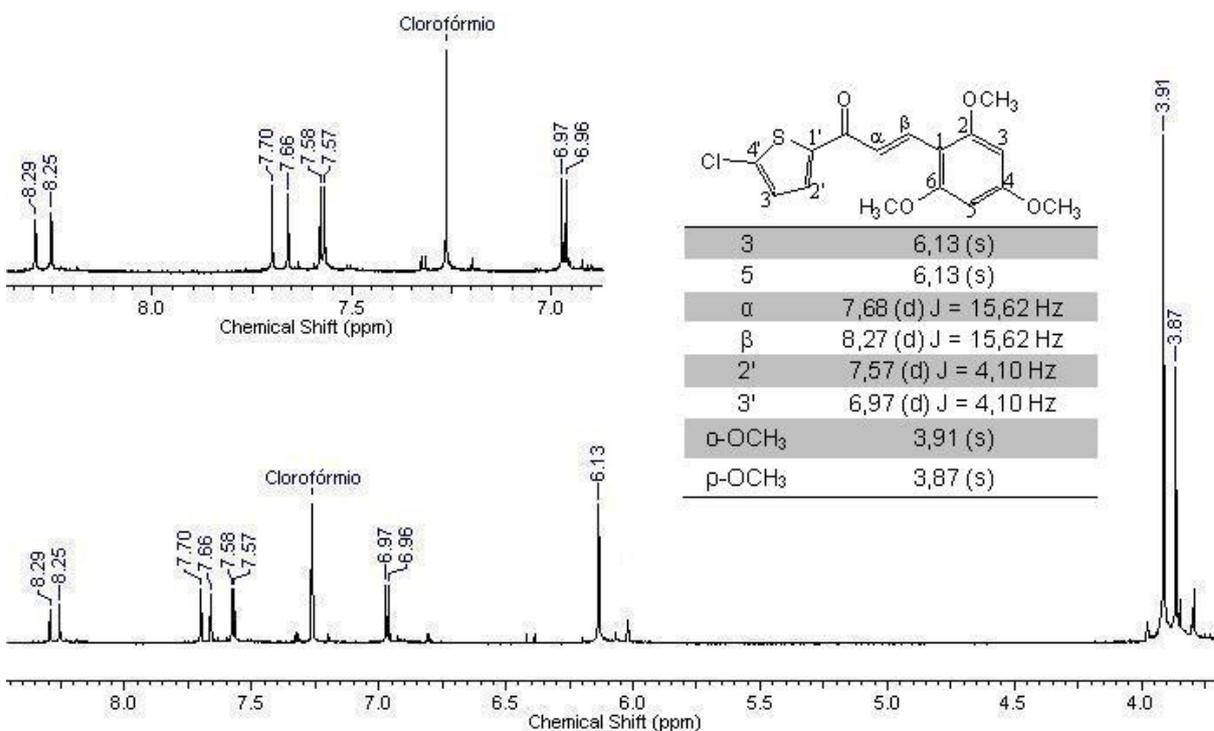
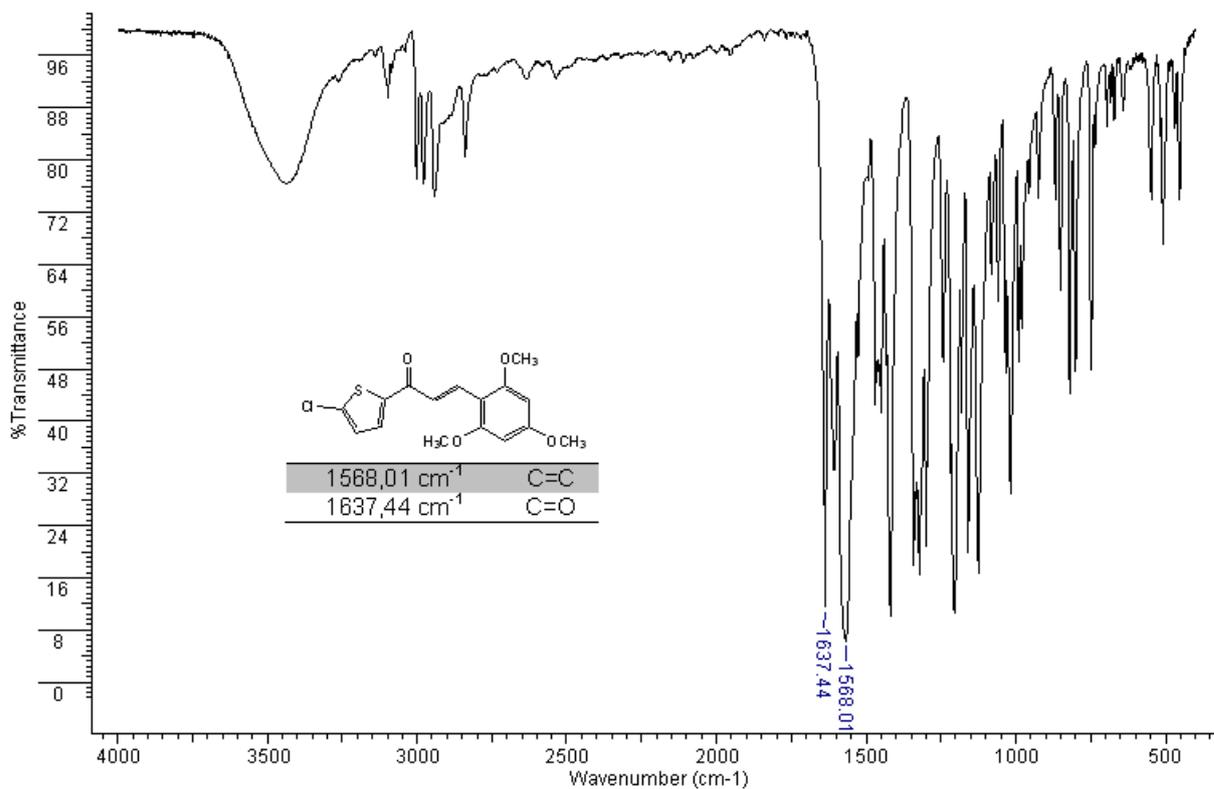
Anexo V – Espectros de absorção no IV e de RMN de ^1H do composto H11.



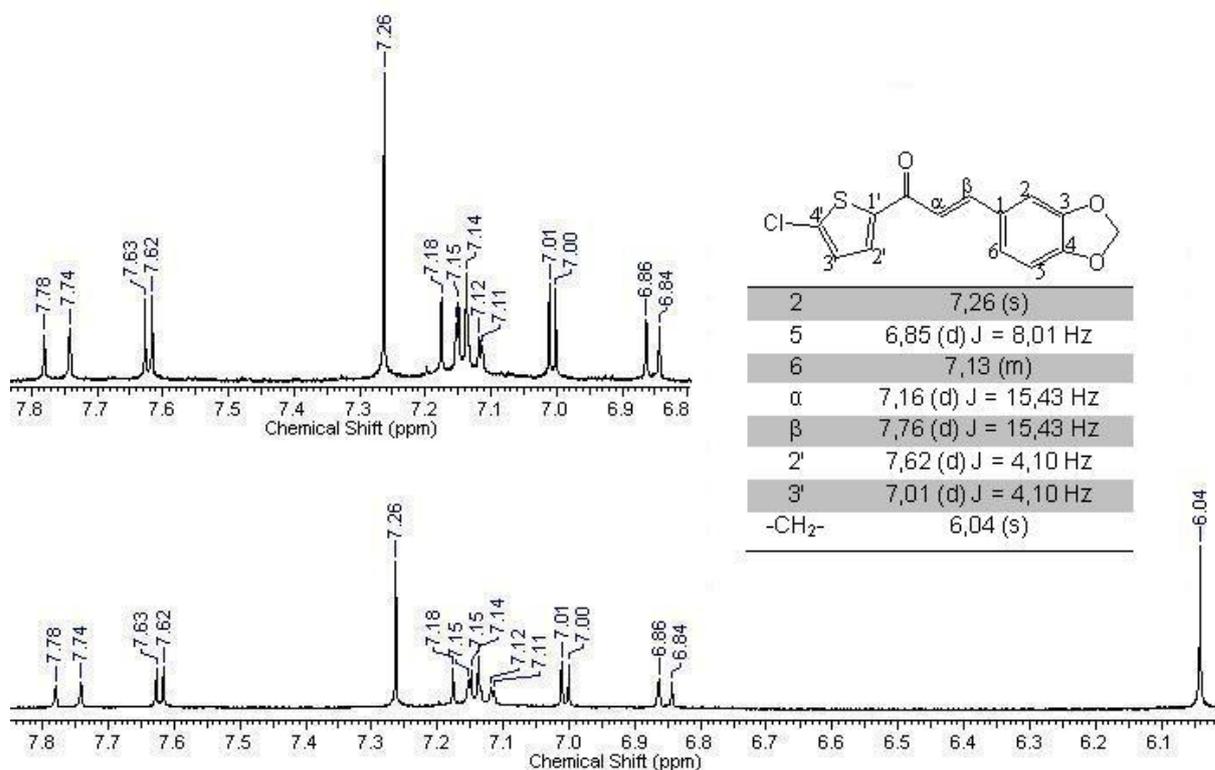
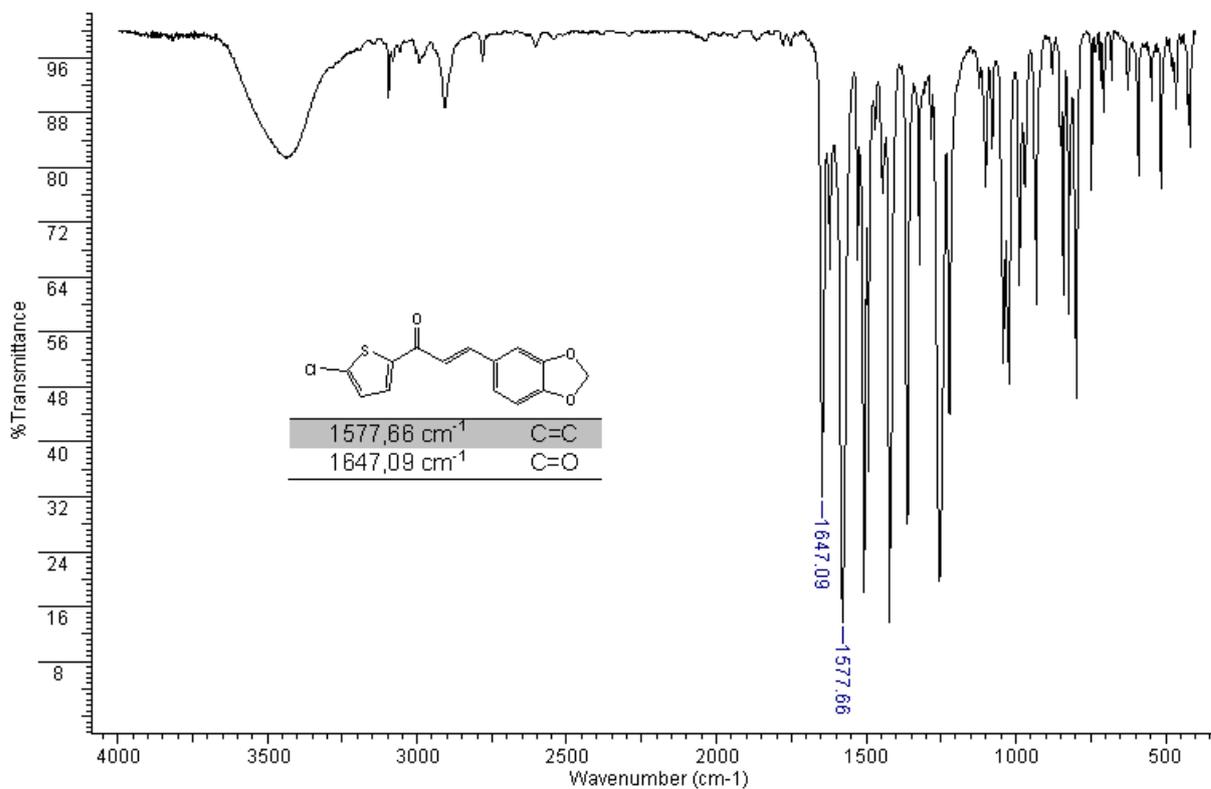
3	6,52 (s)
6	7,09 (s)
α	7,29 (d) J = 15,62 Hz
β	8,10 (d) J = 15,62 Hz
2'	7,62 (d) J = 4,10 Hz
3'	6,99 (d) J = 4,10 Hz
o-OCH ₃	3,96 (s)
m-OCH ₃	3,92 (s)
p-OCH ₃	3,91 (s)



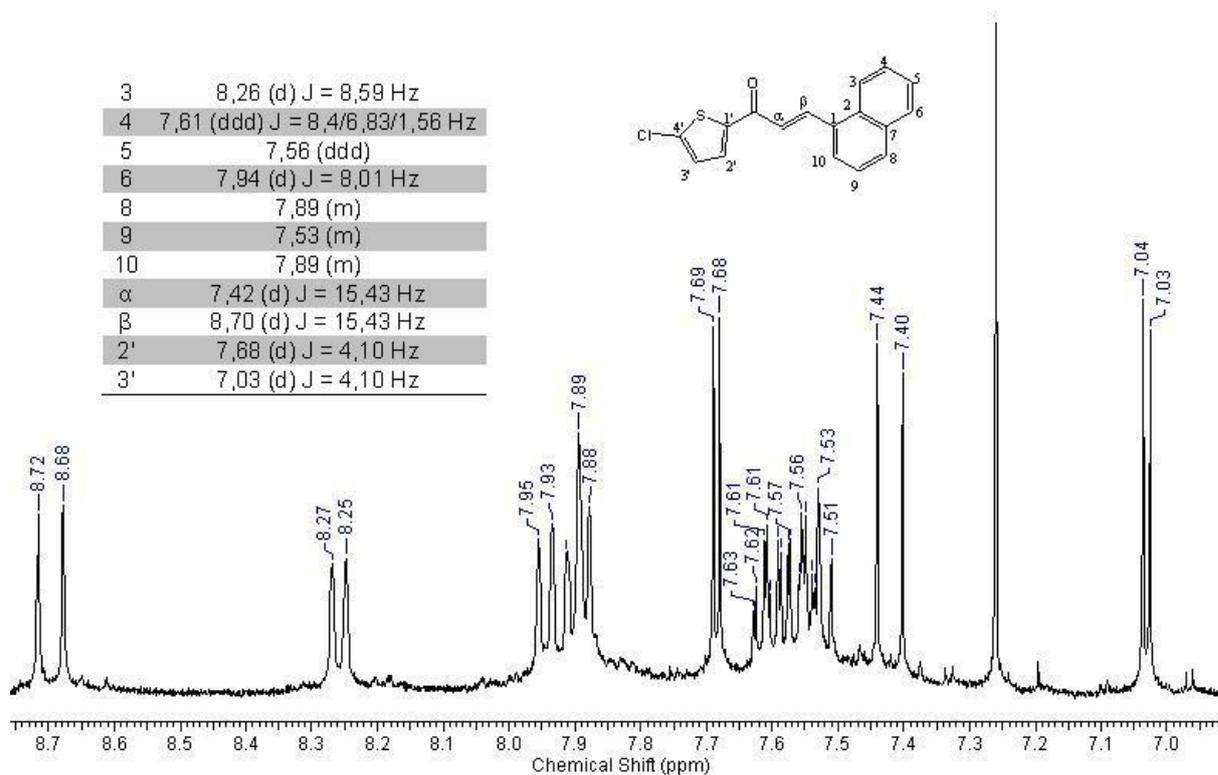
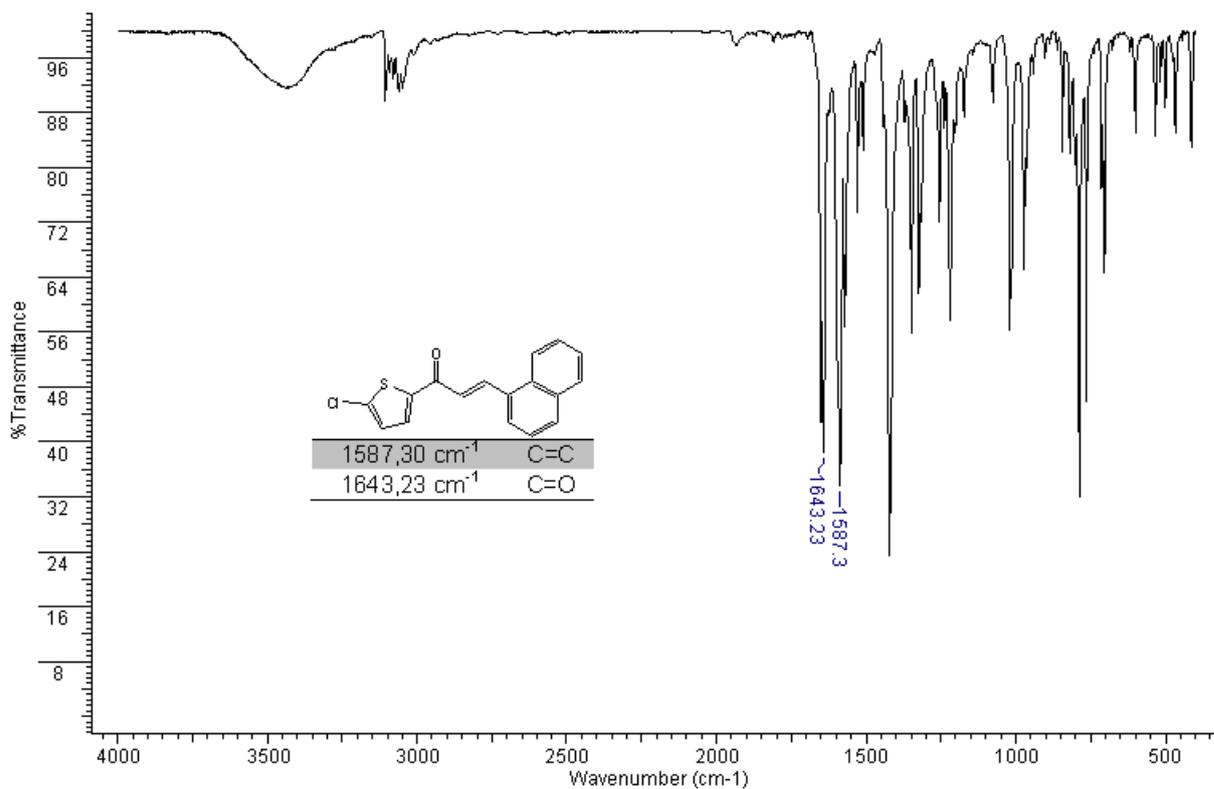
Anexo VI – Espectros de absorção no IV e de RMN de ^1H do composto H12.



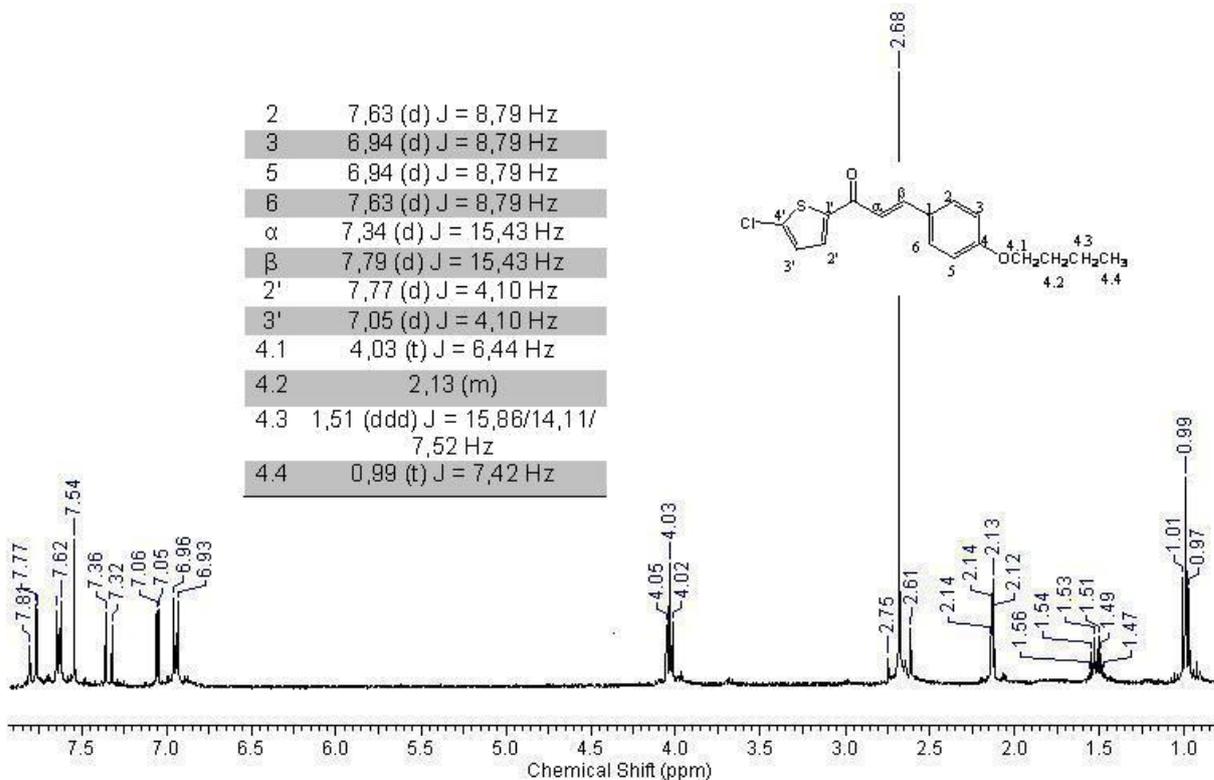
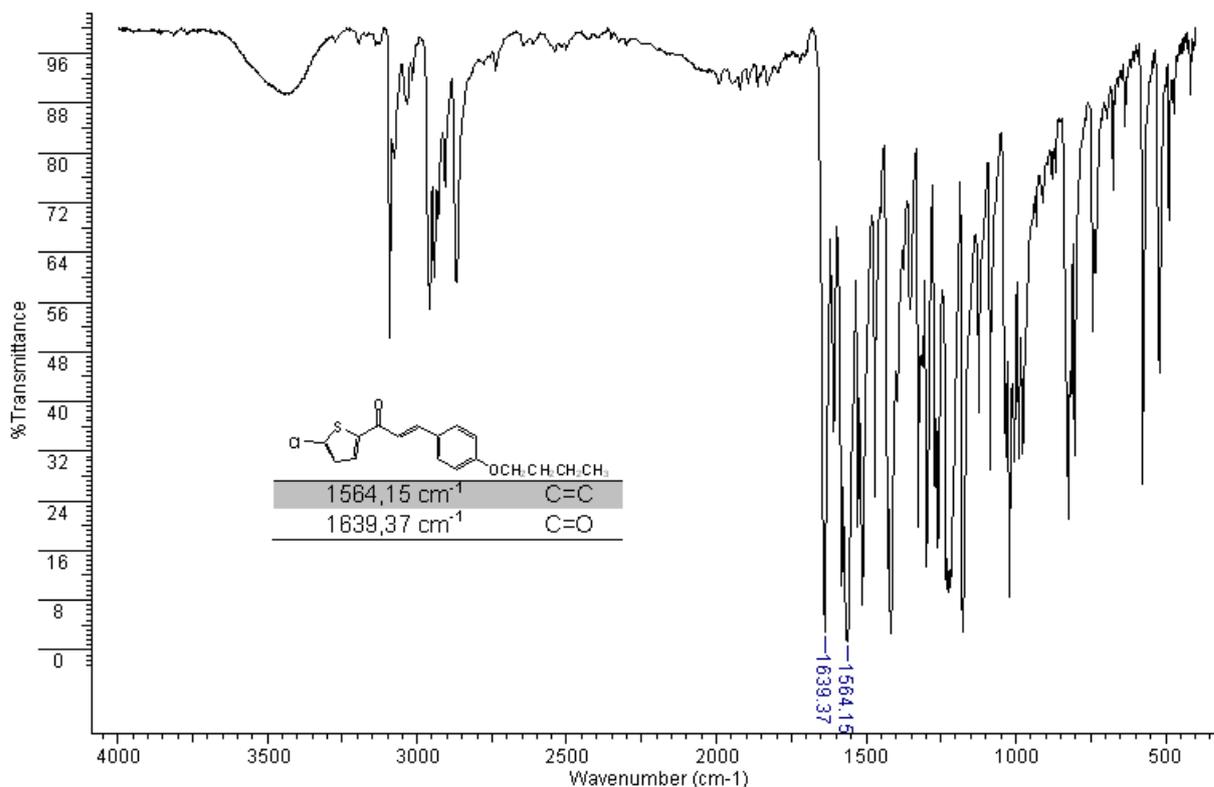
Anexo VII – Espectros de absorção no IV e de RMN de ^1H do composto H14.



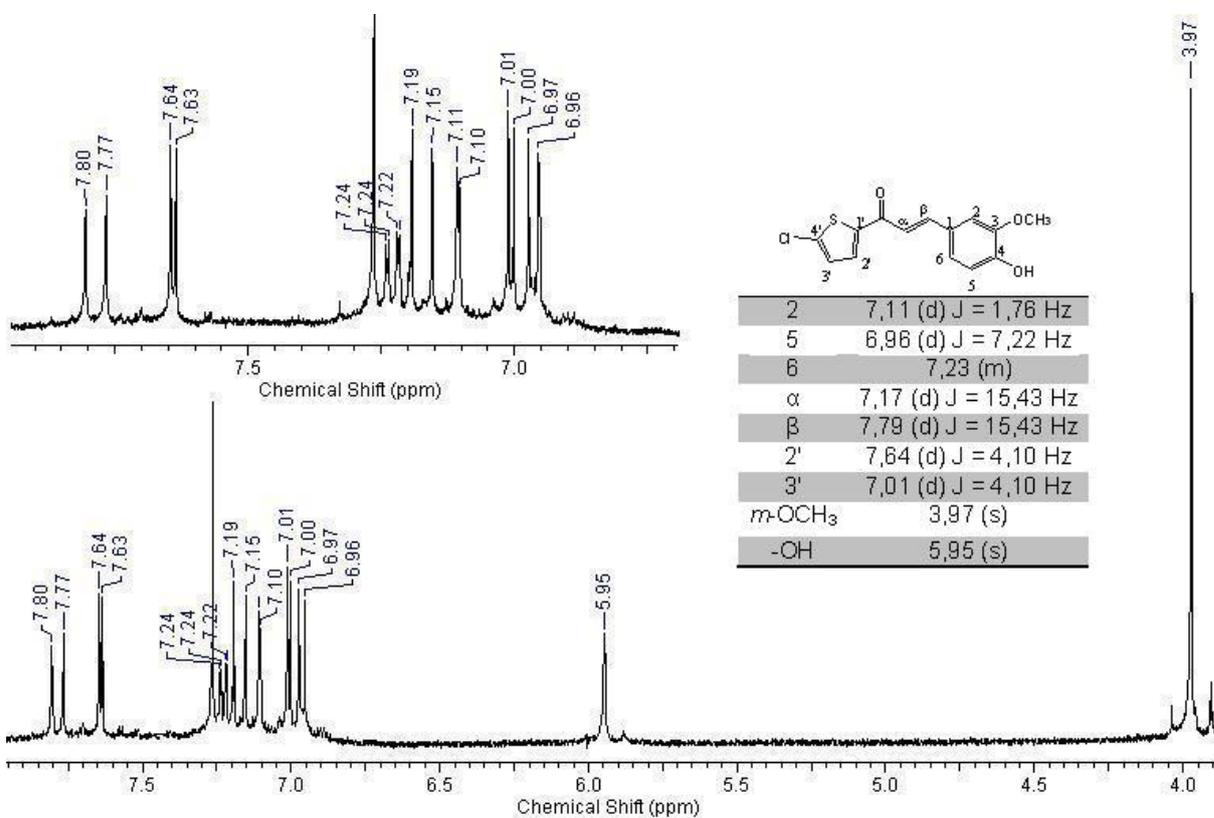
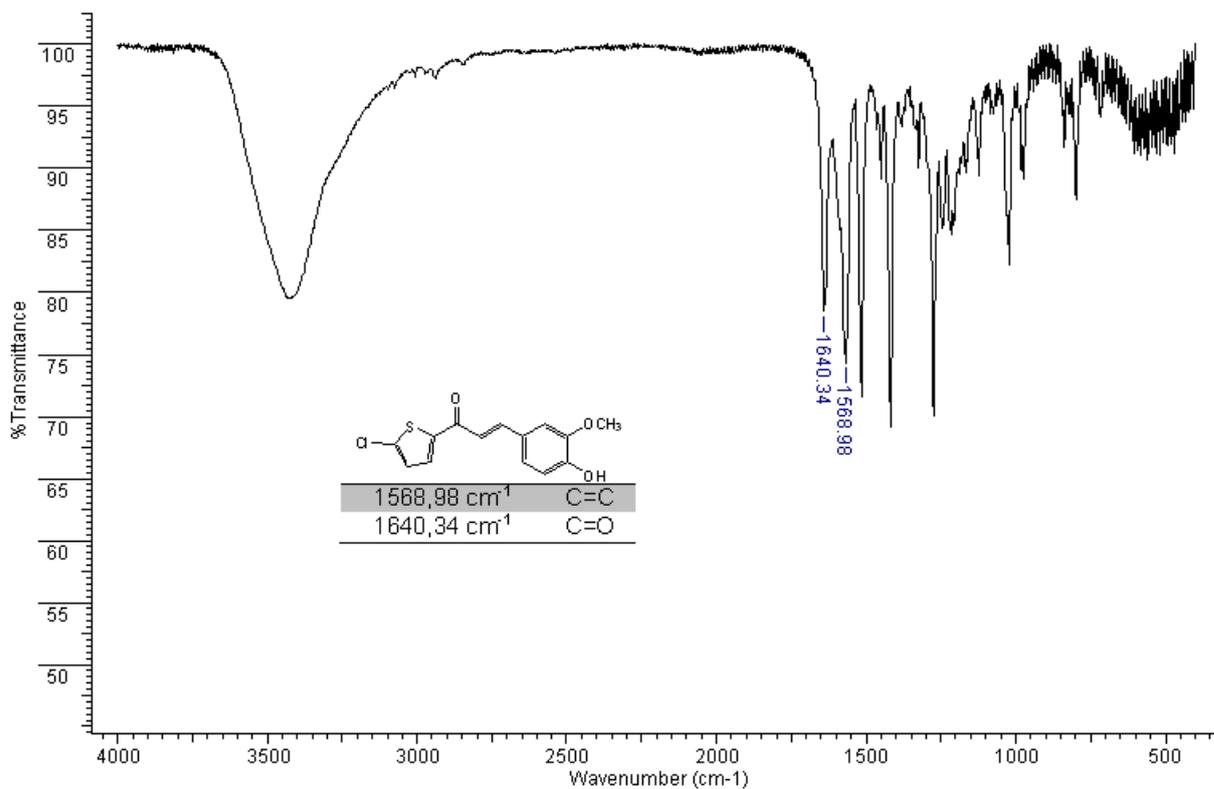
Anexo VIII – Espectros de absorção no IV e de RMN de ^1H do composto H15.



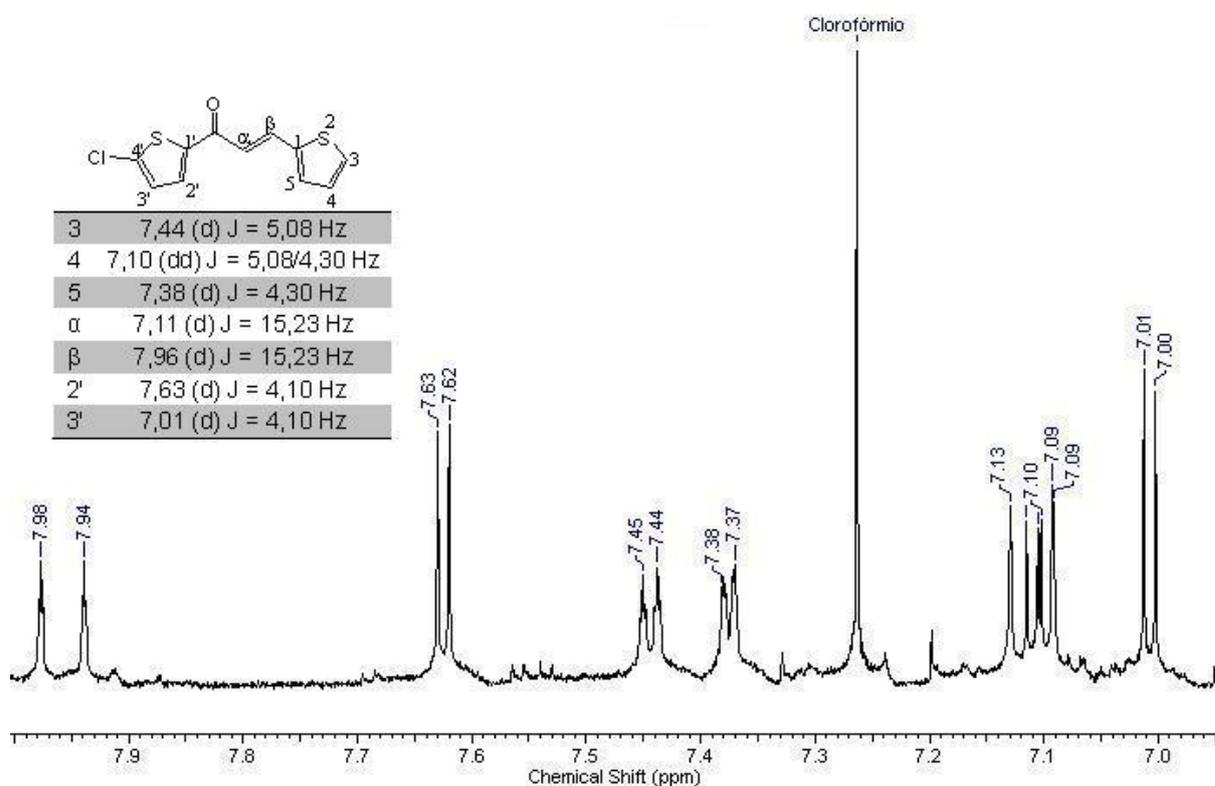
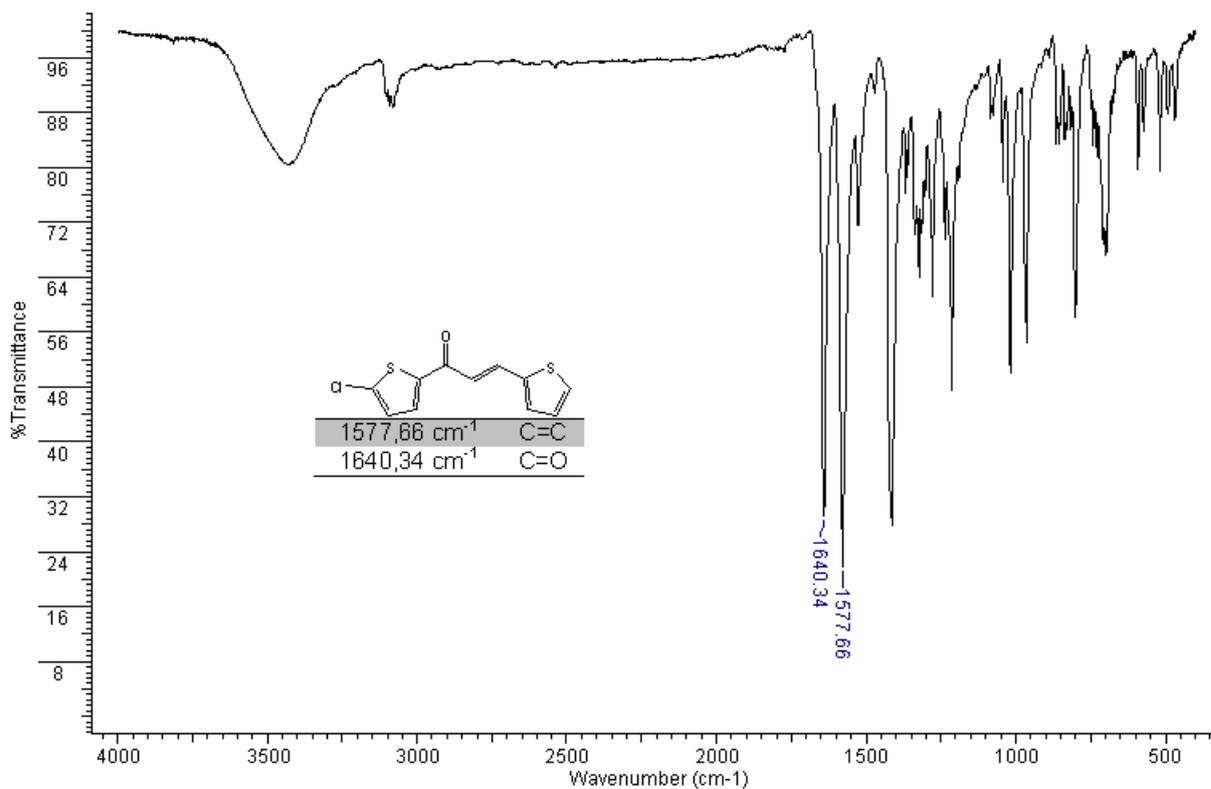
Anexo IX – Espectros de absorção no IV e de RMN de ^1H do composto H16.



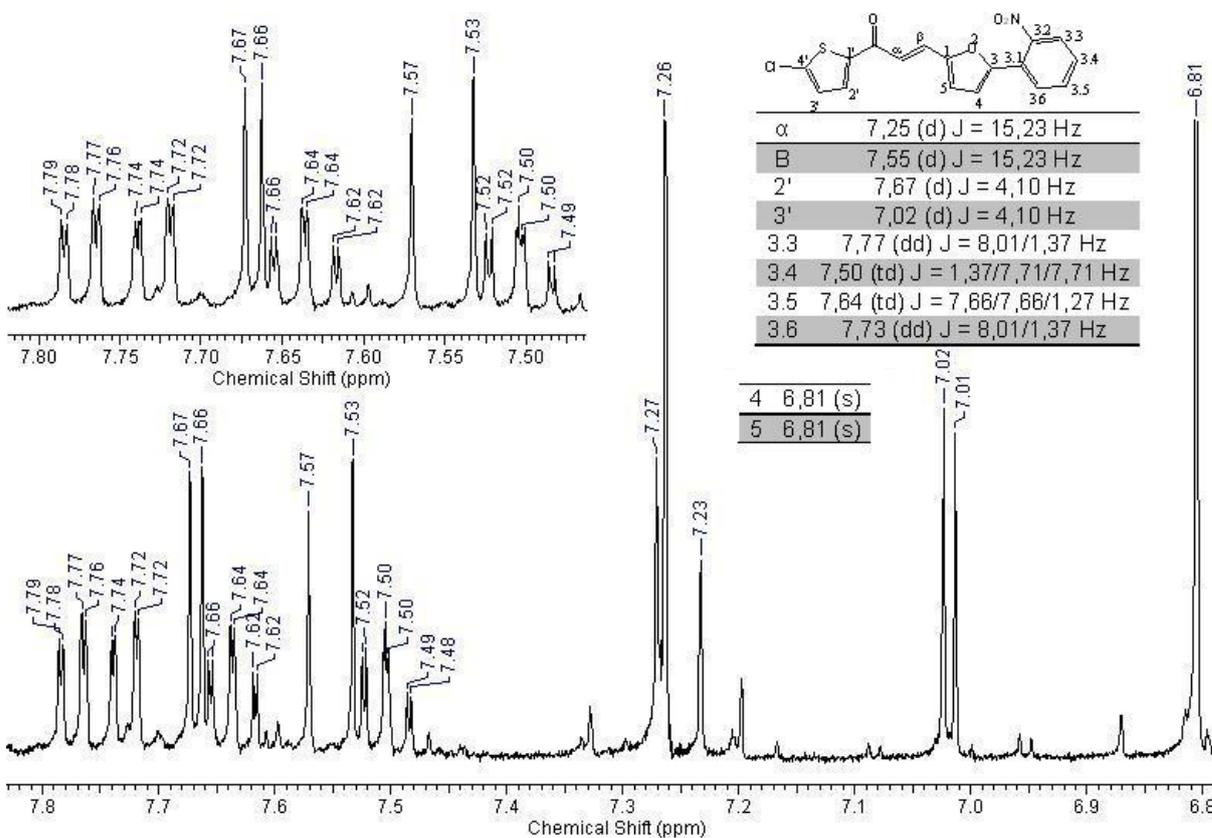
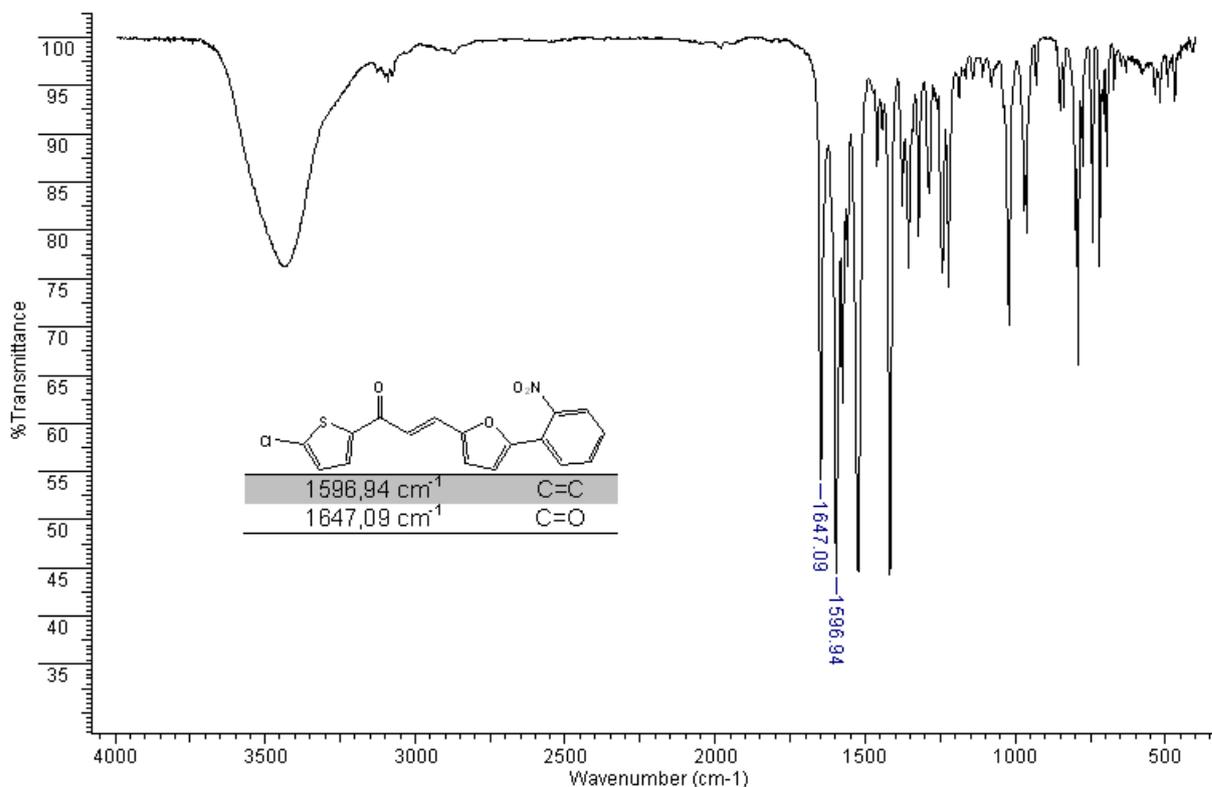
Anexo X – Espectros de absorção no IV e de RMN de ^1H do composto H17.



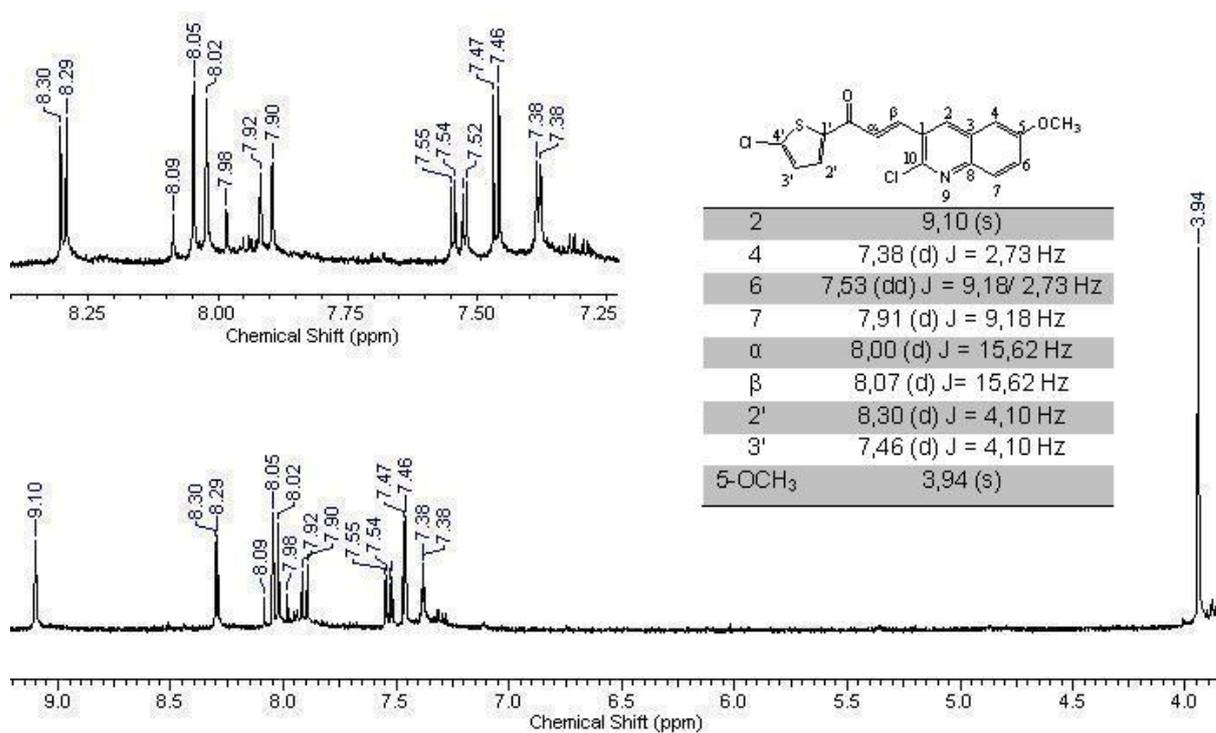
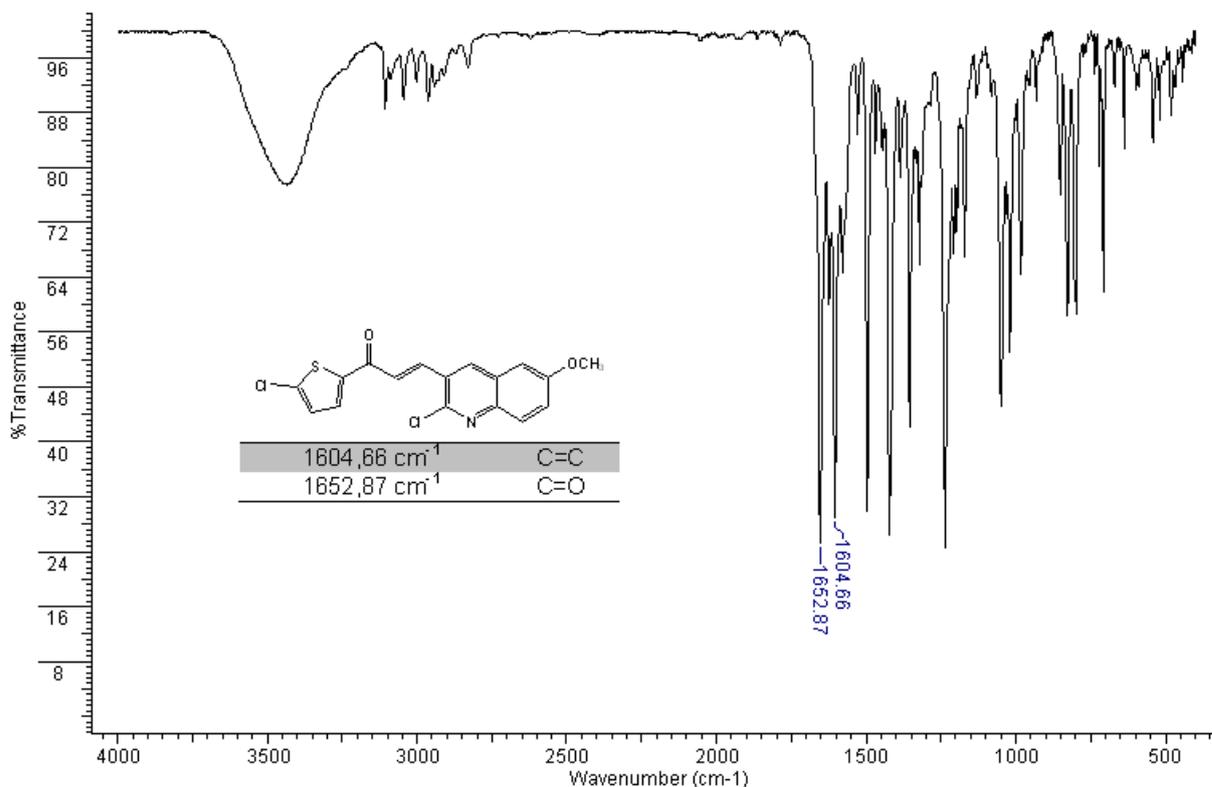
Anexo XI – Espectros de absorção no IV e de RMN de ^1H do composto H19.



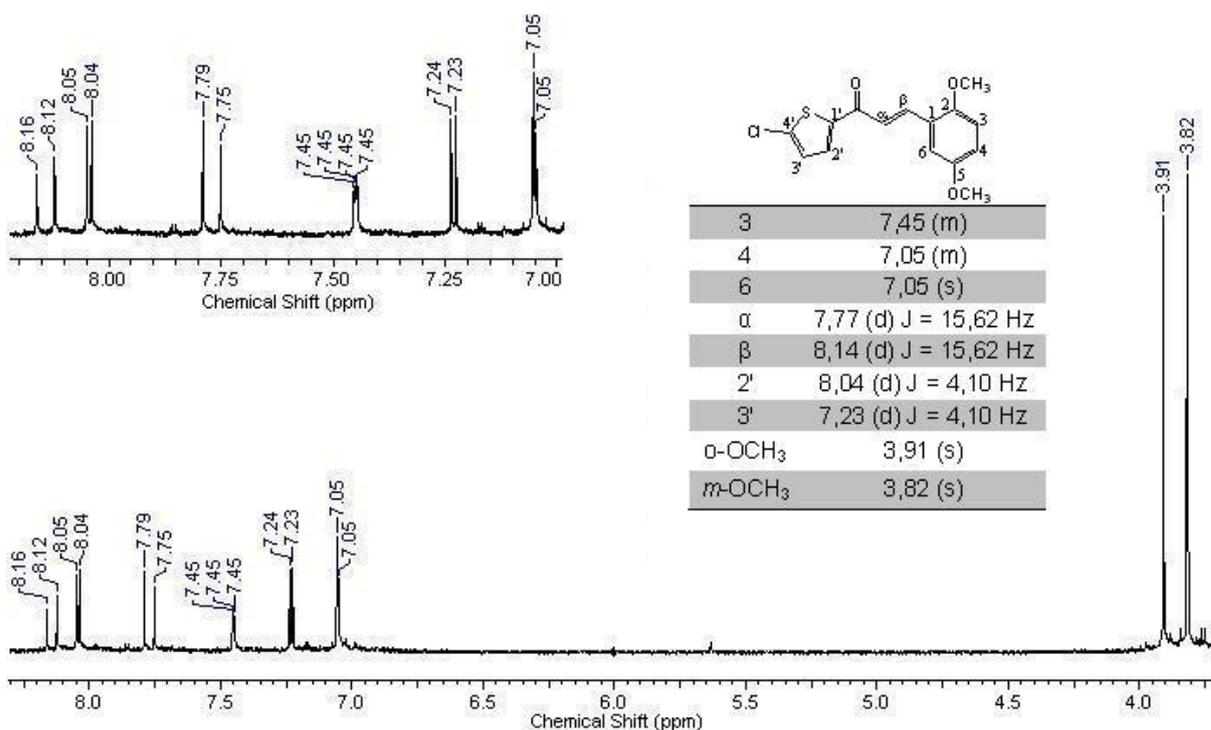
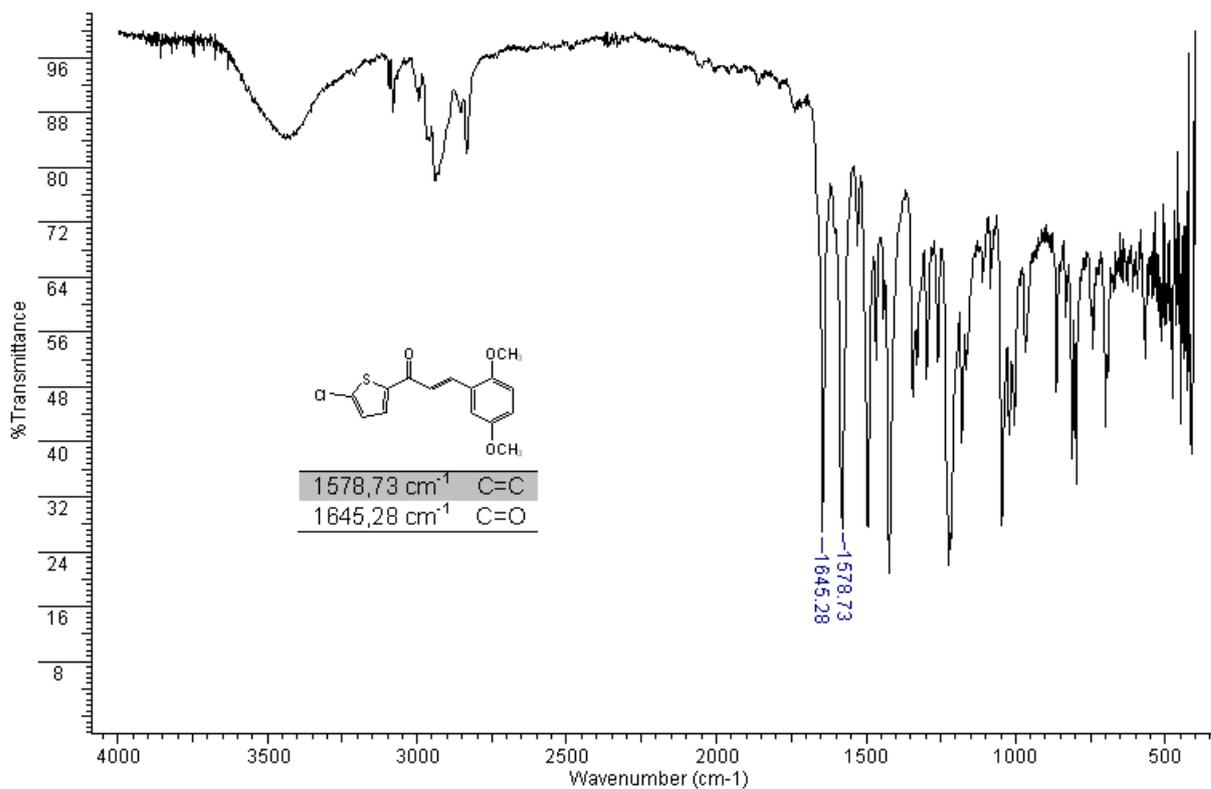
Anexo XII – Espectros de absorção no IV e de RMN de ¹H do composto H21.



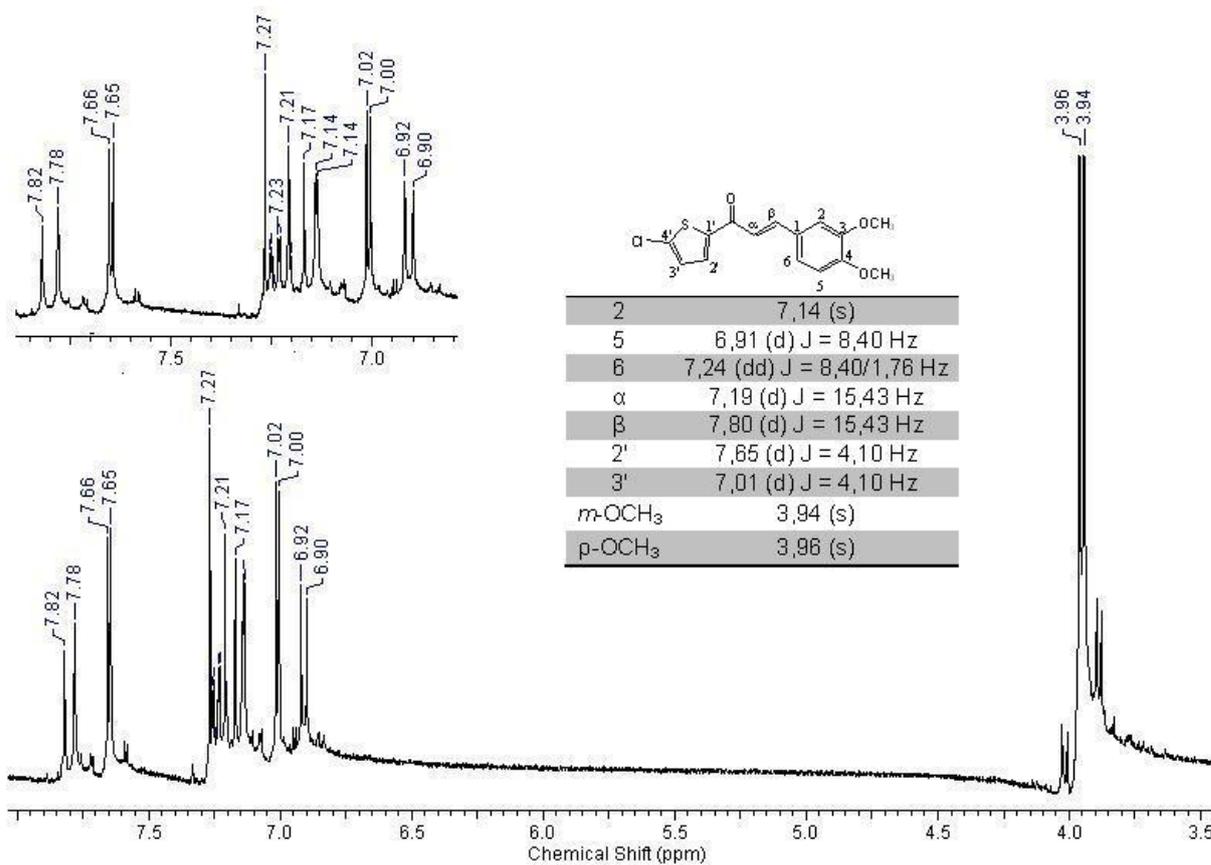
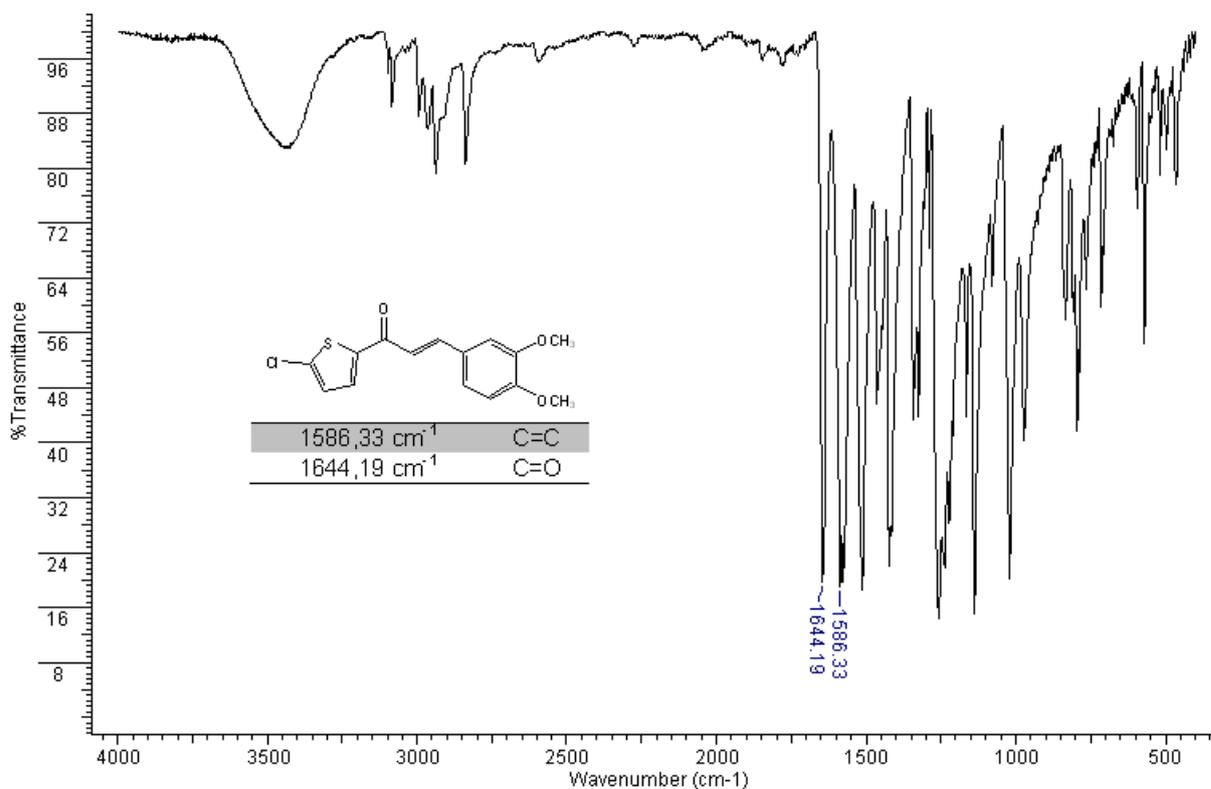
Anexo XIII – Espectros de absorção no IV e de RMN de ^1H do composto H22.



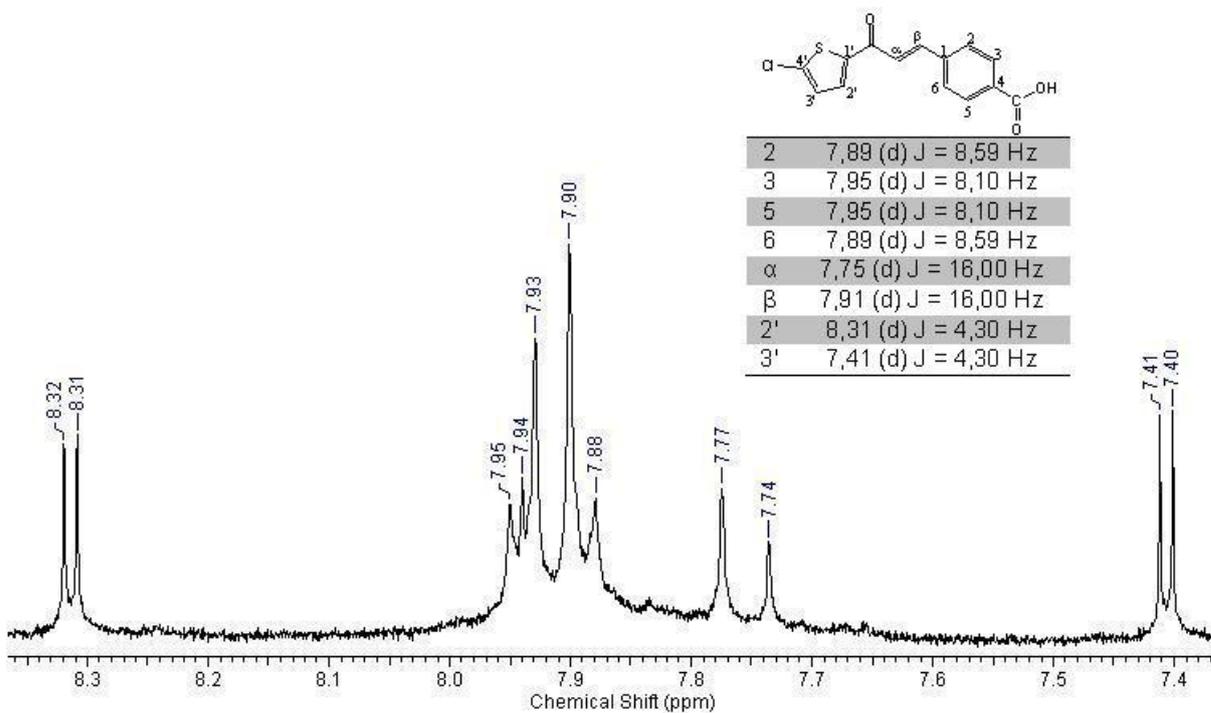
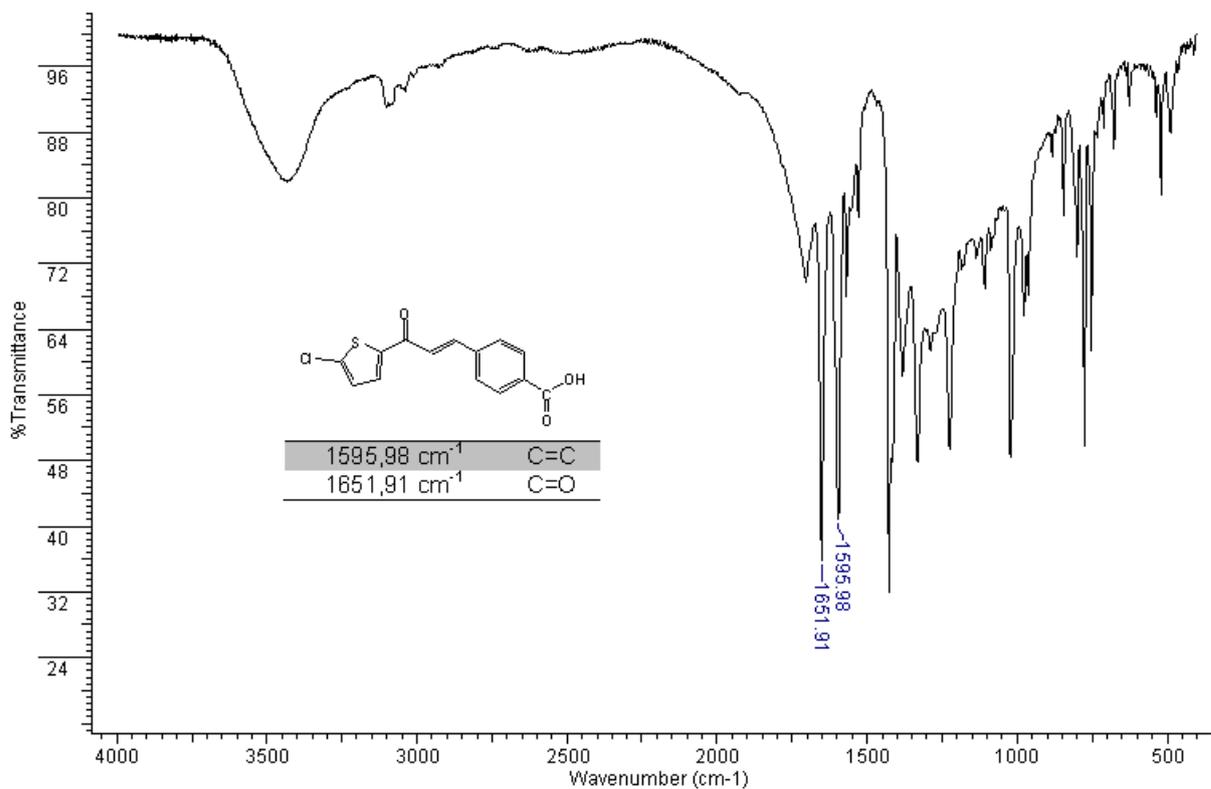
Anexo XIV – Espectros de absorção no IV e de RMN de ¹H do composto H24.



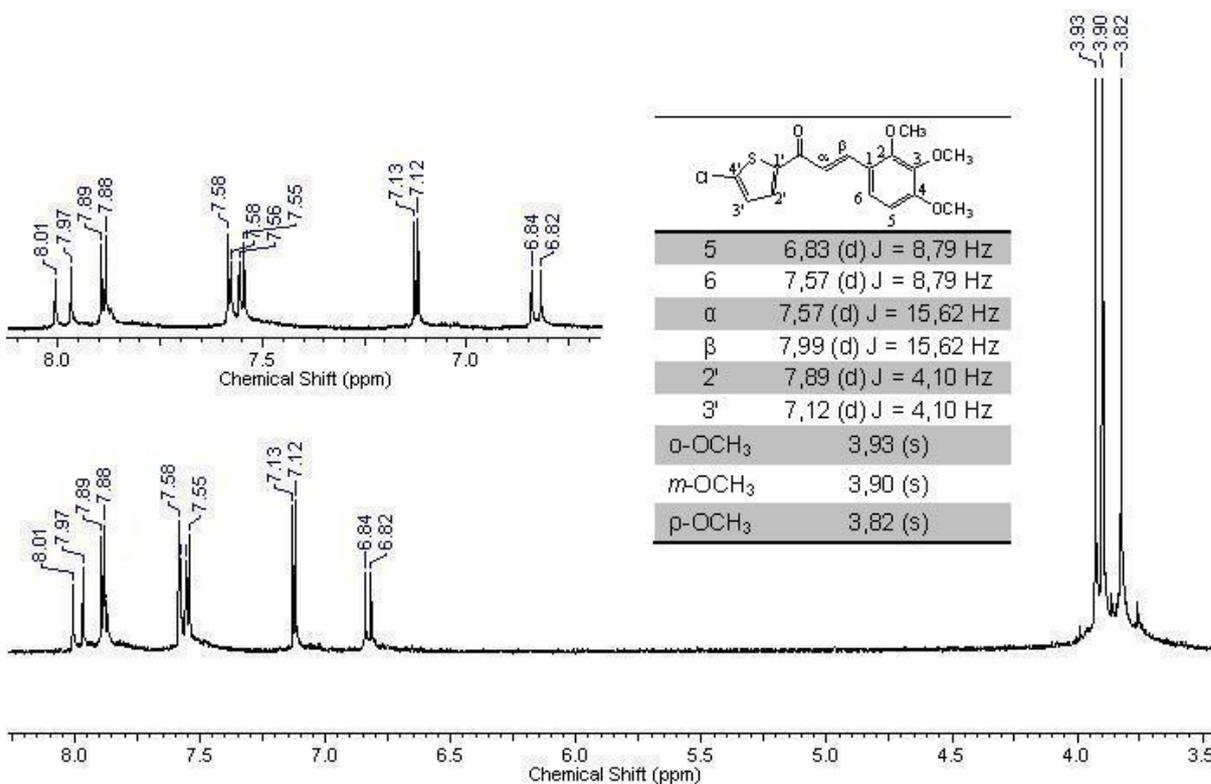
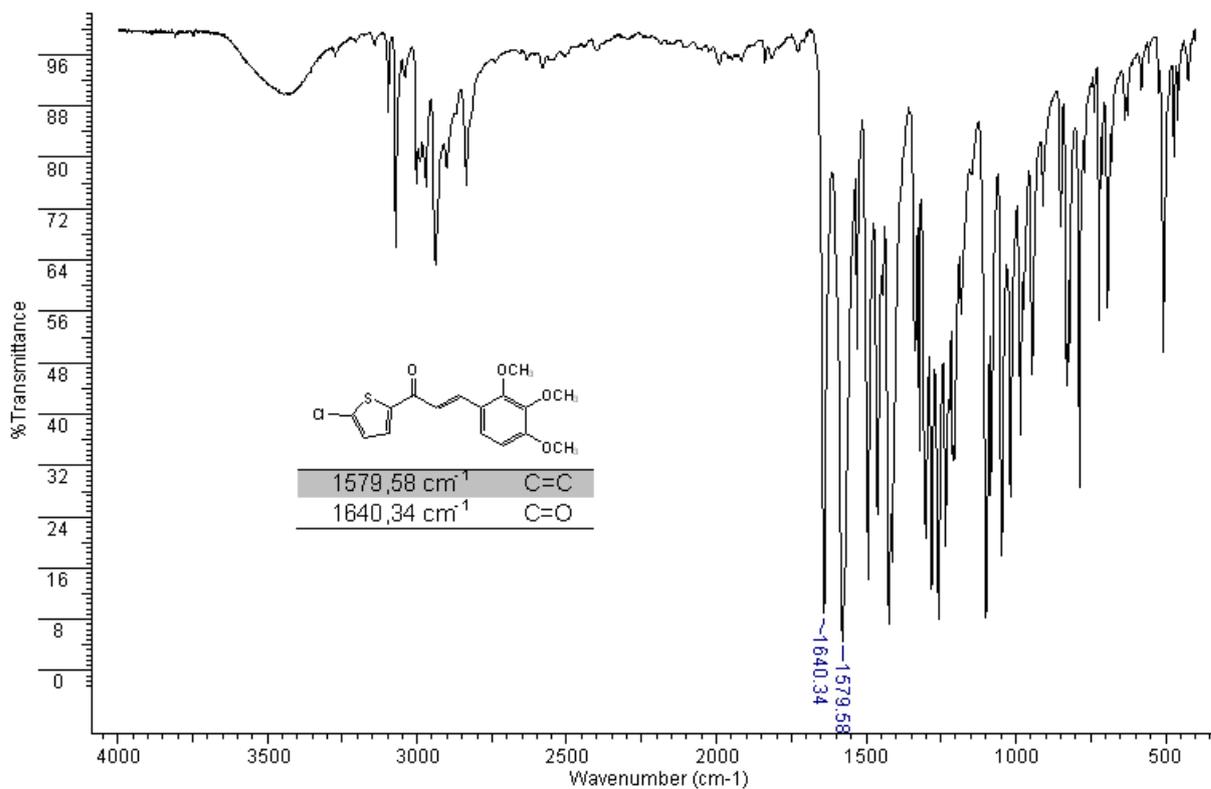
Anexo XV – Espectros de absorção no IV e de RMN de ^1H do composto H25.



Anexo XVI – Espectros de absorção no IV e de RMN de ^1H do composto H28.



Anexo XVII – Espectros de absorção no IV e de RMN de ¹H do composto H29.



Anexo XVIII – Espectros de absorção no IV e de RMN de ¹H do composto H30.

