



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA



IZADORA AMARAL NAKAO

**SÍNTESE DE CHALCONAS E ISOXAZÓIS DERIVADOS DO EUGENOL E
AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL ANTIVIRAL E CITOTÓXICO**

OURO PRETO

2021

IZADORA AMARAL NAKAO

**SÍNTESE DE CHALCONAS E ISOXAZÓIS DERIVADOS DO EUGENOL E
AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL ANTIVIRAL E CITOTÓXICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Farmácia pela Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Belarmino de Souza.

OURO PRETO

2021

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

N163s Nakao, Izadora Amaral .

Síntese de chalconas e isoxazóis derivados do eugenol e avaliação do seu potencial antiviral e citotóxico. [manuscrito] / Izadora Amaral Nakao. - 2021.

104 f.: il.: , tab..

Orientador: Prof. Dr. Thiago Belarmino de Souza.

Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. Eugenol. 2. Chalcona. 3. Isoxazóis. 4. Flavonoides. 5. Essência e óleos essenciais - Cravo da Índia. I. Souza, Thiago Belarmino de. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.



FOLHA DE APROVAÇÃO

Izadora Amaral Nakao

Síntese de chalconas e isoxazóis derivados do eugenol e avaliação do seu potencial antiviral e citotóxico

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia

Aprovada em 20 de Agosto de 2021

Membros da banca

Dr. Thiago Belarmino de Souza - Orientador (Universidade Federal de Ouro Preto)
Dr. Saulo Fehelberg Pinto Braga (Universidade Federal de Ouro Preto)
Dra. Adriana Cotta Cardoso Reis (Universidade Federal de Ouro Preto)

Thiago Belarmino de Souza, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 01/09/2021



Documento assinado eletronicamente por **Thiago Belarmino de Souza, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 01/09/2021, às 12:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0215818** e o código CRC **0B625BEC**.

Dedico este trabalho...

À minha mãe, exemplo de força e vitória, que nunca mediu esforços em ajudar a mim e ao meu irmão e em orientar nosso caminho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar ao Ser que rege esse Universo e que escolho chamar de Deus.

Aos meus pais, que no seu próprio entendimento de educação, me fizeram correr atrás dos meus objetivos com minhas próprias pernas e enfrentar minhas lutas com dedicação e força.

Ao meu irmão, pela presença, escuta e apoio.

A minha dinda, Maristela, que é para mim uma segunda mãe.

A todos os professores que passaram por minha caminhada e contribuíram, cada um da sua forma, para que eu me tornasse a profissional que espero ser. *“Os professores são os membros mais responsáveis e importantes da sociedade porque seus esforços profissionais afetam o destino de todos na Terra”*.

Ao meu orientador, Thiago, por toda paciência e ensinamento durante a execução desse trabalho. Obrigada pela confiança!

Aos colegas e amigos do melhor laboratório da Escola de Farmácia, G-33. Vocês tornaram essa jornada muito mais leve (e alcóolica, rs).

Não posso deixar de agradecer a LAFITec, que surgiu quando eu já estava encerrando o curso, mas em um momento necessário e de grande importância. Obrigada por terem confiado em mim para construir essa história que tem muito a agregar na vida de todos os alunos.

Por fim, agradeço a todos os amigos de Ouro Preto que estiveram comigo durante esse processo: vocês são essenciais na minha vida. Muito obrigada!

RESUMO

As infecções virais e o câncer representam dois problemas graves de saúde pública enfrentados no mundo. As infecções causadas por vírus impactam fortemente os sistemas de saúde e não há tratamentos aprovados ou vacinas eficazes para todos os tipos de vírus, dentre eles Zika virus (ZIKV), Chikungunya virus (CHIKV) e Mayaro virus (MAYV). Já o câncer, apesar de possuir tratamentos disponíveis, sendo o principal deles a quimioterapia, os dados de incidência e mortalidade por câncer aumentam a cada ano no mundo. Em vista do espectro de ação cada vez mais reduzido dos fármacos utilizados para esses tratamentos, devido aos efeitos adversos e falta de seletividade apresentados por grande parte dessas substâncias, o planejamento e síntese de novos candidatos a fármacos anticancerígenos e antivirais tem se tornado cada vez mais necessário e urgente. Dentre as várias substâncias naturais potencialmente ativas, destacam-se, dentre outros, o eugenol, um fenilpropeno principalmente encontrado no óleo essencial do cravo da Índia; as chalconas, flavonoides de cadeia aberta encontrados em frutas, legumes e especiarias, e os isoxazóis, heterociclos de cinco membros contendo átomos de nitrogênio e oxigênio adjacentes, sendo encontrados no Muscimol (um dos principais psicoativos constituintes da *Amanita muscaria*) e também na Cicloserina (antibiótico antituberculoso de ocorrência natural produzida por *Streptomyces garyphalus*). Dentre as diversas atividades biológicas descritas para estes compostos, destaca-se seu potencial citotóxico e antiviral. Considerando a estratégia de hibridação molecular, realizou-se neste trabalho o planejamento, síntese e avaliação citotóxica e antiviral de chalconas e isoxazóis, na forma de híbridos moleculares, derivados do eugenol e análogos (diidroeugenol e *orto*-vanilina). As treze substâncias sintetizadas (finais e intermediárias) foram caracterizadas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , e sua atividade citotóxica avaliada contra linhagens tumorais Hep-G2, T24 e TOV-21G, além da linhagem normal MRC-5. Dentre as substâncias ativas, a chalcona inédita **7** apresentou a atividade mais promissora, sendo ativa contra duas linhagens tumorais (Hep-G2 e TOV-21G) com CC_{50} de 4,25 e 7,22 μM , respectivamente. Em relação a atividade antiviral, os derivados foram avaliados contra os vírus CHIKV, ZIKV e MAYV, e sua citotoxicidade avaliada na linhagem sadia VERO. Os derivados **10** e **16** apresentaram atividades promissoras contra CHIKV e MAYV com CE_{50} de 9,59 μM e 32,19 μM , respectivamente.

Palavras-chave: eugenol, diidroeugenol, *orto*-vanilina, chalconas, isoxazóis, atividade citotóxica, atividade antiviral.

ABSTRACT

Viral infections and cancer represent two serious public health problems facing the world. Virus infections strongly impact healthcare systems and there are no approved treatments or effective vaccines for all types of viruses, including Zika virus (ZIKV), Chikungunya virus (CHIKV) and Mayaro virus (MAYV). As for cancer, despite having treatments available, the main one being chemotherapy, data on cancer incidence and mortality increase every year in the world. In view of the increasingly reduced spectrum of action of the drugs used for these treatments, due to the adverse effects and lack of selectivity presented by most of these substances, the planning and synthesis of new candidates for anticancer and antiviral drugs has become increasingly necessary and urgent. Among the various potentially active natural substances, stand out, among others, eugenol, a phenylpropene mainly found in the essential oil of cloves; chalcones, open-chain flavonoids found in fruits, vegetables and spices, and isoxazoles, five-membered heterocycles containing adjacent nitrogen and oxygen atoms, found in Muscimol (one of the main psychoactive constituents of *Amanita muscaria*) and also in Cycloserine (naturally occurring antituberculous antibiotic produced by *Streptomyces garyphalus*). Among the various biological activities described for these compounds, their cytotoxic and antiviral potential stands out. Considering the molecular hybridization strategy, this work carried out the planning, synthesis and cytotoxic and antiviral evaluation of chalcones and isoxazoles, in the form of molecular hybrids, derivatives of eugenol and analogues (dihydroeugenol and ortho-vanillin). The thirteen synthesized substances (final and intermediate) were characterized by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy of ^1H and ^{13}C , and their cytotoxic activity evaluated against tumor strains Hep-G2, T24 and TOV-21G, in addition to the normal strain MRC-5. Among the active substances, the new chalcone **7** showed the most promising activity, being active against two tumor lines (Hep-G2 and TOV-21G) with CC_{50} of 4.25 and 7.22 μM , respectively. Regarding the antiviral activity, the derivatives were evaluated against the CHIKV, ZIKV and MAYV viruses, and their cytotoxicity evaluated in the healthy strain VERO. Derivatives **10** and **16** showed promising activities against CHIKV and MAYV with EC_{50} of 9.59 μM and 32.19 μM , respectively.

Keywords: eugenol, dihydroeugenol, ortho-vanillin, chalcones, isoxazoles, cytotoxic activity, antiviral activity.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estruturas gerais das chalconas e isoxazóis propostos | 18 |
| Figura 2. Estrutura química do ácido fólico e metotrexato..... | 21 |
| Figura 3. Estrutura química da Dacarbazina, Mitoxantrona e Topotecano..... | 22 |
| Figura 4. Estrutura química da Vimblastina e Vincristina..... | 22 |
| Figura 5. Estrutura química do eugenol..... | 25 |
| Figura 6. Derivados triazólicos do eugenol citotóxicos..... | 27 |
| Figura 7. Estrutura química do eugenol e derivado oxipurano ativo sintetizado por Da Silva e colaboradores (2018) | 27 |
| Figura 8. Estrutura química básica de uma chalcona..... | 28 |
| Figura 9. Estrutura química da Metochalcona e Sofalcona | 28 |
| Figura 10. Estrutura química da buteína..... | 29 |
| Figura 11. Estrutura química da 4HD, XAG, CAR e FKB Fonte: elaborado pela autora | 30 |
| Figura 12. Estrutura química da chalcona mais ativa sintetizada por Burmaoglu e colaboradores (2016) | 30 |
| Figura 13. Chalcona alquilada substituída com grupo hidroperoxila | 31 |
| Figura 14. Estrutura química do Furano, Tiofeno e Pirrol..... | 31 |
| Figura 15. Estrutura química de um anel isoxazólico..... | 32 |
| Figura 16. Estrutura química do Sulfisoxazol, Risperidona e Leflunomida..... | 33 |
| Figura 17. Estrutura química do ácido maslínico, ácido oleanólico e derivado sintético promissor | 33 |
| Figura 18. Nucleosídeos contendo um núcleo isoxazólico, potencialmente antivirais..... | 34 |
| Figura 19. Derivado diidroisoxazólico (18)..... | 47 |
| Figura 20. Novas chalconas e isoxazóis planejadas como híbridos moleculares | 58 |
| Figura 21. Padrão de quatro linhas observado no espectro de RMN de ¹ H do derivado 7 | 66 |
| Figura 22. Padrão de quatro linhas observado no espectro de RMN de ¹ H do derivado 16 | 66 |
| Figura 23. Espectro de RMN de ¹ H do derivado 12 | 72 |
| Figura 24. Espectro de RMN de ¹³ C do derivado 12 | 73 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Quantidades dos reagentes utilizados para a reação de formilação do eugenol (1) e diidroeugenol (2) | 36 |
| Tabela 2. Quantidades dos reagentes utilizados para obtenção das chalconas 6, 7, 8, 9, 10 e 11..... | 38 |
| Tabela 3. Quantidades dos reagentes utilizados para obtenção dos isoxazóis 12, 13, 14, 15, 16 e 17 | 45 |
| Tabela 4. Linhagens celulares utilizadas nos ensaios biológicos in vitro | 52 |
| Tabela 5. Citotoxicidade das substâncias sintetizadas, determinada nas linhagens celulares MRC-5, HepG2, T24 e TOV-21G, expressa em termos de concentração citotóxica a 50% (CC ₅₀), respectivos desvios padrões (n=3) e índice de seletividade (IS), realizada por meio do ensaio colorimétrico do MTT | 75 |
| Tabela 6. Atividade citotóxica (CC ₅₀), e avaliação da atividade antiviral (CE ₅₀) frente aos vírus: ZIKV, CHIKV e MAYV, e frente à linhagem celular VERO, com respectivos desvios padrões (n=3) e índice de seletividade (IS), das substâncias sintetizadas | 78 |

LISTA DE ESQUEMAS

| | |
|--|----|
| Esquema 1. Rota sintética para obtenção das chalconas e isoxazóis propostos..... | 59 |
| Esquema 2. Proposta de mecanismo para a reação de formilação do eugenol e diidroeugenol com hexamina | 61 |
| Esquema 3. Proposta de mecanismo para a condensação de Claisen–Schmidt entre as acetofenonas e os aldeídos | 63 |
| Esquema 4. Proposta de mecanismo para a formação dos compostos isoxazólicos | 69 |

LISTA DE SIGLAS

| | |
|-------------------|--|
| 4HD | 4-hidroxicloroquina |
| CAR | Cardamomina |
| CCD | Cromatografia em Camada Delgada |
| CCS | Cromatografia em Camada de Sílica |
| CDCl ₃ | Clorofórmio |
| CHIKV | Chikungunya vírus |
| COXB3 | Enterovírus patogênico |
| EMCV | Vírus da encefalomiocardite |
| FF | Faixa de Fusão |
| FKB | Flavokavain B |
| FM | Fase Móvel |
| HepG2 | Linhagem celular de carcinoma hepatocelular de fígado humano |
| Hex/AcOEt | Hexano/Acetato |
| HIV | Vírus da Imunodeficiência humana |
| HSV | Vírus da herpes simples |
| IBGE | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| INCA | Instituto Nacional de Câncer |
| MAYV | Mayaro Virus |
| MM | Massa Molecular |
| MRC-5 | Células derivadas de fibroblastos de pulmão humano |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| OPAS | Organização Pan-Americana da Saúde |
| RMN | Ressonância Magnética Nuclear |

| | |
|---------|---|
| SUS | Sistema Único de Saúde |
| T24 | Linhagem celular de carcinoma de bexiga humano |
| TMS | Tetrametilsilano |
| TOV-21G | Linhagem celular de adenocarcinoma maligno de ovário humano |
| VERO | Células derivadas de rins de macaco verde |
| VSV | Vírus da estomatite vesicular |
| XAG | Xantoangelol |
| ZIKV | Zika Virus |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 16 |
| 2. OBJETIVOS..... | 18 |
| 2.1 Objetivo geral | 18 |
| 2.2 Objetivos específicos | 18 |
| 3. REVISÃO DA LITERATURA | 19 |
| 3.1. Câncer | 19 |
| 3.2 Infecções Virais | 23 |
| 3.3 Eugenol | 25 |
| 3.4 Chalconas..... | 27 |
| 3.5 ISOXAZÓIS | 31 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 35 |
| 4.1 Síntese e caracterização das substâncias..... | 35 |
| 4.1.1. Procedimento geral para obtenção do formil eugenol (3) e formil diidroeugenol (4) | 35 |
| 4.1.2. Procedimentos gerais para a obtenção das chalconas 6, 7, 8, 9, 10 e 11..... | 38 |
| 4.1.3 Procedimentos gerais para obtenção dos derivados isoxazólicos 12, 13, 14, 15, 16 e 17..... | 44 |
| 4.2 Avaliação da atividade citotóxica e antiviral das substâncias | 52 |
| 4.2.1 Ensaio biológicos..... | 52 |
| 4.2.2 Avaliação da citotoxicidade pelo ensaio do MTT..... | 53 |
| 4.2.3 Avaliação da atividade antiviral <i>in vitro</i> | 55 |
| 4.2.3.1 Preparo das suspensões estoques virais e determinação dos títulos virais..... | 55 |
| 4.2.3.2 Avaliação da atividade antiviral pela técnica colorimétrica do MTT | 55 |
| 4.2.3.3 Estatística | 57 |
| 4.2.3.4 Determinação do Índice de Seletividade | 57 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 58 |
| 5.1 Planejamento das chalconas e isoxazóis derivados do eugenol e análogos propostos ... | 58 |

| | |
|--|----|
| 5.1.1 Síntese e caracterização dos intermediários formilados do eugenol e diidroeugenol (3 e 4)..... | 60 |
| 5.1.2 Síntese e caracterização das chalconas derivadas do eugenol e análogos (6-11)..... | 62 |
| 5.1.3 Síntese e caracterização dos isoxazóis derivados do eugenol e análogos (12-17) ... | 67 |
| 5.2 Avaliação <i>in vitro</i> do potencial biológico das substâncias sintetizadas..... | 74 |
| 5.2.1 Avaliação do potencial citotóxico das substâncias avaliadas | 74 |
| 5.2.2 Avaliação do potencial antiviral das substâncias sintetizadas | 77 |
| 8. CONCLUSÃO..... | 81 |
| 9. REFERÊNCIAS | 82 |
| ANEXOS | 85 |

1. INTRODUÇÃO

As infecções virais e o câncer representam dois problemas graves de saúde pública enfrentados no mundo. As infecções causadas por vírus impactam fortemente os sistemas de saúde e não há tratamentos aprovados ou vacinas eficazes para todos os tipos de vírus, dentre eles, três arbovírus, o Zika virus (ZIKV), pertencente ao gênero *Flavivirus*, e Chikungunya virus (CHIKV) e Mayaro virus (MAYV), pertencentes ao gênero *Alphavirus*. Esta limitação tem gerado uma grande preocupação em diferentes grupos de pesquisa, e é cada vez mais urgente a necessidade de desenvolvimento de novos medicamentos antivirais (CAMPOS et al., 2020).

O câncer, por sua vez, consiste em um conjunto de mais de cem doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem tecidos adjacentes (INCA, 2019). Os dados de incidência e mortalidade por câncer aumentam a cada ano no mundo, parte pelo envelhecimento e crescimento populacional, mas também pela mudança na distribuição e prevalência dos fatores de risco que estão associados à doença, principalmente os socioeconômicos (INCA, 2020). Atualmente, existem três formas principais de tratamento para o câncer, sendo estas: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Embora o objetivo principal da quimioterapia consistir na destruição das células neoplásicas, seus agentes químicos atuam de forma não específica, atingindo tanto células saudáveis como células tumorais. Essa inespecificidade dos fármacos representa a principal desvantagem do tratamento, incentivando a busca por substâncias mais específicas e menos tóxicas (ALMEIDA et al., 2005).

Desde os primórdios, as plantas medicinais representam a base da fitoterapia tradicional e os produtos naturais são partes fundamentais de antigos sistemas da medicina tradicional, incluindo a Ayurveda, chinesa e egípcia. Cerca de 40% da população depende de medicamentos que tem sua origem em produtos naturais (KAUFMAN, 2015). Sabe-se que a maioria dos fármacos utilizados na terapêutica do câncer são oriundos de produtos naturais e sintéticos (COSTA-LOTUFO et al., 2010), e no que tange a descoberta de novos medicamentos, a natureza é uma valiosa fonte para a medicina (CAMPOS et al., 2020).

Dentre as inúmeras substâncias naturais bioativas já relatadas, destaca-se, dentre outras, o eugenol, um fenilpropano, principalmente encontrado no óleo essencial do cravo da Índia, *Eugenia caryophyllata*, (GAZOLLA et al., 2018) e as chalconas, flavonoides de cadeia aberta, nos quais dois anéis aromáticos são unidos por um sistema carbonil α,β -insaturado, encontrados em frutas, legumes, especiarias, chás e alimentos à base de soja (BATOVSKA; TODOROVA, 2010; K. SAHU et al., 2012). Ainda no contexto de substâncias naturais ativas biologicamente,

pode-se citar os isoxazóis, heterociclos de cinco membros que contém um átomo de oxigênio e um átomo de nitrogênio, em posições adjacentes, sendo encontrados no Muscimol (um dos principais psicoativos constituintes da *Amanita muscaria*) e na Cicloserina (antibiótico antituberculoso de ocorrência natural produzida por *Streptomyces garyphalus*) (REBOU; BRYK, 2008).

Em relação ao eugenol, são relatadas propriedades biológicas interessantes, como antioxidante, anti-inflamatória, antiespasmódica, antidepressiva, antigenotóxica e anticancerígena, o que tem despertado grande interesse por estudos mais aprofundados desta substância por parte de diferentes grupos de pesquisa. A sua fácil disponibilidade e obtenção transformam este produto natural em um interessante protótipo para diferentes estudos, especialmente utilizando-o como material de partida e intermediário de síntese de moléculas mais complexas, que podem ter sua atividade biológica potencializada e, ainda, sua toxicidade reduzida, a partir do aumento de sua seletividade por um determinado alvo de ação (KAUFMAN, 2015).

Quanto às chalconas, são relatadas atividades antioxidante, anti-inflamatória, ansiolítica, antitumoral, antibacteriana e antifúngica (BATOVSKA; TODOROVA, 2010; ZHOU, 2015), o que também tem despertado grande interesse da ciência no que diz respeito à sua manipulação estrutural, visando à obtenção de chalconas modificadas quimicamente, que possam ser utilizadas terapêuticamente, além de um maior entendimento quanto aos mecanismos de ação biológica pelos quais essas substâncias atuam (ZHUANG et al., 2017).

Em relação aos isoxazóis, compostos heterocíclicos que fazem parte da família dos 1,2-azóis, diferentes estudos têm demonstrado que substâncias que contêm o núcleo isoxazólico podem apresentar atividades biológicas diversas, como por exemplo, hipolipidêmica (MOKALE et al., 2014), antimicrobiana, antiulcerosa, antiinflamatória (KIDWAI; KUKREJA; THAKUR, 2006), antitumoral, antiviral e antituberculosa (ZHU et al., 2018). Além disso, quando presentes em estruturas com atividade biológica já conhecida, a unidade isoxazólica pode contribuir para uma melhor eficácia, menor toxicidade e melhor perfil farmacocinético da molécula (SHEN et al., 2019).

Diante do exposto e considerando o potencial biológico relatado para o eugenol chalconas e isoxazóis, neste trabalho é proposta a síntese de chalconas e isoxazóis derivados do eugenol e análogos, para serem avaliados quanto ao seu potencial citotóxico e antiviral. Espera-se a obtenção de novas substâncias que possam representar protótipos de candidatos a novos fármacos anticancerígenos e antivirais úteis clinicamente.

2. OBJETIVOS

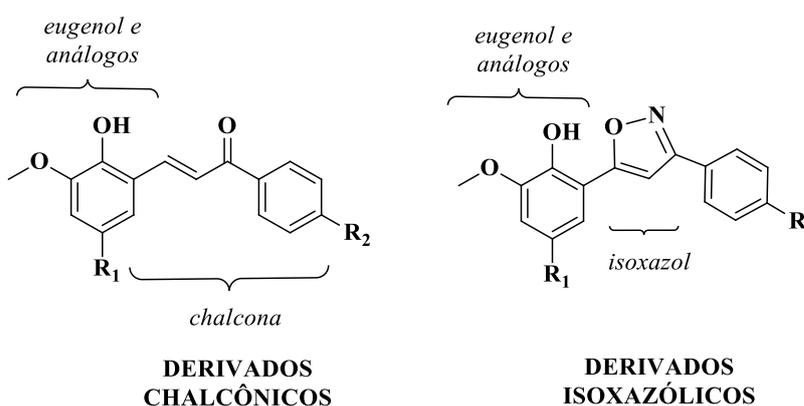
2.1 OBJETIVO GERAL

Síntese, caracterização química e a avaliação da atividade antiviral e citotóxica de chalconas e isoxazóis derivados do eugenol e análogos (estruturas gerais apresentadas na Figura 1 abaixo), na forma de híbridos moleculares, potencialmente mais ativos e menos tóxicos que os protótipos isolados.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Síntese e purificação de chalconas e isoxazóis derivados do eugenol, diidroeugenol e *orto*-vanilina;
- ii. Caracterização química das substâncias obtidas por ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C ;
- iii. Avaliação do potencial antiviral das substâncias nos vírus MAYV, CHIKV e ZIKV
- iv. Avaliação do potencial citotóxico das substâncias nas linhagens HepG2, TOV-21G e T24;
- v. Determinação do índice de seletividade das substâncias ativas;
- vi. Determinação preliminar das relações estrutura-atividade das substâncias sintetizadas.

Figura 1. Estruturas gerais das chalconas e isoxazóis propostos



3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. CÂNCER

O século XX foi marcado, em seu começo, por doenças infecciosas como tuberculose, varíola, tétano, difteria e tantas outras (FRIES, 2005), porém, atualmente, vive-se uma nova era, onde a principal causa de morte são doenças cardíacas e o câncer (BRODY; BENDER; MILLER, 2014), sendo este último identificado como um problema de saúde pública desde o século passado por países desenvolvidos (SILVA et al., 2017).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer, INCA, câncer é o nome dado a um conjunto de mais de cem doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células (INCA, 2019), que invadem tecidos e órgãos, podendo levar à formação de tumores e neoplasias malignas, e que podem ou não migrar para outras regiões do corpo (GAZOLLA et al., 2018). A mais recente estimativa mundial, feita em 2018, mostrou que o câncer é a segunda principal causa de morte no mundo, tendo ocorrido mais de 18 milhões de novos casos e 9,6 milhões de óbitos (OMS, 2018), e encontra-se entre as quatro principais causas de morte prematura (antes dos 70 anos de idade) na maioria dos países (INCA, 2020). A estimativa para o Brasil é de que ocorra cerca de 625 mil novos casos de câncer para cada ano do triênio 2020-2022 (INCA, 2020).

Os dados de incidência e mortalidade por câncer aumentam a cada ano no mundo, parte pelo envelhecimento e crescimento populacional, mas também pela mudança na distribuição e prevalência dos fatores de risco que estão associados à doença, principalmente os socioeconômicos (INCA, 2020). A Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) fez um levantamento em 2020 que apontou que aproximadamente 70% das mortes por câncer ocorrem em países de baixa e média renda, sendo que em 2017 apenas 26% dos países de baixa renda relataram ter serviços de patologia disponíveis no setor público, além de que apenas um em cada cinco países de baixa e média renda tem dados necessários para conduzir uma política para o câncer (OPAS, 2020), indo em consonância com as considerações de Harford e colaboradores (2009, p. 569) que diz que “mais de 70% das mortes por câncer no mundo, ocorrem em países de baixa e média renda, onde o suporte financeiro, a infraestrutura e os recursos humanos necessários para combater a doença são severamente limitados”.

Em 2010 estima-se que foram gastos aproximadamente US\$ 1,16 trilhão de dólares com a doença (OPAS, 2020). De acordo com Medici (2018), o Sistema Único de Saúde (SUS) chega

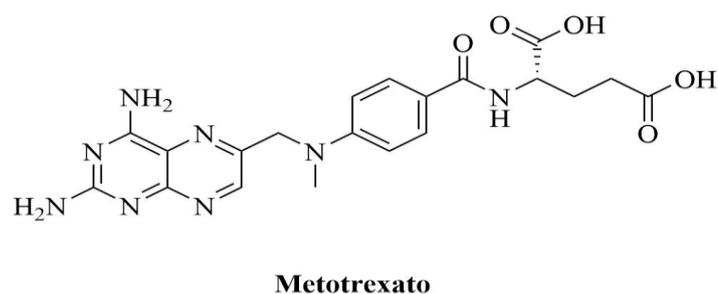
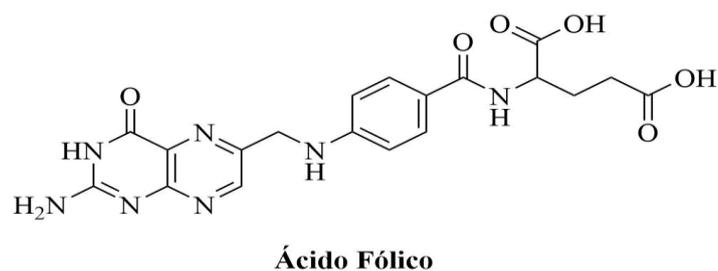
a gastar cerca de seis vezes mais no tratamento do câncer quando ele se encontra em estágio avançado.

O Brasil apresenta uma constante alteração do seu perfil demográfico que é atrelada a uma transformação socioeconômica, principalmente pela diminuição das taxas de mortalidade, variação das taxas de fecundidade e aumento da expectativa de vida (GRAGNOLATI et al., 2012), o que leva a uma preocupação com os cuidados em saúde. O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2011) relatou em seu censo demográfico de 2010 que cerca de 10,8% da população brasileira apresenta mais de 60 anos, levando, em consequência, à maior necessidade e uso do sistema de saúde do país, assim como gastos para mantê-lo. Concomitante às alterações demográficas, seu perfil epidemiológico também foi modificado, de forma que as endemias pararam de se destacar nas agendas de saúde pública e o câncer foi ocupando a pauta, o que contribui para questionamentos sobre os investimentos no tratamento da doença e a urgente necessidade de tratamentos menos tóxicos e agressivos (CHU; SARTORELLI, 2014).

Atualmente, existem três formas principais de tratamento para o câncer, sendo estas: cirurgia (remoção do tumor a partir de um procedimento cirúrgico), radioterapia (emissão de radiação ionizante na região ou órgão afetado) e quimioterapia (utilização de alguma substância química capaz de impedir a propagação das células cancerígenas). A quimioterapia representa a opção mais recorrente e utilizada nos pacientes, devido ao fato da maioria das neoplasias se caracterizarem a partir de um desenvolvimento precoce de micro metástases, requerendo um tratamento sistêmico. Embora o objetivo principal da quimioterapia consistir na destruição das células neoplásicas, seus agentes químicos atuam de forma não específica, atingindo tanto células sadias como células tumorais (ALMEIDA et al., 2005).

Os fármacos quimioterápicos antineoplásicos podem ser divididos em três classes de acordo com seu modo de ação na molécula de DNA da célula cancerígena. A primeira delas são as moléculas que agem inibindo a replicação do DNA, conhecidos como antimetabólitos. Consistem em análogos estruturais de bases purínicas e pirimidínicas (similar aos nucleosídeos) e análogos do ácido fólico (inibem a síntese de ácido nucleico). Como exemplo dessa classe há o Metotrexato, um análogo do ácido fólico que é extensamente utilizado mesmo após 70 anos da sua descoberta e tem sua estrutura representada abaixo em comparação à molécula do ácido fólico.

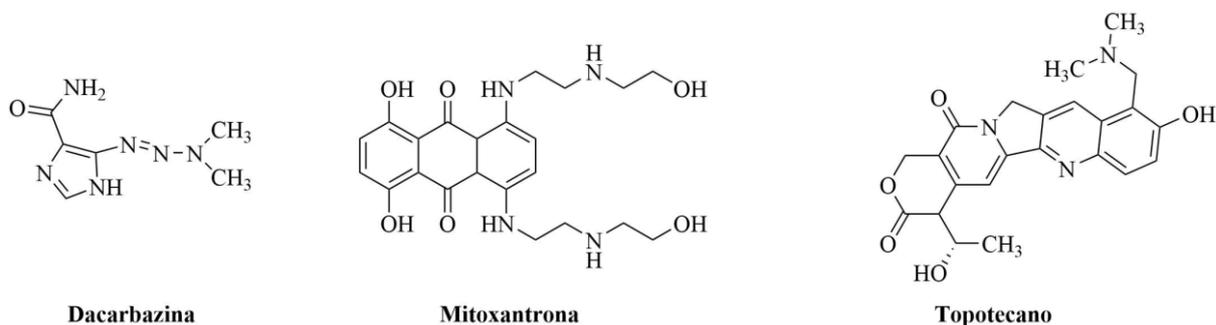
Figura 2. Estrutura química do ácido fólico e metotrexato



Fonte: Elaborado pela autora

A segunda classe de fármacos antineoplásicos utilizados convencionalmente são os agentes que interagem com o DNA, que podem ser divididos em agentes alquilantes, originados a partir do gás mostarda, que agem na incorporação de grupos alquil à molécula de DNA, gerando uma molécula instável de forma que os processos de replicação e transcrição se tornam alterados; agentes intercalantes, que são moléculas capazes de ser incorporadas entre os pares de base do DNA, inibindo assim os processos de replicação e transcrição, e agentes inibidores da topoisomerase, que inibem as enzimas topoisomerase I e II, responsáveis pela clivagem, anelamento e estado topológico da molécula de DNA. Como exemplos dessa classe, têm-se, respectivamente, Dacarbazina, Mitoxantrona e Topotecano, que são representados na figura abaixo.

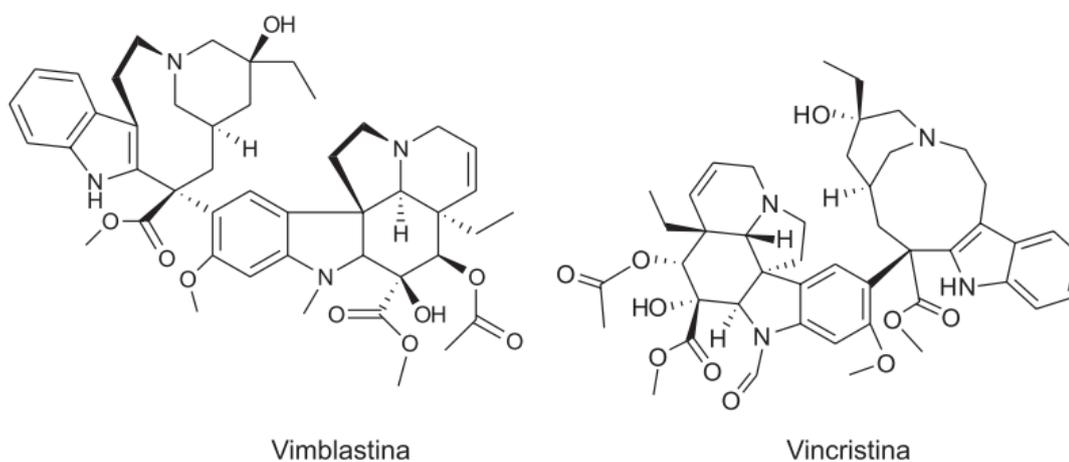
Figura 3. Estrutura química da Dacarbazina, Mitoxantrona e Topotecano



Fonte: elaborado pela autora

A última classe de fármacos são os agentes antitubulina, que agem na dinâmica dos microtúbulos, bloqueando a divisão do núcleo e induzindo a morte celular. Os alcaloides da vinca são os principais membros dessa classe, como a Vincristina e Vimblastina. (GUICHARD et al., 2017).

Figura 4. Estrutura química da Vimblastina e Vincristina



Fonte: GAZOLLA (2018)

Apesar da alta gama de substâncias capazes de serem utilizadas no tratamento do câncer, os fármacos antineoplásicos convencionais atuam de forma não específica, lesando tanto células saudáveis quanto cancerígenas, o que explica sua principal limitação, a baixa seletividade (GUICHARD et al., 2017). Essa falta de especificidade é responsável pela maior parte dos efeitos adversos desses fármacos, como náuseas, perda de cabelo e maior susceptibilidade a infecções (ALMEIDA et al., 2005), incentivando, dessa forma, a busca por moléculas cuja ação seja dirigida especificamente às células cancerígenas e representem uma nova esperança para o tratamento do câncer.

3.2 INFECCÕES VIRAIS

Os vírus abrangem um grande grupo de patógenos responsáveis por causar doenças infecciosas graves e representam uma grande ameaça à saúde e economia globais. Quando um vírus infecta um hospedeiro, ocorre uma fase inicial de infecção aguda. Nessa fase o vírus e o sistema imune do hospedeiro competem pela dominância, de forma que a infecção pode ser eliminada ou se tornar crônica. Ao longo dos anos, os vírus foram capazes de desenvolver estratégias eficazes para estabelecer uma infecção crônica, apesar da presença de uma resposta imune antiviral ativa do hospedeiro. Dessa forma, os vírus devem ser vistos como máquinas moleculares sofisticadas que têm nos “estudado” há muito mais tempo do que nós os estudamos (VIRGIN; WHERRY; AHMED, 2009).

Em infecções virais graves o uso oportuno e eficiente de intervenções terapêuticas é essencial para controlar a disseminação do vírus e assim reduzir a gravidade da doença. Os medicamentos classificados como antivirais atuam principalmente visando as proteínas virais ou celulares, envolvidas no processo de replicação viral (ELKHALIFA et al., 2021). Como a replicação viral depende das células do hospedeiro, encontrar medicamentos eficazes contra o vírus e inofensivos para as células do hospedeiro é um constante desafio, principalmente devido à variação viral (ZHU et al., 2018). Fármacos cujo mecanismo de ação envolve proteínas virais, por haver uma resposta direcionada específica, estão relacionados a um menor risco de efeitos colaterais, porém há uma maior chance de desenvolvimento de resistência viral aos medicamentos. Por outro lado, em se tratando de fármacos cujo mecanismo de ação envolve proteínas celulares, o risco de resistência é diminuído, levando a um amplo espectro de atividade antiviral, mas com maior perfil de toxicidade (ELKHALIFA et al., 2021).

Em 2019 a OMS listou quatro diferentes vírus entre as dez ameaças à saúde global que incluíam Influenza virus, Dengue virus, HIV virus e Ebola virus. Outras infecções virais, de alta ameaça, também foram listadas e dentre eles estão o zika vírus (ZIKV), coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) e síndrome respiratória aguda grave (SARS). Posteriormente, em 2020, o mundo enfrentou a maior pandemia de saúde do século XXI com a tremenda disseminação da COVID-19, desencadeada pelo coronavírus SARS-CoV-2 (ELKHALIFA et al., 2021). Além destas viroses, outras infecções virais já representaram (e ainda preocupam) o foco da atenção global, dentre elas a explosiva contaminação causada pelos arbovírus ZIKV e CHIKV, que surgiram por meados de 2013 e 2016 (FAUCI; MORENS, 2016).

Fauci e colaboradores descrevem os arbovírus como:

“Arbovírus” é um termo descritivo aplicado a centenas de vírus predominantemente de RNA que são transmitidos por artrópodes, principalmente mosquitos e carrapatos. Os arbovírus são frequentemente mantidos em ciclos complexos envolvendo vertebrados, como mamíferos ou pássaros e vetores que se alimentam de sangue. Até recentemente, apenas alguns arbovírus haviam causado doenças humanas clinicamente significativas, incluindo alfavírus transmitidos por mosquitos, como chikungunya, e flavivírus, como dengue (2016, p. 601).

Dentre os vírus classificados como arbovírus, têm-se o ZIKV, MAYV e CHIKV. ZIKV é um flavivírus transmitido para humanos principalmente por mosquitos do gênero *Aedes*. A maioria das infecções causadas por esse vírus são assintomáticas e quando a doença clínica ocorre, ela geralmente é leve, com sintomas clínicos característicos. Entretanto, a infecção por ZIKV durante a gravidez pode levar a perda fetal, microcefalia congênita ou outras anomalias cerebrais graves. Além disso, a Síndrome de Guillain-Barré e casos raros de encefalopatia, meningoencefalite, mielite uveíte, parestesia e trombocitopenia grave já foram relatados após infecção por ZIKV (HILLS; FISCHER; PETERSEN, 2017).

O MAYV pertence à família *Togaviridae* e ao gênero *Alphavirus*. Foi inicialmente isolado em 1954 e desde então o número de infecções causadas por MAYV aumentou em vários países, incluindo Peru, Brasil, Suriname, Venezuela, Colômbia, Equador, Panamá, Bolívia, Costa Rica, Guatemala e México. O vírus causa a febre de Mayaro que se apresenta na forma de sintomas agudos, incluindo febre, mialgia, dor de cabeça, erupção cutânea, artralgia, vômito e diarreia. A natureza genérica dessas manifestações pode resultar em diagnósticos incorretos e subnotificações e, por se tratar de uma doença que atinge regiões mais pobres, há pouca atenção governamental, sendo considerada uma doença negligenciada (CAMINI et al., 2017).

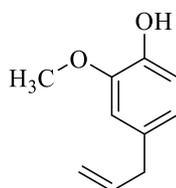
O CHIKV também é pertencente à família *Togaviridae* e ao gênero *Alphavirus*. Recentemente este alfavírus ressurgiu desencadeando graves surtos epidêmicos entre populações de diferentes continentes como Ásia, Américas, África e Europa (CHUA et al., 2017). A sua transmissão global é um risco eminente, uma vez que a disseminação do mosquito vetor da doença, *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* é crescente (COUDERC et al., 2012). A infecção causada pelo CHIKV é caracterizada por febre abrupta, dor articular profunda, mialgia e exantema macular (CHUA et al., 2017), costumando ser sintomática, mas 3% a 15% dos indivíduos infectados permanecem assintomáticos, dificultando o diagnóstico e o melhor manejo clínico da doença (COUDERC et al., 2012).

As infecções causadas por esses patógenos impactam fortemente os sistemas de saúde dos países que sofrem com essas infecções, entretanto, atualmente, ainda não há tratamentos aprovados ou vacinas eficazes para combatê-las, levando a uma preocupação e urgente necessidade de desenvolvimento de novos medicamentos antivirais eficazes e seguros (ZHU et al., 2018).

3.3 EUGENOL

No que tange a descoberta de novos candidatos a fármacos, a natureza é uma valiosa fonte para a medicina, devido à existência de produtos naturais ativos em várias espécies de plantas (CAMPOS, et al., 2020). Dentre estas substâncias naturais, o eugenol (Figura 5) representa um composto natural bem conhecido e estudado. Foi isolado em 1929 como um composto volátil da *Eugenia caryophyllata* (cravo da Índia) e teve sua produção comercial iniciada em 1940 (ULANOWSKA; OLAS, 2021). O cravo da Índia é considerado a principal fonte natural deste composto, representando entre 45% e 90% da composição do óleo essencial derivado desta espécie (GAZOLLA et al., 2018). Apesar disso, o eugenol pode ser encontrado em outras espécies como noz moscada, canela, folha de louro, sassafrás, mirra e manjerição (HUAN et al., 2012).

Figura 5. Estrutura química do eugenol



Fonte: elaborado pela autora

O crescente interesse por tratamentos não convencionais a base de medicamentos que contém produtos naturais e o grande conhecimento das propriedades biológicas do eugenol, fez com que ele se tornasse alvo de estudos científicos como um potencial protótipo a candidato a novos produtos. Segundo Ulanowska (2021), são descritas para o eugenol as seguintes atividades:

Antifúngica, analgésica, antimutagênica, antiplaquetária, antialérgica, anti-inchaço e anti-inflamatória. Também é descrito seu efeito antimicrobiano contra patógenos humanos, incluindo um amplo grupo de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e fungos e um número de parasitas, incluindo *Giardia lamblia*, *Fasciola gigantica* e *Haemonchus contortus*. Além disso, o eugenol também é capaz de proteger contra a hepatotoxicidade induzida pelo tetracloreto de carbono (2021, p.2).

Estudos recentes mostraram a atividade anticancerígena do eugenol contra diversas linhagens celulares de câncer em modelos animais, e o mecanismo molecular da indução de apoptose, causada pelo eugenol, em melanoma, tumores cutâneos, osteossarcoma, leucemia e mastócitos gástricos vem sendo cada vez mais documentados (JAGANATHAN et al., 2011). Estudo realizado por Ghosh e colaboradores (2005), mostrou que o eugenol é capaz de inibir o crescimento de células de melanomas em humanos e camundongos, tanto por crescimento dependente de ancoragem, quando necessitam de adesão e superfície de contato para que a proliferação inicie, quanto por crescimento independente de ancoragem. Esse mesmo estudo também demonstrou que os animais tratados com eugenol não morreram por metástase ou invasão tumoral, indicando a habilidade dessa substância em suprimir a metástase causada pelo melanoma.

Além disso, o estudo também avaliou que o tamanho do tumor em animais tratados era 40% menor do que os animais do grupo controle, sendo que os animais do grupo controle apresentavam áreas viáveis do tumor e apenas pequenas áreas de necrose, enquanto os animais tratados demonstraram áreas extensas de necrose tumoral, com apenas algumas pequenas áreas de células tumorais viáveis. Esses resultados indicam que o eugenol pode ser considerado um potente agente para o tratamento de melanoma.

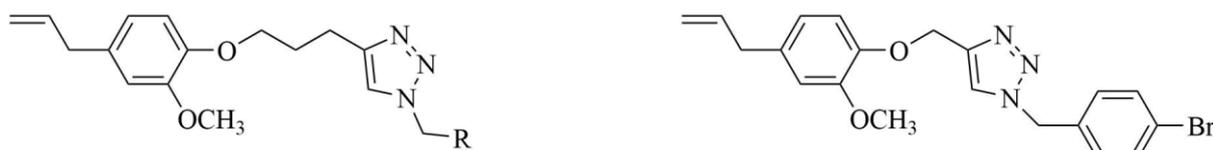
Apesar das atividades relatadas, também há descrições de que em altas concentrações o eugenol se torna tóxico para o organismo, causando irritação e reações alérgicas (SUZUKI; SUGIYAMA; FURUTA, 1985). Há descrições na literatura sobre o efeito corrosivo do eugenol, sendo este menor do que quando comparado com o fenol. Além disso, a estimulação do eugenol pode causar síndrome respiratória e sua ingestão, acidose metabólica e, experimentos em animais demonstraram que o eugenol pode causar gastroenterite e anorexia (KONG et al., 2014).

Assim, modificações estruturais em substâncias biologicamente ativas que ocorrem de forma natural é uma das muitas estratégias utilizadas pelos químicos medicinais para aumentar seus efeitos biológicos e reduzir eventuais efeitos adversos. O amplo espectro de atividades biológicas relatadas para o eugenol o torna uma molécula em constante utilização para modificações químicas, com o intuito de se descobrir novos derivados ou análogos com melhores propriedades terapêuticas e menores efeitos tóxicos (DA SILVA et al., 2018).

Em estudo realizado por Gazolla e colaboradores (2018), a síntese de derivados do eugenol contendo unidades 1,2,3-triazólicas possibilitou a descoberta de cinco derivados (Figura 6) que reduziram significativamente a viabilidade da linhagem celular leucêmica

mieloide (HL60) e sua subsequente avaliação mostrou que três deles possuíam atividade contra a linhagem leucêmica linfoide (Nalm6).

Figura 6. Derivados triazólicos do eugenol citotóxicos

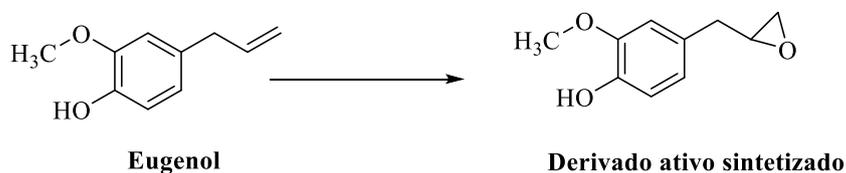


R = fenila; 4-clorofenila; 3-bromofenila

Fonte: elaborado pela autora

Em outro estudo, a modificação estrutural do eugenol resultou na obtenção de uma substância com forte efeito antibiótico (Figura 7) contra *Bacillus cereus* e um efeito moderado contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* e *Klebsiella pneumoniae*, com maior poder de inibição do crescimento quando comparada com o eugenol (DA SILVA et al., 2018).

Figura 7. Estrutura química do eugenol e derivado oxirano ativo sintetizado por Da Silva e colaboradores (2018)



Eugenol

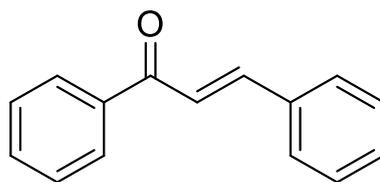
Derivado ativo sintetizado

Fonte: elaborado pela autora

3.4 CHALCONAS

Dentre os bem estudados compostos fitoquímicos encontram-se as chalconas. As chalconas (Figura 8) são consideradas precursoras de flavonoides e isoflavonoides, sendo uma das principais classes de produtos naturais, amplamente distribuídas no reino vegetal, estando presentes em frutas e vegetais (ELKHALIFA et al., 2021).

Figura 8. Estrutura química básica de uma chalcona



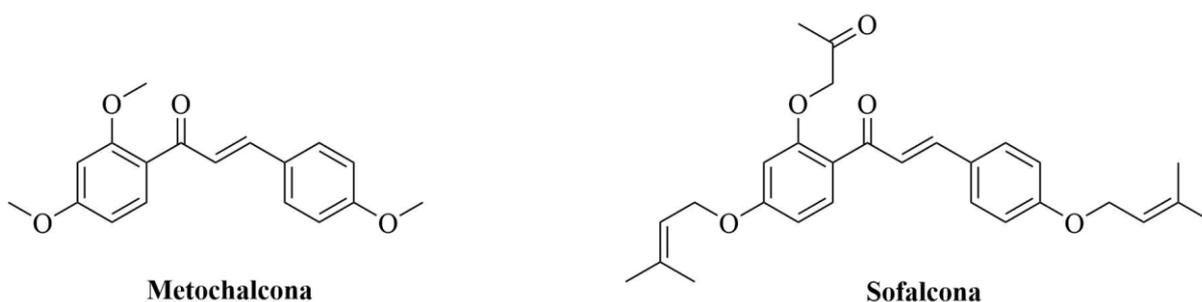
Fonte: elaborado pela autora

Quimicamente, as chalconas consistem em flavonoides de cadeia aberta, nos quais dois anéis aromáticos são unidos por um sistema carbonil α,β -insaturado (K. SAHU et al., 2012). A família das chalconas possui uma extensa diversidade estrutural e podem ser classificadas de maneira grosseira em duas categorias: chalconas simples ou clássicas; e chalconas híbridas (ou substituídas) com o esqueleto central de 1,3-diaril-2-propen-1-ona preservado (ZHUANG et al., 2017).

Na natureza, encontram-se chalconas ligadas a uma combinação de substituintes em seus anéis benzênicos, principalmente funções hidroxila e metoxila. Além destas funções, os derivados sintéticos das chalconas podem conter um ou mais substituintes em seus grupos arila, como halogênios, alquila, amino, nitro, nitrila, acetamido, carboxila, anéis heterocíclicos, entre outros. Esses grupos funcionais adicionais podem influenciar diretamente na farmacocinética e na atividade biológica específica exibida pelas chalconas, no entanto, a unidade cetona α,β -insaturada é considerada o principal grupo farmacofórico, visto que a sua remoção total ou parcial leva a perda da bioatividade da molécula (BATOVSKA; TODOROVA, 2010).

As aplicações terapêuticas das chalconas remontam há décadas, quando o uso de plantas e ervas para o tratamento de doenças eram comuns. Alguns compostos baseados em chalconas já foram aprovados para uso clínico, como por exemplo a Metochalcona (Figura 9), fármaco comercializado na Itália, utilizada como colerético e a Sofalcona (Figura 9), comercializado no Japão, utilizada como antiulcerativo e mucoprotetor (ZHUANG et al., 2017).

Figura 9. Estrutura química da Metochalcona e Sofalcona

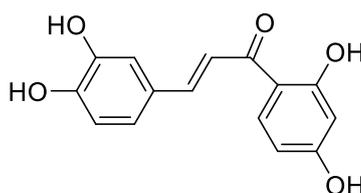


Fonte: Zhuang (2017)

Chalconas de origem natural e seus análogos e/ou derivados sintéticos exibem um amplo espectro de atividades biológicas, dentre elas, antiviral, antitumoral, anti-inflamatória, antibacteriana, antioxidante, antimicrobiana, efeitos neuroprotetores, dentre outras (ZHUANG et al., 2017). Devido às propriedades biológicas atribuídas a essas substâncias, o interesse acerca dessas moléculas por grupos de pesquisa foi se tornando cada vez mais evidente.

Em um estudo realizado por Yang e colaboradores (2015) a buteína (Figura 10) reduziu a viabilidade de células TOV-21G (linhagem celular de adenocarcinoma maligno de ovário humano) em uma dose/tempo dependente. Comparando-se com o grupo controle de células, houve um progressivo decréscimo da viabilidade das células com o aumento da concentração da buteína, uma chalcona poli-hidroxilada. Além disso, esse estudo demonstrou que a buteína foi capaz de aumentar as células pró apoptóticas avaliadas e regular negativamente células anti apoptóticas.

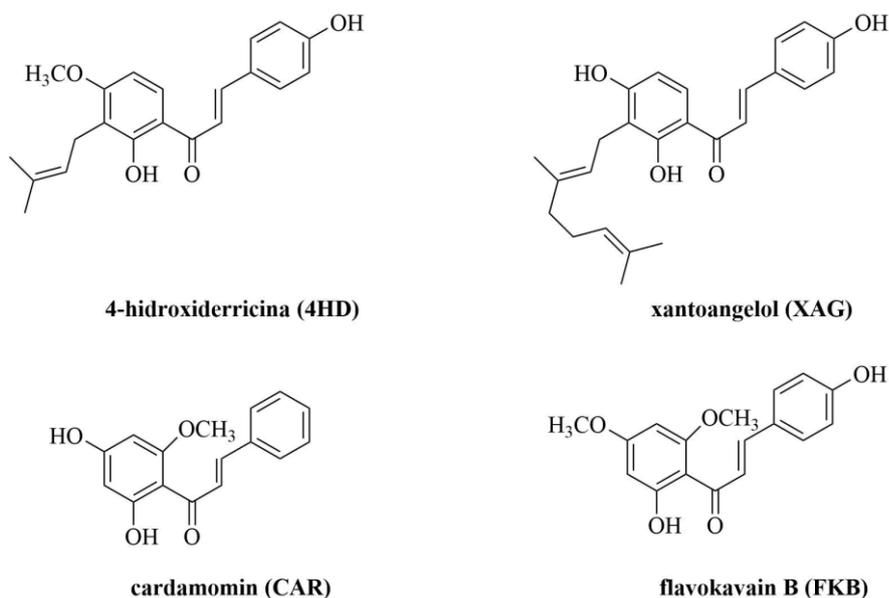
Figura 10. Estrutura química da buteína



Fonte: elaborado pela autora

Em outro estudo, tratou-se células HepG2 (linhagem celular de carcinoma hepatocelular de fígado humano) com uma mistura de ácido palmítico e ácido oleico (proporção 1:2) a fim de se criar um ácido graxo e fornecer um modelo *in vitro* para esteatose hepática. Utilizando esse modelo, testou-se duas chalconas (Figura 11) provenientes da *Angelica keiskei*, a 4-hidroxiclericina (4HD) e o xantangelol (XAG), que possuem atividades biológicas já bem relatadas como seu efeito contra a inflamação de tumores e diabetes. Utilizou-se também a cardamomin (CAR), um dos principais constituintes das sementes de *Alpinia katsumadai* Hayata, tradicionalmente utilizada na China como uma erva antiemética, e a Flavokavain B (FKB), análogo da CAR, e um componente ativo da *Alpinia pricei* Hayata e Kava. CAR e FKB (Figura 11) já demonstraram atividades antioxidantes, antiinflamatórias e antidiabéticas. Foi determinado que, além dos efeitos biológicos já relatados para essas moléculas, as quatro chalconas testadas foram capazes de diminuir significativamente a indução de mistura de ácidos graxos e o acúmulo de lipídeos em células HepG2 sem causar citotoxicidade (ZHANG; YAMAMOTO; ASHIDA, 2014).

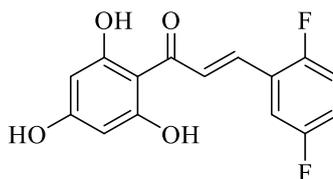
Figura 11. Estrutura química da 4HD, XAG, CAR e FKB



Fonte: elaborado pela autora

Já em um estudo realizado por Burmaoglu e colaboradores (2016), testou-se chalconas fluoradas e hidroxiladas (Figura 12) contra linhagem de células HepG2 comparando sua atividade com o metotrexato. Observou-se que em um curto período, o metotrexato exibiu atividade melhor do que os compostos sintetizados, porém com a manutenção da exposição das células às substâncias elas atingiram efeitos significativos e atividade próxima a do metotrexato.

Figura 12. Estrutura química da chalcona mais ativa sintetizada por Burmaoglu e colaboradores (2016)

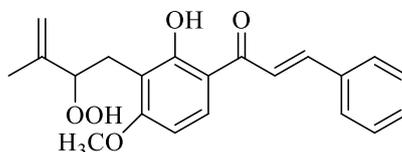


Fonte: elaborado pela autora

Além dos relatos acerca das atividades em células cancerígenas descritas, há estudos na literatura de diversos tipos de chalconas sendo capazes de atuar em alvos moleculares de doenças causadas por infecções virais, afetando diferentes etapas do ciclo de replicação viral, incluindo a transcriptase reversa, protease, neuraminidase, aminotransferases, superóxido dismutase, glutathione peroxidase e outras enzimas associadas (ELKHALIFA et al., 2021). Em estudo realizado por Park e colaboradores (2016), foi possível avaliar o efeito inibitório de chalconas alquiladas em proteases de Sars-CoV, sendo que uma delas, substituída com um grupo hidroperoxila (Figura 13), apresentou potente efeito inibitório contra uma protease

semelhante à quimotripsina (3CLpro) e contra outra protease semelhante a papaína (PLpro) com IC_{50} de 11,4 e 1,2 μ M, respectivamente.

Figura 13. Chalcona alquilada substituída com grupo hidroperoxila



Fonte: elaborado pela autora

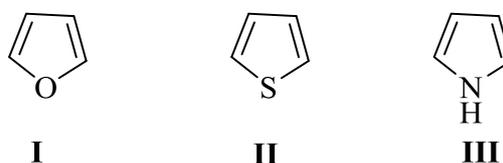
3.5 ISOXAZÓIS

Até o final do segundo milênio, aproximadamente 20 milhões de substâncias químicas foram identificadas, sendo que dois terços são total ou parcialmente aromáticos e aproximadamente a metade deles são heterociclos (BALABAN; ONICIU; KATRITZKY, 2004). Acerca dos compostos heterocíclicos, em sua tese, Edna Esquivel diz que:

Os heterociclos são denominados como compostos orgânicos cíclicos com pelo menos um átomo diferente do carbono, sendo os heteroátomos mais comuns o nitrogênio, oxigênio e enxofre. No entanto, os *N*-heterociclos são avaliados como estruturas privilegiadas que facilitam a síntese de novos produtos e, ao mesmo tempo, as propriedades químicas, físicas e biológicas destes compostos podem ser alteradas com a incorporação de novos grupos funcionais, convertendo-os em compostos importantes na descoberta de candidatos com potencial biológico (2018, p.7).

A classe de heterociclos com maior diversidade são o furano (**I**), tiofeno (**II**) e pirrol (**III**) (Figura 14), caracterizados por ser um grupo de anéis de cinco membros (ESQUIVEL, 2018).

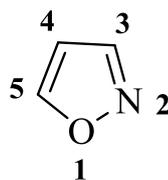
Figura 14. Estrutura química do Furano, Tiofeno e Pirrol



Fonte: elaborado pela autora

A partir do furano e do pirrol derivam-se outros heterociclos que possuem mais de um heteroátomo, como por exemplo o isoxazol (Figura 15), composto que faz parte da classe dos azois, que tem como característica uma substituição na posição 2 do anel furânico por um heteroátomo (ESQUIVEL, 2018).

Figura 15. Estrutura química de um anel isoxazólico



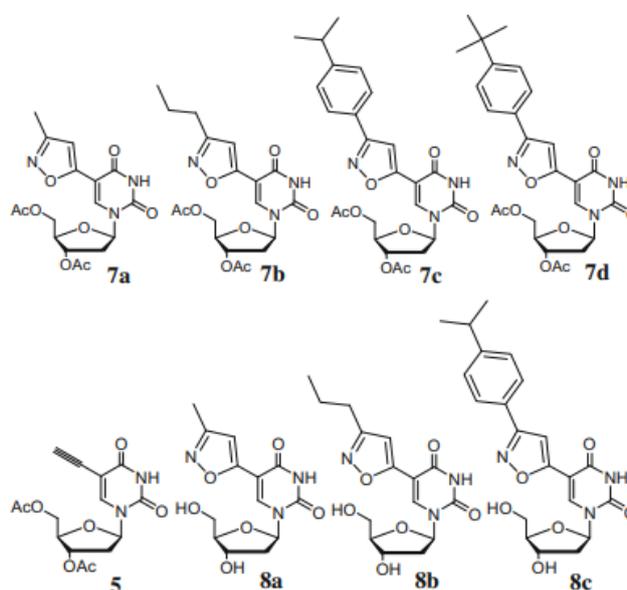
Fonte: elaborado pela autora

O anel isoxazólico está associado a diferentes atividades biológicas, principalmente porque seus dois heteroátomos eletronegativos contribuem para interações não covalentes, principalmente ligações de hidrogênio (aceptores de ligações de hidrogênio) e π stack (anel não saturado de cinco membros). Devido a essas características, é relatado que a inclusão de um anel isoxazólico em uma substância, pode contribuir para o aumento do seu potencial biológico e seletividade, além de melhorar o seu perfil farmacocinético (ZHU et al., 2018).

Evidências consideráveis têm se acumulado a fim de demonstrar a importância biológica dos derivados isoxazólicos (UPADHYAY et al., 2010). Compostos contendo um núcleo isoxazolólico são associados a atividades antimicrobiana, antitumoral, anti-inflamatória, entre outras (KIDWAI; KUKREJA; THAKUR, 2006). Devido às atividades biológicas relacionadas e às aplicações bem-sucedidas do desenvolvimento de novas substâncias contendo um núcleo isoxazólico, foi possível a inserção de alguns fármacos no mercado contendo este heterociclo em suas estruturas. O sulfisoxazol, ou sulfafurazol (Figura 16), foi aprovado para o tratamento de infecções bacterianas graves, repetidas ou de longa duração do trato urinário, cujo mecanismo de ação consiste na inibição da enzima diidropteorato sintase da bactéria. A risperidona (Figura 16) foi aprovada para tratamento de esquizofrenia em adultos e adolescentes, com idades entre 13-17 anos e para o tratamento de curto prazo de episódios maníacos ou mistos de transtorno bipolar I em crianças e adolescentes com idades entre 10-17 anos; ela causa o bloqueio dos receptores dopaminérgicos D2 no sistema límbico, aliviando os sintomas da esquizofrenia. Por fim, a leflunomida (Figura 16) foi aprovada para tratamento dos sinais e sintomas da artrite reumatóide ativa, levando a melhora da função física e reduzindo a progressão do dano estrutural causado pela doença (ZHU et al., 2018).

Em outro estudo, modificações estruturais de análogos de nucleosídeos foram realizadas, incorporando-se o anel isoxazólico, o que levou à obtenção de oito derivados, que foram avaliados contra doze tipos de vírus, dentre eles, HIV (vírus da imunodeficiência humana), HSV (vírus da herpes simples), Coxsackie B3 (Cox B3 - enterovírus patogênico, que desencadeia doenças que variam de sofrimento gastrointestinal a pericardite e miocardite), VSV (vírus da estomatite vesicular) e EMCV (vírus da encefalomiocardite). Os derivados **7c**, **7d** e **8c** (Figura 18) exibiram atividade anti-HSV, sendo que os resultados apresentados foram melhores do que o do fármaco controle (aciclovir). Além disso, os nucleosídeos também exibiram atividades promissoras contra os vírus de RNA avaliados (Cox B3, EMCV e VSV), com atividades antivirais cerca de duas a quatro vezes melhor do que o controle positivo (ribavirina). Entretanto, em termos de citotoxicidade, todos os derivados apresentam alto potencial citotóxico e índices de seletividade inferiores aos dos controles positivos. (LEE; PARK; KIM, 2009).

Figura 18. Nucleosídeos contendo um núcleo isoxazólico, potencialmente antivirais



Fonte: LEE (2009)

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos de síntese, caracterização, e avaliação da atividade citotóxica e antiviral *in vitro* das chalconas e isoxazóis derivados do eugenol e análogos propostos estão descritos a seguir.

4.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS

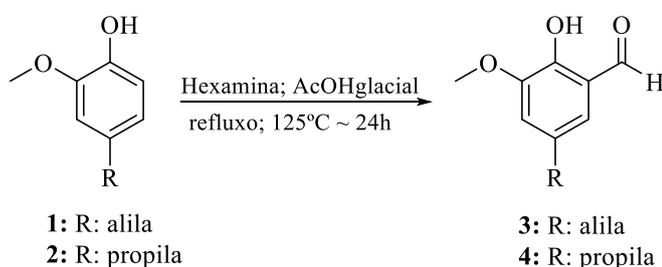
As chalconas e isoxazóis sintetizados foram purificados por cromatografia em camada de sílica (CCS) utilizando-se sílica gel 60, e posteriormente foram caracterizados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C .

Para as análises cromatográficas em camada delgada (CCD) utilizou-se sílica gel 60 G sobre lâmina de vidro, tendo a camada de sílica, uma espessura de 0,25 mm. Como reveladores, utilizou-se vapores de iodo, para todas as substâncias sintetizadas, bem como Molibdato Cérico de Amônio (CAM), que consiste em uma solução de molibdato de amônio em água com sulfato de cério e ácido sulfúrico, Cloreto de Ferro III (5%) e luz ultravioleta, quando necessário.

As análises de RMN de ^1H e ^{13}C foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Caracterização de Moléculas da UFOP/MG, em espectrômetro Bruker AC-400 MHz. O solvente deuterado utilizado foi clorofórmio (CDCl_3), e como padrão interno, tetrametilsilano (TMS). Os valores dos deslocamentos químicos (δ) foram descritos em ppm relativamente aos sinais de ^1H e ^{13}C e os valores de constante de acoplamento (J), em Hz.

As faixas de fusão das substâncias sintetizadas foram determinadas no Laboratório de Química Medicinal e Bioensaio da UFOP/MG, obtidas em aparelho Reichert Austria.

4.1.1. Procedimento geral para obtenção do formil eugenol (3) e formil diidroeugenol (4)



Fonte: Elaborado pela autora

Em um balão de fundo redondo de 125 mL adicionou-se hexamina (5 equivalentes) e ácido acético glacial (40 mL). A mistura reacional foi colocada sob banho de óleo e mantida sob agitação e aquecimento (125°C), em refluxo, por 10 minutos. Após esse tempo, o eugenol

(**1**, 1 eq.) ou diidroeugenol (**2**, 1 eq.) foram adicionados à mistura reacional. Ao se verificar o fim da reação (por CCD; eluente: Hex/AcOEt 1:1; reveladores: vapor de iodo seguido de cloreto férrico 5%), adicionou-se à mistura uma solução aquosa de HCl 1M (10 mL) mantendo-se o refluxo e aquecimento por mais 24h.

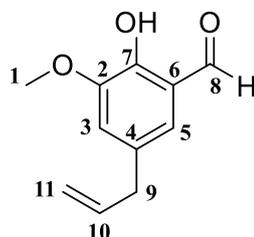
Após esse tempo, a mistura reagente foi vertida em um béquer de 500 mL e este foi colocado sob banho de gelo para que a neutralização da solução fosse realizada. Para tal, utilizou-se uma solução supersaturada de bicarbonato de sódio, adicionado sob agitação magnética. Após atingido o pH 7, a solução foi transferida para um funil de separação e extraída com clorofórmio (5 x 25 mL). A fase orgânica foi reunida, seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente evaporado sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica (eluente: Hex/AcOEt 95:5), obtendo-se um óleo amarelo (0,9380g; 80% de rendimento) que foi caracterizado por RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT (espectros em anexo). A tabela 1 a seguir apresenta a quantidade em massa (mg) e número de mol (mmol) dos reagentes que foram utilizados para a obtenção dos derivados formulados.

Tabela 1. Quantidades dos reagentes utilizados para a reação de formilação do eugenol (**1**) e diidroeugenol (**2**)

| Fenol | Hexamina |
|--|----------------------|
| 1 : eugenol (6,090 mmol; 1000 mg) | 4270 mg (30,4 mmol) |
| 2 : diidroeugenol (6,016 mmol; 1000 mg) | 4220 mg (30,08 mmol) |

Fonte: Elaborado pela autora

Dados de caracterização da substância 5-alil-2-hidroxi-3-metoxibenzaldeído (**3**):



Fonte: elaborado pela autora

F.M: C₁₁H₁₂O₃ **MM:** 192,21g/mol

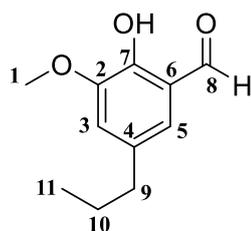
Aspecto físico: Óleo amarelo

Massa obtida: 938 mg (4,88 mmol; 80% de rendimento)

RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃), δ (ppm): RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃), δ (ppm): 10,98 (s, 1H, H-aldeído); 9,86 (s, 1H, OH); 6,97 (d, 1H, ⁴J = 1,28 Hz, H-5); 6,93 (s, 1H, H-3); 5,98-5,88 (m, 1H, H-10); 5,12-5,07 (m, 2H, H-9); 3,89 (s, 3H, H-1); 3,36 (d, 2H, ³J = 6,4 Hz, H-11).

RMN de ¹³C (400 MHz; CDCl₃), δ (ppm): 196,58 (1C, C-8); 149,94 (1C, C-2); 148,10 (1C, C-7); 136,66 (1C, C-10); 131,35 (1C, C-4); 123,62 (1C, C-6); 120,34 (1C, C-5); 118,56 (1C, C-3); 116,48 (1C, C-11); 56,19 (1C, C-1); 39,34 (1C, C-9).

Dados de caracterização da substância 2-hidroxi-3-metoxi-5-propilbenzaldeído (**4**):



Fonte: elaborado pela autora

F.M: C₁₁H₁₄O₃ **MM:** 194,23g/mol

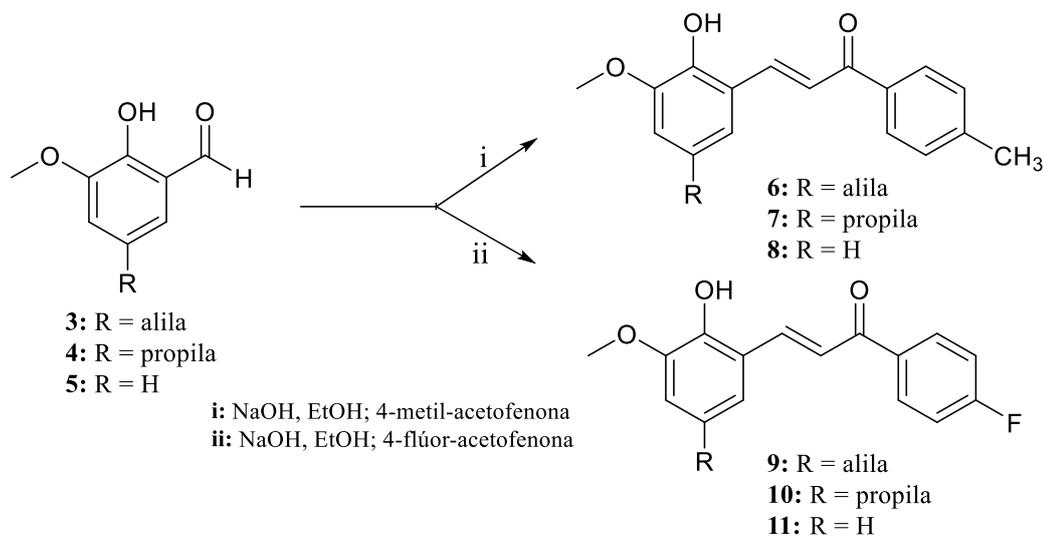
Aspecto físico: Óleo amarelo

Massa obtida: 852,1 mg (4,38 mmol; 73% de rendimento)

RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃), δ (ppm): 10,94 (s, H-aldeído); 9,87 (s, OH); 6,96-6,95 (m, 1H, H-5); 6,93 (s, 1H, H-3); 3,90 (s, 3H, H-1); 2,56 (t, 2H, ³J = 7,36 Hz, H-9); 1,68-1,58 (sex, 2H, ³J = 7,48 Hz, H-10); 0,94 (t, 3H, ³J = 7,44 Hz, H-11).

RMN de ¹³C (400 MHz; CDCl₃), δ (ppm): 196,67 (1C, C-8); 149,63 (1C, C-2); 147,97 (1C, C-7); 134,05 (1C, C-4); 123,52 (1C, C-6); 120,34 (1C, C-5); 118,66 (1C, C-3); 56,24 (1C, C-1); 37,27 (1C, C-9), 24,42 (1C, C-10); 13,62 (1C, C-11).

4.1.2. Procedimentos gerais para a obtenção das chalconas 6, 7, 8, 9, 10 e 11



Fonte: elaborado pela autora

A síntese de tais substâncias foi feita por meio de duas técnicas, sendo que a primeira delas apresentou um rendimento relativamente baixo para as substâncias de interesse, motivando a busca por uma técnica que melhorasse tais rendimentos. O procedimento de ambas as técnicas é apresentado em seguida, assim como os dados de caracterização das substâncias **6-11**. A tabela 2 a seguir apresenta a quantidade em massa (mg) e número de mol (mmol) dos reagentes que foram utilizados para a obtenção das chalconas.

Tabela 2. Quantidades dos reagentes utilizados para obtenção das chalconas **6, 7, 8, 9, 10 e 11**

| Aldeído | Acetofenona | Chalcona obtida |
|--------------------------------|--|-----------------|
| 3 (1,0452 mmol; 200 mg) | 4-metil-acetofenona: 139,6 mg (1,0452 mmol) | 6 |
| 4 (1,0297 mmol; 200 mg) | 4-metil-acetofenona: 138,0 mg (1,029 mmol) | 7 |
| 5 (1,314 mmol; 200 mg) | 4-metil-acetofenona: 160,5 mg (1,314mmol) | 8 |
| 3 (1,0425 mmol; 200 mg) | 4-flúor-acetofenona: 143,7 mg (1,0452 mmol) | 9 |
| 4 (1,0297 mmol; 200 mg) | 4-flúor-acetofenona: 142,2 mg (1,0297 mmol) | 10 |

| | | |
|-------------------------------|---|----|
| 5 (1,314 mmol; 200 mg) | 4-flúor-acetofenona: 181,5 mg (1,3114mmol) | 11 |
|-------------------------------|---|----|

Fonte: Elaborado pela autora

Técnica I

Esta técnica foi utilizada para a síntese das substâncias **8** e **11**.

Preparou-se, em um balão de fundo redondo de 50 mL, uma solução contendo a acetofenona correspondente (1 eq.) em etanol (2,5 mL/mmol de acetofenona) e a esta solução, adicionou-se NaOH (3 eq.) A mistura permaneceu sob agitação magnética à temperatura ambiente por 10 minutos, e após esse tempo, a *orto*-vanilina (**5**, 1,2 eq.) foi adicionada, mantendo-se a mesma condição por mais 24 h. Ao se observar o fim da reação por CCD (eluente: Hex/AcOEt 8:2; revelador: vapor de iodo) a mistura foi resfriada e neutralizada utilizando-se HCl 1 M. Após a mistura atingir pH 7, evaporou-se o etanol sob pressão reduzida e, em seguida, a mistura resultante foi transferida para um funil de separação, sendo extraída utilizando-se acetato de etila (3x20 mL). A fase orgânica foi reunida, seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada em evaporador rotatório. O produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica e caracterizado por RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT (espectros em anexo).

Esse procedimento foi realizado duas vezes para cada uma das substâncias. Alcançou-se um rendimento de 19% (65,9 mg) para o derivado **8** e de 47% (132,3 mg) para o derivado **11**.

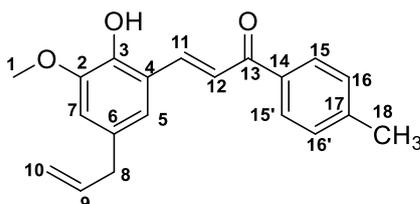
Técnica II

Esta técnica foi utilizada para a síntese das substâncias **6**, **7**, **9** e **10**.

Em um balão de 50 mL, preparou-se uma solução contendo a acetofenona (1 eq.) e o aldeído (1 eq.) correspondentes, em etanol (10 mL). A esta solução adicionou-se 6 mL de uma solução aquosa de NaOH (60%), gota a gota, por 30 minutos (2 mL a cada 10 minutos) sob agitação constante. O sistema foi mantido sob agitação magnética por 4 horas à temperatura ambiente. Ao ser observado o fim da reação, por CCD (eluente: Hex/AcOEt 6:4; reveladores: vapor de iodo e CAM), a mistura reagente foi neutralizada utilizando-se HCl 1 M, sob resfriamento. Após atingir pH próximo de 7, a solução foi filtrada e o sólido recolhido e

purificado por cromatografia em coluna de sílica, alcançando-se rendimentos de 56% (103,1 mg), 93% (241,8 mg), 89% (172,9 mg) e 55% (89,9 mg) para os derivados **6**, **7**, **9** e **10** respectivamente. Os produtos obtidos foram caracterizados por espectroscopia de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT (espectros em anexo).

Dados de caracterização da substância (*E*)-3-(5-alil-2-hidroxi-3-metoxifenil)-1-(*p*-tolil)prop-2-en-1-ona (**6**)



Fonte: elaborado pela autora

F.M: $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_3$ **MM:** 308,38 g/mol

F.F: 80-82 °C

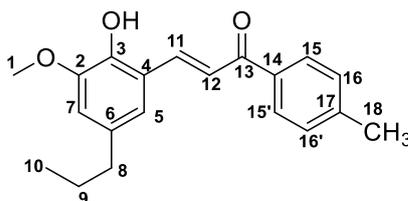
Aspecto físico: sólido vermelho

Massa obtida: 103,1 mg (56% rendimento)

RMN de ^1H (400 MHz; CDCl_3), δ (ppm): 7,98 (d, 1H, $^3J_{trans} = 15,8$ Hz, H-11); 7,92 (d, 2H, $^3J = 8,0$ Hz, H-15); 7,70 (d, 1H, $^3J_{trans} = 15,8$ Hz, H-12); 7,49 (d, 2H, $^3J = 7,92$ Hz, H-16); 6,98 (s, 1H, H-5); 6,69 (s, 1H, H-7); 5,99-5,89 (m, 1H, H-9); 5,11-5,06 (m, 2H, H-10); 3,89 (s, 3H, H-1); 3,32 (d, 2H, $^3J = 6,6$ Hz, H-8); 2,41 (s, 3H, H-18).

RMN de ^{13}C (400 MHz; CDCl_3), δ (ppm): 190,78 (1C, C-13); 146,81 (1C, C-2); 144,18 (1C, C-3); 143,30 (1C, C-17); 139,77 (1C, C-11); 137,34 (1C, C-9); 135,94 (1C, C-14); 131,37 (1C, C-6); 129,23 (2C, C-16); 128,74 (2C, C-15); 128,37 (1C, C-12); 123,50 (1C, C-5); 121,27 (1C, C-4); 116,05 (1C, C-10); 112,49 (1C, C-7); 56,23 (1C, C-1); 39,84 (1C, C-8); 21,68 (1C, C-18).

Dados de caracterização da substância (*E*)-3-(2-hidroxi-3-metoxi-5-propilfenil)-1-(*p*-tolil)prop-2-en-1-ona (**7**)



Fonte: elaborado pela autora

F.M: C₂₀H₂₂O₃ **MM:** 310,39g/mol

F.F: 80-82 °C

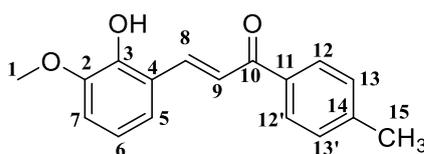
Aspecto físico: Sólido amarelo

Massa obtida: 241,8 mg (93% rendimento)

RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃), δ (ppm): 8,0 (d, 1H, ³J_{trans} = 15,8 Hz, H-11); 7,94 (d, 2H, ³J = 8,16 Hz; H-15); 7,73 (d, 1H, ³J_{trans} = 15,8 Hz, H-12); 7,29 (d, 2H, ³J = 7,88 Hz; H-16); 6,97 (d, 1H, ⁴J = 1,16 Hz, H-5); 6,71 (d, 1H, ⁴J = 1,48 Hz, H-7); 6,16 (s, 1H, OH); 3,91 (s, 3H, H-1); 2,54 (t, 2H, H-8); 2,42 (s, 3H, H-18); 1,68-1,59 (sext, 2H, H-9); 0,95 (t, 3H, H-10).

RMN de ¹³C (400 MHz; CDCl₃), δ (ppm): 190,80 (1C, C-13); 146,61 (1C, C-2); 143,82 (1C, C-3); 143,24 (1C, C-18); 139,99 (1C, C-11); 135,91 (1C, C-14); 134,04 (1C, C-6); 129,18 (2C, C-15); 128,69 (2C, C-16); 123,28 (1C, C-12); 121,08 (1C, C-5); 120,80 (1C, C-4); 112,43 (1C, C-7); 56,16 (1C, C-1); 37,68 (1C, C-8); 24,70 (1C, C-9); 21,62 (1C, C-18); 13,73 (1C, C-10).

Dados de caracterização da substância (*E*)-3-(2-hidroxi-3-metoxifenil)-1-(*p*-tolil)prop-2-en-1-ona (**8**)



F.M: C₁₇H₁₆O₃ **MM:** 268,31g/mol

F.F: 98-102 °C

Aspecto físico: Sólido vermelho

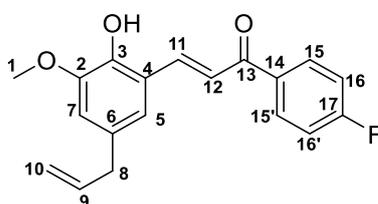
Massa obtida: 65,9 mg (10% de rendimento)

RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃), δ (ppm): 8,04 (d, 1H, ³J_{trans} = 15,8 Hz; H-8); 7,95 (d, 2H, ³J = 8,12 Hz; H-12); 7,75 (d, 1H, ³J_{trans} = 15,8 Hz, H-9); 7,31 (s, 1H, H-5); 7,29 (s, 1H, H-7); 7,21-

7,19 (m, 1H, H-6); 6,90-6,88 (m, 2H, H-13); 6,31 (s, 1H, OH); 3,93 (s, 3H, H-1); 2,44 (s, 3H, H-15).

RMN de ^{13}C (400 MHz; CDCl_3), δ (ppm): 190,69 (1C, C-10); 146,83 (1C, C-2); 145,76 (1C, C-3); 143,30 (1C, C-14); 139,61 (1C, C-8); 135,88 (1C, C-11); 129,20 (2C, C-12); 128,68 (2C, C-13); 123,57 (1C, C-6); 121,69 (1C, C-9); 121,40 (1C, C-5) 119,66 (1C, C-4); 111,83 (1C, C-7); 56,21 (1C, C-1); 21,63 (1C, C-15).

Dados de caracterização da substância (*E*)-3-(5-alil-2-hidroxi-3-metoxifenil)-1-(4-fluorfenil)prop-2-en-1-ona (**9**)



F.M: $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{FO}_3$ **MM:** 312,34g/mol

F.F: 82-84 °C

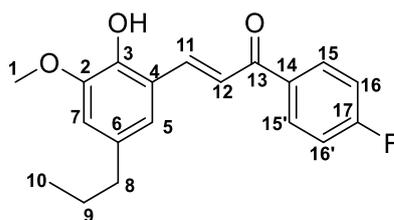
Aspecto físico: Sólido amarelo

Massa obtida: 172,9 mg (89% rendimento)

RMN de ^1H (400 MHz; CDCl_3), δ (ppm): 8,08-8,04 (m, 2H, H-15); 8,0 (d, 1H, $^3J_{trans} = 15,8$ Hz, H-11); 7,70 (d, 1H, $^3J_{trans} = 15,8$ Hz, H-12); 7,16 (t, 2H, $^3J = 8,6$ Hz; H-16); 6,99 (s, 1H, H-5); 6,73 (d, 1H, $^4J = 1,4$ Hz, H-7); 6,19 (s, OH); 6,00-5,91 (m, 1H, H-9); 5,13-5,08 (m, 2H, H-10); 3,91 (s, 3H, H-1); 3,34 (d, 2H, $^3J = 6,56$ Hz, H-8).

RMN de ^{13}C (400 MHz; CDCl_3), δ (ppm): 189,61 (1C, C-13); 165,48 (1C, d, $^1J = 252,26$ Hz, C-17); 146,81 (1C, C-2); 144,27 (1C, C-3); 140,49 (1C, C-11); 137,28 (1C, C-9); 134,83 (d, 2C, $^4J = 2,62$ Hz, C-14); 131,47 (1C, C-6); 131,15 (d, 2C, $^3J = 9,15$ Hz, C-15); 123,02 (1C, C-12); 121,42 (1C, C-5); 120,79 (1C, C-4); 116,11 (1C, C-10); 115,61 (d, 2C, $^2J = 21,5$ Hz, C-16); 112,68 (1C, C-7); 56,24 (1C, C-1); 39,82 (1C, C-8).

Dados de caracterização da substância (*E*)-1-(4-fluorfenil)-3-(2-hidroxi-3-metoxi-5-propilfenil)prop-2-en-1-ona (**10**)



F.M: C₁₉H₁₉FO₃ **MM:** 314,36g/mol

F.F: 72-74 °C

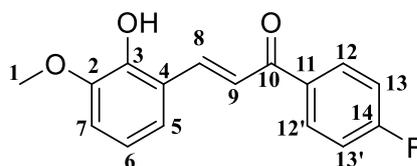
Aspecto físico: Sólido amarelo

Massa obtida: 89,9 mg (55% rendimento)

RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃), δ (ppm): 8,08-8,05 (m, 2H, H-15); 8,0 (d, 1H, ³J_{trans} = 15,8 Hz, H-11); 7,71 (d, 1H, ³J_{trans} = 15,8 Hz, H-12); 7,16 (t, 2H, ³J = 8,6 Hz; H-16); 6,97 (d, 1H, ⁴J = 1,52 Hz, H-5); 6,73 (d, 1H, ⁴J = 1,8 Hz, H-7); 6,16 (s, OH); 3,91 (s, 3H, H-1); 2,54 (t, 2H, ³J = 1,8 Hz; H-8); 1,68-1,61 (m, 2H, H-9); 0,95 (t, 3H, ³J = 7,36 Hz; H-10).

RMN de ¹³C (400 MHz; CDCl₃), δ (ppm): 189,80 (1C, C-13); 165,61 (1C, d, ¹J = 252,22 Hz, C-17); 146,79 (1C, C-2); 144,10 (1C, C-3); 140,88 (1C, C-11); 135,02 (d, 1C, ⁴J = 2,73 Hz, C-14); 134,32 (1C, C-6); 131,28 (2C, d, ³J = 9,14 Hz, C-15); 123,03 (1C, C-12); 121,43 (1C, C-5); 120,75 (1C, C-4); 115,75 (2C, d, ²J = 21,79 Hz, C-16); 112,80 (1C, C-7); 56,36 (1C, C-1); 37,86 (1C, C-8); 24,88 (1C, C-9); 13,92 (1C, C-10).

Dados de caracterização da substância (*E*)-1-(4-fluorfenil)-3-(2-hidroxi-3-metoxifenil)prop-2-en-1-ona (**11**)



F.M: C₁₆H₁₃FO₃ **MM:** 272,28g/mol

F.F: 102-104 °C

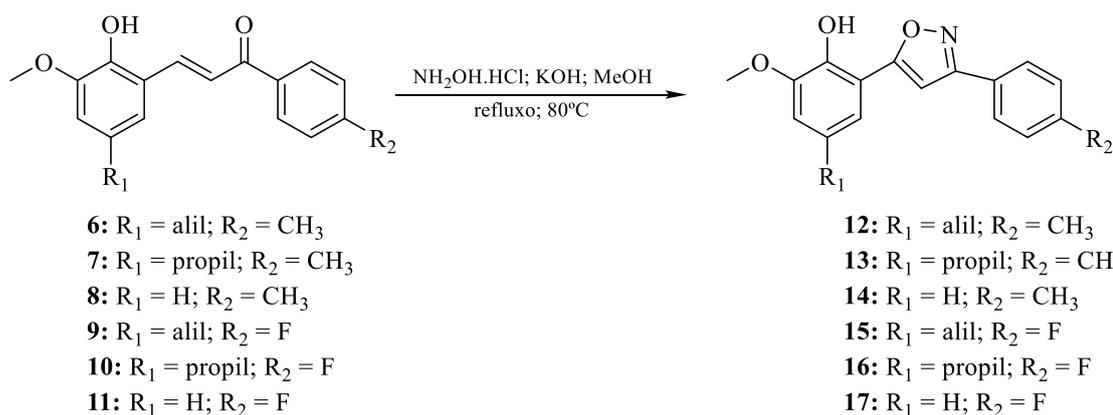
Aspecto físico: Sólido vermelho

Massa obtida: 132,3 mg (47% rendimento)

RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃), δ (ppm): 8,08-8,04 (m, 2H, H-12); 8,02 (d, 1H, ³J_{trans} = 15,8 Hz, H-8); 7,73 (d, 1H, ³J_{trans} = 15,8 Hz, H-9); 7,19-7,14 (m, 3H, H-5, H-7, H-6); 6,91-6,86 (m, 2H, H-13); 6,33 (s, 1H, OH); 3,92 (s, 1H, H-1).

RMN de ^{13}C (400 MHz; CDCl_3), δ (ppm): 189,42 (1C, C-10); 165,34 (d, 2C, $^1J = 252,29$ Hz, C-14); 146,71 (1C, C-2); 145,74 (1C, C-3); 140,22 (1C, C-8); 134,65 (d, 1C, $^4J = 2,8$ Hz, C-11); 130,98 (d, 2C, $^3J = 9,1$ Hz, C-12); 122,98 (1C, C-6); 121,75 (1C, C-5); 121,02 (1C, C-9); 119,61 (1C, C-4); 115,47 (d, 2C, $^2J = 21,6$ Hz, C-13); 111,89 (1C, C-7); 56,10 (1C, C-1).

4.1.3 Procedimentos gerais para obtenção dos derivados isoxazólicos 12, 13, 14, 15, 16 e 17



Fonte: elaborado pela autora

A síntese dos isoxazóis foi realizada por meio de quatro técnicas distintas. Cada uma delas está descrita a seguir, assim como seus dados de caracterização. O número de mols (mmol) e massa (mg) dos reagentes utilizados está apresentado na tabela 3 abaixo.

Tabela 3. Quantidades dos reagentes utilizados para obtenção dos isoxazóis **12**, **13**, **14**, **15**, **16** e **17**

| Chalcona | Cloridrato de hidroxilamina | KOH | Isoxazol obtido |
|--------------------------------|------------------------------------|------------------------|------------------------|
| 6 (0,486 mmol; 150 mg) | 33,7 mg (0,486 mmol) | 54,58 mg (0,973 mmol) | 12 |
| 7 (0,483 mmol; 150 mg) | 134 mg (1,932 mmol) | 135,48 mg (2,415 mmol) | 13 |
| 8 (0,559 mmol; 150 mg) | 38,8 mg (0,559 mmol) | 62,7 mg (1,12 mmol) | 14 |
| 9 (0,262 mmol; 82,1 mg) | 18,2 mg (0,262 mmol) | 29,3 mg (5,24 mmol) | 15 |
| 10 (0,445 mmol; 140 mg) | 30,9 mg (0,445 mmol) | 49,9 mg (0,89 mmol) | 16 |
| 11 (0,734 mmol; 200 mg) | 204,02 mg (2,936 mmol) | 205,89 mg (3,67 mmol) | 17 |

Fonte: elaborado pela autora

Técnica I

O isoxazol **14** foi sintetizado seguindo essa técnica.

Em um balão de fundo redondo de 50 mL acoplado a um condensador de refluxo, adicionou-se o KOH (2 eq.), que foi solubilizado em metanol (20 mL). Em seguida, adicionou-se a chalcona (**8**; 1 eq.) e o cloridrato de hidroxilamina (1 eq.), mantendo a mistura reacional sob aquecimento (80°C) e agitação magnética por 48 h. Em seguida, retirou-se o aquecimento e a agitação foi mantida por mais 24 h, em temperatura ambiente.

Após esse tempo, a mistura reacional foi acidificada utilizando HCl 1M até pH~3. Em seguida, evaporou-se o solvente sob pressão reduzida, adicionou-se cerca de 10 mL de água no balão, transferindo o conteúdo para um funil de separação para que a extração fosse feita. Para tal, utilizou-se diclorometano (5 x 25 mL). A fase orgânica foi reunida, lavada com H₂O destilada (2x50mL), seca com sulfato de sódio anidro, filtrada, e o solvente evaporado sob

pressão reduzida. O produto bruto, observado por CCD apenas após a elaboração da reação, foi purificado por cromatografia em coluna de sílica (eluente: Hex/AcOEt 90:10), obtendo-se um sólido amarelo com rendimento de 34% (27,9 mg). O produto foi caracterizado por RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT (espectros em anexo).

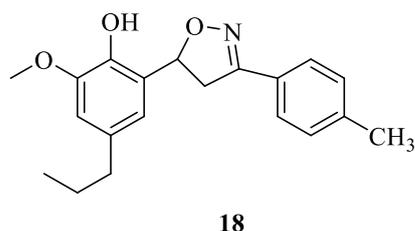
Técnica II

Os derivados isoxazólicos **12** e **16** foram sintetizados seguindo essa técnica.

Em um balão de fundo redondo de 50 mL acoplado a um condensador de refluxo, adicionou-se o KOH (2 eq.), que foi solubilizado em metanol (20 mL). Em seguida, adicionou-se a chalcona correspondente (**6** ou **10**; 1 eq.) e o cloridrato de hidroxilamina (1 eq.), mantendo-se a mistura reacional sob aquecimento (80°C) e agitação magnética por 24 h. Foi possível observar, por CCD, que, para estas reações, no mesmo Rf do material de partida, havia uma mancha de cor diferente (o possível produto de interesse), de forma que o aquecimento e agitação foram retirados e a reação acidificada com HCl 1M até pH~3.

Evaporou-se o solvente sob pressão reduzida, adicionou-se cerca de 10 mL de água no balão, e a mistura reacional foi transferida para um funil de separação, a fim de se realizar a extração da fase aquosa. Para tal, utilizou-se diclorometano (5 x 25 mL) e a fase orgânica foi reunida, lavada com H₂O destilada (2x50mL), seca com sulfato de sódio anidro, filtrada, e o solvente evaporado sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica (Eluente: Hex/AcOEt 93:7), obtendo-se um sólido amarelo (22,0 mg; 19% de rendimento) correspondente ao derivado **12** e um sólido verde (12 mg; 9% de rendimento) correspondente ao derivado **16**. As substâncias foram caracterizadas por RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT (espectros em anexo).

Na tentativa de obtenção do derivado isoxazólico **13** a partir da chalcona **7**, também realizada seguindo-se essa técnica, observou-se a obtenção de um outro derivado, o diidroisoxazol (**18**) correspondente, um derivado reduzido do isoxazol, confirmado após as análises dos espectros de RMN. A estrutura química do derivado **18** é apresentada na figura abaixo.

Figura 19. Derivado diidroisoxazólico (**18**)

Fonte: Elaborado pela autora

Para o diidroisoxazol (**18**), a purificação também foi realizada por meio de coluna de sílica (Eluente: Hex/AcOEt 98:2), obtendo-se um sólido marrom com rendimento de 8 % (14,2 mg).

Técnica III

O derivado **15** foi sintetizado seguindo essa técnica.

Em um balão de fundo redondo de 50 mL acoplado a um condensador de refluxo, adicionou-se peneira molecular 3Å, KOH (5,24 mmol; 29,3 mg; 2 eq.) e metanol (25mL).

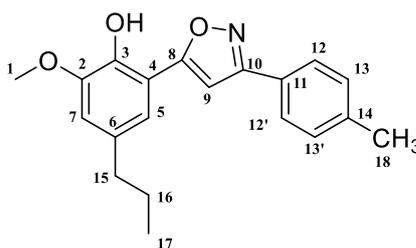
Após o KOH ter se solubilizado completamente no metanol, adicionou-se a chalcona (**9**, 0,262 mmol; 82,1 mg; 1 eq.) e o cloridrato de hidroxilamina (0,262 mmol; 18,2 mg; 1 eq.). Manteve-se a mistura reacional sob aquecimento (80°C) e agitação magnética por 24h. Observado o fim da reação por CCD (eluente: Hex/AcOEt 6:4 2x; reveladores: luz ultravioleta, vapor de iodo e CAM), a mistura reagente foi filtrada a vácuo, para que a peneira molecular fosse removida, lavando-se o balão com metanol. Assim, acidificou-se a solução até pH~3, utilizando HCl 1 M, sob resfriamento. Após atingido o pH citado, o metanol foi evaporado sob pressão reduzida e a mistura extraída com diclorometano (3x25mL). A fase orgânica foi, em seguida, lavada com H₂O (2x50mL), seca com sulfato de sódio anidro e concentrada em rotavapor. O produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica (eluente: Hex/AcOEt 93:7), obtendo-se um sólido verde (15 mg, 24% de rendimento) correspondente ao derivado **15**, que foi caracterizado por RMN de ¹H, ¹³C e DEPT (espectros em anexo).

Técnica IV

Para a síntese das substâncias **13** e **17**, experimentou-se utilizar essa técnica de duas formas, sendo a variável dos dois experimentos, o tempo de reação. A reação para a obtenção do derivado **13** permaneceu sob as condições citadas abaixo por 24 h, enquanto para a obtenção do derivado **17**, por apenas 1 h.

Em um balão de fundo redondo de 50 mL acoplado a um condensador de refluxo, adicionou-se o KOH (5 eq.) solubilizando-o com metanol (20mL). Em seguida, adicionou-se a chalcona (**7** ou **11**; 1 eq.) e o cloridrato de hidroxilamina (4 eq.), mantendo a mistura reacional sob aquecimento (80°C) e agitação magnética por 24 h (derivado **13**) ou 1 h (derivado **17**). Após esse tempo, acidificou-se a mistura reagente utilizando HCl 1M até pH~3, sob resfriamento. Em seguida, evaporou-se o solvente em rotavapor, adicionou-se cerca de 10 mL de H₂O destilada e a solução foi transferida para um funil de separação, para ser extraída com diclorometano (5 x 25 mL). A fase orgânica foi reunida, lavada com H₂O destilada, seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente evaporado sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica (eluente: Hex/AcOEt 95:5), obtendo-se sólidos brancos com rendimento igual a 13 mg (12% de rendimento) e 8 mg (9% de rendimento) para os derivados **13** e **17**, respectivamente

Dados de caracterização da substância 2-metóxi-4-propil-6-(3-(*p*-tolil)isoxazol-5-il-fenol (**13**)



F.M: C₂₀H₂₁NO₃ **MM:** 323,39 g/mol

F.F: 82-84°C

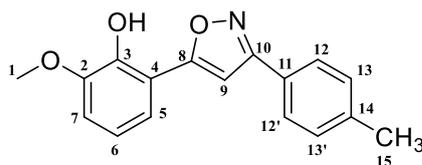
Aspecto físico: Sólido branco

Massa obtida: 9 mg (6,0% rendimento)

RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃), δ (ppm): 9,09 (s, 1H, OH); 7,75 (d, 2H, ³J = 8,16 Hz; H-12); 7,3 (d, 2H, ³J = 8 Hz; H-13); 7,04 (d, 1H, ⁴J = 1,72 Hz, H-5); 6,92 (s, 1H, H-9); 6,80 (d, 1H, ⁴J = 1,64 Hz, H-7); 3,94 (s, 3H, H-1); 2,59 (t, 2H, H-16); 2,43 (s, 3H, H-18); 1,72-1,57 (m, 2H, H-16); 0,93 (t, 3H, H-17).

RMN de ¹³C (400 MHz; CDCl₃), δ (ppm): 169,4 (1C, C-8); 163,0 (1C, C-10); 148,28 (1C, C-2); 144,13 (1C, C-3); 140,88 (1C, C-6); 134,02 (1C, C-18); 129,73 (2C, C-13); 125,88 (2C, C-12); 124,23 (1C, C-11); 123,52 (1C, C-5); 119,98 (1C, C-4); 113,53 (1C, C-7); 97,26 (1C, C-9); 56,13 (1C, C-1); 37,68 (1C, C-15); 24,74 (1C, C-16); 21,50 (1C, C-18); 13,76 (1C, C-17).

Dados de caracterização da substância 2-methoxi-6-(5-(*p*-tolil)isoxazol-3-il)fenol (**14**)



F.M: C₁₇H₁₅NO₃ **MM:** 281,31g/mol

F.F: 122-124°C

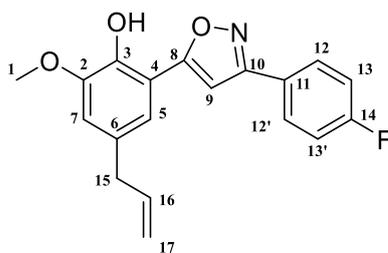
Aspecto físico: Sólido verde

Massa obtida: 0,0279 g (34% rendimento)

RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃), δ (ppm): 9,30 (s, 1H, OH); 7,74 (d, 2H, H-12); 7,30 (d, 2H, H-13); 7,23 (t, 1H, H-6); 6,98-6,93 (m, 2H, H-5; H-7); 6,90 (s, 1H, H-9); 3,95 (s, 3H, H-1); 2,42 (s, 3H, H-15).

RMN de ¹³C (400 MHz; CDCl₃), δ (ppm): 169,56 (1C, C-8); 162,56 (1C, C-10); 148,59 (1C, C-2); 146,20 (1C, C-3); 140,98 (1C, C-14); 129,76 (2C, C-13); 125,91 (2C, C-12); 124,14 (1C, C-5); 119,65 (1C, C-11); 119,62 (1C, C-6); 113,86 (1C, C-4); 112,98 (1C, C-7); 97,16 (1C, C-9); 56,14 (1C, C-1); 21,52 (1C, C-15).

Dados de caracterização da substância 4-aliil-2-(3-(4-fluorofenil)isoxazol-5-il)-6-metoxifenol (15)



F.M: C₁₉H₁₆FNO₃ **MM:** 325,34 g/mol

F.F: 64-66 °C

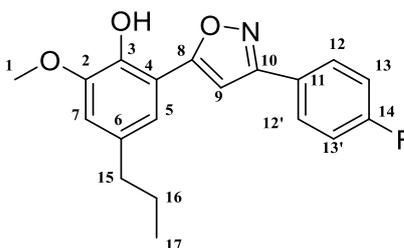
Aspecto físico: Sólido verde

Massa obtida: 0,015 g (24% rendimento)

RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃), δ (ppm): 8,92 (s, 1H, OH); 7,85-7,82 (m, 2H, H-12); 7,19 (t, 2H, H-13); 7,05 (d, 1H, ⁴J_{meta} = 1,84 Hz, H-5); 6,91 (s, 1H, H-9); 6,79 (d, 1H, ⁴J_{meta} = 1,72 Hz, H-7); 6,03-5,93 (m, 1H, H-16); 5,14-5,09 (m, 2H, H-17); 3,93 (s, 3H, H-1); 3,38 (d, 2H, ³J = 6,64 Hz, H-15).

RMN de ^{13}C (400 MHz; CDCl_3), δ (ppm): 169,3 (1C, C-8); 163,92 (1C, d, $^1J = 250,35$ Hz, H-14); 162,53 (1C, C-10); 148,38 (1C, C-2); 144,36 (1C, C-3); 137,38 (1C, C-16); 131,40 (1C, C-6); 128,05 (2C, d, $^3J = 8,51$ Hz, C-12); 123,34 (1C, C-4); 123,30 (1C, C-11); 119,19 (1C, C-5); 116,31 (2C, d, $^2J = 21,98$ Hz, C-13); 116,07 (2C, C-17); 113,61 (1C, C-7); 97,81 (1C, C-9); 56,14 (1C, C-1); 39,76 (1C, C-15).

Dados de caracterização da substância 2-(3-(4-fluorfenil)isoxazol-5-il)-6-metoxi-4-propilfenol (**16**)



F.M: $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{FNO}_3$ **MM:** 327,36 g/mol

F.F: 78-80 °C

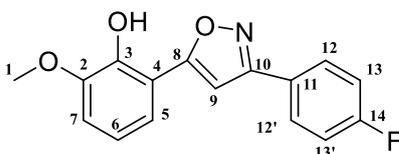
Aspecto físico: Sólido verde

Massa obtida: 0,0121 g (9% rendimento)

RMN de ^1H (400 MHz; CDCl_3), δ (ppm): 8,89 (s, 1H, OH); 7,85-7,82 (m, 2H, H-12); 7,19 (t, 2H, H-13); 7,04 (d, $^4J = 1,84$ Hz, H-5); 6,92 (s, 1H, H-9); 6,79 (d, 1H, $^4J = 1,68$ Hz, H-7); 3,93 (s, 3H, H-1); 2,58 (t, 2H, H-15); 1,70 (sex, 2H, H-16); 0,69 (t, 3H, H-17).

RMN de ^{13}C (400 MHz; CDCl_3), δ (ppm): 168,25 (1C, C-8); 165,12 (1C, C-14); 162,61 (1C, C-10); 148,16 (1C, C-2); 143,95 (1C, C-3); 134,10 (1C, C-6); 128,01 (2C, d, $^3J = 8,53$ Hz, C-12); 123,32 (1C, C-11); 123,29 (1C, C-4); 118,95 (1C, C-5); 116,27 (2C, d, $^2J = 22$ Hz, C-13); 113,46 (1C, C-7); 97,77 (1C, C-9); 56,08 (1C, C-1); 37,64 (1C, C-15); 24,72 (1C, C-16); 13,74 (1C, C-17).

Dados de caracterização da substância 2-(3-(4-fluorfenil)isoxazol-5-il)-6-metoxifenol (**17**)



F.M: C₁₆H₁₂FNO₃ **MM:** 285,27 g/mol

F.F: 120-122 °C

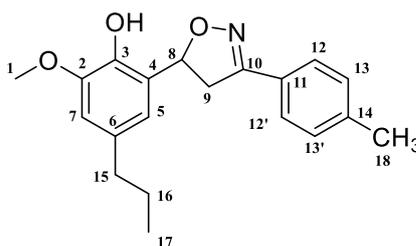
Aspecto físico: Sólido branco

Massa obtida: 8 mg (9,0% de rendimento)

RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃), δ (ppm): 9,10 (1H, OH); 7,85-7,81 (m, 2H, H-12); 7,24-7,16 (m, 3H, H-5, H-6, H-7); 6,97-6,92 (m, 2H, H-13); 6,90 (s, 1H; H-9); 3,94 (s, 3H, H-1).

RMN de ¹³C (400 MHz; CDCl₃), δ (ppm): 168,40 (1C, C-8); 163,94 (d, 1C, ¹J = 250,23 Hz, C-14); 162,54 (1C, C-10); 148,52 (1C, C-2); 146,08 (1C, C-3); 128,07 (d, 2C, ³J = 8,69 Hz, C-12); 123,26 (1C, ⁴J = 3,46 Hz, C-11); 119,71 (1C, C-6); 119,65 (1C, C-5); 116,33 (d, 2C, ²J = 21,96 Hz, C-13); 113,70 (1C, C-4); 113,0 (1C, C-7); 97,73 (1C, C-9); 56,14 (1C, C-1).

Dados de caracterização da substância 2-metoxi-4-propil-6-(3-(p-tolil)-4,5-diidroisoxazol-5-il)fenol (**18**)



F.M: C₂₀H₂₃NO₃ **MM:** 325,41g/mol

Aspecto físico: Sólido marrom

Massa obtida: 14,2 mg (8,0% de rendimento)

RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃), δ (ppm): 7,58 (d, 2H, H-12); 7,19 (d, 2H, H-13); 6,85 (d, 1H, J = 1,8 Hz, H-5); 6,64 (d, 1H, J = 1,8 Hz, H-7); 5,95 (dd, 1H, J = 8,04 Hz, H-8); 5,69 (s, 1H, OH); 3,87 (s, 3H, H-1); 3,78 (dd, 1H, J = 11,08 Hz, H-9); 3,30 (dd, 1H, J = 8,04, H-9'); 2,49 (t, 2H, H-15); 2,37 (s, 3H, H-18); 1,63-1,54 (sext, 2H, H-16); 0,91 (s, 3H, H-17).

RMN de ¹³C (400 MHz; CDCl₃), δ (ppm): 156,74 (1C, C-10); 146,31 (1C, C-2); 140,41 (1C, C-3); 140,34 (1C, C-14); 134,61 (1C, C-6); 129,51 (2C, C-12); 127,06 (1C, C-4); 126,87 (2C, C-13); 126,61 (1C, C-11); 118,19 (1C, C-7); 110,54 (1C, C-5); 78,18 (1C, C-8); 56,24 (1C, C-1); 42,43 (1C, C-9); 38,07 (1C, C-15); 25,03 (1C, C-16); 21,59 (1C, C-18); 14,01 (1C, C-17).

4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTIVIRAL DAS SUBSTÂNCIAS

4.2.1 Ensaios biológicos

Os ensaios biológicos *in vitro* foram realizados no Laboratório de Biologia e Tecnologia de Micro-organismos, do Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, e no Laboratório de Química Medicinal e Bioensaios, da Escola de Farmácia, da Universidade Federal de Ouro Preto. Nestes ensaios foram utilizadas as seguintes linhagens celulares e vírus:

Zika vírus: A amostra de ZIKV utilizada para a propagação *in vitro* deste vírus foi obtida de um paciente com quadro clínico sem complicações, morador do estado de Pernambuco (PE-243/215). Esta amostra foi gentilmente cedida pela Prof. Dra. Erna Geessien Kroon, da Universidade Federal de Minas Gerais.

Chikungunya vírus (CHIKV): A amostra de CHIKV (527-African) utilizada para a propagação *in vitro* deste vírus foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto, do Instituto de Pesquisa em Virologia da Universidade Federal de São Paulo.

Mayaro vírus (MAYV): A amostra de MAYV utilizada para a propagação *in vitro* deste vírus foi isolada de um humano no Estado do Acre. Esta amostra foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira, da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.

Células C6/36: As células C6/36 são derivadas de larvas do mosquito *Aedes albopictus*, multiplicadas em meio L15 suplementado com 5 % SFB contendo, penicilina (100 UI/mL) e anfotericina B (5 µg/mL), em ambiente com 5% de CO₂ a 37 °C. Estas células foram utilizadas na produção do vírus estoque de ZIKV.

Células HepG2: As células HepG2 são derivadas de carcinoma hepatocelular do fígado de humano (homem caucasiano de 15 anos de idade), multiplicadas em meio DMEM suplementado com 5 % SFB contendo penicilina/estreptomicina (100 UI/mL) e anfotericina B (5 µg/mL), em estufa com 5 % de CO₂, a 37 °C. Estas células foram utilizadas nos ensaios de citotoxicidade.

Células MRC-5: As células MRC-5 são derivadas de fibroblastos de pulmão de um feto masculino de 14 semanas, multiplicadas em meio DMEM suplementado com 5 % SFB contendo penicilina/estreptomicina (100 UI/mL) e anfotericina B (5 µg/mL), em estufa com 5 % de CO₂, a 37 °C. Estas células foram utilizadas nos ensaios de citotoxicidade.

Células T24: As células T24 são derivadas de carcinoma de células de transição da bexiga de humano (mulher caucasiana de 81 anos de idade), multiplicadas em meio DMEM suplementado com 5 % SFB contendo penicilina/estreptomicina (100 UI/mL) e anfotericina B (5 µg/mL), em estufa com 5 % de CO₂, a 37 °C. Estas células foram utilizadas nos ensaios de citotoxicidade.

Células TOV-21G: As Células TOV-21G são derivadas de adenocarcinoma maligno primário de ovário de humano (mulher caucasiana de 62 anos de idade), multiplicadas em meio DMEM suplementado com 5 % SFB contendo penicilina/estreptomicina (100 UI/mL) e anfotericina B (5 µg/mL), em estufa com 5 % de CO₂, a 37 °C. Estas células foram utilizadas nos ensaios de citotoxicidade.

Células Vero: As células Vero são derivadas de rins de macaco verde (*Cercopithecus aethiops*), cultivadas em meio DMEM suplementado com 5 % SFB contendo penicilina/estreptomicina (100 UI/mL) e anfotericina B (5 µg/mL), em estufa com 5 % de CO₂, a 37 °C. Estas células foram empregadas nos experimentos de citotoxicidade, de atividade antiviral contra os arbovírus ZIKV, CHIKV e MAYV.

Na tabela 4, estão resumidas as características das linhagens celulares (origem histológica e ATCC®) e as concentrações de plaqueamento utilizadas nos ensaios de citotoxicidade, em microplacas de 96 cavidades, para as células HepG2, MRC-5, T24, TOV-21G e Vero, e de atividade antiviral, para a linhagem celular Vero.

Tabela 4. Linhagens celulares utilizadas nos ensaios biológicos *in vitro*

| LINHAGEM CELULAR | ORIGEM HISTOLÓGICA | ATCC® | CONCENTRAÇÃO DE PLAQUEAMENTO (CÉLULAS/POÇO) |
|------------------|-------------------------|---------------------------|---|
| HepG2 | Carcinoma hepatocelular | HB – 8065 TM | 2 x 10 ⁴ |
| MRC-5 | Fibroblasto de pulmão | CCL-171 TM | 1,0 x 10 ⁴ |
| T24 | Carcinoma de bexiga | HTB – 4 TM | 1 x 10 ⁴ |
| TOV-21G | Adenocarcinoma ovariano | CRL – 11730 TM | 5 x 10 ⁴ |
| Vero | Célula epitelial renal | CCL-81 TM | 2,0 x 10 ⁴ |

4.2.2 Avaliação da citotoxicidade pelo ensaio do MTT

Suspensões de células HepG2 (linhagem celular de carcinoma hepático de fígado humano), MRC-5 (linhagem celular de fibroblasto de pulmão humano), T24 (linhagem celular de câncer de bexiga humano), TOV-21G (linhagem celular de câncer de ovário humano) e VERO (linhagem celular de rim de macaco verde), em meio de cultura suplementado com 5% SFB, foram distribuídas em microplacas de 96 cavidades. As placas foram incubadas em

atmosfera úmida, a 5 % de CO₂, a 37 °C por 24 horas (MOSMANN, 1983; TWENTYMAN; LUSCOMBE, 1987). Oito diluições seriadas das amostras, previamente solubilizadas em DMSO, foram preparadas utilizando meio DMEM 1 % SFB, em concentrações que variam de 100 a 0,78125 µg/mL. O volume utilizado das amostras foi calculado para que a quantidade de DMSO por poço não excedesse a concentração de 2% (BRANDÃO et al., 2010).

Após a formação da monocamada celular na superfície dos poços de cada placa, o meio de cultura foi removido das cavidades e 100 µL das soluções diluídas das amostras e 100 µL de meio de cultura DMEM 1 % SFB foram adicionados e as placas incubadas sob a mesma condição atmosférica. A solução de MTT [brometo de 3-(4',5'-dimetiltiazol-2'-ila)-2,5-difeniltetrazol] (Sigma Aldrich®), preparada em tampão fosfato estéril (PBS) na concentração de 1,0 mg/mL, foi adicionada 120 minutos antes da realização das leituras (MOSMANN, 1983; TWENTYMAN; LUSCOMBE, 1987).

As leituras foram realizadas em leitor de microplacas 24 horas após a adição das amostras nos ensaios realizados com a linhagem celular MRC-5, após 48 horas nos ensaios com a célula tumoral T24 e após 72 horas nos ensaios utilizando as células Vero e as células tumorais HepG2 e TOV-21G. A quantificação da formazana, obtida após a redução do sal de tetrazólio (MTT) nas células viáveis, foi realizada no leitor VICTOR™ X3 (Perkin Elmer®) com auxílio do *software WorkOut 2.5* no comprimento de onda de 490 nm (MOSMANN, 1983; TWENTYMAN; LUSCOMBE, 1987). A multiplicação celular da monocamada tratada foi comparada com controle celular.

A toxicidade celular foi expressa em termos de concentração citotóxica a 50 % (CC₅₀). A porcentagem citotóxica foi calculada como $[(A-B)/A] \times 100$, onde A e B são as densidades óticas a 490 nm (DO₄₉₀) das cavidades onde estão presentes células não tratadas (A) e tratadas (B), respectivamente.

Este experimento foi realizado com os seguintes controles:

Controle celular: a monocamada de células foi incubada apenas com meio de cultura suplementado com 1 % SFB. Este controle avalia o comportamento das células sem que as mesmas tenham contato com qualquer interferente durante o período de incubação. Assim, os poços reservados para esse controle foram utilizados como padrão para comparação com aqueles em que fossem observados alguma atividade citotóxica.

Controle de DMSO: poços contendo a monocamada celular foram acrescidos de meio de cultura com 1 % SFB e tratados com DMSO. Este controle foi utilizado para demonstrar que o solvente usado para solubilizar as amostras não possui potencial atividade citotóxica.

4.2.3 Avaliação da atividade antiviral *in vitro*

4.2.3.1 Preparo das suspensões estoques virais e determinação dos títulos virais

A multiplicação do Zika virus (ZIKV) foi realizada conforme descrito por Coelho *et al.* (2017), para obtenção dos estoques de vírus, células C6/36, cultivadas em garrafas de 150 cm³, foram infectadas com 0,01 unidades formadoras de placas (UFP) e mantidas em estufa BOD, durante cinco dias, a 28 °C.

A multiplicação do CHIKV e do MAYV foi realizada em células Vero, cultivadas em garrafas de 150 cm³, foram infectadas com 0,01 unidades formadoras de placas (UFP) e mantidas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂, por dois dias para o CHIKV e três dias para o MAYV.

Após a visualização de morte celular em 90 a 100 % das células, o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 4000 rpm, por 10 minutos, em centrífuga previamente refrigerada a 4 °C. O sobrenadante foi aliquoteado e armazenado a -80 °C.

O título dos vírus produzidos foi determinado pela técnica de contagem do número de unidades formadoras de placas (UFP). O ZIKV apresentou título de $6,8 \times 10^5$ UFP/mL, o título do CHIKV foi de $1,4 \times 10^{11}$ UFP/mL e do MAYV de $2,5 \times 10^8$ UFP/mL.

4.2.3.2 Avaliação da atividade antiviral pela técnica colorimétrica do MTT

A avaliação da atividade antiviral *in vitro* foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Brandão *et al.* (2010). Soluções estoque das amostras foram preparadas em DMSO. As amostras foram avaliadas em concentrações não citotóxicas, a partir de concentrações inferiores à concentração citotóxica a 50 % (CC₅₀).

As monocamadas celulares foram cultivadas em placas de 96 cavidades ($2,0 \times 10^4$ células/cavidade). Após 24 horas de incubação em 5 % de CO₂, a 37 °C, o meio de cultura (DMEM 5 % SFB) foi removido e 100 µL das diluições das amostras, foram adicionados em cada cavidade, juntamente com 100 µL da suspensão viral (título de $1,0 \times 10^3$ TCID₅₀/mL, para o Zika virus; título de $1,0 \times 10^5$ TCID₅₀/mL, para o CHIKV; título de $1,0 \times 10^6$ TCID₅₀/mL, para o MAYV). Em seguida, as placas foram incubadas em atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂, a 37 °C, por 72 horas. Os experimentos foram desenhados da seguinte forma: controle de células tratadas e não infectadas (CT); controle de células não tratadas e infectadas (CV) e controle de células não tratadas e não infectadas (CC), além da triplicata da atividade antiviral das amostras testes (células infectadas e tratadas).

Além disso, todos os testes foram comparados com o controle positivo, ribavirina ou amantadina, simultaneamente, em circunstâncias idênticas como relatado anteriormente (BETANCUR-GALVIS *et al.*, 2002).

A viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico do MTT (MOSMANN, 1983). O sobrenadante foi removido e, em seguida, foram adicionados 28 µL de uma solução de MTT (1,0 mg/mL em PBS), em cada cavidade. As placas foram incubadas por 120 minutos a 37 °C e, após este tempo de incubação, foram adicionados 100 µL de DMSO, em cada cavidade, para dissolver os cristais de formazana. As placas foram mantidas sob agitação, em agitador de placas durante 15 minutos e a densidade óptica foi determinada em 490 nm (DO₄₉₀), no leitor de microplacas.

A concentração eficaz que apresenta 50 % de efeito antiviral, isto é, concentração efetiva a 50 % (CE₅₀), é expressa como a concentração que promove a proteção de 50 % das células tratadas da destruição causada pelo vírus. A porcentagem de proteção é calculada como $[(A-B)/C-B] \times 100$, onde A, B e C são as DO₄₉₀ das cavidades nas quais estão presentes células tratadas e infectadas (A), não tratadas e infectadas (B), e não tratadas e não infectadas (C), respectivamente.

Este experimento foi realizado com os seguintes controles:

Controle celular: a monocamada de células foi incubada apenas com meio de cultura suplementado com 1 % SFB. Este controle avalia o comportamento das células sem que as mesmas tenham contato com qualquer interferente durante o período de incubação. Assim, os poços reservados para esse controle foram utilizados como padrão para comparação com aqueles em que fossem observados alguma atividade citotóxica ou citopática.

Controle de citotoxicidade das amostras testadas: poços contendo a monocamada celular foram simultaneamente acrescidos de meio de cultura suplementado com 1 % SFB e as diluições das amostras nas concentrações em que as mesmas foram utilizadas no ensaio antiviral. Este controle foi realizado para confirmar que as amostras não possuem atividade citotóxica nas concentrações avaliadas.

Controle viral: a monocamada de células foi incubada com meio de cultura suplementando com 1 % SFB e com a suspensão de vírus, simultaneamente, sem nenhum tratamento. O controle de vírus é utilizado como padrão de comparação para determinar o efeito citopático provocado pelo vírus.

Controle de vírus com DMSO: poços contendo a monocamada celular foram acrescidos de meio de cultura com 1 % SFB e de suspensão de vírus, além de serem tratados com DMSO. Este controle foi utilizado para demonstrar que o solvente usado para solubilizar as amostras não possui potencial atividade antiviral.

Controle positivo: a monocamada de célula foi acrescida de meio de cultura suplementado com 1 % SFB, suspensão de vírus e tratada com a substância ribavirina, conhecidamente ativa frente

ao Zika virus (KAMIYAMA *et al.*, 2017) e ao MAYV (FERRAZ *et al.*, 2019). Para os ensaios de atividade anti-CHIKV foi utilizada o princípio ativo amandatina, previamente descrito como ativo *in vitro* contra o CHIKV (DEY *et al.*, 2019). O controle positivo foi utilizado para demonstrar que o ensaio proposto é confiável na determinação da atividade antiviral frente aos arbovírus, além de ser um parâmetro de comparação com as amostras testadas em relação à avaliação da atividade antiviral.

4.2.3.3 Estatística

Foi utilizado o Teste t de *Student*, a análise de variância do pacote estatístico *GraphPad Prism*, versão 5.00, para avaliar diferenças entre as médias e medianas nos ensaios de citotoxicidade e de atividade antiviral em comparação com os controles. Foi aceito para todos os testes o nível de significância de 5 %.

4.2.3.4 Determinação do Índice de Seletividade

Nos ensaios de citotoxicidade, o índice de seletividade (IS) de determinada amostra é definido como a razão entre a sua concentração citotóxica média (CC_{50}), em células MRC-5, pela sua concentração citotóxica média (CC_{50}) em cada uma das linhagens celulares tumorais (HepG2, T24 ou TOV-21G). O valor do IS, neste ensaio, indica a seletividade das amostras testadas em apresentar atividade citotóxica frente às células tumorais quando comparada à linhagem celular normal de humano (MRC-5).

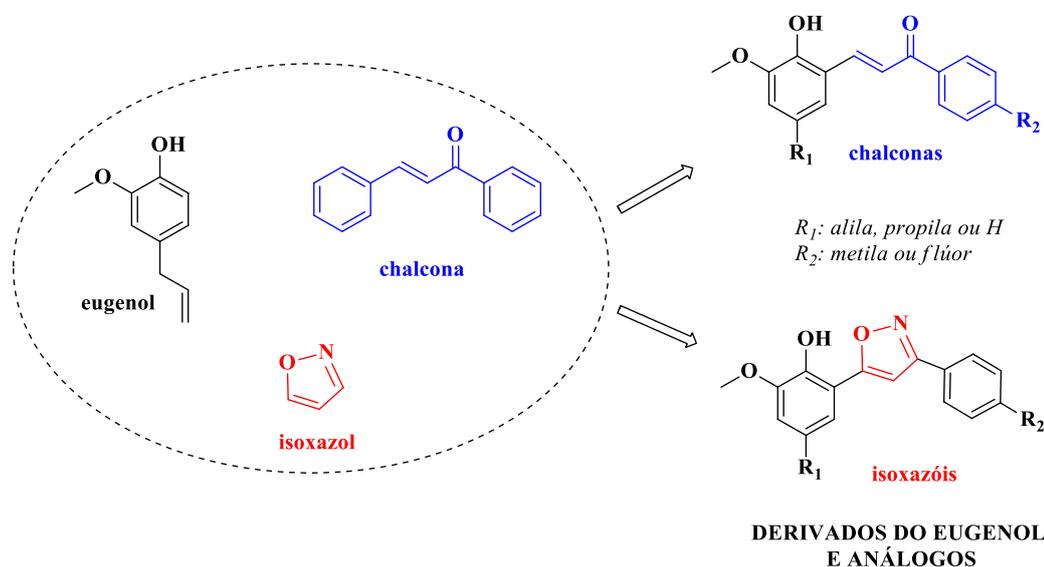
Nos ensaios de atividade antiviral, o IS das amostras testadas é definido como a razão entre a sua concentração citotóxica média (CC_{50}), pela sua concentração efetiva média (CE_{50}), na linhagem celular VERO. O valor do IS no ensaio antiviral sugere a seletividade das amostras testadas em inibir o ciclo de multiplicação dos vírus, impedindo, assim, a infecção da monocamada celular pelos vírus.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PLANEJAMENTO DAS CHALCONAS E ISOXAZÓIS DERIVADOS DO EUGENOL E ANÁLOGOS PROPOSTOS

Baseado em estudos que apresentam relatos de diferentes atividades biológicas para chalconas e isoxazóis, como antifúngica, antiviral e citotóxica (ZHU et al., 2018; ZHUANG et al., 2017), nosso grupo de pesquisa propôs a síntese dessas substâncias contendo estas duas classes químicas na forma de híbridos moleculares com o eugenol [e seus análogos diidroeugenol (R_1 : propila) e *orto*-vanilina (R_1 : H)], um alilfenol natural também potencialmente bioativo (Figura 20). Os derivados propostos se diferenciam quanto à presença de um grupo doador de elétrons (metila) e um grupo retirador de elétrons (flúor) em um de seus anéis benzênicos, a fim de se compreender a importância do efeito eletrônico desses grupos para a atividade biológica das substâncias. A *orto*-vanilina foi utilizada para a avaliação da importância dos grupos alila e propila do eugenol e seu análogo diidroeugenol, respectivamente, no anel benzênico proveniente dos fenóis.

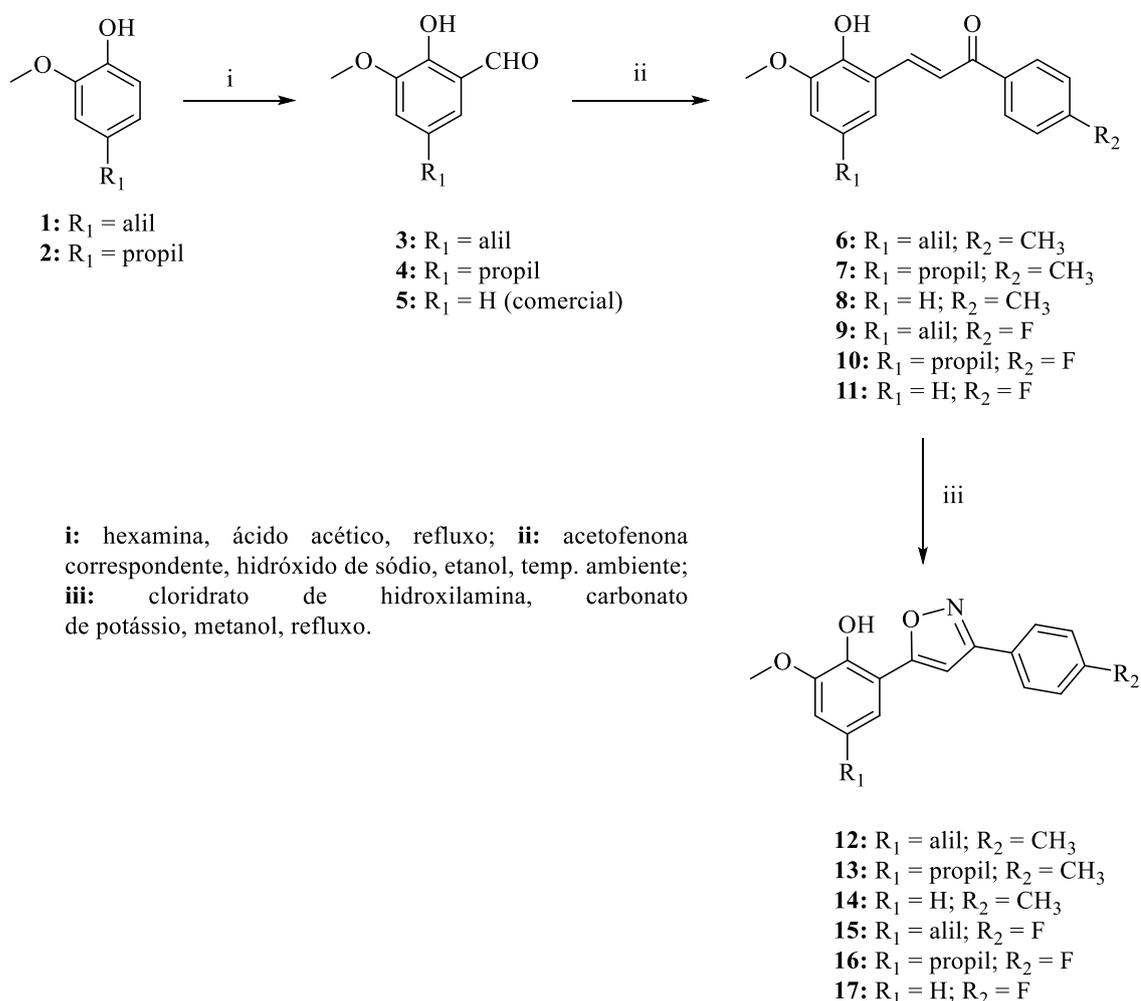
Figura 20. Novas chalconas e isoxazóis planejadas como híbridos moleculares



Conforme apresentado no Esquema 1 a seguir, a síntese das chalconas (**6 a 11**) requereu, inicialmente, a obtenção dos derivados formilados do eugenol (**1**) e diidroeugenol (**2**), por meio de uma reação com hexamina e ácido acético (BRANCAGALION et al. 2018), para que, posteriormente, uma reação de condensação aldólica entre os três aldeídos (o terceiro aldeído é

a *orto*-vanilina, obtida comercialmente) e duas acetofenonas pudesse originar as chalconas, por meio da reação de condensação de Claisen-Schmidt, já bem descrita na literatura (YAEGHOBI et al., 2016; YADAV et al., 2017). Para a obtenção dos derivados **8** e **11**, não foi necessária a formilação prévia de seu fenol precursor, visto que a *orto*-vanilina já possui um grupo formila em sua estrutura. De posse de todas as chalconas, a obtenção dos derivados isoxazólicos **12** a **17**, foi possível a partir de sua reação de ciclização com cloridrato de hidroxilamina (KIDWAI; KUKREJA; THAKUR, 2006).

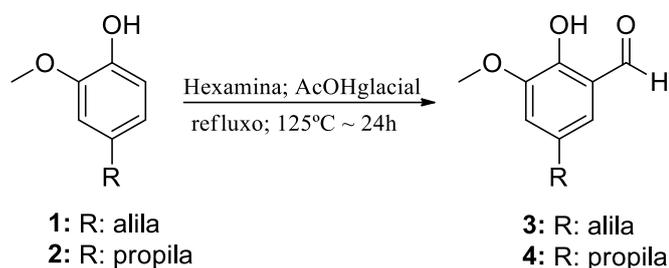
Esquema 1. Rota sintética para obtenção das chalconas e isoxazóis propostos.



Fonte: elaborado pela autora

As chalconas e isoxazóis sintetizados foram purificados por cromatografia em camada de sílica (CCS) e posteriormente foram caracterizadas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C.

5.1.1 Síntese e caracterização dos intermediários formilados do eugenol e diidroeugenol (3 e 4)

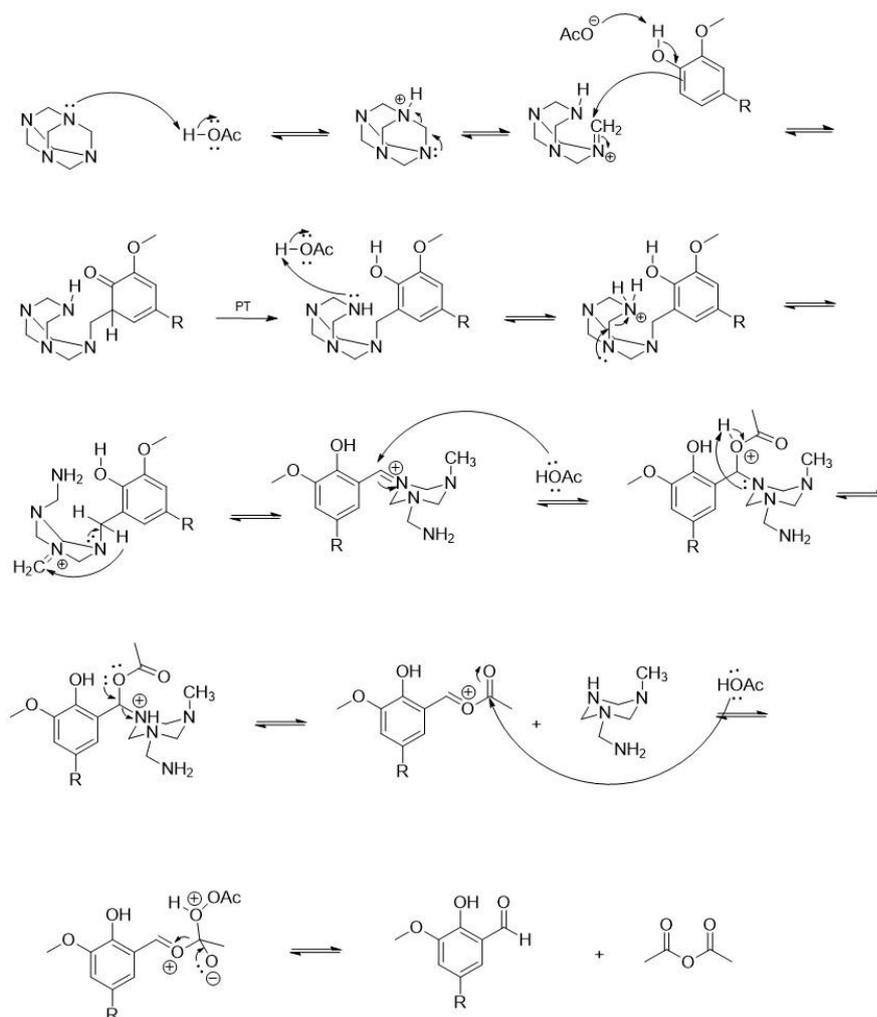


Fonte: elaborado pela autora

A reação de formilação dos fenóis para a obtenção dos intermediários de interesse foi realizada conforme descrito por Brancaglione e colaboradores (2018). A metodologia mostrou-se adequada diante das condições e materiais disponíveis em nosso laboratório, além de fornecer os produtos de interesse em bons rendimentos e quantidades suficientes para caracterização e síntese das chalconas, embora os produtos tenham sido obtidos com rendimentos inferiores àqueles descritos na literatura.

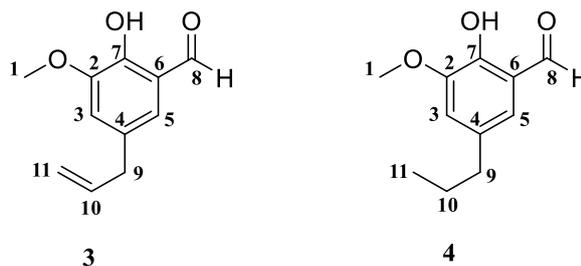
Trata-se de uma reação de substituição eletrofílica aromática (SEA), em meio ácido. Conforme demonstrado no mecanismo proposto no Esquema 2 abaixo, inicialmente, é necessário que ocorra a formação de uma espécie eletrofílica, que, neste caso, se dá pela reação entre a hexamina e o ácido acético glacial. Como resultado, é formada uma espécie protonada cíclica que, posteriormente, levará à formação de um eletrófilo ionizado. A posição *orto* livre do eugenol (**1**) ou diidroeugenol (**2**), favorecida eletronicamente devido ao efeito eletrodoador (por ressonância) do grupo hidroxila, torna-o um efetivo nucleófilo frente ao eletrófilo formado. Este ataque leva à formação do íon arênio, que é estabilizado por ressonância (etapa lenta), e consequente perda da aromaticidade. Para que a aromaticidade seja re-estabelecida e o produto obtido, um próton ligado ao carbono, cujo eletrófilo foi adicionado, é perdido, permitindo a restauração da ligação π , sendo essa uma etapa rápida.

Esquema 2. Proposta de mecanismo para a reação de formilação do eugenol e diidroeuogenol com hexamina



Fonte: GRIMBLAT (2016)

Os intermediários formilados do eugenol e diidroeuogenol foram caracterizados por espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C . No espectro de RMN de ^1H o sinal presente em aproximadamente $\delta 10,9$ confirmou a presença dos hidrogênios do grupo aldeído. A cadeia alílica do eugenol foi caracterizada por meio de sinais característicos em 5,98-5,88 (m, 1H, H-10); 5,12-5,07 (m, 2H, H-9); 3,36 (d, 2H, $^3J = 6,4$ Hz, H-11). Já a cadeia propílica do diidroeuogenol, sinais em 2,56 (t, 2H, $^3J = 7,36$ Hz, H-9); 1,68-1,58 (sex, 2H, $^3J = 7,48$ Hz, H-10); 0,94 (t, 3H, $^3J = 7,44$ Hz, H-11), confirmaram a sua presença.



Fonte: elaborado pela autora

No espectro de ^{13}C , esses sinais aparecem em 37, 24 e 13 ppm, para C-9, C-10 e C-11, respectivamente, referentes à cadeia propílica; enquanto a cadeia alílica, os sinais se encontram em deslocamentos próximos à 136, 116 e 39 ppm referentes a C-10, C-11 e C-9, respectivamente. O C-8, carbono carbonílico, em ambas as moléculas, apresentou deslocamento químico próximo de 196 ppm, corroborando, assim, a formação das moléculas propostas.

5.1.2 Síntese e caracterização das chalconas derivadas do eugenol e análogos (6-11)

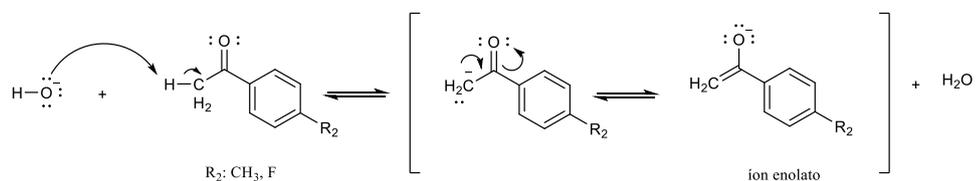
Para obtenção das chalconas **6** a **11**, os intermediários formulados foram submetidos a uma reação contendo as acetofenonas correspondentes, em meio básico, reação conhecida como condensação de Claisen–Schmidt. Inicialmente, as chalconas haviam sido obtidas por meio da metodologia descrita por Yaeghoobi e colaboradores (2016), em que se utiliza etanol a uma proporção de 2,5 mL/mmol de acetofenona, entretanto os rendimentos obtidos foram muito baixos e motivaram a busca de uma nova metodologia. Sendo assim, passamos a seguir a técnica descrita por Yadav e colaboradores (2017), que propõe o uso de uma solução aquosa de NaOH a 60%, que é adicionada ao meio contendo a acetofenona e o aldeído, gota a gota, por 30 minutos, sob agitação magnética constante. Foi possível notar que, com a mudança da técnica os rendimentos dos produtos obtidos melhoraram significativamente, chegando, em alguns derivados, a cerca de 90%.

A reação de Claisen-Schmidt trata-se de uma reação aldólica cruzada, em que um dos reagentes é uma cetona. Primeiramente, a base presente no meio capta o próton do carbono α à carbonila (H_α) levando a formação do ânion enolato, que é estabilizado pelo equilíbrio ceto-enólico. O ânion enolato age como nucleófilo, atacando a carbonila da molécula do aldeído presente no meio, de forma que os elétrons π da carbonila atacada são deslocados, originando assim, o ânion alcoóxido. Após isso, o ânion alcoóxido capta o hidrogênio de uma molécula de água do meio, levando à formação do aldol correspondente. Na sequência, a base presente no meio ainda promove uma nova desprotonação do hidrogênio α à carbonila do aldol formado,

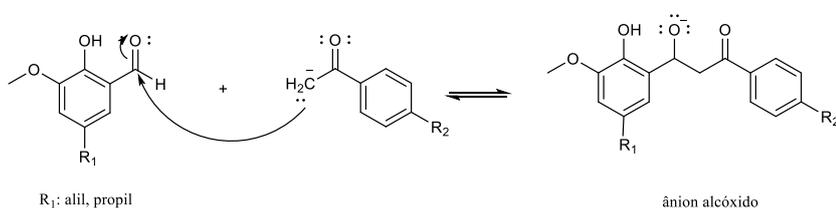
levando a uma desidratação e conseqüente formação do produto α,β -insaturado. O mecanismo proposto para a reação descrita está ilustrado no Esquema 3.

Esquema 3. Proposta de mecanismo para a condensação de Claisen–Schmidt entre as acetofenonas e os aldeídos

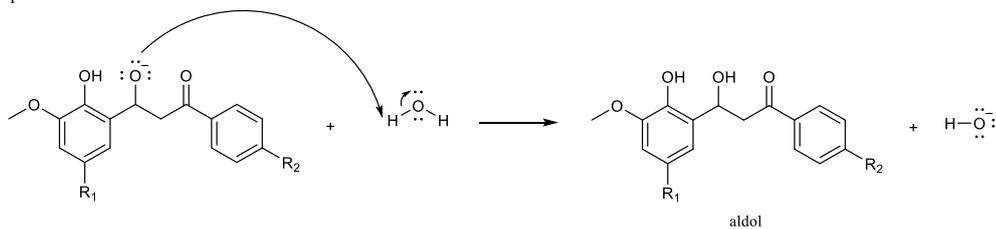
Etapa 1



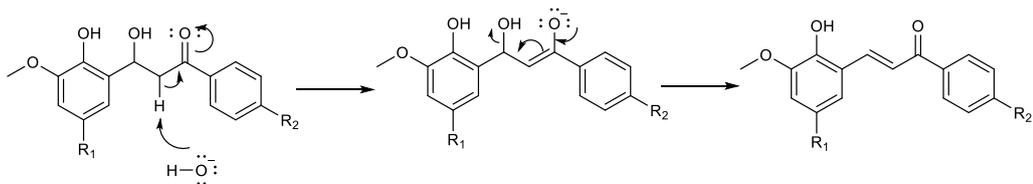
Etapa 2



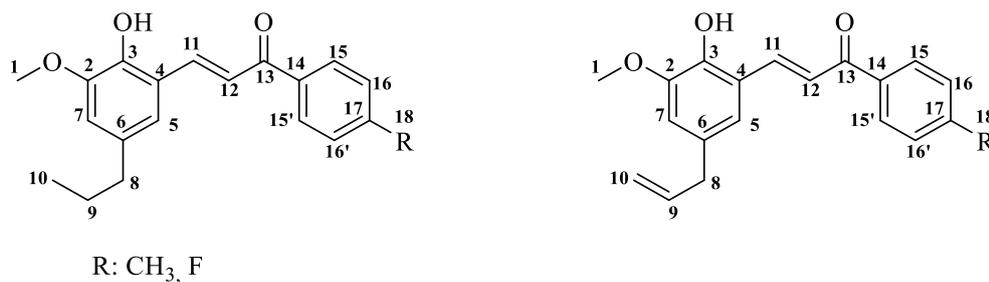
Etapa 3



Etapa 4



Fonte: elaborado pela autora



Fonte: elaborado pela autora

A confirmação da formação das chalconas sintetizadas foi possível a partir da análise de seus espectros de RMN de ¹H, em que se pode observar dois dubletos na região de δ8,0 e δ7,9 confirmando a formação da ligação α-β, insaturada com a carbonila. A isomeria *E* (*trans*) das substâncias foi confirmada uma vez que a constante de acoplamento entre os hidrogênios olefínicos de todos os derivados sintéticos foi de aproximadamente 15,8 Hz, valor típico descrito para alcenos com esse tipo de isomeria. Para alcenos *cis* (*Z*), são relatados valores de constante de acoplamento (³*J*) na faixa de 10 Hz (PAVIA, 2010), evidenciando, desta forma, a estereoquímica *E* das substâncias obtidas.

Além desses sinais, observou-se também um simpleto de integral igual a 3 em aproximadamente δ3,8 referente aos hidrogênios do grupo metoxila (OCH₃) presente nas chalconas e em δ2,5 o sinal dos hidrogênios do grupo metila (CH₃) presente nos derivados **6**, **7** e **8**. Os hidrogênios aromáticos H-5 e H-7 aparecem em regiões próximas a δ6,98 e δ6,69, na forma de simpletos ou dubletos com constantes de acoplamento ⁴*J* próximas de 1,40 Hz, caracterizados pelo acoplamento aromático do tipo ⁴*J* (*meta*) entre estes dois hidrogênios aromáticos; a presença do grupo metóxi mais próximo de H-7 torna esse próton mais blindado que H-5, diminuindo assim o efeito da anisotropia magnética causada pelo anel aromático, justificando seu sinal em região mais blindada. Já para as chalconas derivadas da *orto*-vanilina, por não possuíram substituinte em C-6, os sinais dos hidrogênios aromáticos H-5, H-6 e H-7, encontram-se em regiões próximas de δ7,3, sendo que para o derivado **11** esses sinais se sobrepuseram no espectro aparecendo na forma de um multipeto em região de δ7,19.

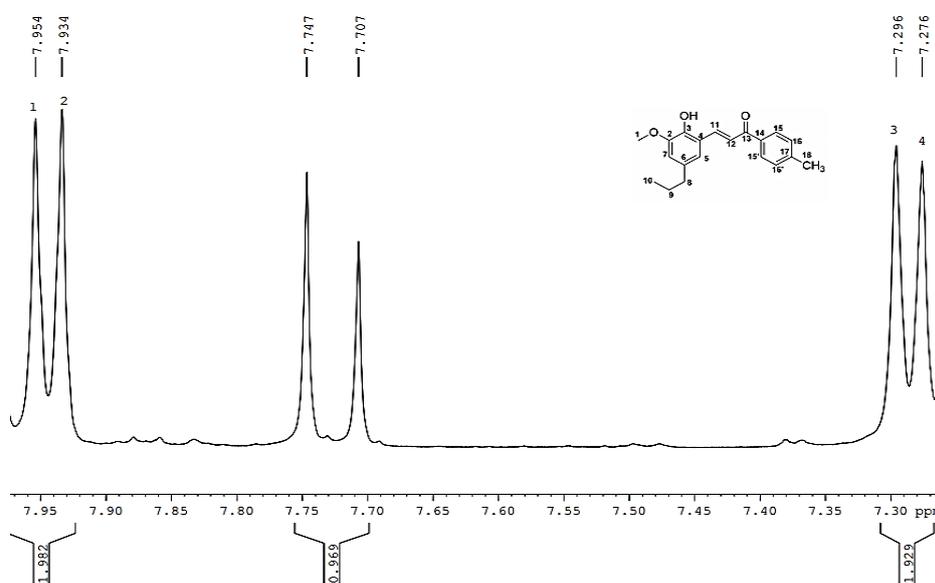
Quanto à cadeia lateral alílica do eugenol, observou-se sinais característicos compatíveis, como um dupeto em aproximadamente δ3,32 (CH₂-CH=CH₂; ³*J* = 6,5 Hz; 2H), um multipeto em δ5,99-5,89 (CH₂-CH=CH₂; 1H) e, considerando que os hidrogênios vinílicos terminais (CH₂-CH=CH₂; 2H) não são magneticamente equivalentes, teoricamente os sinais presentes em δ5,13-5,12 e δ5,11-5,08 deveriam fornecer um par de duplos dubletos, entretanto

no espectro, ocorreu, possivelmente, uma sobreposição dos sinais não sendo possível a observação dos duplos dubletos, mas sim um multipletto com valor de integral compatível.

Já para os derivados **7**, **10**, **13** e **16**, que possuem a cadeia propílica em substituição ao grupo alila, sinais presentes em, aproximadamente, $\delta 2,54$, $\delta 1,68$ e $\delta 0,95$, na forma de um tripleto ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), um sexteto ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$) e outro tripleto ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), respectivamente, confirmaram a sua presença.

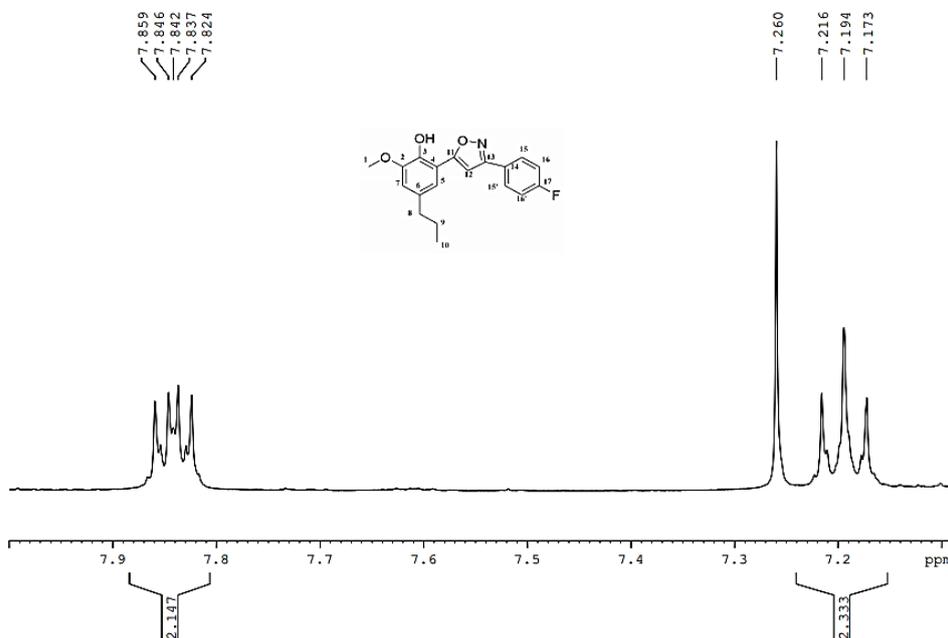
É importante ainda, ressaltar a presença, em aproximadamente $\delta 8,0$ dos espectros, de um padrão de quatro linhas de um anel *para*-dissubstituído, além do alto deslocamento químico para esses prótons, demonstrando o efeito da anisotropia magnética das ligações π na posição *orto* ($\delta 7,95$, 2H, H-15) à carbonila, tornando-os muito mais desblindados do que os prótons *meta* ($\delta 7,29$, 2H, H-16). Como os derivados sintetizados apresentam um plano de simetria (que atravessa o grupo metila e carbonila ou flúor e carbonila), espera-se que os prótons H-15 e H-15' (ambos *orto* à carbonila) tenham o mesmo deslocamento químico, assim como os prótons H-16 e H-16'. Assim, presume-se que ambos os lados do anel apresentam um padrão de separação idêntico, de forma que o próton H-16 acopla com H-15 gerando um dubleto e H-15 acopla com H-16 gerando outro dubleto. Na figura 20 é possível notar exatamente esse padrão de separação. Como esses prótons não são magneticamente equivalentes, o padrão de quatro linhas não corresponde a uma separação de primeira ordem, levando a uma situação mais complexa. O que se pode relatar é que, para os derivados com substituinte metila na posição *para*, observou-se o padrão da figura 20, entretanto os derivados com flúor como substituinte apresentaram um padrão diferente, como representado na figura 21.

Figura 21. Padrão de quatro linhas observado no espectro de RMN de ^1H do derivado **7**



Fonte: elaborado pela autora

Figura 22. Padrão de quatro linhas observado no espectro de RMN de ^1H do derivado **16**



Fonte: elaborado pela autora

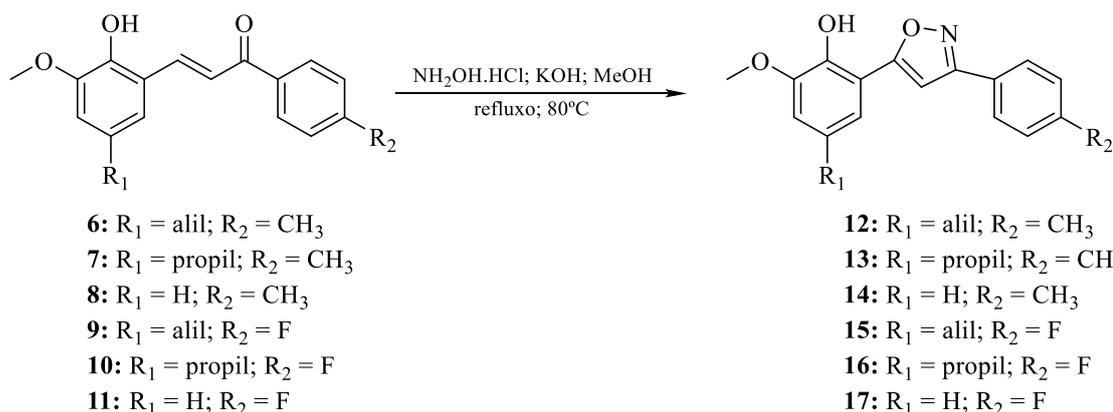
Nos espectros de RMN de ^{13}C das chalconas, observou-se em aproximadamente 56,0 ppm o sinal relativo ao carbono do grupo metoxila (OCH_3 ; 1C) e em 25 ppm o sinal relativo ao grupo metila (CH_3) dos derivados **6**, **7** e **8**. Os sinais referentes aos carbonos α - β , insaturados

foram observados em 146,0 e 122 ppm, e da carbonila (entre 190-189 ppm) confirmando assim, mais uma vez, a obtenção destas substâncias.

Foi possível observar, para os derivados **9**, **10** e **11** o efeito do acoplamento heteronuclear entre os carbonos (C-14, C-15, C-16 e C-17) e o átomo de flúor, fornecendo assim doubletos em aproximadamente 165; 134; 130 e 115 ppm com constantes de acoplamento iguais a 252 (2J); 2 (4J); 9 (3J) e 21 Hz (2J), respectivamente.

Além disso, para corroborar as análises feitas por meio dos espectros de RMN de 1H para as moléculas quanto à presença das cadeias alílica e propílica do eugenol e diidroeugenol, respectivamente, observou-se no espectro de RMN de ^{13}C dessas substâncias, sinais em aproximadamente 39 ppm, referente ao C-8 dos derivados **6** e **9** e em 37, 24 e 13 ppm, referentes ao C-8, C-9 e C-10 dos derivados **7** e **10**. Para os derivados da *orto*-vanilina (**8** e **11**) o sinal de C-6 encontra-se em, aproximadamente 122-123 ppm.

5.1.3 Síntese e caracterização dos isoxazóis derivados do eugenol e análogos (12-17)



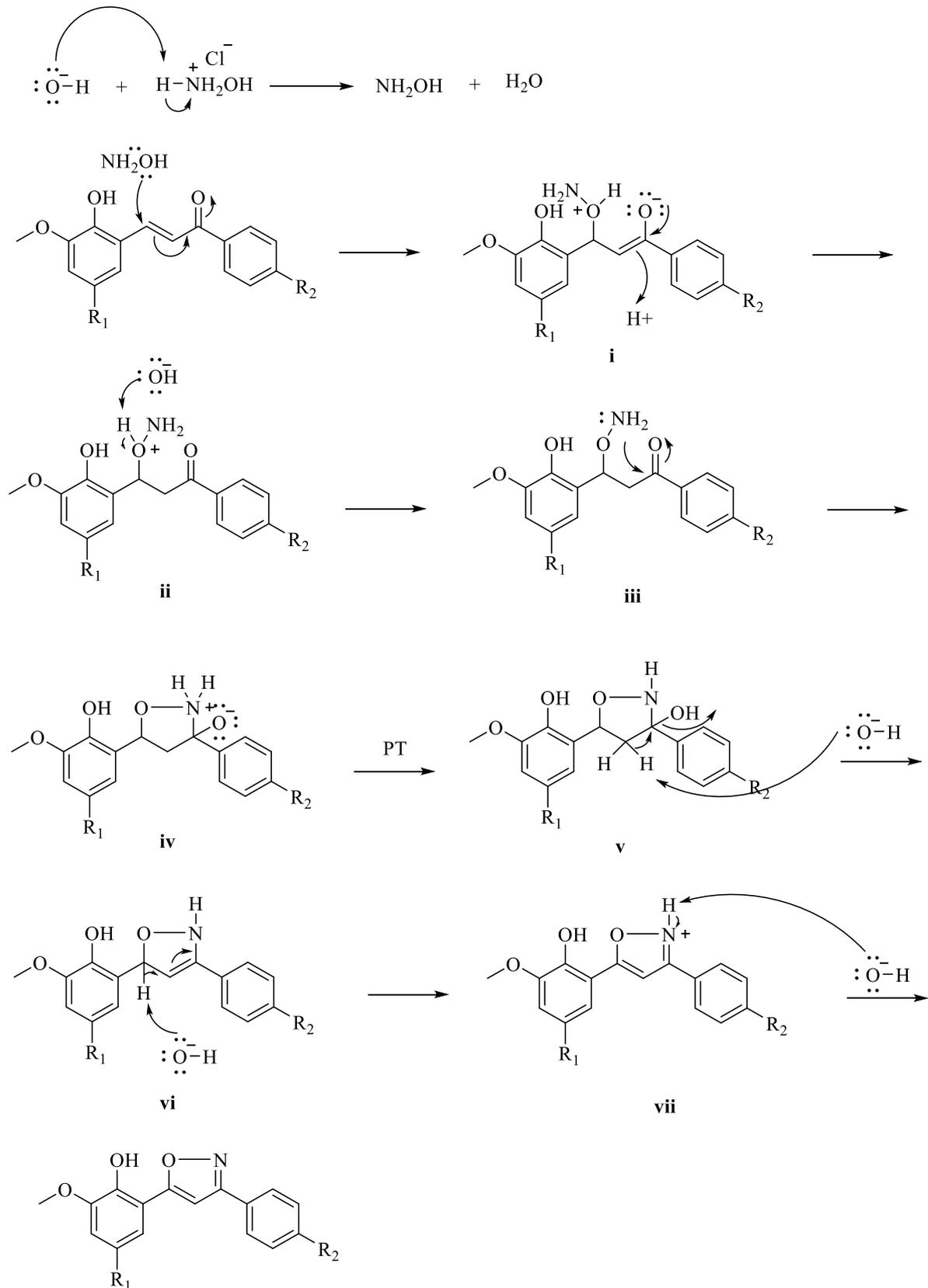
A síntese dos isoxazóis **12-17** foi realizada a partir de uma metodologia em que as chalconas são submetidas a um meio contendo cloridrato de hidroxilamina e uma base forte. Assim, através de uma reação de adição conjugada seguida de ciclização, o heterociclo isoxazólico é formado (MOKALE et al., 2014).

A reação de obtenção das substâncias inéditas **12-17** forneceu diversos subprodutos, sendo de difícil purificação, permitindo a obtenção dos produtos de interesse com baixos rendimentos. Além dos isoxazóis de interesse, foi possível caracterizar a estrutura química de um dos subprodutos formados, que possuía R_f próximo ao material de partida e produto de interesse, sendo ele, um derivado diidroisoxazólico (**18**), cuja formação foi proporcional ao tempo de reação sob aquecimento e os dados referentes à sua caracterização serão discutidos a seguir. Este fato pode ser constatado uma vez que se realizou a técnica de formação do isoxazol

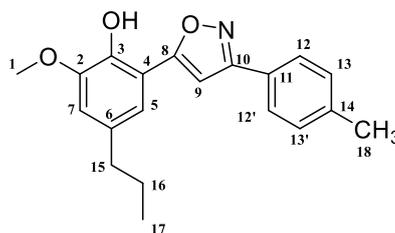
em 4 diferentes tempos (45 h, 24 h, 6 h e 1 h), e observou-se, ao se comparar com substâncias já isoladas, por diferença de Rf, que no maior tempo não era possível visualizar a formação do isoxazol em CCD, apenas do possível anel isoxazólico em sua forma reduzida (diidroisoxazol). O tempo de 24, 6 e 1 h levavam à formação de ambos os produtos, entretanto o menor tempo contribuía para menor formação de outros subprodutos que não foram identificados e, possivelmente, um melhor rendimento do produto de interesse após a purificação. Apesar disso, o rendimento da reação para obtenção do isoxazol ainda foi baixo, considerando o tempo de 1 h, sendo de apenas 8 % (**17**), o que pode ser justificado pela pouca formação do produto de interesse. Enquanto para as demais substâncias o baixo rendimento pode ser justificado pela dificuldade de separação do produto de interesse e seus subprodutos formados.

Reações de adição em compostos α,β -insaturados podem ocorrer de duas formas, tanto pela adição 1,2 (diretamente na carbonila) ou 1,4 (no carbono β à carbonila). Conforme apresentado no Esquema 4 a seguir, o provável mecanismo químico para a formação dos isoxazóis se inicia pelo ataque nucleofílico do oxigênio da hidroxilamina ao carbono β à carbonila (adição conjugada do tipo 1,4), formando o intermediário (**i**). Em seguida, esse intermediário sofre um rearranjo levando à formação de um novo intermediário (**ii**). A base presente no meio, promove a estabilização da molécula formada, captando o próton ligado ao oxigênio proveniente da hidroxilamina, levando à formação do intermediário (**iii**). O nitrogênio promove um ataque intramolecular no carbono carbonílico levando à formação do intermediário cíclico (**iv**), que sofre um prototropismo, formando o intermediário (**v**) e em seguida, a base presente no meio, capta o hidrogênio ácido do anel recém-formado, levando à formação do anel (**vi**), que após novo ataque da base leva à formação do anel isoxazólico protonado (**vii**), o qual sofre uma desprotonação pelo meio básico, originando o isoxazol correspondente de interesse.

Esquema 4. Proposta de mecanismo para a formação dos compostos isoxazólicos



Fonte: elaborado pela autora



Fonte: elaborado pela autora

A confirmação da formação dos isoxazóis sintetizados foi possível a partir da análise de seus espectros de RMN de ^1H , em que foram observados simpletos com integral 1 na região de $\delta 6,9$ referentes ao H-9 do anel isoxazólico dos heterociclos.

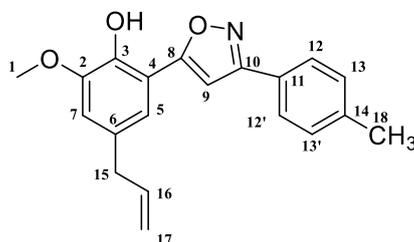
O mesmo padrão observado para as chalconas em relação às cadeias alílicas e propílicas, também foi registrado para as substâncias **13**, **15** e **16**. Para o derivado que possui a cadeia alílica do eugenol (**15**) os sinais referentes a essa cadeia se apresentaram na forma de um duplete em, aproximadamente, $\delta 3,38$ ($\text{CH}_2\text{-CH=CH}_2$; 2H), um multiplete em $\delta 6,03\text{--}5,93$ ($\text{CH}_2\text{-CH=CH}_2$; 1H) e um multiplete em $\delta 5,14\text{--}5,09$ referentes aos hidrogênios vinílicos terminais ($\text{CH}_2\text{-CH=CH}_2$; 2H). Já para os derivados que possuem a cadeia propílica, derivados do diidroeugenol (**13** e **16**), sinais presentes em, aproximadamente, $\delta 2,58$, $\delta 1,70$ e $\delta 0,69$, na forma de um tripleto ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), um sexteto ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$) e outro tripleto ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), respectivamente, confirmam a sua formação.

Além destes sinais, observou-se também um simpleto de integral igual a 3 em aproximadamente $\delta 3,93$ referente aos hidrogênios do grupo metoxila (OCH_3) e um sinal em $\delta 2,4$ referente aos hidrogênios do grupo metila dos derivados **13** e **14**. Dois dubletos em, aproximadamente, $\delta 7,05$ e $\delta 6,79$, respectivamente, referentes aos hidrogênios aromáticos H-5 e H-7 ($^4J = 1,84$ Hz) caracterizados pelo acoplamento aromático do tipo 4J (*meta*). Para os aromáticos derivados da *orto*-vanilina, sem substituinte em C-6, observou-se descolamento próximo de 7,23 e 6,98 para o derivado **14** e 7,24 para o derivado **17**, sendo que para o derivado **17** esses sinais foram representados na forma de um multiplete entre os 3 respectivos hidrogênios.

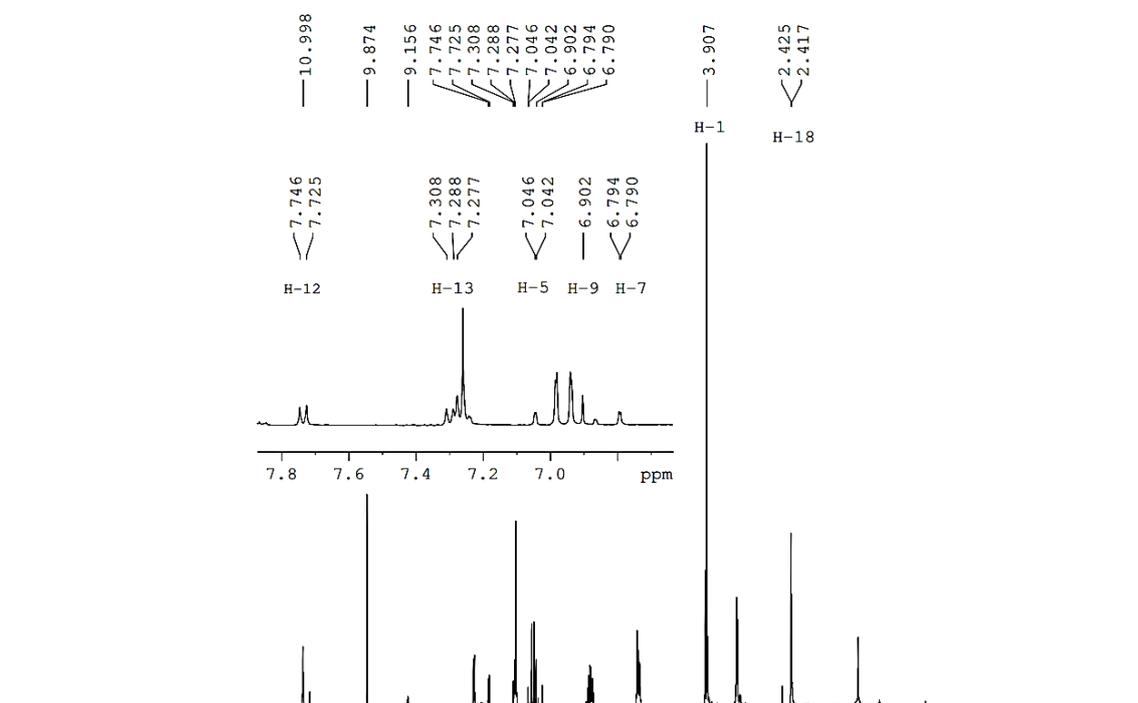
Em aproximadamente $\delta 7,85$, observou-se, para os derivados **13-17** o mesmo padrão de quatro linhas, característico de anéis *para*-dissubstituídos observado nas chalconas **6-11**, já discutido anteriormente.

Além disso, nos espectros de RMN de ^{13}C destas substâncias, o padrão de acoplamento heteronuclear entre o carbono e flúor também foi observado nos derivados **15**, **16** e **17**. E, assim como nos derivados **6**, **7**, **9** e **10**, observou-se, para os derivados **13**, **15** e **16**, sinais em aproximadamente 39 ppm, referente ao C-15 do derivado **15** e em 37, 24 e 13 ppm, referentes ao C-15, C-16 e C-17 dos derivados **13** e **16**, confirmando a formação das cadeias alílicas e propílicas do eugenol e diidroeugenol, respectivamente. Para os derivados da *orto*-vanilina (**8** e **11**) o sinal de C-6 encontra-se em, aproximadamente 122-123 ppm. Em relação ao grupo metoxila (OCH_3 ; 1C), seu sinal encontra-se em aproximadamente 56,0 ppm, enquanto o grupo metila (CH_3) dos derivados **13** e **14** em 22,5 ppm. Por fim, em aproximadamente 97,7 ppm, observou-se o sinal referente a C-9 do heterociclo, comprovando, mais uma vez a sua formação.

Por fim, para corroborar as análises feitas por meio dos espectros RMN de ^1H para as moléculas quanto à presença das cadeias alílica e propílica do eugenol e diidroeugenol, respectivamente, observou-se no espectro de ^{13}C dessas substâncias, sinais em aproximadamente 39, 137 e 116 ppm referentes ao C-15, C-16 e C-17 do derivado **15** e em 37, 24 e 13 ppm, referentes ao C-15, C-16 e C-17 dos derivados **13** e **16**, o que confirma a presença dessas cadeias.

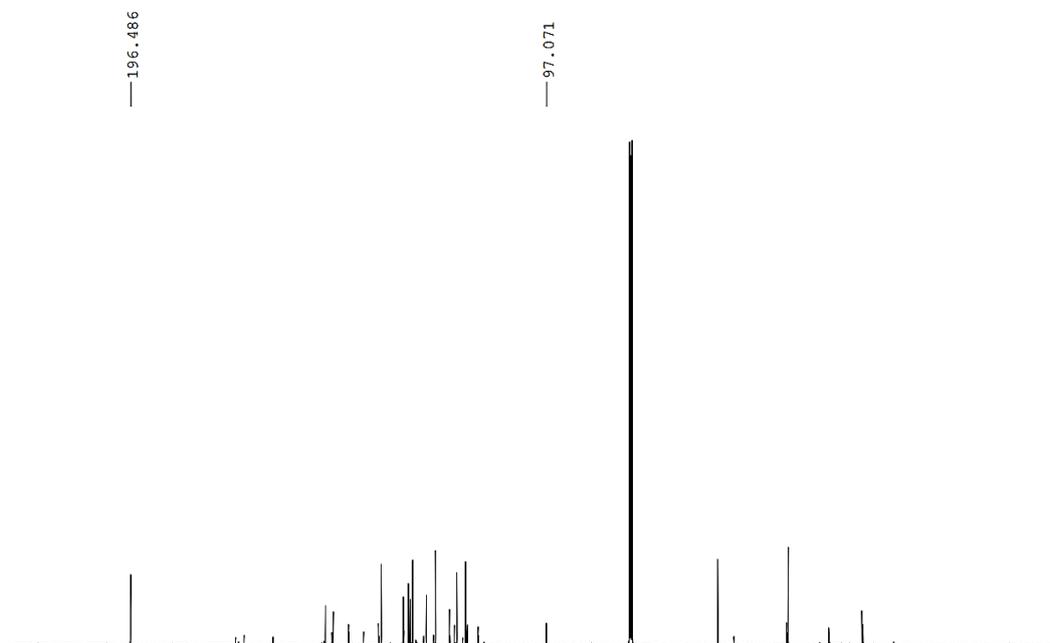


A síntese da substância **12**, derivado isoxazólico do eugenol, substituído com grupo metila, foi realizada conforme descrita no item 4.1.3, entretanto a análise de seus espectros de RMN de ^1H e ^{13}C mostrou que a substância não apresentou um bom grau de pureza, estando contaminada com o material de partida (chalcona **6**), o que dificultou a análise espectroscópica, diante de valores de integrais incompatíveis. Apesar disso, é possível relatar que o derivado proposto foi obtido, pois, como observado na análise dos demais derivados, o espectro de RMN de ^1H apresenta sinais nas regiões de δ 6,9, δ 3,9 e δ 2,4 que indicam a presença de H-9 e dos grupos metóxi e metila, respectivamente. Além disso, há sinais característicos dos hidrogênios aromáticos H-5 e H-7, em regiões de aproximadamente δ 7,0 e δ 6,7, assim como dos hidrogênios aromáticos H-12 e H-13 em aproximadamente δ 7,74 e δ 7,3, respectivamente, com valores de 3J de 8,0 Hz. A presença desses sinais é apresentada na figura 23 abaixo.

Figura 23. Espectro de RMN de ^1H do derivado **12**

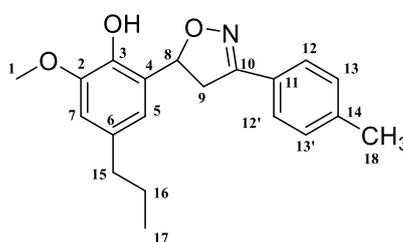
Fonte: elaborado pela autora

O espectro de RMN de ^1H mostrou que havia contaminação no produto obtido levantando a suspeita de poder ser do material de partida, uma vez que os valores de integral estavam duplicados. Assim, a análise do espectro de RMN de ^{13}C confirmou a presença do material de partida, uma vez que é claramente notável o sinal característico da carbonila em 196 ppm, porém também há um sinal em 99 ppm, indicando a formação do heterociclo isoxazólico de interesse. A presença desses sinais é apresentada na figura 24 abaixo.

Figura 24. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado **12**

Fonte: elaborado pela autora

A impureza desse derivado pode ser justificada pela dificuldade durante a purificação da substância por CCS, uma vez que o material de partida (chalcona **6**) possui R_f próximo ao produto de interesse. A técnica de purificação por recristalização não pode ser utilizada, visto que o derivado era líquido e apresentava grande quantidade de impurezas, o que impossibilita o uso dessa técnica. A síntese e purificação desta substância está sendo reproduzida.



Em relação à caracterização química do derivado diidroisoxazólico isolado (subproduto da reação), esta foi possível a partir da observação da presença de dois duplos dubletos, no espectro de RMN de ^1H , na região de δ 3,78 e 3,30 referentes aos dois hidrogênios H-9, que são diastereotópicos, e por isso acoplam entre si e com o hidrogênio vicinal H-8, fornecendo assim esse padrão. A presença do sinal com deslocamento químico de 78 e 42 ppm referentes a C-8 e

C-9, respectivamente, contribuíram para corroborar a proposta de formação dessa substância, uma vez que o sinal do C-9 do anel isoxazólico está em $\delta 97,7$.

5.2 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL BIOLÓGICO DAS SUBSTÂNCIAS SINTETIZADAS

5.2.1 Avaliação do potencial citotóxico das substâncias avaliadas

O potencial citotóxico das substâncias sintetizadas foi avaliado contra uma linhagem celular normal (saudável) de fibroblasto pulmonar humano (MRC-5), e contra linhagens tumorais de células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2), carcinoma de bexiga humano (T24) e adenocarcinoma de ovário humano (TOV-21G), através do método colorimétrico do MTT. Utilizou-se, como controle positivo a Doxorubicina e com esses dados, foi possível determinar o índice de seletividade das substâncias ativas. Os resultados estão apresentados na tabela 5 abaixo.

Tabela 5. Citotoxicidade das substâncias sintetizadas, determinada nas linhagens celulares MRC-5, HepG2, T24 e TOV-21G, expressa em termos de concentração citotóxica a 50% (CC₅₀), respectivos desvios padrões (n=3) e índice de seletividade (IS), realizada por meio do ensaio colorimétrico do MTT

| SUBSTÂNCIA SINTÉTICA | CC ₅₀ µM | | | | | | |
|--|---------------------|---------------------|--------------|------------------|--------|----------------------|-------------|
| | MRC-5 ^a | HepG2 ^b | IS | T24 ^c | IS | TOV-21G ^b | IS |
| 6 | 56,94 ± 1,87 | 29,76 ± 1,44 | 1,91 | 56,13 ± 1,45 | 1,01 | 29,57 ± 1,32 | 1,93 |
| 7 | 47,20 ± 1,39 | 4,25 ± 1,35 | 11,10 | > 161,08 | < 0,29 | 7,22 ± 1,31 | 6,54 |
| 8 | 47,41 ± 1,40 | 58,07 ± 1,46 | 0,82 | 67,87 ± 1,73 | 0,70 | 67,16 ± 1,45 | 0,71 |
| 9 | 50,60 ± 1,46 | 14,55 ± 1,45 | 3,48 | 76,77 ± 1,49 | 0,66 | 47,99 ± 1,76 | 1,06 |
| 10 | 45,58 ± 1,53 | 10,67 ± 1,40 | 4,27 | > 159,05 | < 0,29 | 64,61 ± 1,35 | 0,71 |
| 11 | 61,99 ± 1,35 | 14,51 ± 1,56 | 4,27 | 83,48 ± 1,53 | 0,74 | 77,93 ± 1,42 | 0,80 |
| 13 | 43,82 ± 1,62 | 38,22 ± 1,45 | 1,15 | 80,51 ± 2,15 | 0,54 | > 100,00 | < 0,44 |
| 14 | > 355,48 | 263,30 ± 1,44 | > 1,35 | > 355,48 | 1,0 | > 355,48 | 1,0 |
| 15 | > 307,37 | 135,54 ± 1,25 | > 2,26 | > 307,37 | 1,0 | > 307,37 | 1,0 |
| 16 | 48,72 ± 1,73 | 37,48 ± 1,31 | 1,30 | 208,97 ± 2,30 | 0,23 | 279,56 ± 1,54 | 0,17 |
| 17 | > 350,54 | 148,94 ± 1,25 | > 2,35 | > 350,34 | 1,0 | > 350,54 | 1,0 |
| Doxorrubicina (Controle positivo) | 15,77 ± 1,33 | 11,23 ± 1,56 | 1,40 | 5,21 ± 1,25 | 3,03 | 4,12 ± 1,33 | 3,83 |

IS (Índice de seletividade): CC₅₀MRC-5/ CC₅₀Linhagem celular tumoral; ^a Leitura realizada após 48h do tratamento; ^b Leitura realizada após 72h do tratamento ^c Leitura realizada após 48h do tratamento.

Para a linhagem de células sadias humanas avaliadas (MRC-5), os isoxazóis **14**, **15** e **17** não foram citotóxicos nas concentrações máximas testadas, 355,48 μM e 350,54 μM para ambos os derivados isoxazólicos da *orto*-vanilina (**14** e **17**), e 307,37 μM para o derivado do eugenol substituído com flúor (**15**). O derivado **11** apresentou CC_{50} de 61,99 μM na faixa de concentração avaliada, sendo ela a substância menos citotóxica quando comparada às outras que mostraram alguma toxicidade. Os derivados **7**, **8**, **10** e **13** apresentaram, respectivamente, valores de CC_{50} entre 43,82-47,20 μM , sendo estes os derivados de maior citotoxicidade para a linhagem MRC-5. Além disso, todos os derivados apresentaram citotoxicidade inferior ao do controle positivo (15,77 μM), sendo esta cerca de três vezes inferior. Por fim, pode-se concluir que, de maneira geral, a conversão das chalconas nos respectivos isoxazóis contribuiu significativamente para a redução da citotoxicidade das substâncias frente à linhagem MRC-5.

Em relação às linhagens tumorais, os resultados apresentados na tabela 5 mostram que nenhum dos derivados apresentou atividade considerável contra a linhagem T24, com baixos índices de seletividade quando comparadas com o controle positivo, ativo a 5,21 μM . Para a linhagem TOV-21G a chalcona metilada derivada do diidroeugenol (**7**) apresentou o resultado mais promissor, sendo ativa a 7,22 μM e quase duas vezes menos tóxica que a doxorrubicina, o que pode ser observado pelos seus índices de seletividade (6,4 e 3,8, respectivamente). Os melhores resultados observados para as substâncias sintetizadas foram em relação à linhagem HepG2, visto que quatro derivados (chalconas **7**, **9**, **10** e **11**) foram as mais ativas. As substâncias **9** e **11**, derivados do eugenol e *orto*-vanilina, respectivamente, e ambos substituídos com átomo de flúor, foram ativas com uma potência próxima a do controle positivo (CC_{50} : 11,23 μM), a 14,55 e 14,51 μM , respectivamente, porém com índice de seletividade cerca de três vezes maior ao da doxorrubicina ($\text{IS} = 1,40$), indicando sua melhor seletividade em relação a este controle positivo. Os derivados **7** e **10**, ambos derivados do diidroeugenol contendo um grupo metila e flúor, respectivamente, apresentaram citotoxicidade e IS melhores que o controle positivo (11,23 μM ; 1,40), (4,25 μM ; 11,10) e (10,67 μM ; 4,27), respectivamente. Vale destacar o resultado observado para o derivado **7**, que foi quase três vezes mais ativo que o controle positivo e ainda apresentou índice de seletividade cerca de oito vezes maior que o fármaco controle, tornando essa substância um interessante *hit* para futuros estudos. Todos os isoxazóis foram pouco tóxicos ou inativos quando comparados com as chalconas precursoras, indicando que o núcleo chalcônico é essencial para a atividade citotóxica das substâncias sintetizadas.

Ainda quanto às relações estrutura-atividade das substâncias no que diz respeito ao grupo metila e ao átomo de flúor, não foi observada uma relação diretamente associada a estes

substituintes. A presença do flúor, átomo retirador de densidade eletrônica, como substituinte para à carbonila das chalconas, pode ter contribuído para a atividade das substâncias contra as linhagens avaliadas, visto que dos quatro derivados mais ativos, três deles era substituídos com flúor. Por outro lado, derivado mais ativo (7) contra duas linhagens tumorais (HepG2 e TOV-21G) e menos tóxico contra a linhagem MRC-5, é substituído com grupamento metila, doador de densidade eletrônica, podendo haver alguma relação da presença deste grupo com a seletividade destas chalconas. Por outro lado, quanto à variação do grupo alila do eugenol (derivados 6 e 9) pelo grupo propila (derivados 7 e 10 do diidroeugenol) ou pelo átomo de hidrogênio (derivados 8 e 11 da *o*-vanilina), a presença da cadeia propílica parece contribuir significativamente tanto para a potência quanto para o índice de seletividade das chalconas, já que o derivado 7 apresentou os melhores índices de seletividade tanto na linhagem HepG2 quanto na TOV-21G, única chalcona ativa contra mais de uma linhagem tumoral, além de apresentar os menores valores de CC₅₀. A segunda substância mais ativa foi a chalcona 10, ativa contra a linhagem HepG2 a 10,63 μM, também um derivado contendo o grupo propila, o que corrobora com a importância deste grupo para a atividade citotóxica desta série de substâncias.

Por fim, é importante destacar que, a alteração no núcleo α,β -insaturado das chalconas pelo núcleo isoxazólico levou à uma diminuição drástica da atividade das substâncias contra as células cancerígenas avaliadas e ainda levou a uma redução dos índices de seletividade, uma vez que nenhum dos derivados isoxazólicos (13-17) apresentou atividade significativa contra as linhagens tumorais avaliadas. Desta forma, é possível concluir que a ligação α,β -insaturada é parte essencial da atividade das chalconas contra as linhagens tumorais avaliadas.

5.2.2 Avaliação do potencial antiviral das substâncias sintetizadas

O potencial antiviral dos derivados sintetizados foi avaliado contra os seguintes vírus: Chikungunya virus (CHIKV) e Mayaro virus (MAYV) e está sendo avaliada contra Zika Virus (ZIKV). Como controle positivo utilizou-se os fármacos Ribavirina e Amantadina e o potencial citotóxico das substâncias foi avaliado em linhagem celular derivada de rins de macaco verde (VERO). Com esses dados, foi determinado o índice de seletividade (IS) das substâncias ativas. Os resultados estão apresentados na tabela 6 abaixo.

Tabela 6. Atividade citotóxica (CC₅₀), e avaliação da atividade antiviral (CE₅₀) frente aos vírus: ZIKV, CHIKV e MAYV, e frente à linhagem celular VERO, com respectivos desvios padrões (n=3) e índice de seletividade (IS), das substâncias sintetizadas

| SUBSTÂNCIA SINTÉTICA | VERO CC ₅₀ μM | ZIKV ^a CE ₅₀ μM | IS ^b | CHIKV ^c CE ₅₀ μM | IS | MAYV ^d CE ₅₀ μM | IS |
|---|--------------------------|---------------------------------------|-----------------|--|-------------|---------------------------------------|--------------|
| 6 | 15,30 ± 1,38 | NA | – | NA | – | NA | – |
| 7 | 43,72 ± 1,68 | NA | – | NA | – | NA | – |
| 8 | > 74,54 | NT | – | NA | – | NA | – |
| 9 | 27,90 ± 1,23 | NA | – | NA | – | NA | – |
| 10 | 47,11 ± 1,83 | NA ^e | – ^f | NA | – | 9,59 ± 1,37 | 4,91 |
| 11 | 32,37 ± 1,40 | NT | – | NA | – | NA | – |
| 13 | 265,04 ± 1,75 | NT | – | 51,30 ± 1,53 | 5,17 | 28,39 ± 2,78 | 9,34 |
| 14 | 161,31 ± 1,19 | NT ^g | – | NA | – | NA | – |
| 15 | 269,75 ± 1,60 | NT | – | NA | – | 37,16 ± 1,68 | 7,26 |
| 16 | 184,84 ± 1,35 | NT | – | 32,19 ± 1,94 | 5,74 | NA | – |
| 17 | 106,32 ± 1,36 | NT | – | NA | – | NA | – |
| Ribavirina (Controle positivo) | 1516,75 ± 1,20 | 386,84 ± 2,70 | 3,92 | NA | – | 119,61 ± 1,39 | 12,68 |
| Amantadina (Controle positivo) | 561,26 ± 1,16 | NT | – | 418,98 ± 1,70 | 1,34 | NT | – |

^a ZIKV: Título viral 1x10³ TCID₅₀/mL; ^b IS (Índice de seletividade) = CC_{50 (Vero)}/EC_{50 (Vero)}; ^c CHIKV: Título viral 1x10⁷ TCID₅₀/mL; MAYV: Título viral 1x10⁴ TCID₅₀/mL; ^e NA: Não ativo; ^f –: Não determinado, ^g Não testado.

Considerando a linhagem de células normais sadias avaliadas (VERO), apenas a substância **8** (chalcona derivada da *orto*-vanilina substituída com grupo metila) não apresentou citotoxicidade na concentração máxima testada. Os derivados do diidroeugenol substituído com flúor (**13**) e do eugenol substituído com grupo metila (**15**) apresentaram, respectivamente, CC_{50} de 265,04 μM e 269,75 μM , sendo estes os derivados com menor citotoxicidade frente às células VERO, em comparação às demais substâncias analisadas. As chalconas **6**, **7**, **9**, **10** e **11** apresentaram maior perfil citotóxico, com valores de CC_{50} entre 15,30-47,11 μM . Esses resultados indicam que, tanto para a linhagem celular VERO, como para a linhagem MRC-5, as chalconas apresentam uma citotoxicidade considerável, porém de maneira geral, apresentam citotoxicidade inferior na linhagem humana MRC-5, sendo este um fator considerável em pesquisas de substâncias com potencial citotóxico. Por fim, conforme foi observado para as células MRC-5, também se pode concluir que a conversão das chalconas nos respectivos isoxazóis contribuiu significativamente para a redução da citotoxicidade das substâncias frente à linhagem VERO, já que estes heterociclos foram citotóxicos com valores de CC_{50} entre 106,3-269,7 μM .

Em relação às avaliações antivirais, os testes para ZIKV foram realizados, até o momento, com apenas quatro derivados (**6**, **7**, **9** e **10**) e nenhum deles apresentou atividade. Tratando-se do CHIKV, é possível observar, na tabela 5, que os derivados de maior atividade são **13** e **16** (CE_{50} de 51,30 μM e 32,19 μM , respectivamente). Todos esses derivados apresentaram valores de CE_{50} menores do que o controle positivo amantadina (CE_{50} : 418,9 μM ; IS: 1,6) com valores de IS entre 1,5-5,74, enquanto a ribavirina não apresentou atividade contra este vírus. Dentre essas substâncias isoxazólicas, destaca-se o isoxazol **16**, derivado do diidroeugenol contendo um átomo de flúor como substituinte na posição *para* à carbonila. Esse derivado apresentou um valor de IS quatro vezes maior que a amantadina, sendo cerca de treze vezes menos tóxico que este fármaco frente à linhagem VERO.

Quanto à atividade contra o MAYV, os derivados de maior atividade foram a chalcona **10** (CE_{50} de 9,59 μM) e os isoxazóis **13** e **15** (CE_{50} : 28,39 μM e 37,16 μM , respectivamente). Apenas a ribavirina foi avaliada contra essa linhagem, como controle positivo, e foi possível observar que esses quatro isoxazóis apresentaram melhor atividade antiviral e maiores índices de seletividade em relação a este fármaco. Enquanto a chalcona **10**, derivado do diidroeugenol, foi a substância mais ativa contra o MAYV, o derivado **13**, isoxazol derivado do diidroeugenol e substituído com grupamento metila, apresentou o melhor índice de seletividade em relação às demais substâncias, com atividade antiviral cerca de quatro vezes maior que a ribavirina.

Os resultados apresentados indicam que, em relação à atividade antiviral, os isoxazóis (**13-17**) são substâncias mais promissoras do que as chalconas (**6-11**), uma vez que apenas a chalcona **10** apresentou atividade contra a linhagem viral MAYV.

Propôs-se, neste trabalho, avaliar a influência de grupos eletrodadores (metila) e eletrorretiradores (flúor) do anel aromático, utilizando-se diferentes acetofenonas, além de variações das cadeias laterais do eugenol, diidroeugenol e *o*-vanilina para avaliar a importância deste grupo para a atividade. Em relação a essas modificações, observa-se que a presença da cadeia alílica e propílica do eugenol e diidroeugenol, respectivamente, influenciam na atividade das substâncias, uma vez que os derivados da *o*-vanilina (**14 e 17**) não apresentaram atividade contra nenhum dos vírus avaliados. Já em relação aos substituintes, metila e flúor, não foi possível relacionar a sua influência direta na atividade antiviral das substâncias, uma vez que derivados com ambos os substituintes apresentaram atividade potencial.

Devido à impureza relatada para o derivado **12** os testes de avaliação citotóxica e antiviral não foram considerados.

8. CONCLUSÃO

Foram planejados, sintetizados, purificados e caracterizados neste trabalho, seis chalconas (**6-11**) e cinco isoxazóis (**13-17**) inéditos, na forma de híbridos moleculares.

A avaliação citotóxica das substâncias mostrou que, de forma geral, as chalconas apresentam um melhor perfil contra as linhagens celulares HepG2 e TOV-21G, de forma que as modificações estruturais realizadas levaram a melhores perfis de atividade e índice de seletividade em relação ao controle positivo utilizado (doxorubicina). O derivado **7** apresentou os melhores resultados, sendo ativo contra as duas linhagens tumorais, com atividade de 7,22 μM (HepG2) e 4,25 μM (TOV-21G), e índice de seletividade cerca de oito vezes maior que a doxorubicina, em relação à linhagem HepG2.

Quanto à avaliação antiviral dos derivados frente aos vírus ZIKV, CHIKV e MAYV, os resultados indicaram que a modificação estrutural das chalconas para os derivados isoxazóis contribuiu significativamente para a atividade, uma vez que dentre todos os derivados avaliados três isoxazóis (**13**, **15** e **16**) foram mais ativos que os controles positivos utilizados, e apenas uma chalcona (**10**) apresentou resultado promissor. A presença da cadeia alílica do eugenol e propílica do diidroeugenol parecem ter influenciado positivamente na atividade antiviral, uma vez que os derivados da *o*-vanilina não apresentaram atividade contra nenhum dos vírus avaliados.

9. REFERÊNCIAS

- ANTHONY S. FAUCI, M.D., AND DAVID M. MORENS, M. . Zika Virus in the Americas — Yet Another Arbovirus Threat. p. 601–604, 2016.
- BALABAN, A. T.; ONICIU, D. C.; KATRITZKY, A. R. ET AL. Aromaticity as a cornerstone of heterocyclic chemistry. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 5, p. 2777–2812, 2004.
- BATOVSKA, D.; TODOROVA, I. Trends in Utilization of the Pharmacological Potential of Chalcones. **Current Clinical Pharmacology**, v. 5, n. 1, p. 1–29, 2010.
- BETANCUR-GALVIS, L. A. et al. Cytotoxic and Antiviral Activities of Colombian Medicinal Plant Extracts of the Euphorbia genus. **Mem. Ins. Oswaldo Cruz**, v. 97, n. June, p. 541–546, 2002.
- BRANDÃO, G. C. et al. Antiviral activity of Bignoniaceae species occurring in the state of Minas Gerais (Brazil): Part 1. **Letters in Applied Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 469–476, 2010.
- BRODY, H.; BENDER, E.; MILLER, K. OUTLOOK. p. 2014, 2014.
- BURMAOGLU, S. et al. Synthesis and anti-proliferative activity of fluoro-substituted chalcones. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 13, p. 3172–3176, 2016.
- CAMINI, F. C. et al. Oxidative stress in Mayaro virus infection. **Virus Research**, v. 236, n. November 2016, p. 1–8, 2017.
- CHOUAÏB, K. et al. Regiospecific synthesis, anti-inflammatory and anticancer evaluation of novel 3,5-disubstituted isoxazoles from the natural maslinic and oleanolic acids. **Industrial Crops and Products**, v. 85, p. 287–299, 2016.
- CHUA, C. L. et al. The neutralizing role of IgM during early Chikungunya virus infection. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, p. 1–16, 2017.
- COSTA-LOTUFO, L. V. et al. The Contribution of Natural Products as Source of New Anticancer Drugs: Studies Carried Out at the National Experimental Oncology Laboratory from the Federal University of Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47–58, 2010.
- COUDERC, T. et al. Chikungunya virus infection of corneal grafts. **Journal of Infectious Diseases**, v. 206, n. 6, p. 851–859, 2012.
- DA SILVA, F. F. M. et al. Eugenol derivatives: synthesis, characterization, and evaluation of antibacterial and antioxidant activities. **Chemistry Central Journal**, v. 12, n. 1, p. 1–9, 2018.
- DALKIRIA CAMPOS, SUSANA NAVARRO, Y. Y. L.-G.; MADELAINE SUGASTI AND JOSÉ GONZÁLEZ-SANTAMARÍA. Broad Antiviral Activity of Ginkgolic Acid against. 2020.
- DEY, D. et al. The effect of amantadine on an ion channel protein from Chikungunya virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 7, p. 1–22, 2019.
- ELKHALIFA, D. et al. A comprehensive review on the antiviral activities of chalcones. **Journal of Drug Targeting**, v. 29, n. 4, p. 403–419, 2021.
- ESQUIVEL, E. C. C. SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE 3,5-DIARIL-PIRAZOL-4-OIS E 3,5-DIARIL-ISOXAZOL-4-OIS A PARTIR DE CHALCONAS COMO POTENCIAIS AGENTES ANTICANCERÍGENOS. 2018.
- FERRAZ, A. C. et al. Virucidal activity of proanthocyanidin against Mayaro virus. **Antiviral Research**, 2019.
- FRIES, J. The Compression of Morbidity The Finite Life Span. **The Milbank Quarterly Published by Blackwell Publishing. Reprinted from The Milbank Memorial Fund Quarterly**, v. 83, n. 3, p. 801–23, 2005.

- GAZOLLA, P. A. R. et al. Síntese e Avaliação da Atividade Citotóxica de derivados do eugenol contendo núcleos 1,2,3-triazólicos. v. 41, n. 5, p. 497–506, 2018.
- GHOSH, R. et al. Eugenol causes melanoma growth suppression through inhibition of E2F1 transcriptional activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 7, p. 5812–5819, 2005.
- GRAGNOLATI, M. et al. Envelhecendo em um país mais velho (sumário executivo). **Revista Portal de Divulgação**, v. 2, n. 1, p. 64, 2012.
- GRIMBLAT, N. et al. A theoretical study of the Duff reaction: Insights into its selectivity. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 14, n. 44, p. 10496–10501, 2016.
- GUICHARD, N. et al. Antineoplastic drugs and their analysis: A state of the art review. **Analyst**, v. 142, n. 13, p. 2273–2321, 2017.
- HARFORD, J. B. et al. Cancer control-planning and monitoring population-based systems. **Tumori**, v. 95, n. 5, p. 568–578, 2009.
- HILLS, S. L.; FISCHER, M.; PETERSEN, L. R. Epidemiology of Zika Virus Infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. Table 2, p. S868–S874, 2017.
- HUAN, S. K. H. et al. Scutellaria baicalensis alleviates cantharidin-induced rat hemorrhagic cystitis through inhibition of cyclooxygenase-2 overexpression. **Molecules**, v. 17, n. 6, p. 6277–6289, 2012.
- JAGANATHAN, S. K. et al. Apoptotic effect of eugenol in human colon cancer cell lines. **Cell Biology International**, v. 35, n. 6, p. 607–615, 2011.
- K. SAHU, N. et al. Exploring Pharmacological Significance of Chalcone Scaffold: A Review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 2, p. 209–225, 2012.
- KAMIYAMA, N. et al. Ribavirin inhibits Zika virus (ZIKV) replication in vitro and suppresses viremia in ZIKV-infected STAT1-deficient mice. **Antiviral Research**, v. 146, p. 1–11, 2017.
- KAUFMAN, T. S. The multiple faces of Eugenol. A versatile starting material and building block for organic and bio-organic synthesis and a convenient precursor toward bio-based fine chemicals. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 6, p. 1055–1085, 2015.
- KIDWAI, M.; KUKREJA, S.; THAKUR, R. K₂CO₃-Mediated Regioselective Synthesis of Isoxazoles and Pyrazolines. **Letters in Organic Chemistry**, v. 3, n. 2, p. 135–139, 2006.
- LEE, Y. S.; PARK, S. M.; KIM, B. H. Synthesis of 5-isoxazol-5-yl-2'-deoxyuridines exhibiting antiviral activity against HSV and several RNA viruses. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 4, p. 1126–1128, 2009.
- MOKALE, S. N. et al. Synthesis and in-vivo hypolipidemic activity of some novel substituted phenyl isoxazol phenoxy acetic acid derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 9, p. 2155–2158, 2014.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, dez. 1983.
- PARK, J. Y. et al. Chalcones isolated from *Angelica keiskei* inhibit cysteine proteases of SARS-CoV. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 31, n. 1, p. 23–30, 2016.
- REBOU, F.; BRYK, A. S. Síntese regioselectiva de cristais líquidos contendo o heterociclo isoxazol. 2008.
- SHEN, S. et al. Discovery of a New Isoxazole-3-hydroxamate-Based Histone Deacetylase 6 Inhibitor SS-208 with Antitumor Activity in Syngeneic Melanoma Mouse Models. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, n. 18, p. 8557–8577, 2019.
- SILVA, M. J. S. DA et al. Política de Atenção ao Câncer no Brasil após a Criação do Sistema Único de

Saúde Cancer Care Policy in Brazil after Creation of Unified Health System. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 63, n. 3, p. 177–187, 2017.

SUZUKI, Y.; SUGIYAMA, K.; FURUTA, H. Eugenol-Mediated Superoxide Generation and Cytotoxicity in Guinea Pig Neutrophils. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 39, n. 3, p. 381–386, 1985.

TWENTYMAN, P. R.; LUSCOMBE, M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. **British Journal of Cancer**, v. 56, n. 3, p. 279–285, 1987.

ULANOWSKA, M.; OLAS, B. Biological properties and prospects for the application of eugenol—a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 7, 2021.

UPADHYAY, A. et al. Isoxazole derivatives as a potential insecticide for managing *Callosobruchus chinensis*. **Journal of Pesticide Science**, v. 35, n. 4, p. 464–469, 2010.

VERA LÚCIA DE ALMEIDA, ANDREI LEITÃO, LUISA DEL CARMEN BARRETT REINA, C. A. M. E C. L. D. CÂNCER E AGENTES ANTINEOPLÁSICOS CICLO-CELULAR ESPECÍFICOS E CICLO-CELULAR NÃO ESPECÍFICOS QUE INTERAGEM COM O DNA: UMA INTRODUÇÃO. **Quimica Nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005.

VIRGIN, H. W.; WHERRY, E. J.; AHMED, R. Redefining Chronic Viral Infection. **Cell**, v. 138, n. 1, p. 30–50, 2009.

YADAV, P. et al. Green synthesis and anticancer potential of chalcone linked-1,2,3-triazoles. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 126, p. 944–953, 2017.

YAEGHOobi, M. et al. QSAR, in silico docking and in vitro evaluation of chalcone derivatives as potential inhibitors for H1N1 virus neuraminidase. **Medicinal Chemistry Research**, v. 25, n. 10, p. 2133–2142, 2016.

YANG, P. Y. et al. Butein Shows Cytotoxic Effects and Induces Apoptosis in Human Ovarian Cancer Cells. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 43, n. 4, p. 769–782, 2015.

ZHANG, T.; YAMAMOTO, N.; ASHIDA, H. Chalcones suppress fatty acid-induced lipid accumulation through a LKB1/AMPK signaling pathway in HepG2 cells. **Food and Function**, v. 5, n. 6, p. 1134–1141, 2014.

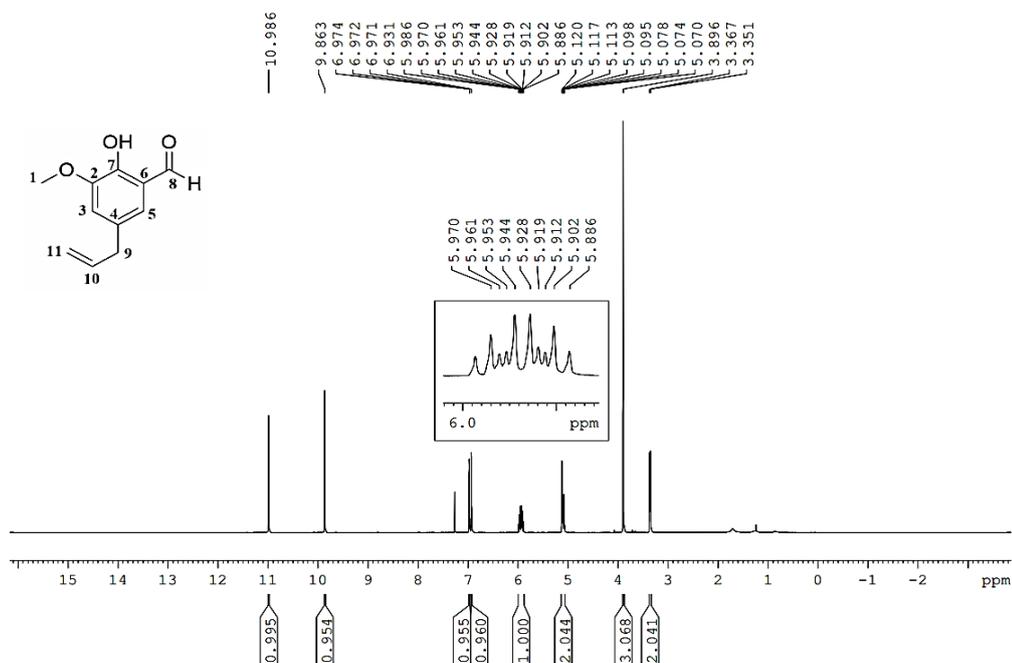
ZHOU, B. Diverse Molecular Targets for Chalcones with Varied Bioactivities. **Medicinal Chemistry**, v. 5, p. 388–404, 2015.

ZHU, J. et al. **The recent progress of isoxazole in medicinal chemistry** *Bioorganic and Medicinal Chemistry* Elsevier, , 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.05.013>>

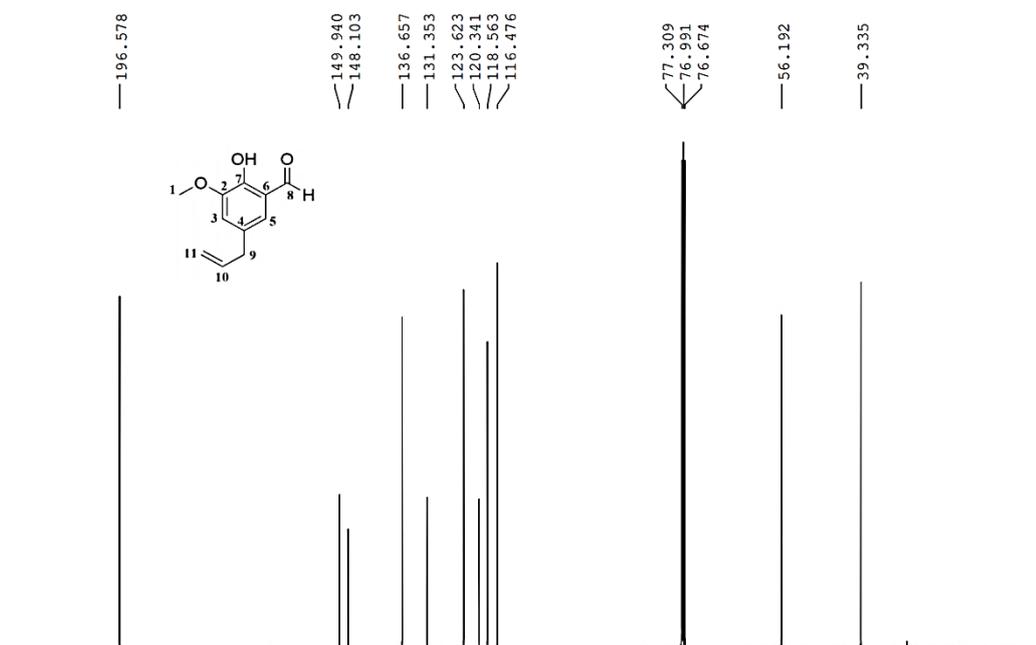
ZHUANG, C. et al. Chalcone: A Privileged Structure in Medicinal Chemistry. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 12, p. 7762–7810, 2017.

ANEXOS

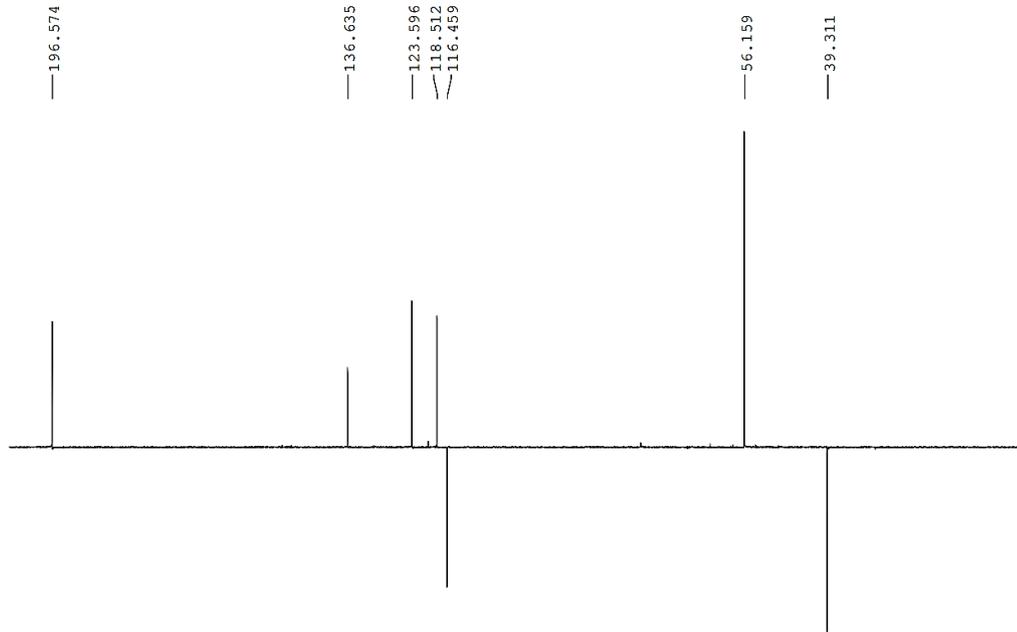
Anexo 1. Espectro de RMN de ^1H do derivado 3



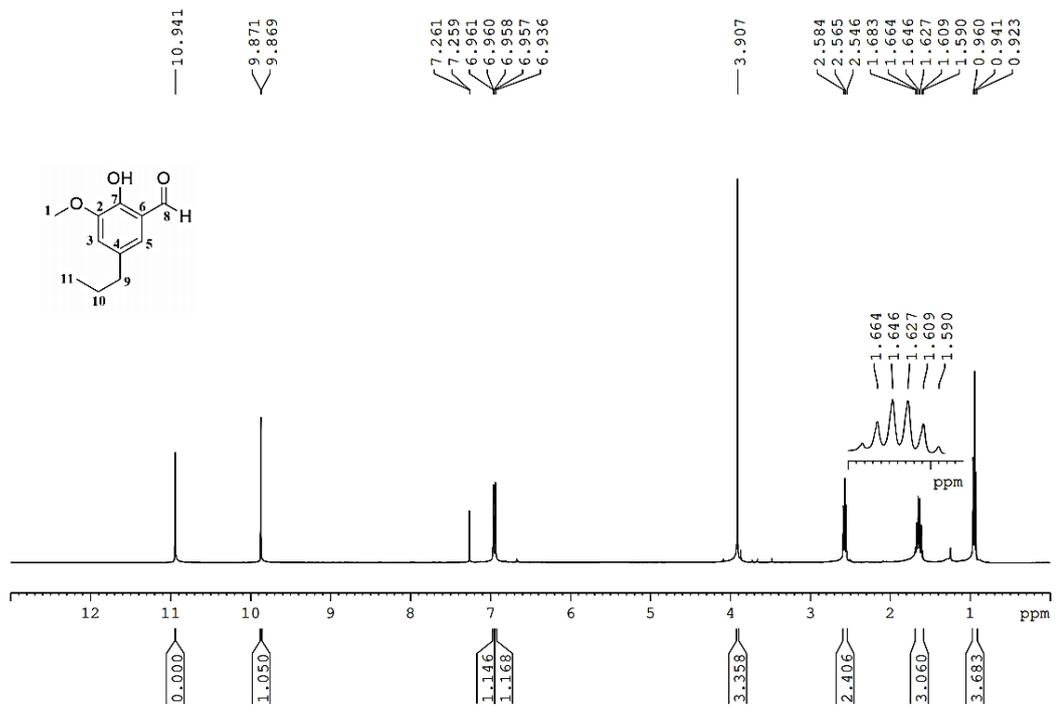
Anexo 2. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado 3

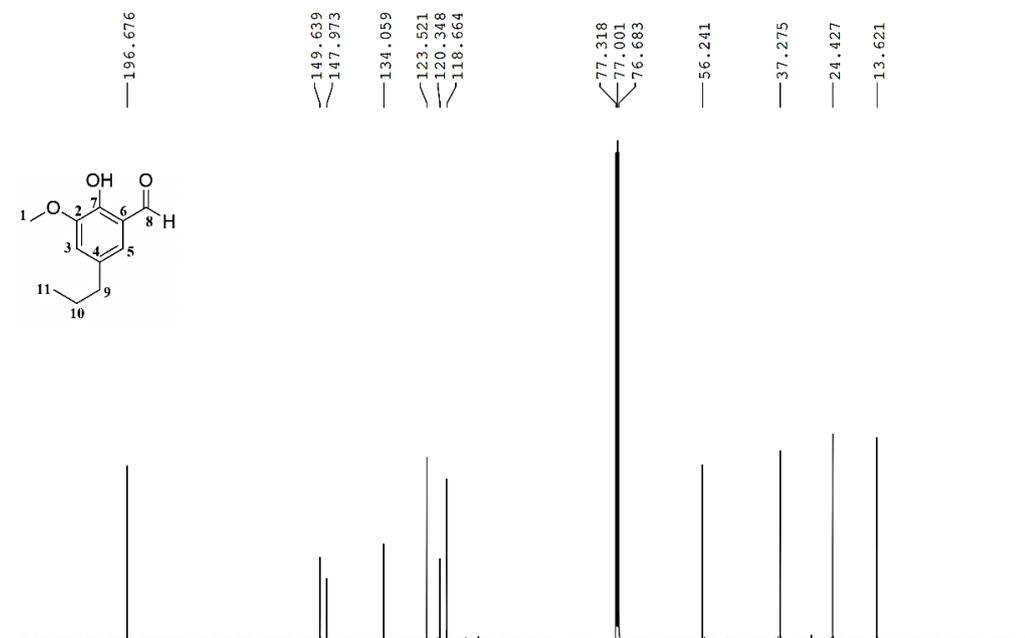
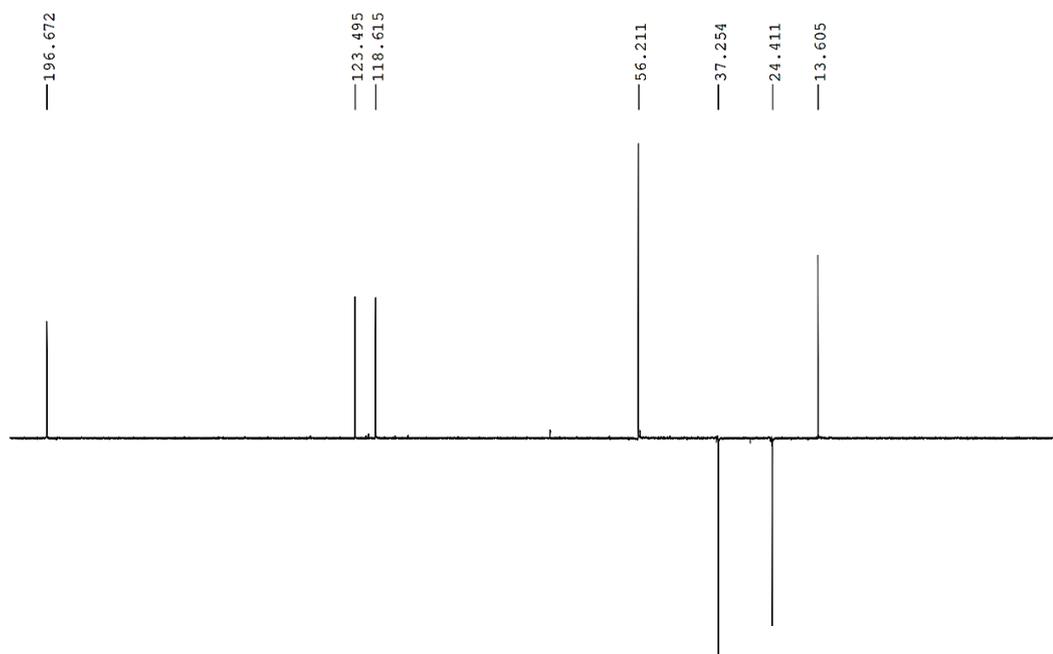


Anexo 3. Subespectro DEPT do derivado 3

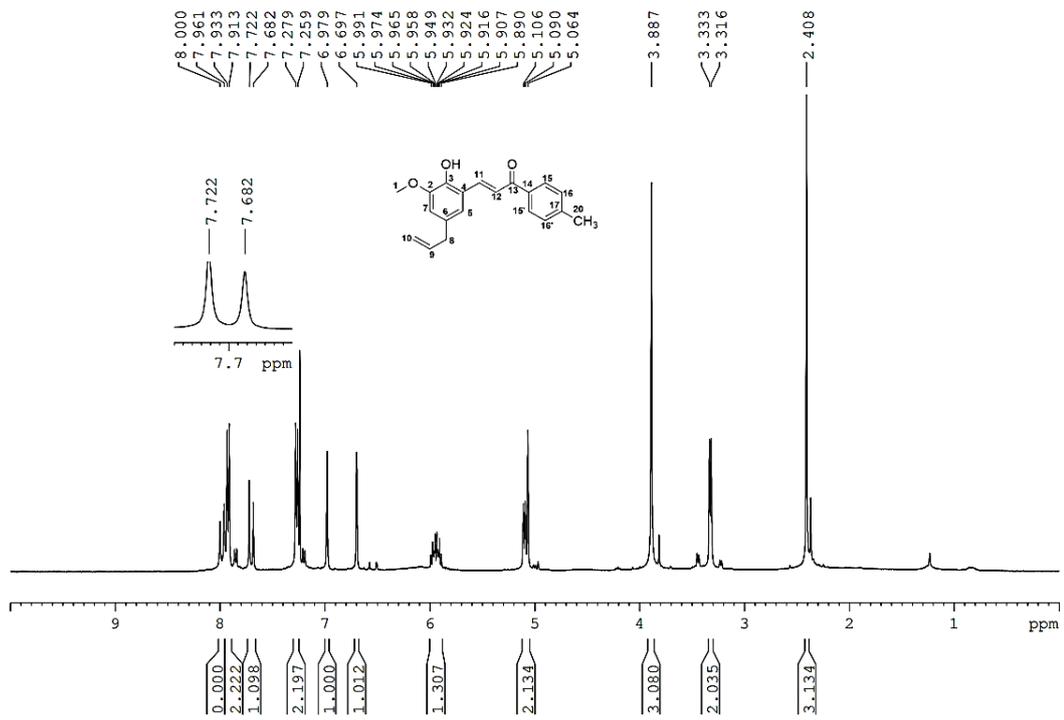


Anexo 4. Espectro de RMN de ¹H do derivado 4

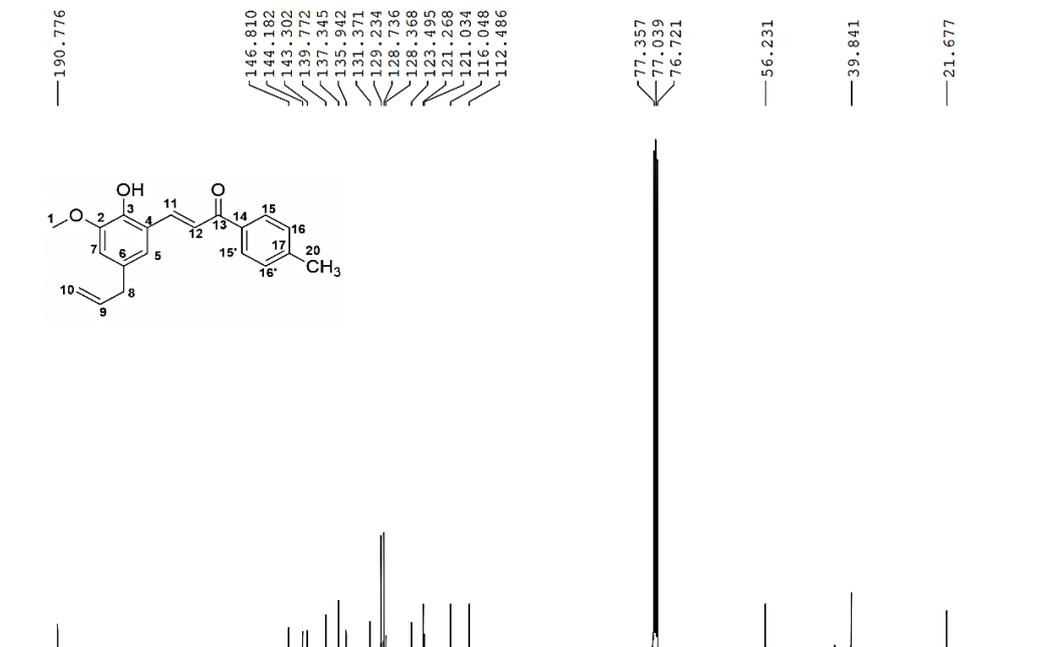


Anexo 5. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado 4**Anexo 6. Subespectro DEPT do derivado 4**

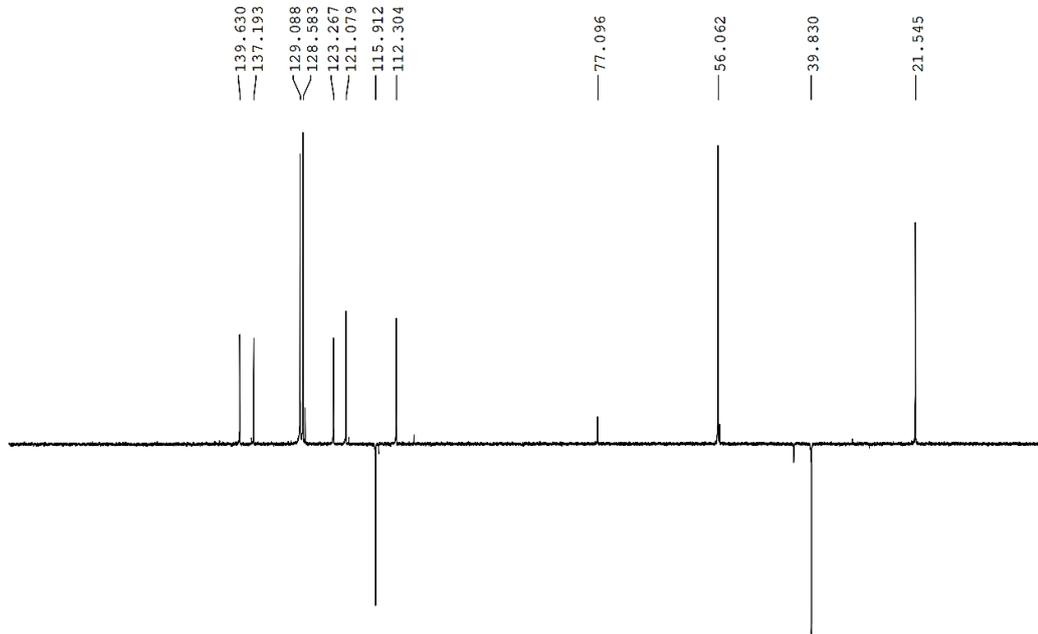
Anexo 7. Espectro de RMN ^1H do derivado 6



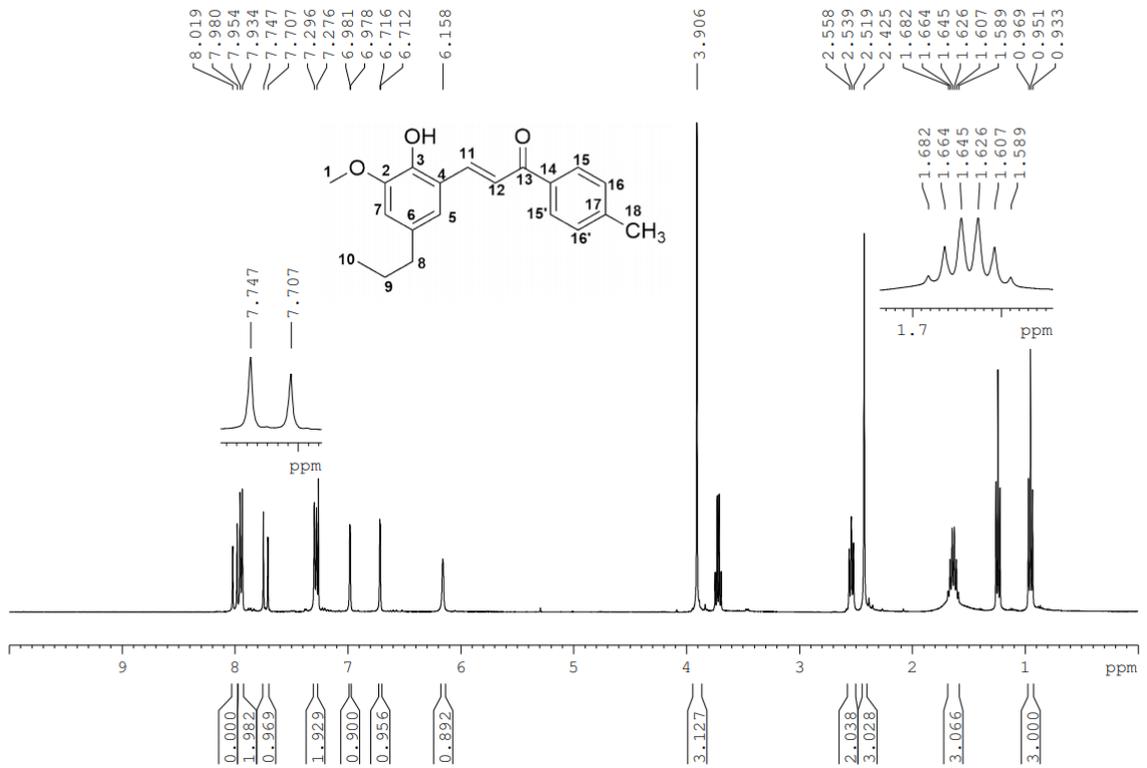
Anexo 8. Espectro de RMN ^{13}C do derivado 6



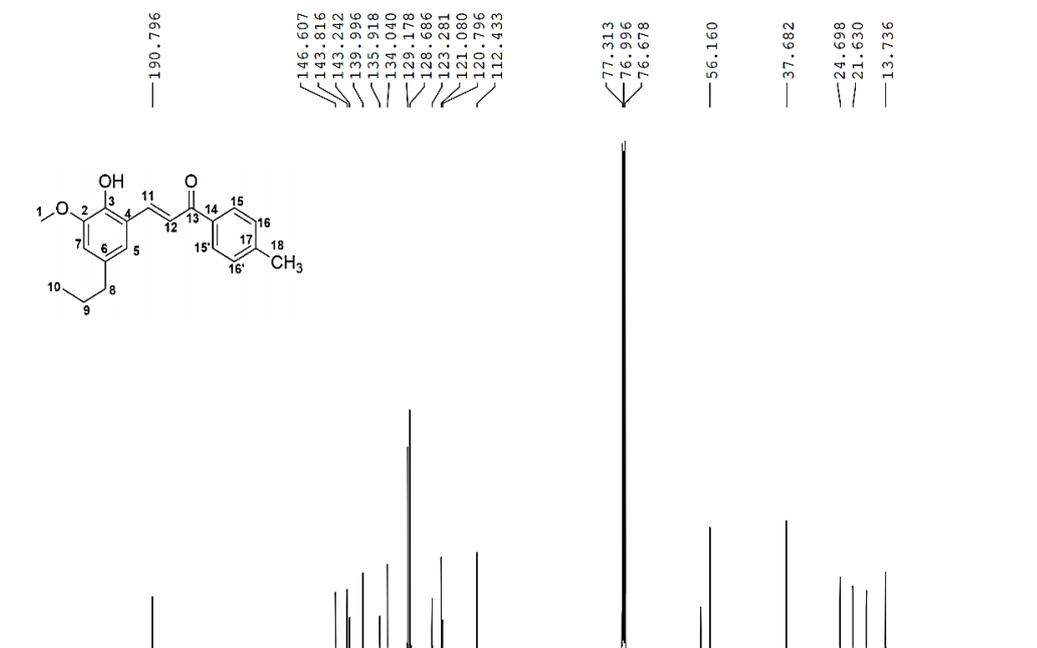
Anexo 9. Subespectro DEPT do derivado 6



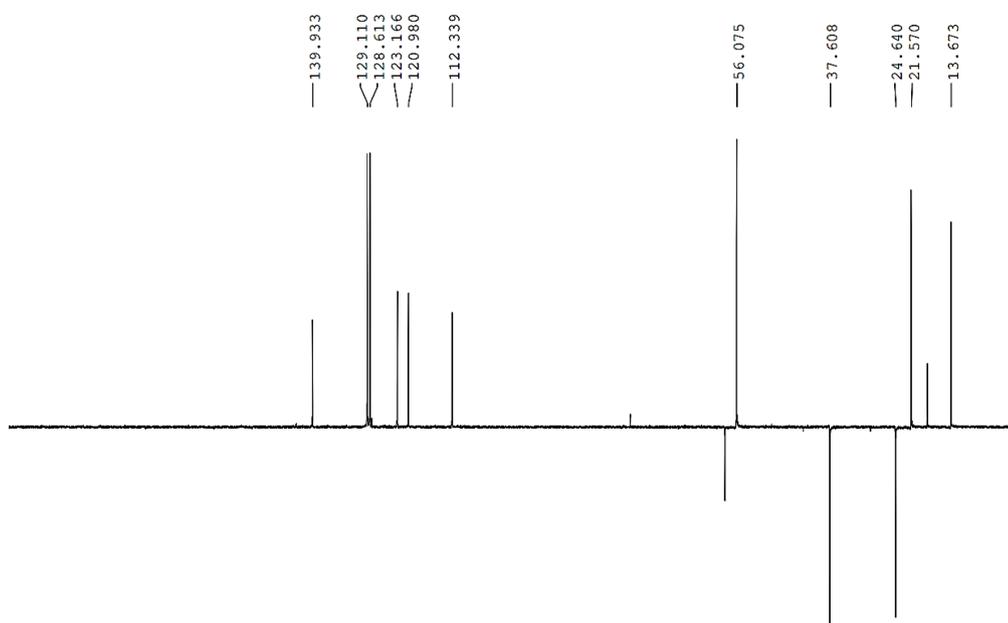
Anexo 10. Espectro de RMN ^1H do derivado 7



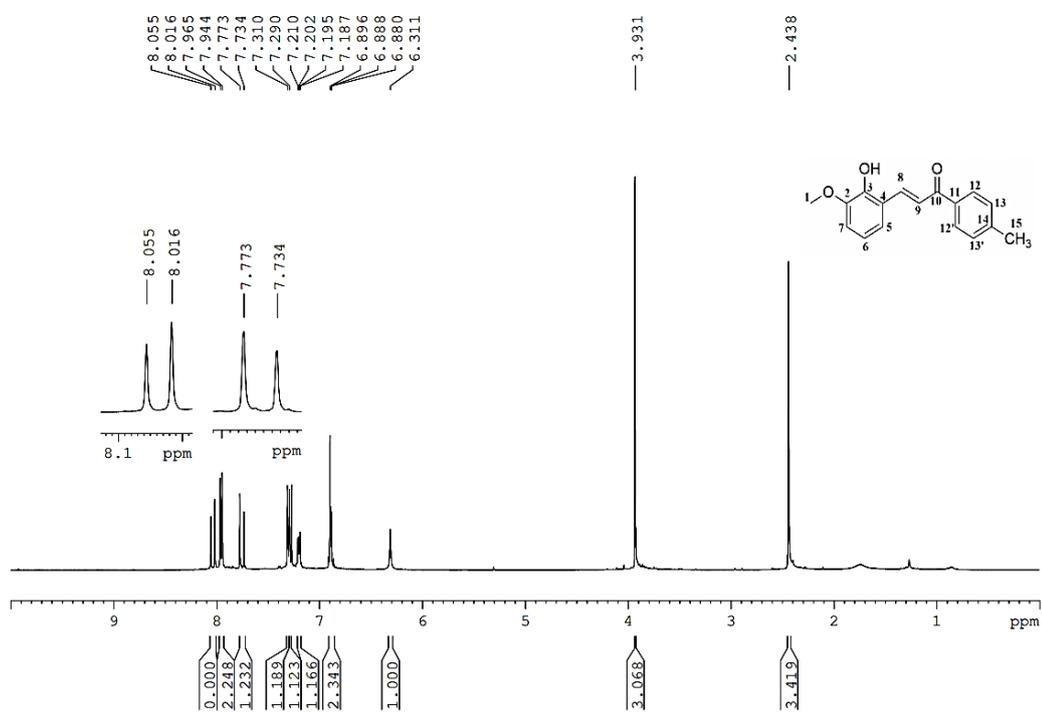
Anexo 11. Espectro de RMN ^{13}C do derivado 7



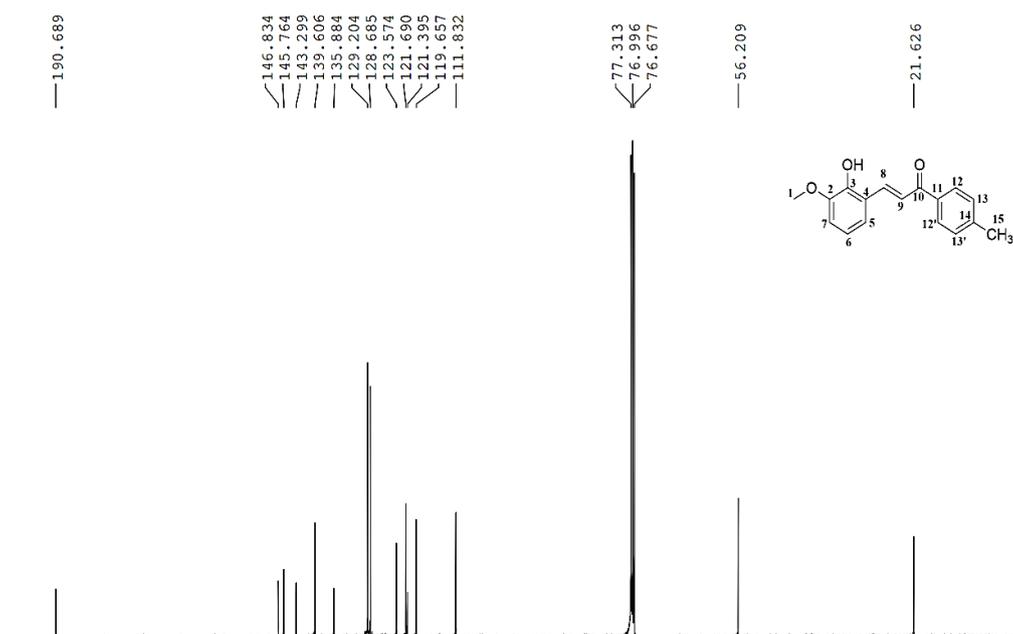
Anexo 12. Subespectro DEPT do derivado 7



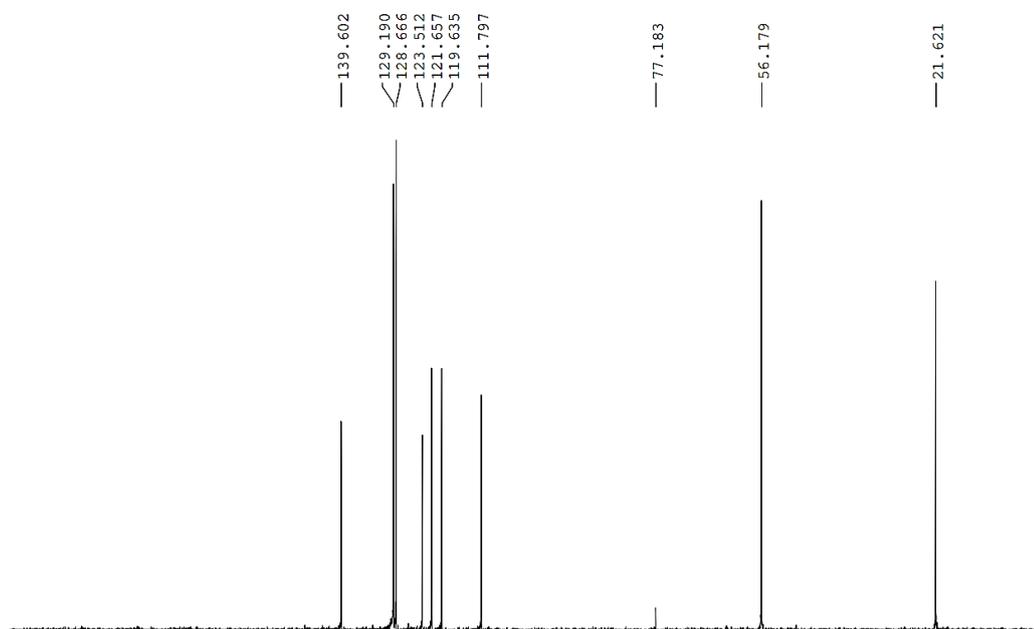
Anexo 13. Espectro de RMN ^1H do derivado 8



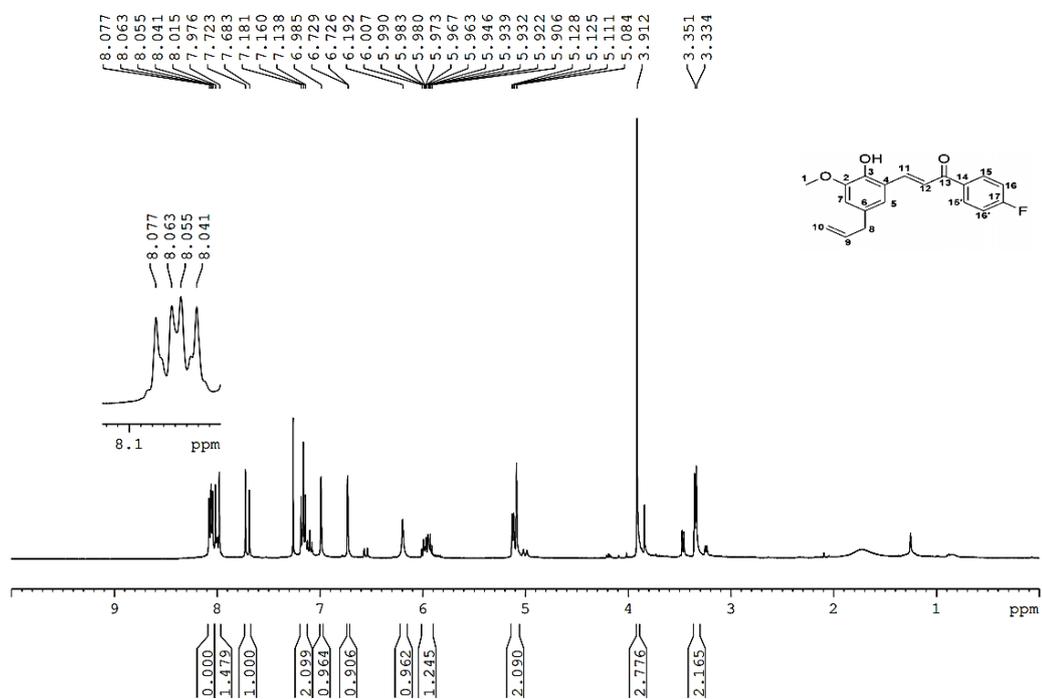
Anexo 14. Espectro de RMN ^{13}C do derivado 8



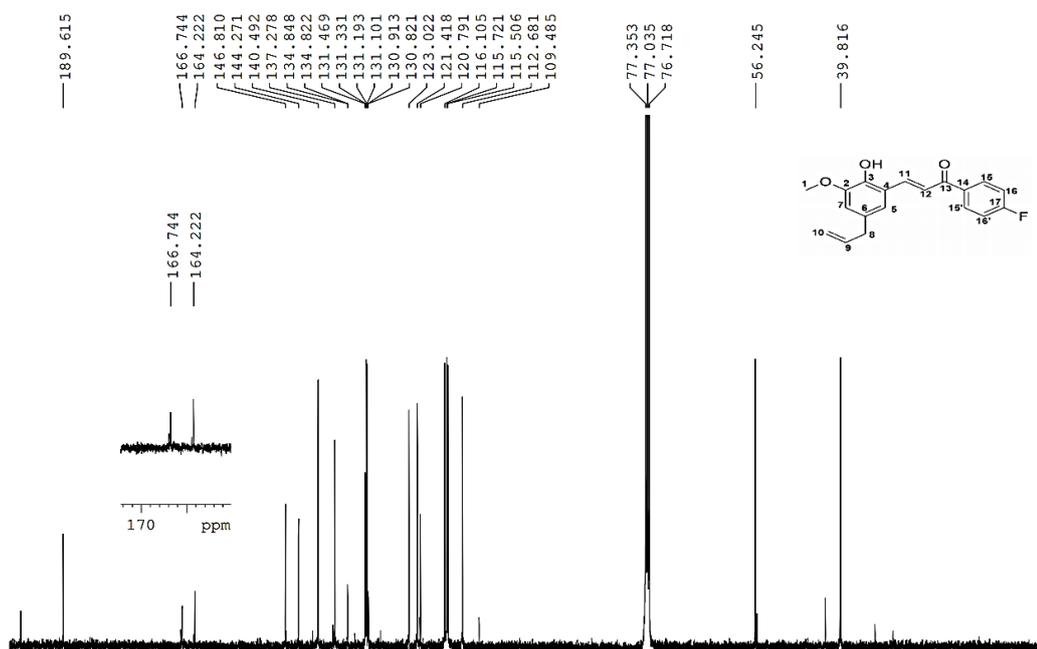
Anexo 15. Subespectro DEPT do derivado 8



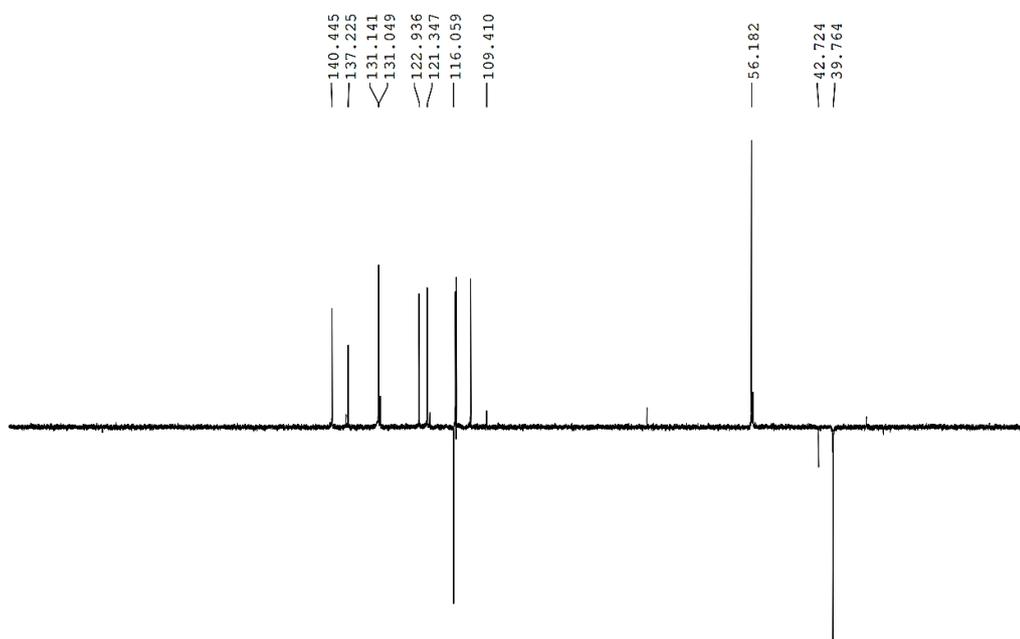
Anexo 16. Espectro de RMN ^1H do derivado 9



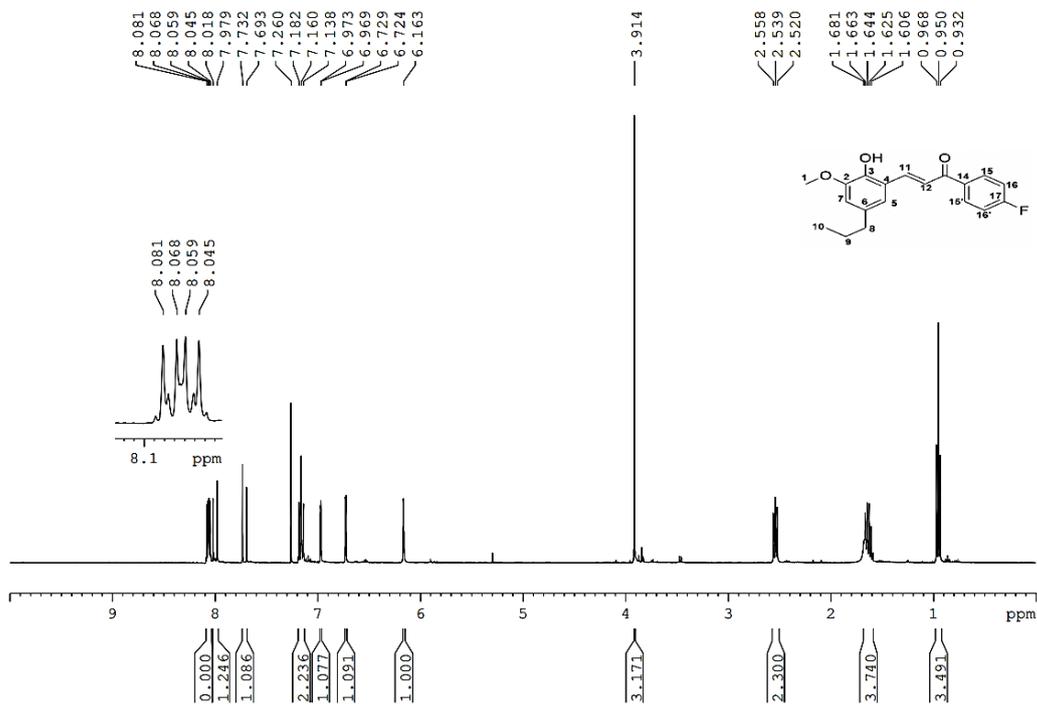
Anexo 17. Espectro de RMN ^{13}C do derivado 9



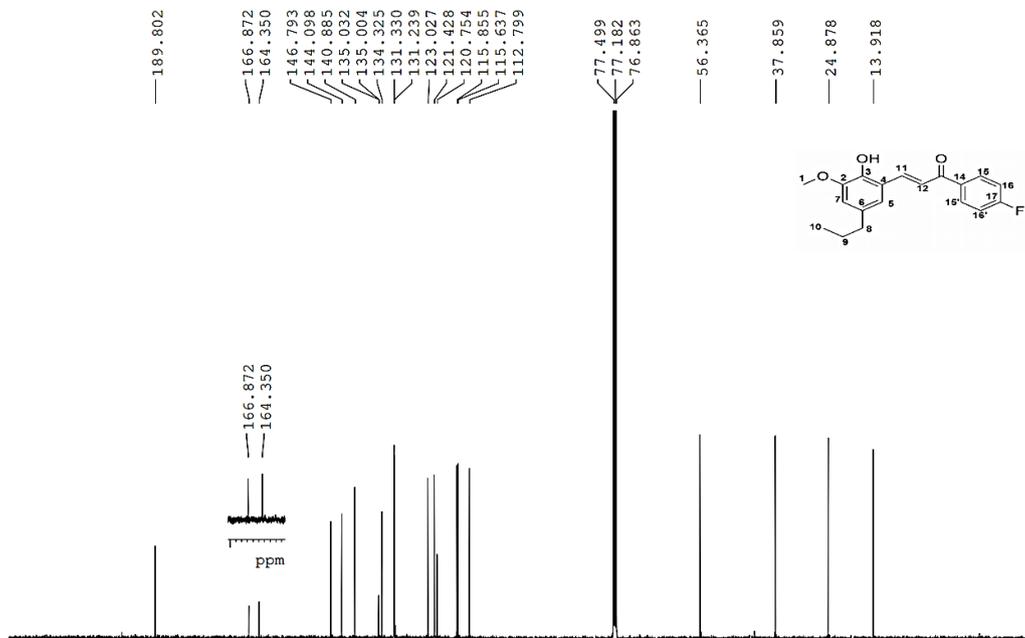
Anexo 18. Subespectro DEPT do derivado 9



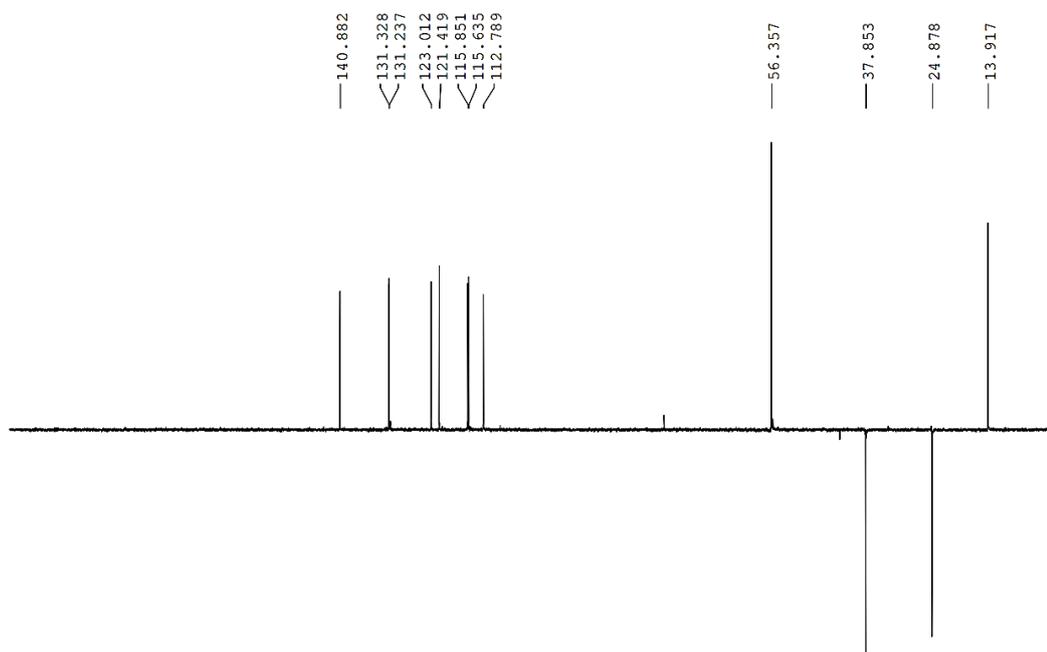
Anexo 19. Espectro de RMN de ^1H do derivado 10



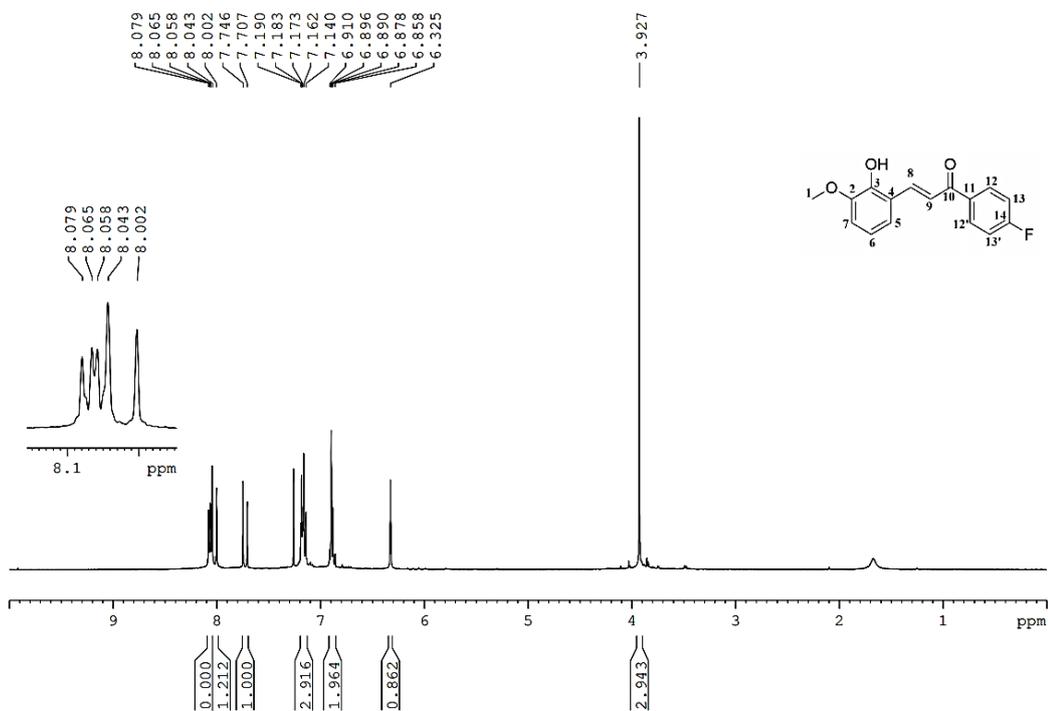
Anexo 20. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado 10

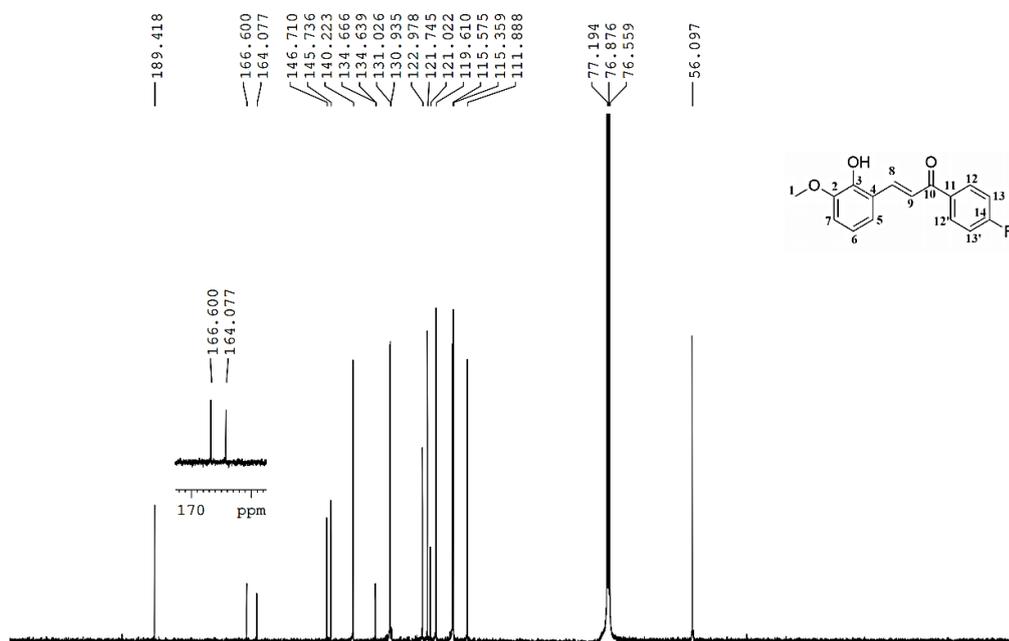
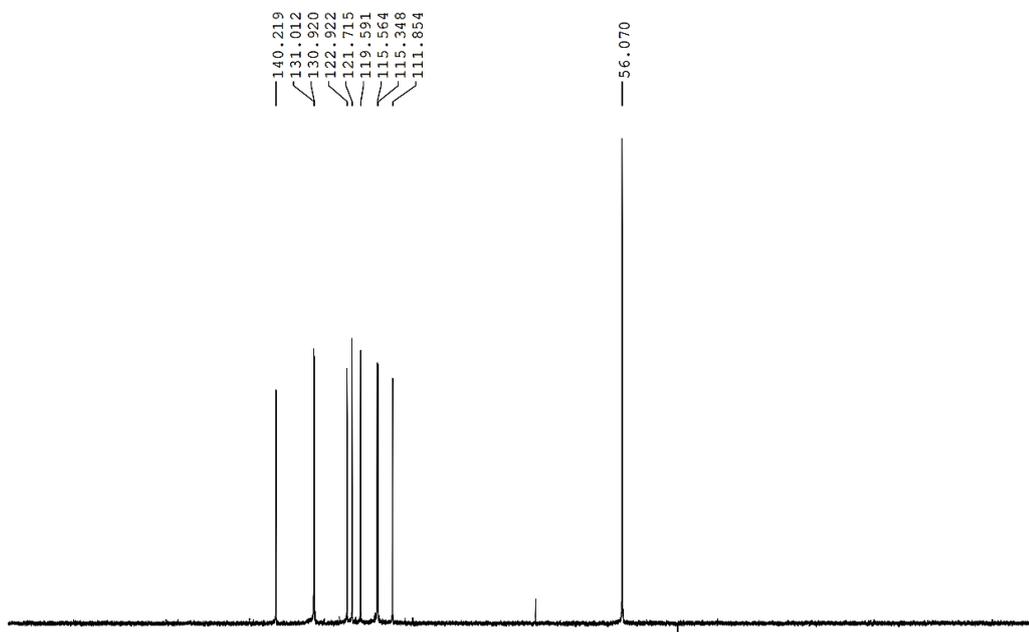


Anexo 21. Subespectro DEPT do derivado 10

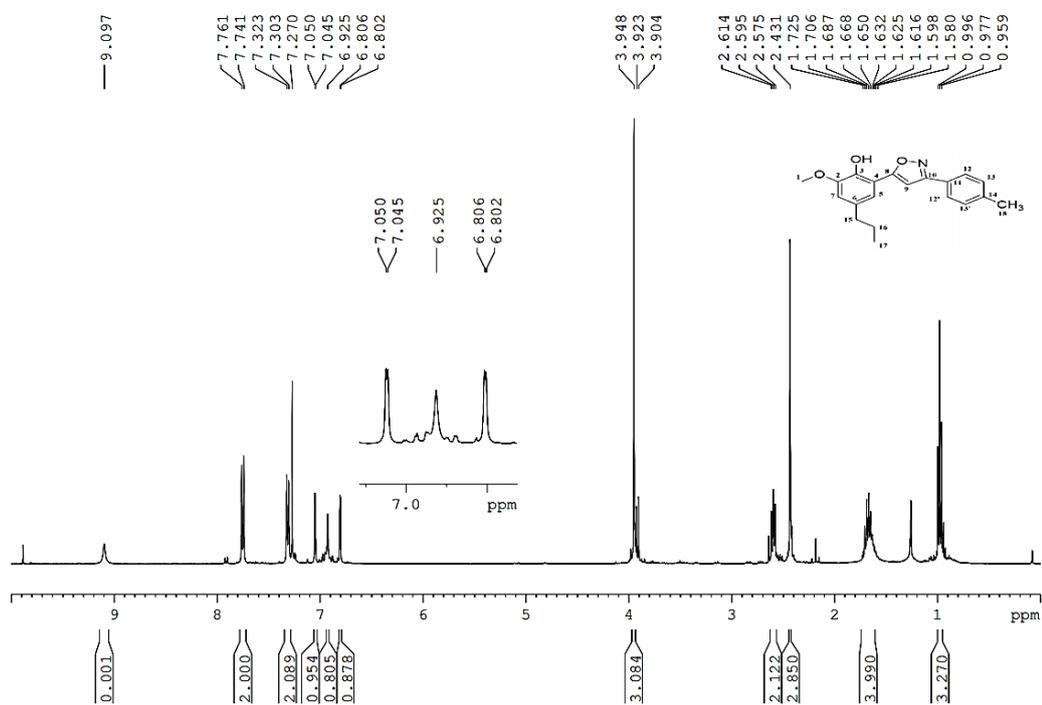


Anexo 22. Espectro de RMN de ^1H do derivado 11

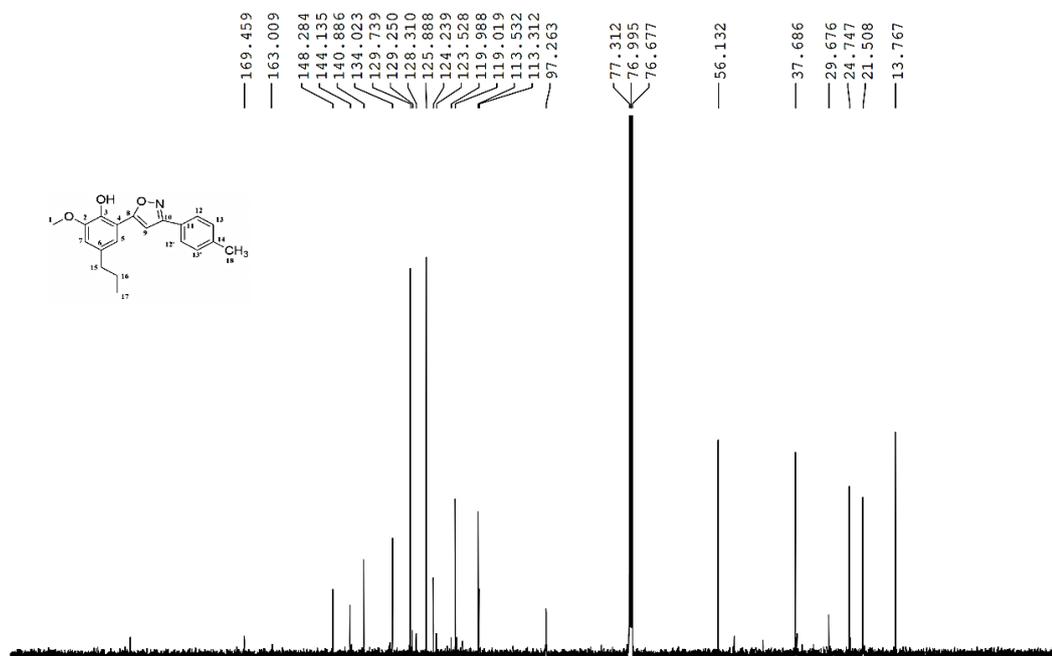


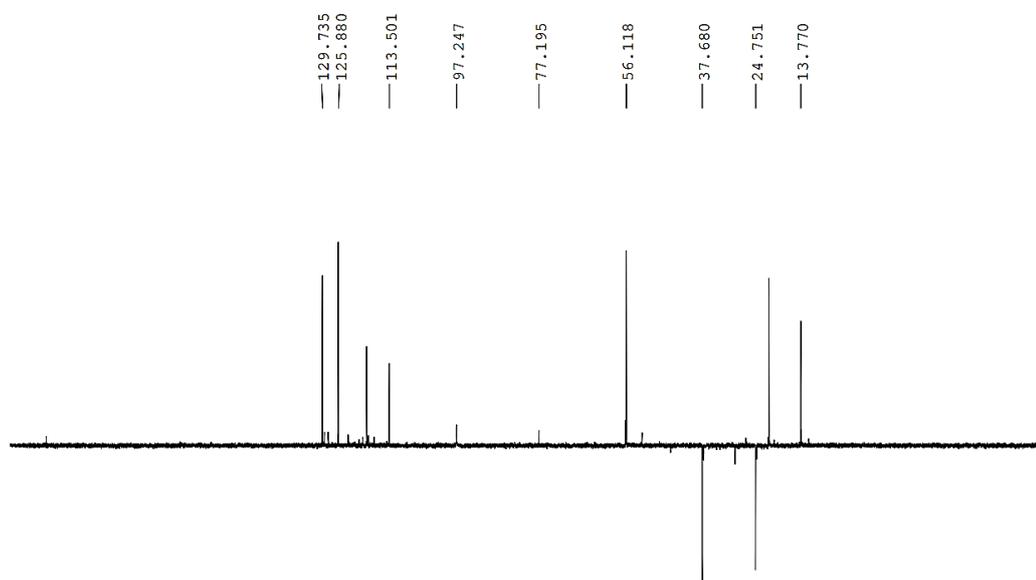
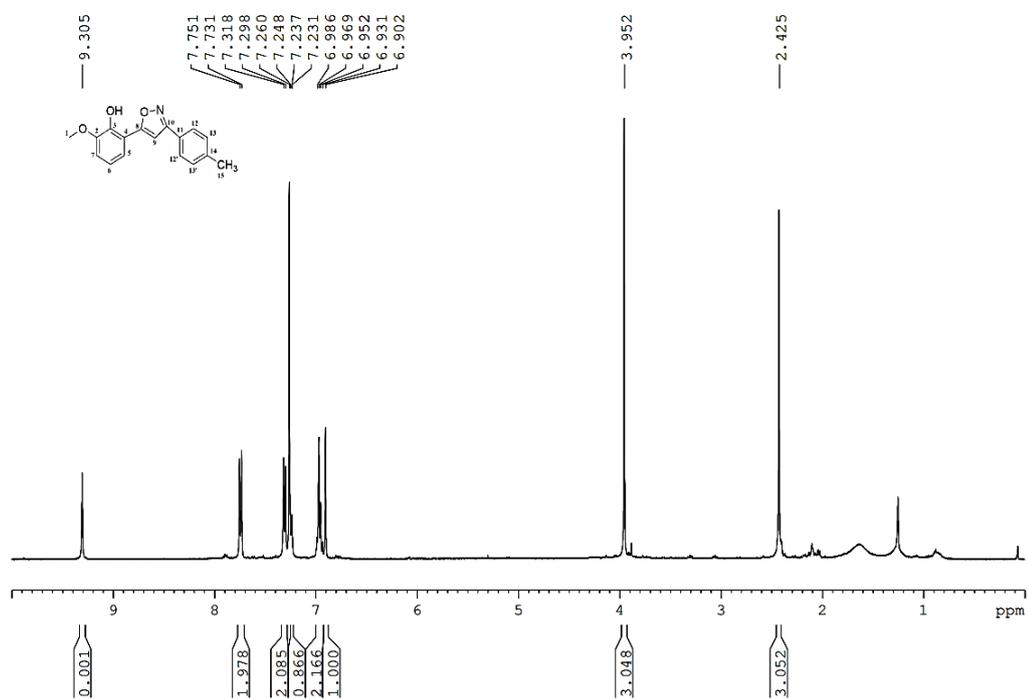
Anexo 23. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado **11****Anexo 24.** Subespectro DEPT do derivado **11**

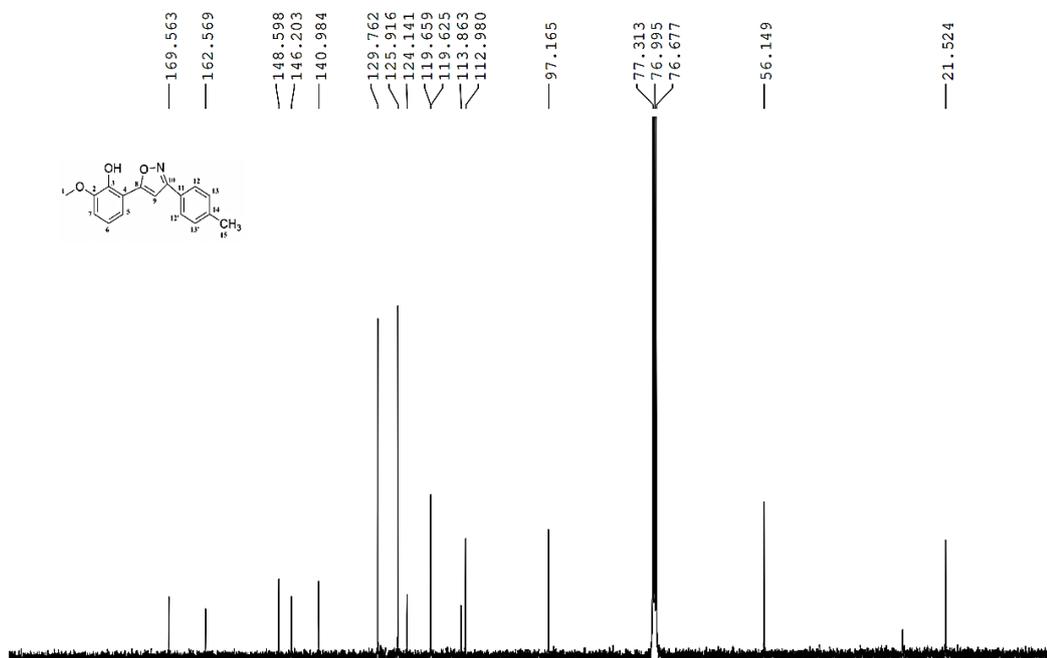
Anexo 25. Espectro de RMN de ^1H do derivado 13



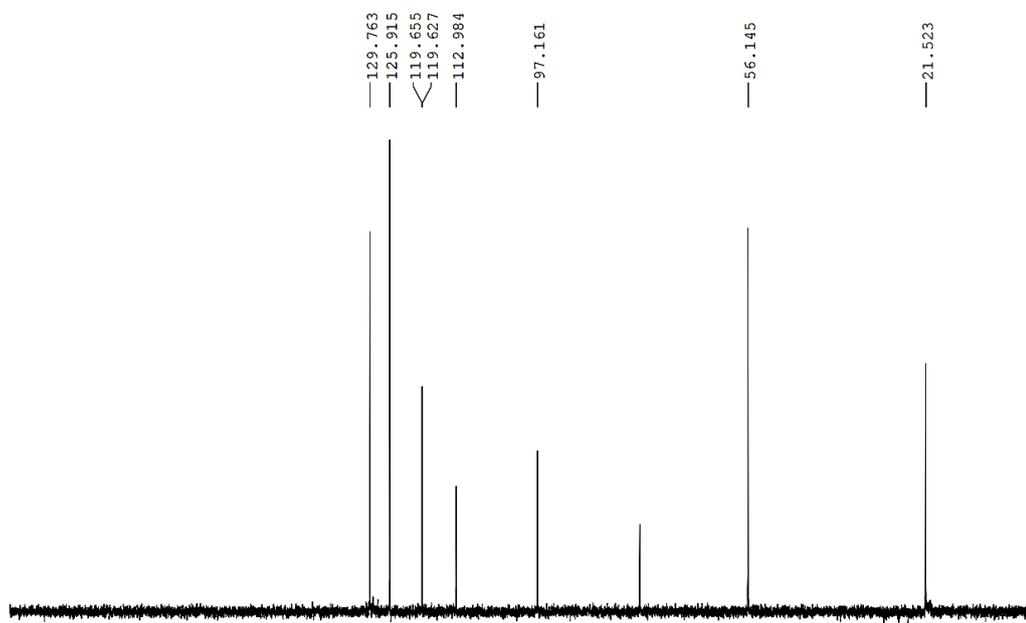
Anexo 26. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado 13



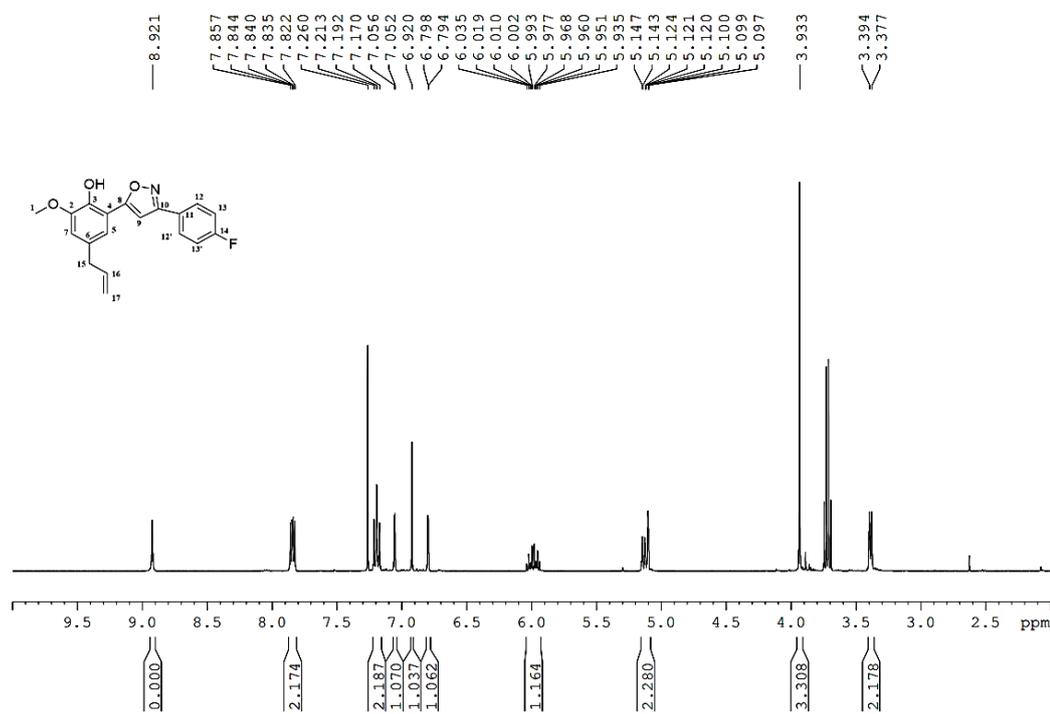
Anexo 27. Subespectro DEPT do derivado 13**Anexo 28. Espectro de RMN de ^1H do derivado 14**

Anexo 29. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado 14

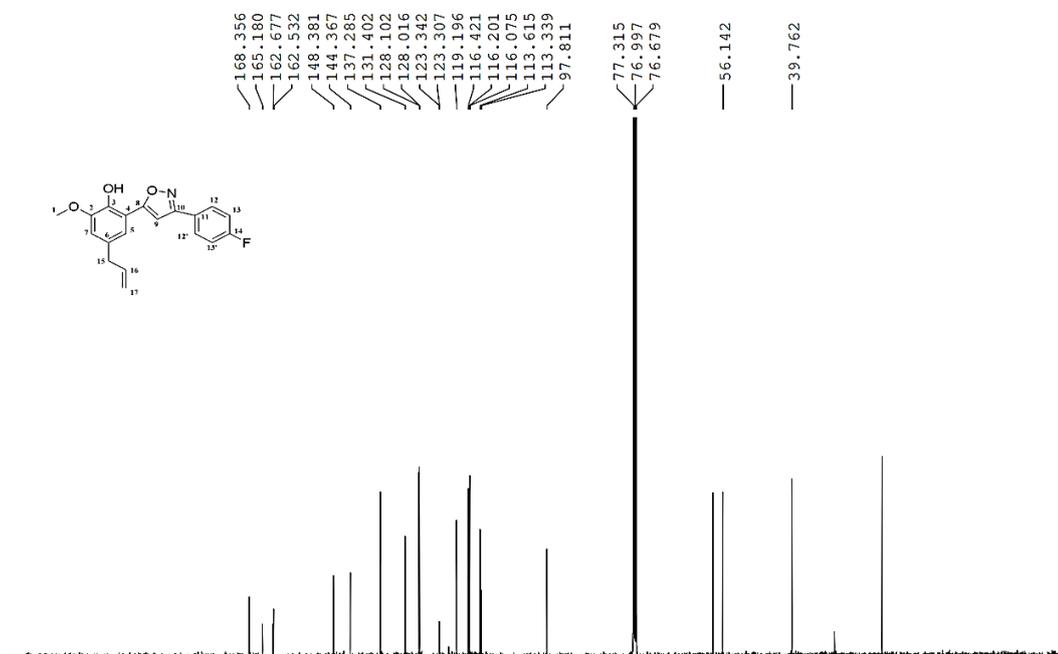
Anexo 30. Subespectro DEPT do derivado 14



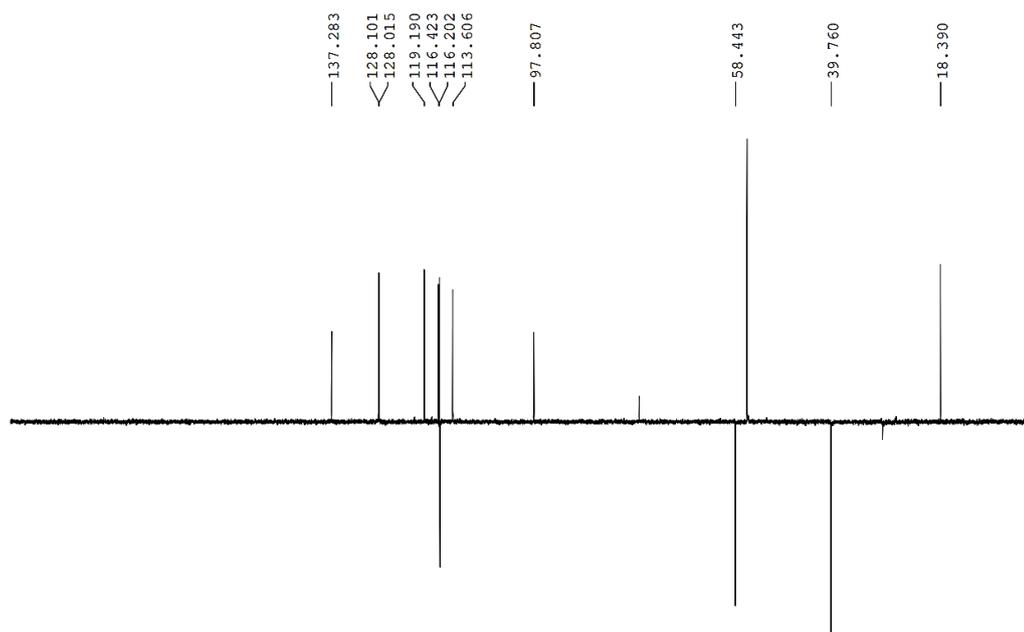
Anexo 31. Espectro de RMN de ^1H do derivado 15



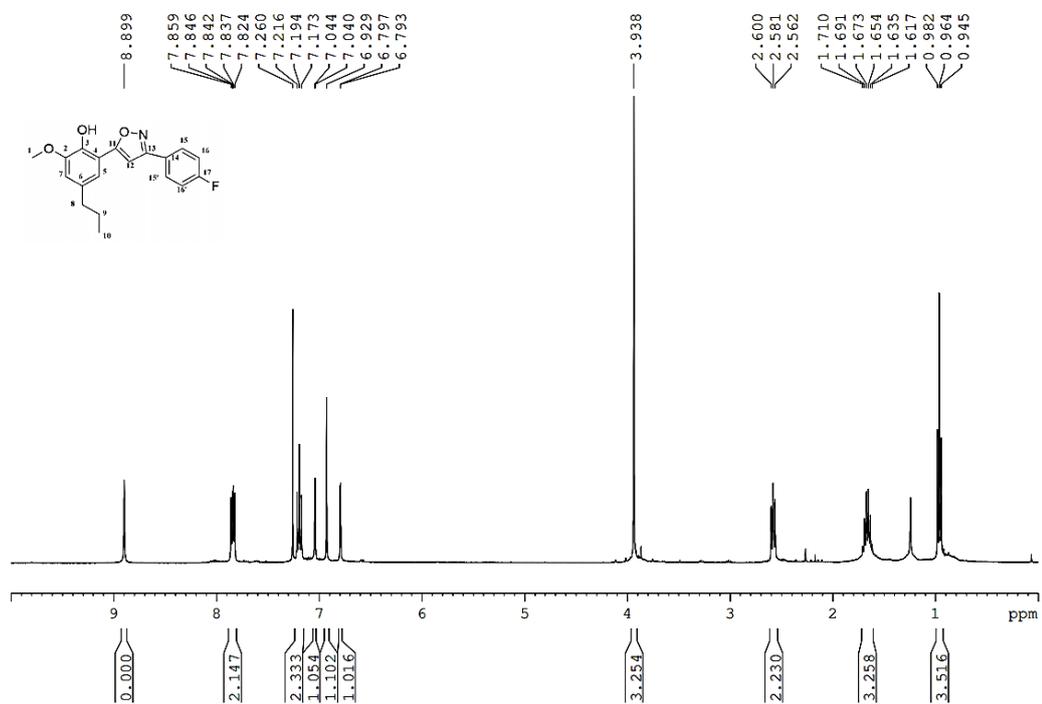
Anexo 32. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado 15



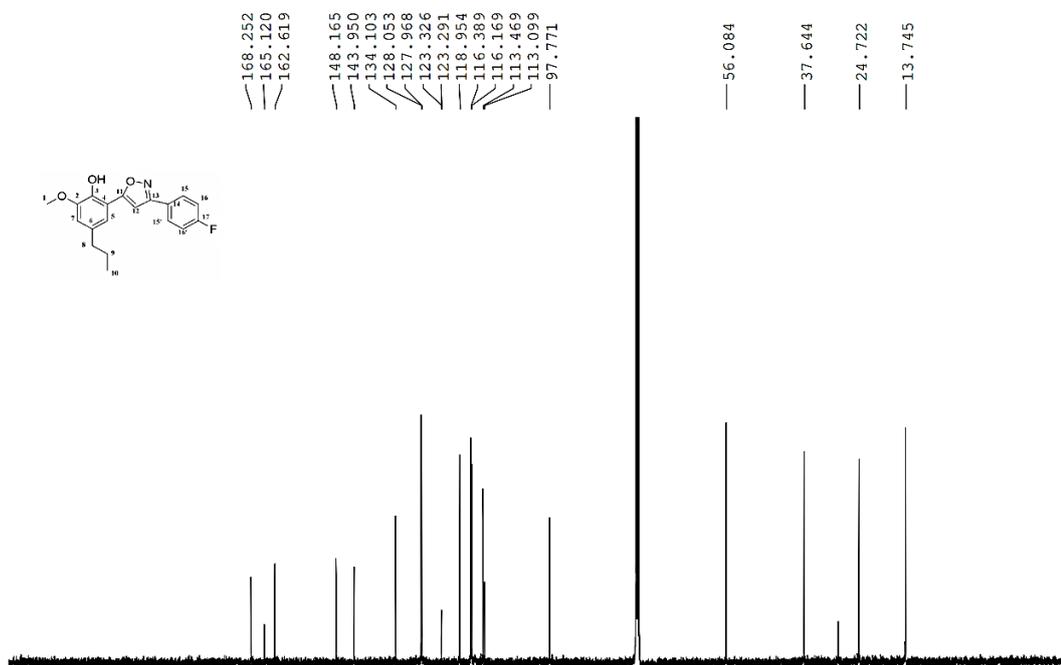
Anexo 33. Subespectro DEPT do derivado 15



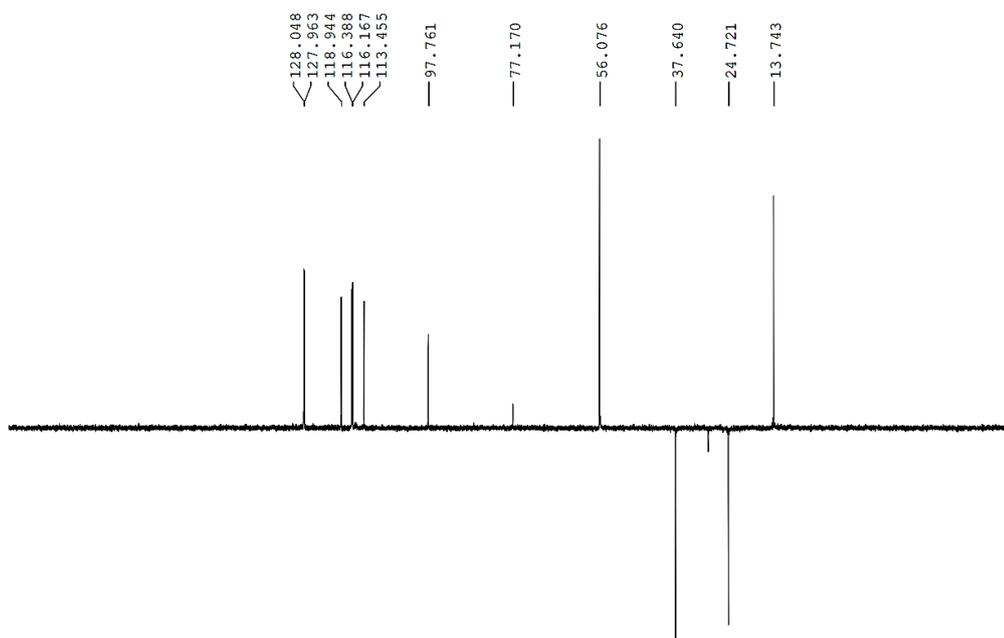
Anexo 34. Espectro de RMN de ^1H do derivado 16



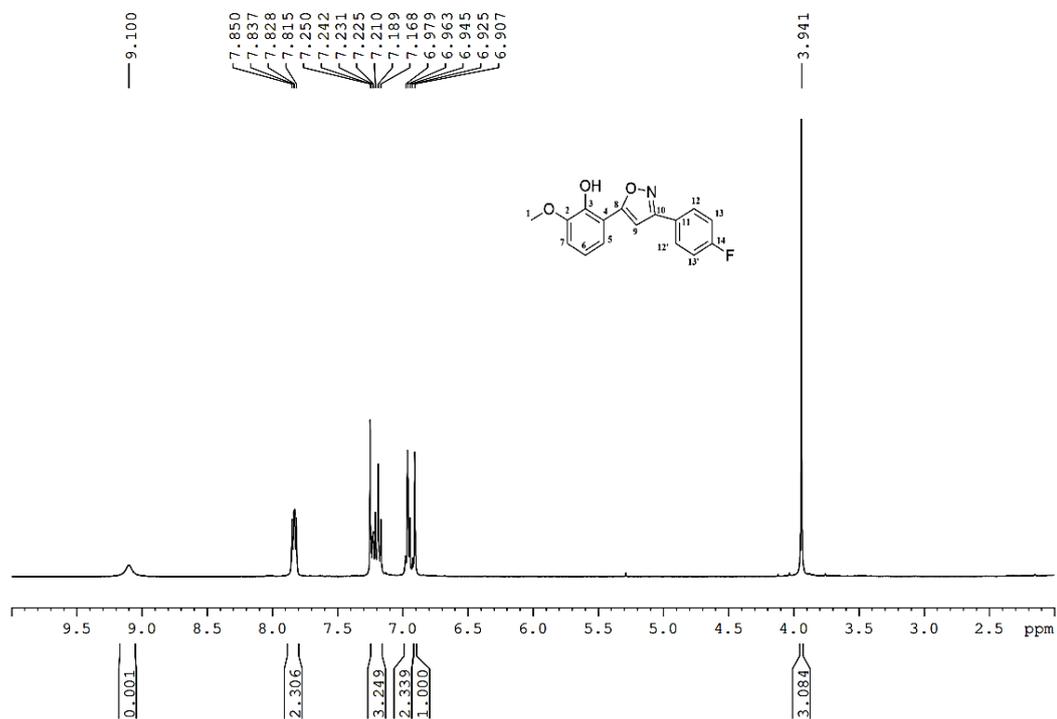
Anexo 35. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado 16



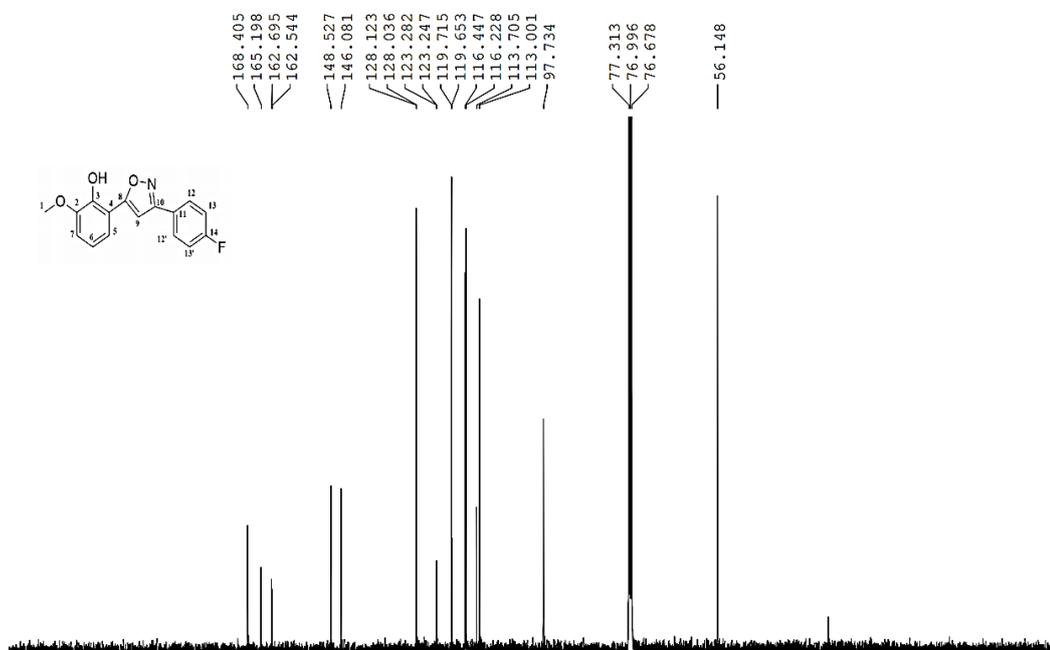
Anexo 36. Subespectro DEPT do derivado 16



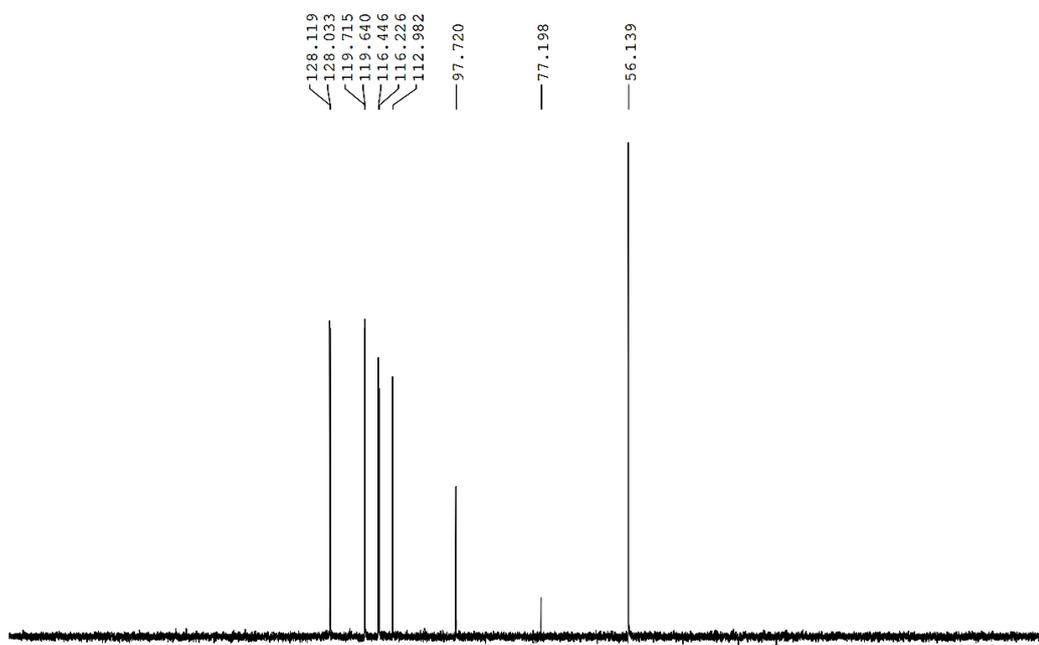
Anexo 37. Espectro de RMN de ^1H do derivado **17**



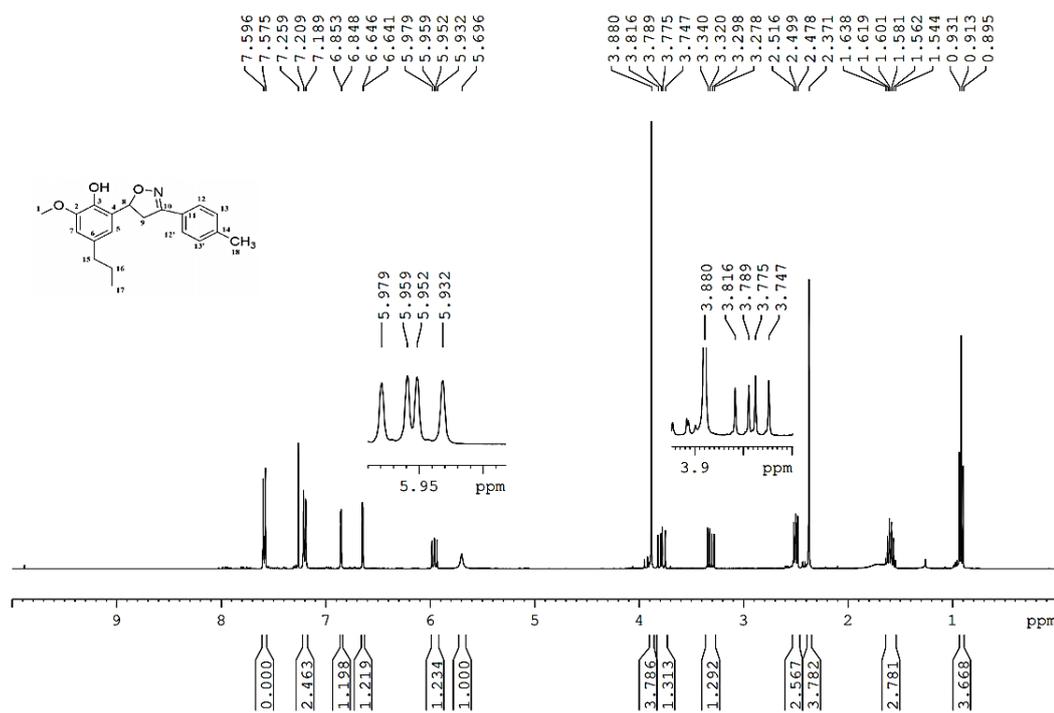
Anexo 38. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado **17**



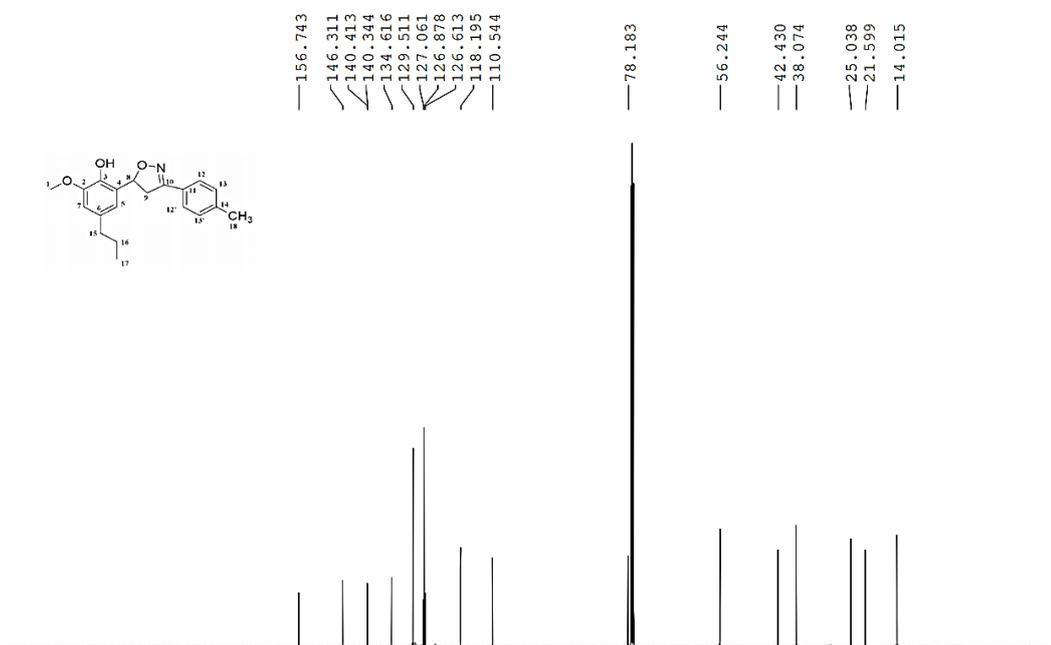
Anexo 39. Subespectro DEPT do derivado **17**



Anexo 40. Espectro de RMN de ^1H do derivado 18



Anexo 41. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado **18**



Anexo 42. Subespectro DEPT do derivado **18**

