



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIPROLIFERATIVA DE
CHALCONAS E DERIVADOS- *IN VITRO***

Maricelia Lopes dos Anjos

BELÉM - PA
2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIPROLIFERATIVA DE
CHALCONAS E DERIVADOS- *IN VITRO***

Autora: Maricelia Lopes dos Anjos

**Orientador: Prof. Dr. Heriberto
Rodrigues Bitencourt.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre.

BELÉM - PA
2020

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBDSistema
de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)**

Anjos, Maricelia Lopes dos.

Síntese, caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana e antiproliferativa de chalconas e derivados -in vitro / Maricelia Lopes dos Anjos. — 2020.
78 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Heriberto Rodrigues Bitencourt
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas, Belém, 2020.

1. antimicrobiana, antiproliferativa, chalconas. I.
Título.

CDD 615.19

FOLHA DE APROVAÇÃO

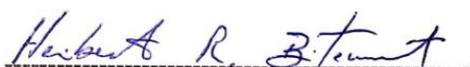
Maricelia Lopes dos Anjos

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIPROLIFERATIVA DE CHALCONAS E DERIVADOS- *IN* *VITRO*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em: 21 de dezembro de 2020

Banca Examinadora



Prof. Dr. Heriberto Rodrigues Bitencourt (PPGCF/UFPA)
Orientador

Prof. Dr. Andrey Moacir do Rosário Marinho (PPGQ/UFPA)
1º Examinador

Prof. Dr. Alejandro Ferraz do Prado (PPGCF/UFPA)
2º Examinadora

DEDICATÓRIA

A Deus, por ser essencial em minha vida e a meus pais (*in memoriam*), por me ensinarem a lutar e nunca desistir.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus e nossa senhora de Nazaré, por toda proteção e graças alcançadas.

As minhas filhas Marcely, Manuelle e Maria Clara.

Ao meu marido Marileno e meus queridos irmãos Evandro e Marilúcia, por estarem ao meu lado em todos os momentos, sempre me incentivando.

Aos meus pais (*in memorian*), que me ensinaram a nunca desistir diante dos obstáculos da vida, sempre com muita fé em Deus.

Ao meu orientador Prof. Dr. Heriberto R. Bitencourt, pela oportunidade em desenvolver este trabalho. Agradeço por todos os ensinamentos, pela dedicação. Enfim, por tudo.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Ao PPGCF na Universidade Federal do Pará por esta oportunidade para que eu pudesse realizar essa pós-graduação. Proporcionaram-me conhecimento técnico e científico.

Ao laboratório de ensaios *in vitro* de microbiologia-LABEIM, em especial a colega Rose, pelos testes microbiológicos.

Ao Núcleo de pesquisa em Oncologia, em especial a amiga Natasha e o Prof. Dr. André Kayat, pelo ensaio citotóxico.

A todos os meus colegas de laboratório e amigos, Simone, Carlos, Jefferson e Lorena.

Ninguém vence sozinho... OBRIGADA A TODOS!

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

RESUMO

ANJOS, M.L. Síntese, caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana e antiproliferativa de chalconas e derivados- *In vitro*. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2020.

No presente trabalho realizamos a síntese, caracterização e avaliação de atividades antimicrobiana e antiproliferativa de chalconas e derivados- *in vitro*. O interesse pela obtenção de chalconas se deve as inúmeras atividades farmacológicas descritas na literatura para essas classes de compostos que são intermediários dos flavonoides. Dessa forma a síntese e caracterização de várias chalconas e derivados se tornam importantes para o desenvolvimento de compostos com atividade antimicrobiana e antiproliferativa. Foram sintetizadas dez substâncias, contendo sete chalconas e três naftoflavanonas, obtidas pela reação de condensação aldólica de Claisen Schmidt entre acetofenonas e aldeídos, em condições de temperatura ambiente ou com aquecimento. Os rendimentos variaram entre 65,35% e 97,45%. Sendo caracterizadas e confirmadas por meio de técnicas espectroscópicas. A atividade antimicrobiana *in vitro* foi analisada nas cepas: *Staphylococcus aureus*; *Enterococcus faecalis*; *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, seguindo o protocolo de microdiluição, porém seu resultado de inibição não foi satisfatório. Todas substâncias foram submetidas ao ensaio de viabilidade celular (MTT), para a avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro*, em linhagem tumoral gástrica (AGP01), com comparação de dose resposta à linhagem celular normal de pulmão (MRC-5). As substâncias AMB, 34M, MEB, PEB e EBA, apresentaram atividade citotóxica significativas. O que pode representar novas possibilidades farmacológicas, até pelo fato, das mesmas não terem sido testadas nesta linhagem de célula.

Palavras-chaves: Antimicrobiana; Antiproliferativa; AGP01; Chalconas.

ABSTRACT

ANJOS, M.L. Synthesis, characterization and evaluation of the antimicrobial and antiproliferative activity of chalcones and derivatives- *In vitro*. Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pará, Belém, 2020.

In the present work we perform the synthesis, characterization and evaluation of antimicrobial and antiproliferative activities of chalcones and derivatives - *in vitro*. The interest in obtaining chalcones is due to the numerous pharmacological activities described in the literature for these classes of compounds that are intermediates for flavonoids. Thus, the synthesis and characterization of various chalcones and derivatives become important for the development of compounds with antimicrobial and antiproliferative activity. Ten substances were synthesized, containing seven chalcones and three naphthoflavanones, obtained by the Claisen Schmidt aldolic condensation reaction between acetophenones and aldehydes, at room temperature or with heating. Yields varied between 65.35% and 97.45%. Being characterized and confirmed by spectroscopic techniques. The antimicrobial activity *in vitro* was analyzed in the strains: *Staphylococcus aureus*; *Enterococcus faecalis*; *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, following the microdilution protocol, however their inhibition result was not satisfactory. All substances were submitted to the cell viability test (MTT), to evaluate the antiproliferative activity *in vitro*, in gastric tumor line (AGP01), with comparison of dose response to the normal lung cell line (MRC-5). The substances AMB, 34M, MEB, PEB and EBA, showed significant cytotoxic activity. Which may represent new pharmacological possibilities, even because they have not been tested in this cell line.

Keywords: Antimicrobial; Antiproliferative; AGP01; Chalcones.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estruturas químicas das classes dos flavonoides.	17
Figura 2 -	Equação química da chalcona por condensação de Claisen-Schmidt.	18
Figura 3 -	Estruturas de Licochalconas A e C.	21
Figura 4 -	2'4'- dihidroxichalcona e isoliquiritigenina	22
Figura 5 -	Chalconas (3), (4), (5) e (6).	22
Figura 6 -	Gráfico: Taxas brutas de incidência estimadas para 2020 por sexo, segundo Estado e capital*	24
Figura 7 -	Chalconas com atividades citotóxicas.	25
Figura 8 -	Esquema do Procedimento geral das sínteses.	30
Figura 9 -	Esquema de Microdiluição.	35
Figura 10-	Esquema de preparo de microdiluições seriadas de inóculos bacterianos.	36
Figura 11-	Esquema geral do ensaio antimicrobiano.	37
Figura 12-	Redução do MTT por enzimas mitocondriais;	38
Figura 13-	Expansão do espectro de RMN ¹ H (400MHz, CDCl ₃) de EBA	59
Figura 14-	Expansão do espectro de RMN ¹ H (400MHz, CDCl ₃) de AMB	59
Figura 15-	Expansão do espectro de RMN ¹ H (400MHz, CDCl ₃) de MEB	60
Figura 16-	Expansão do espectro de RMN ¹ H (400MHz, CDCl ₃) de PEB.	60
Figura 17-	Expansão do espectro de RMN ¹ H (400MHz, CDCl ₃) de 4G3.	61
Figura 18-	Expansão do espectro de RMN ¹ H (400MHz, CDCl ₃) de 34M.	61
Figura 19-	Expansão do espectro de RMN ¹ H (400MHz, CDCl ₃) de OPC	62
Figura 20-	Expansão do espectro de RMN ¹ H (400MHz, CDCl ₃) de A1.	62
Figura 21-	Expansão do espectro de RMN ¹ H (400MHz, CDCl ₃) de A3.	63
Figura 22-	Expansão do espectro de RMN ¹ H (400MHz, CDCl ₃) de A3.	63
Figura 23-	Espectro RMN ¹ H (300MHz, CDCl ₃) de A5.	64
Figura 24-	Expansão do espectro RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) expandido de A5.	65
Figura 25-	Espectro RMN ¹³ C (75MHz, CDCl ₃) expandido de A5.	66
Figura 26-	Espectro DEPT (75MHz, CDCl ₃) de A5.	67
Figura 27-	Correlação HETCOR (75MHz, CDCl ₃) de A5.	68
Figura 28-	Correlação HETCOR (75MHz, CDCl ₃) expandido de A5.	69
Figura 29-	Expansão do mapa de contornos COSY (300 MHz, CDCl ₃) de A5.	70
Figura 30-	Expansão do mapa de contornos COSY (300 MHz, CDCl ₃) de A5.	71
Figura 31-	Espectro de HMBC (300 MHz, CDCl ₃) expandido de A5.	72
Figura 32-	Espectro RMN ¹³ C (100MHz, CDCl ₃) expandido de EBA.	73
Figura 33-	Espectro RMN ¹³ C (100MHz, CDCl ₃) expandido de EBA.	<u>73</u>
Figura 34-	Espectro RMN ¹³ C (100MHz, CDCl ₃) expandido de AMB.	74
Figura 35-	Espectro RMN ¹³ C (100MHz, CDCl ₃) expandido de MEB.	74
Figura 36-	Espectro RMN ¹³ C (100MHz, CDCl ₃) expandido de PEB.	75
Figura 37-	Espectro RMN ¹³ C (100MHz, CDCl ₃) expandido de 4G3.	75
Figura 38-	Espectro RMN ¹³ C (100MHz, CDCl ₃) expandido de 34M.	76
Figura 39-	Espectro RMN ¹³ C (100MHz, CDCl ₃) expandido de OPC.	76
Figura 40-	Espectro RMN ¹³ C (100MHz, CDCl ₃) expandido de A1.	77
Figura 41-	Espectro RMN ¹³ C (100MHz, CDCl ₃) expandido de A1.	77
Figura 42-	Espectro RMN ¹³ C (100MHz, CDCl ₃) expandido de A3.	78
Figura 43-	Espectro RMN ¹³ C (100MHz, CDCl ₃) expandido de A3.	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 01-	Estrutura química das chalconas e naftoflavanonas sintetizadas.	42
Tabela 02-	Rendimentos e pontos de fusão de chalconas e naftoflavanonas.	43
Tabela 03-	Valores de IC ₅₀ (μM) com intervalo de confiança de 95% das chalconas AMB, 34M, MEB, PEB e EBA nas linhagens AGP01 e MRC5.	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de Etila
AGP01	Célula de Adenocarcinoma Gástrico
AMH	Ágar Miller Hinton
Ar	Aromático
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
CG	Câncer Gástrico
CC _{50%}	Concentração citotóxica 50%
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EtOH	Etanol
Fig	Figura
HETCOR	<i>Heteronuclear Chemical Shift Correlation</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
IC ₅₀	Concentração inibitória 50%
IV	Infravermelho
LABEIM	Laboratório de Ensaios <i>in vitro</i> de Microbiologia
Lit	Literatura
MS	Ministério da Saúde
MeOH	Metanol
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio]
MRC5	Fibroblasto de pulmão humano
NaOH	Hidróxido de Sódio
NPO	Núcleo de Pesquisa em Oncologia
OH ⁻	Íon Hidroxila
OMS/WHO	Organização Mundial de Saúde / <i>World Health Organization</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
P.f	Ponto de fusão
Ppm	Parte por milhão
RMN ¹ H	Ressonância Magnética nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética nuclear de carbono-13
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFPA	Universidade Federal do Pará
Vis.	Visível

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

α	Alfa
Å	Angstrom
β	Beta
λ	Comprimento de onda
°C	Graus Celsius
δ	Deslocamento químico em parte por milhão
d	Dubleto
dd	Dubleto duplo
ddd	Duplo duplo dubleto
dl	Dubleto largo
J	Constante de Acoplamento Escalar (Hz)
Kg	Quilograma
g	Grama
°GL	Grau Gay Lussac
h	Hora
Hz	Hertz
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
μs	Microsegundos
L	Litro
m	Massa
M	Concentração molar
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mol/L	Mol por litro
min	Minuto
nm	Nanômetro
%	Porcentagem
seg.	Segundos
s	Simpleto
sl	Simpleto largo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	CHALCONAS	16
2.2	SÍNTESE DE CHALCONAS	17
2.3	ATIVIDADE BIOLÓGICA	18
2.3.1	Atividade antimicrobiana	19
2.3.2	Atividade antiproliferativa	22
3	OBJETIVOS	27
3.1	GERAL	27
3.2	ESPECÍFICO	27
4	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1	MATERIAL	28
4.1.1	Procedimentos gerais	28
4.1.2	Reagentes e soluções	28
4.1.3	Meios de cultura	28
4.1.4	Bactérias	29
4.1.5	Células	29
4.1.6	Outros materiais	29
4.2	MÉTODOS	29
4.2.1	Procedimento geral da obtenção das substâncias	29
4.2.2	Síntese de chalconas e naftoflavanonas	30
4.2.3	Dados espectroscópicos de compostos sintetizados	30
4.3	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	34
4.3.1	Testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por microdiluição para bactéria de crescimento aeróbico	34
4.3.2	Preparo da solução mãe	34
4.3.3	Preparo das concentrações de trabalho	35
4.3.4	Preparação do inóculo para testes de microdiluição	35
4.3.5	Microdiluição em caldo	36
4.3.6	Concentração inibitória mínima (CIM)	36
4.3.7	Concentração bactericida mínima (CBM)	37
4.4	ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA	38
4.4.1	Teste de viabilidade celular (método MTT)	38
4.4.2	Cultivo celular	39
4.4.3	Ensaio de viabilidade celular	40
4.4.4	Análise estatística	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1	SÍNTESES DAS CHALCONAS	42
5.2	AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA	44
5.3	AVALIAÇÃO ANTIPROLIFERATIVA	45
6	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS	50
	ANEXO	59

1 INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana aos antibióticos é considerada uma ameaça para a saúde pública, apesar de ser um mecanismo natural, entretanto o mau uso desses fármacos acelera o processo natural de resistência das bactérias contra os antimicrobianos (OMS, 2018). O câncer é outro sério problema de saúde que acomete a população, sendo uma das principais causas de morte no mundo, o número de pacientes diagnosticados com diferentes tipos de câncer vem crescendo a cada ano, sendo as causas as mais diversas como: distúrbio hormonal, condições imunológicas, mutações genéticas ou presentes no meio ambiente (INCA, 2018). O câncer gástrico (CG) é o quinto caso de câncer mais diagnosticado e a terceira principal causa de morte por câncer no mundo, tendo 783 mil mortes em 2018, de acordo com dados estabelecidos pelo IARC, para 36 tipos de câncer em 185 países. (WHO, 2018; BRAY et al., 2018; PLUMMER et al., 2016; MARRELLI et al., 2015; ORDITURA et al., 2014).

As chalconas vem sendo descritas na literatura por possuírem grande potencial farmacológico, incluindo atividade antiproliferativa, antioxidante, anticâncer, anti-inflamatória, antimalárica, antimicrobiana, agentes antiprotozoários, nematicida, anti-HIV, bactericidas, antifúngico, antitubercular, antileishmania, antiúlcera, antivirais (ATTAR et al., 2011; AHMAD et al., 2016; SINGH; ANAND; KUMAR, 2014; BHALE et al., 2017; GAONKAR; VIGNESH, 2017; FU et al., 2020) e inibidoras da tirosina fosfatase A de *Mycobacterium tuberculosis* (MASCARELLO et al., 2010; ANANDAM et al., 2018). As atividades antibacterianas das chalconas e de seus derivados são frequentemente melhores contra bactérias Gram positivas, mas também inibem o crescimento de microrganismos Gram negativos. Já foram relatadas na literatura inibições para as bactérias: *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae* e *Mycobacterium tuberculosis*, dentre outras (LIN et al., 2002; VANANGAMUDI; SUBRAMANIAN; THIRUNARAYANAN, 2017; SUNITHA et al., 2018; VÁSQUEZ-MARTÍNEZ et al., 2019).

Dessa forma, as chalconas mostram-se uma fonte riquíssima e interessante para obtenção de novos princípios ativos e sua vantagem sobre outros produtos naturais é a versatilidade sintética, pois existem inúmeros benzaldeídos e acetofenonas comerciais, fornecendo assim uma variedade estrutural (BITENCOURT

et al., 2007; NARENDER et al., 2011; DE MELLO et al., 2014; FERREIRA et al., 2018). Considerando o potencial de utilizações das chalconas e a crescente dificuldade nos tratamentos das doenças bacterianas e do câncer, o presente trabalho propõe a síntese e caracterização de chalconas e derivados, bem como avaliar a atividade antimicrobiana e antiproliferativa desses compostos *in vitro* e futuramente sua utilização para o desenvolvimento de novos fármacos.

2 REFERENCIAL TEORICO

2.1 CHALCONAS

Os flavonóides pertencem a uma ampla classe de substâncias químicas de origem natural, cuja síntese não ocorre em seres humanos. Contudo, apresentam uma série de propriedades farmacológicas que lhes permite atuar em sistemas biológicos e assim favorecer a saúde humana (SANDHAR et al., 2011; LEI et al., 2016; WANG; LI; BI, 2018).

As chalconas (I) são uma das maiores classes de flavonoides, com distribuição ampla nos vegetais, sendo seu precursor biossintético (Figura 1) (WANG; LI; BI, 2018). Segundo a Química dos Produtos Naturais, podem ser definidas como flavonoides de cadeia aberta, sendo formadas por duas subunidades benzênicas (anéis A e B) espaçadas por uma cetona α , β -insaturada (enona), compondo um esqueleto C6-C3-C6 (SHARMA et al., 2016; DAS; MANNA, 2016; AHMAD et al., 2016; KOTHA et al., 2017).

A Síntese Orgânica representa a vertente da Química Orgânica capaz de construir moléculas, independentemente do seu grau de complexidade estrutural, explorando conceitos fundamentais que regem o comportamento químico dos diferentes grupamentos funcionais, sendo capaz, inclusive, de ordenar hierarquicamente esta reatividade, de maneira a introduzir níveis de seletividade comparáveis aos efetuados na natureza pelas enzimas (SOLOMONS; FRYHLE, 2002).

A síntese de Produtos Naturais é um dos caminhos para obter quantidades maiores e diversificação do esqueleto estrutural, como pode ser exemplificado pelo diterpeno anticancerígeno, Taxol, isolado do gênero *Taxus*, que após sua síntese em escala industrial, já se encontra disponível no mercado farmacêutico, representando grande esperança para pessoas portadoras de câncer de ovários e pulmões. As chalconas e seus derivados têm recebido grande atenção devido a sua estrutura relativamente simples e a diversidade de atividades farmacológicas que é em grande parte atribuída às inúmeras possibilidades de substituições nos anéis aromáticos (SINGH et al., 2014).

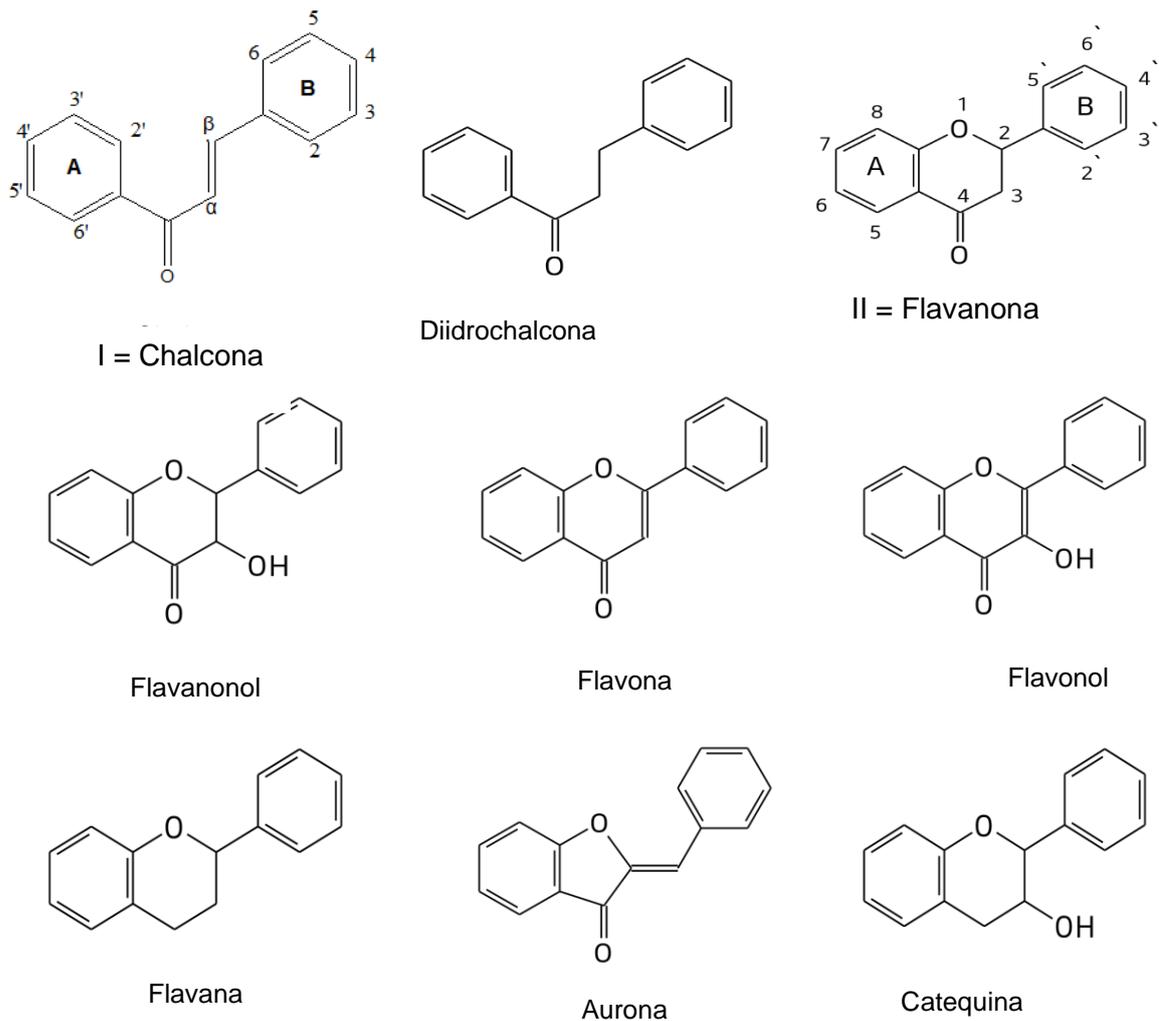


Figura 1 - Estruturas químicas das classes dos flavonoides.
Fonte: WANG; LI; BI, 2018

2.2 SÍNTESE DAS CHALCONAS

Apesar de ser um produto natural, o isolamento pioneiro de chalconas só foi realizado em 1910 por Kametaka e Perkin, mediante manipulação de extratos da espécie *Carthamus tinctorius* - flores de açafrão (SHIMOKORIYAMA, 1962). Um fator de diversificação encontrado nas chalconas naturais é a natureza e posição dos substituintes presentes nos anéis A e B. Geralmente, observam-se grupos hidroxilas, metoxilas, O-glicosilas, C-glicosilas e C-alquilas, distribuídos nas posições orto, meta e para (KOZLOWSKI et al., 2007).

Estes compostos são de origem natural, porém podem ser obtidos em laboratórios por síntese. A estratégia sintética mais utilizada é a reação de

condensação de Claisen-Schmidt, onde requer a presença de uma base catalítica, solvente e aquecimento, o tempo de reação pode variar de 3 a 24 horas dependendo dos substituintes dos anéis aromáticos. O rendimento do produto obtido pode ser dosado (Figura 2) (SOLOMONS, FRYHLE, 2002; BITENCOURT et al., 2007; NARENDER et al., 2011).

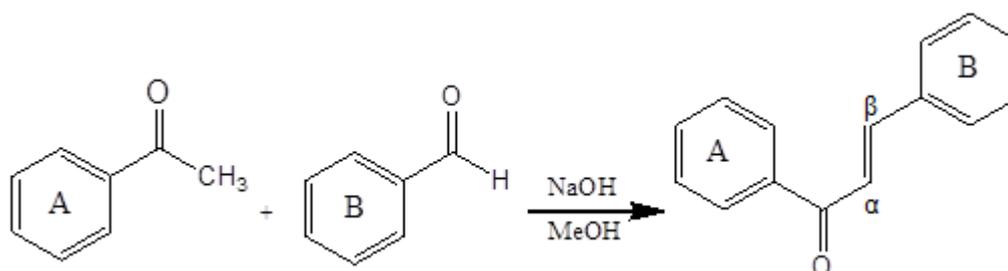


Figura 2 – Equação química da chalcona por condensação de Claisen-Schmidt
Fonte: Autor

2.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA

As chalconas vêm sendo descritas na literatura por possuírem grande potencial farmacológico, incluindo atividade antioxidante (SIVAKUMAR; PRABHAKAR; DOBLE, 2011; QIAN et al., 2011; NARSINGHANI; SHARMA; BHARGAV, 2013; AHMAD M R et al., 2016; BHALE et al., 2017), antinociceptivo (ISMAIL et al., 2016), Alzheimer (RAMPA et al., 2018), antimalárica (TOMAR et al., 2010; TADIGOPPULA et al., 2013; SUWITO et al., 2014), quimiopreventivo e quimioterápico (ORLIKOVA et al., 2011), antimicrobiana (LIN et al., 2002; NIELSEN et al., 2004; VENTURA et al., 2015; VANANGAMUDI; SUBRAMANIAN; THIRUNARAYANAN, 2017; SUNITHA et al., 2018; VÁSQUEZ-MARTÍNEZ et al., 2019), anti-inflamatória (NOWAKOWSKA, 2007; WINTER et al., 2010; WU et al., 2011; BHALE et al., 2017), nematicida (ATTAR et al., 2011), antifúngica (NOWAKOWSKA, 2007; ZHANG et al., 2011), bioherbicida (BITENCOURT et al., 2007), leishmaniose (DE MELLO et al., 2014; TADIGOPPULA et al., 2013), citotóxica (AHMAD M R et al., 2016), antitumoral (NOWAKOWSKA, 2007; WINTER et al., 2010; MAHAPATRA et al., 2015), antiviral (FU et al., 2020), anti-HIV

(CHEENPRACHA et al., 2006; TADIGOPPULA et al., 2013; SHARMA et al., 2011), dentre outras atividades.

2.3.1 Atividade antimicrobiana

A descoberta da penicilina por Alexandre Fleming em 1929 revolucionou a terapia microbiana fazendo com que várias doenças pudessem ser tratadas farmacologicamente. Entretanto, em meados do século XX os primeiros casos de resistência bacteriana começaram a ser relatados na literatura, e hoje, configuram números alarmantes acerca da eficácia dos antibióticos mais potentes disponíveis no mercado farmacêutico, gerando assim, numerosos casos de infecções bacterianas por cepas multirresistentes, o que ocasiona em um grande número de óbitos em todo mundo (TAVARES, 2001; HIRATA, 2008).

Antibióticos são substâncias químicas que são utilizadas na quimioprofilaxia ou tratamento de infecções bacterianas. A resistência bacteriana aos antibióticos surge quando por mecanismos naturais ou induzidos, tais como, seleção natural e mutação, a bactéria adquire resistência em resposta ao uso desses medicamentos inativando o princípio ativo e conseqüentemente tornando ineficaz a atividade deste composto. A resistência aos antibióticos é um fenômeno natural embora seja um processo acelerado antropicamente pelo uso indiscriminado de antimicrobianos (WHO, 2019).

Algumas espécies de bactérias são consideradas naturalmente resistentes aos antibacterianos (resistência primária), pois somente concentrações tóxicas *in vivo* exerceriam efeito sobre elas. Pela exposição continuada a antimicrobianos, apresentam resistência adquirida (secundária), decorrente do desenvolvimento de novos mecanismos de defesa (FUCHS; WANNMACHER, 1999). Algumas células podem adquirir mutações genéticas aleatoriamente que podem proporcionar resistência a algum antibiótico (DECAMP; MORIARTY, 2006). Denomina-se resistência simples quando a bactéria é resistente a uma só droga; resistência múltipla, quando simultaneamente a duas ou mais (TAVARES, 2001). A resistência pode ser considerada um fenômeno ecológico que ocorre como uma resposta da bactéria frente ao amplo uso de antibióticos e sua presença no meio ambiente (DEMAIN, 2002).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) considera a resistência de bactérias aos antibióticos uma séria ameaça. O problema tem chamado a atenção depois de

casos recorrentes de infecção por microrganismos resistentes em hospitais. Segundo a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), no Brasil, a taxa de infecção hospitalar é de 15% mais alta do que em países da Europa e nos Estados Unidos, onde o índice é de 10% (MOUTINHO, 2015). O desenvolvimento de resistência a múltiplas drogas é um problema importante no tratamento de doenças infecciosas causadas por microrganismos patogênicos (VIMAL et al., 2009).

Dentro da nova safra de superbactérias, a mais preocupante é a *Staphylococcus aureus*, resistente à meticilina (anti-infeccioso potente usado em casos de infecção hospitalar), ou MRSA (na sigla em inglês correspondente a Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*). No entanto, essa bactéria já desenvolveu outras versões tão ou igualmente perigosas. No Japão, por exemplo, foram encontradas cepas da *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina, o anti-infeccioso mais poderoso já criado pela indústria farmacêutica (HIRATA, 2008).

A resistência antimicrobiana é um fator limitante na eficácia de tratamentos de infecções emergentes é um dos problemas mundiais de saúde contemporânea (SUDHA et al., 2016). Dados de vigilância sobre resistência aos antibióticos da Organização Mundial da Saúde (OMS) (2018) mostraram alto nível de resistência antimicrobiana, principalmente em países subdesenvolvidos com relatos de bactérias superresistentes, dentre as quais destacam-se *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Salmonella* spp. As mortes anuais relacionadas a casos de resistências a antibióticos poderão chegar em 2050 a 4,7 milhões na Ásia, 4,1 milhões na África e 392 mil na América Latina (CDC, 2016; NCBI, 2016). O uso irracional de medicamentos acentua os novos mecanismos de resistência ao mesmo tempo que há uma dramática redução na descoberta de novos protótipos de antibióticos (GUIMARÃES, 2010). O uso constante de antimicrobianos inevitavelmente leva a seleção de microrganismos resistentes, surgindo à necessidade contínua por novos antibióticos.

Dados recentes da Organização Mundial da Saúde (OMS) (2018) mostram altos níveis de resistência aos antibióticos em todo o mundo, sendo que cerca de 700 mil pessoas morrem por ano no mundo em função de superbactérias resistentes aos antibióticos comerciais. Além disso, projeções feitas pelo Sistema Global de Vigilância Antimicrobiana (SGVA) (2018) em 2050 este número tende a subir para 10 milhões, caso nada seja feito.

De acordo com Nowakowska (2007), a atividade antimicrobiana das chalconas é observada como consequência da habilidade da cetona α - β insaturada, em reagir com o grupo tiol de proteínas essenciais das bactérias. Segundo Haraguchi et al. (1998), que isolou as chalconas licochalcona A e licochacona C (Figura 3), a partir de *Glycyrrhiza inflata*, as quais também mostraram potente atividade antibacteriana especialmente sobre *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus*, com valores de concentração inibitória mínima (CIM) entre 3,13 – 12,5 $\mu\text{g/mL}$.

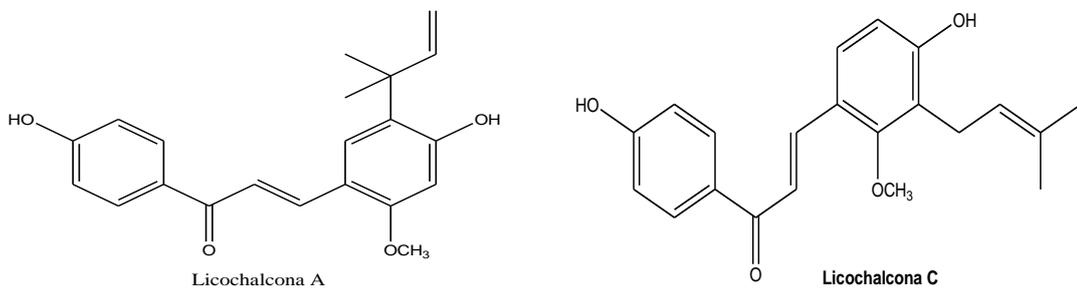


Figura 3 - Estruturas de Licochalconas A e C.
Fonte: HARAGUCHI (1998).

A partir da Licochalcona A, foram sintetizados por Nielsen e colaboradores (2004) 30 análogos através de substituições no anel A e B. Sendo assim investigaram duas principais alterações estruturais: mudança da acidez do anel A por substituição fenólica e mudança de posição do grupo ácido carboxílico do anel B. As substâncias com substituição na posição *para* foram as mais potentes, devido ao aumento da lipofilicidade, das mesmas. Essas chalconas, 4'-carboxi-3,5-bistrifluorometil-chalcona e 4'-carboxy-3,5-dibromo-chalcona foram equipotentes com Ciprofloxacina e Linezolida com valores de CIM de 2 $\mu\text{g/mL}$ e nenhuma citotoxicidade (NIELSEN, 2004).

Dentre as chalconas com atividade antimicrobiana foram isoladas por Joray e colaboradores (2015) de *Flourensia oolepis* as chalconas com atividade antimicrobiana 2'4'- dihidroxichalcona e isoliquiritigenina (Figura 4), que mostraram concentração mínima inibitória (CIM) contra as cepas de *Staphylococcus aureus* nas concentrações de 31 $\mu\text{g/mL}$ e 250 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

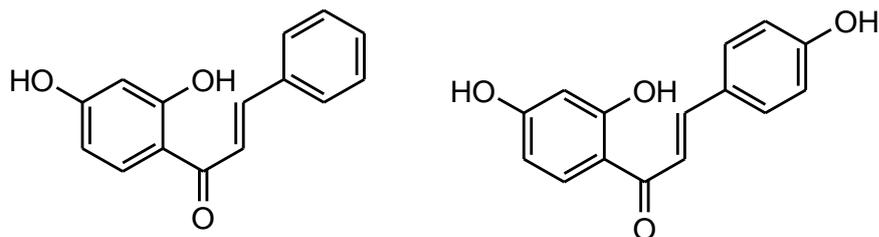


Figura 4 - 2',4'- dihidroxichalcona e isoliquiritigenina
Fonte: JORAY et al., 2015.

A atividade antimicrobiana foi observada para as chalconas (3), (4), (5) e (6) (Figura 5) de origem sintética frente a *Mycobacterium tuberculosis* com CI_{50} de $20,1 \pm 1,0 \mu\text{M}$, $11,7 \pm 3,4 \mu\text{M}$, $10,2 \pm 4,9 \mu\text{M}$ e $18,2 \pm 3,6 \mu\text{M}$. A atividade destas chalconas demonstra a potencial atividade antimicrobiana que esta classe tem (VENTURA et al., 2015).

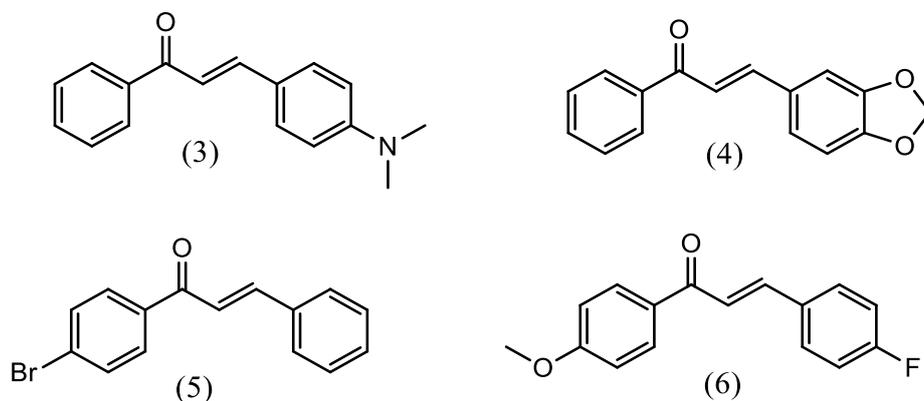


Figura 5– Chalconas (3), (4), (5) e (6).
Fonte: VENTURA et al., 2015.

2.3.2 Atividade antiproliferativa

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo, representando cerca de 9,6 milhões de mortes em 2018. A nível global, uma em cada seis mortes são relacionadas à doença, sendo considerado o principal problema de saúde pública. A definição genérica de câncer é um grupo de doenças que podem afetar qualquer parte do corpo. Tumores malignos e neoplasias são termos científicos utilizados para o câncer (WHO, 2020; BRAY et al., 2018; FERLAY et al., 2019).

Segundo dados publicados em 2018 pelo Centro Internacional para Pesquisa do Câncer (IARC), aponta que o câncer de pulmão é o mais incidente (2,1 milhões) seguido pelo câncer de mama (2,1 milhões), cólon e reto (1,8 milhão) e próstata (1,3 milhão). A incidência em homens (9,5 milhões) representa 53% dos casos novos, sendo um pouco maior nas mulheres, com 8,6 milhões (47%) de casos novos. Os tipos de câncer mais frequentes nos homens foram o câncer de pulmão (14,5%), próstata (13,5%), cólon e reto (10,9%), estômago (7,2%) e fígado (6,3%). Nas mulheres, as maiores incidências foram câncer de mama (24,2%), cólon e reto (9,5%), pulmão (8,4%) e colo do útero (6,6%) (BRAY et al., 2018).

Em um panorama nacional, a estimativa para cada ano do triênio 2020-2022 aponta que ocorrerão 625 mil casos novos de câncer. Os tipos de câncer mais frequentes em homens, à exceção do câncer de pele não melanoma, serão próstata com 65.840 casos notificados (29,2%), cólon e reto com 20.540 (9,1%), traqueia, brônquio e pulmão somam 17.760 (7,9%), estômago com 13.360 (5,9%) e cavidade oral com 11.200 casos (5,0%). Nas mulheres, exceto o câncer de pele não melanoma, os cânceres de mama com 66.280 (29,7%), cólon e reto com 20.470 (9,2%), colo do útero com 16.710 (7,4%), traqueia, brônquio e pulmão somam 12.440 (5,6%) e tireoide com 11.950 (5,4%) figurarão entre os principais. O câncer de pele não melanoma representará 27,1% de todos os casos de câncer em homens e 29,5% em mulheres (INCA, 2020).

Segundo estimativas do INCA 2020 (Figura 6, p. 24) acerca das taxas brutas de incidência do câncer no estado do Pará, o câncer de estômago é o segundo com maior incidência entre os homens com 560 (12,71%) dos casos notificados, ficando atrás somente dos casos da capital referente ao câncer de próstata com 930 (21,23%) dos casos. Entre as mulheres o câncer de mama e do colo do útero contém maior taxa de incidência no estado do Pará com 780 (18,24%) e 780 (18,41%) de casos notificados respectivamente, já na capital os casos notificados foram 320 (37,80%), seguidos de câncer de estômago no estado do Pará com 300 (7,05%) casos notificados.

O câncer gástrico (CG) é o quinto câncer mais diagnosticado (1,03 milhão) de casos e a terceira principal causa de morte por câncer no mundo, tendo 783 mil mortes em 2018, de acordo com dados estabelecidos pelo IARC, para 36 tipos de câncer em 185 países. Apesar do enorme progresso no tratamento do câncer, a cirurgia continua

sendo o principal tratamento para o CG (WHO, 2020; BRAY et al., 2018; PLUMMER et al., 2016; MARRELLI et al., 2015; ORDITURA et al., 2014).

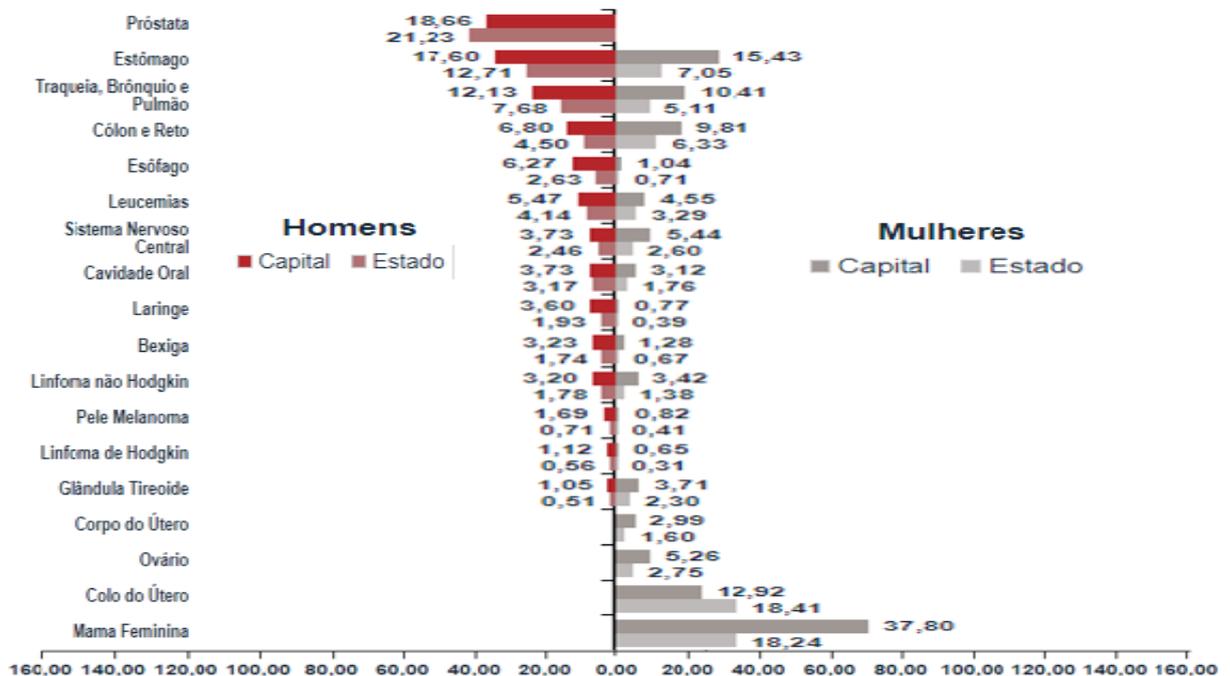


Figura 6 - Gráfico: Taxas brutas de incidência estimadas para 2020 por sexo, segundo Estado e capital*
Fonte: INCA (2020)

Nas últimas décadas com a introdução de mais 70 novos medicamentos fez com que houvesse um significativo avanço no tratamento do câncer. Entretanto a seletividade desses medicamentos ainda é uma meta a ser almejada, isto deve-se, à relativa semelhança entre células neoplásicas e normais do organismo (BRANDÃO et al., 2010). Os medicamentos em uso na clínica destroem as células tumorais e normais com maior taxa de mitose sem distinção entre elas. A consequência desta baixa seletividade são as inúmeras reações adversas e tóxicas que dificultam a adesão ao tratamento pelo paciente (OLIVEIRA; ALVES, 2002; FERREIRA et al., 2013).

Atualmente, a oncologia é a especialidade que mais tem buscado fármacos derivados de produtos naturais (HARVEY, 2008). Em particular, as chalconas que apresentam vários graus de inibição na proliferação de células *in vitro*, contra células cancerígenas de diferentes linhagens como: PC-3 (próstata) (MARQUINA et al., 2019), DU-145 (DELMULLE et al., 2006), HGC-27 (câncer gástrico) (SHIBATA, 1994),

HeLa (carcinoma cervical) (YE et al., 2004), MCF-7 (câncer de mama) (YADAV et al., 2017; SANTOS et al., 2019), A549 (câncer de pulmão) (YADAV et al., 2017), HepG2 (câncer de fígado) (YADAV et al., 2017), HT29 (cólon) (KOTHA et al., 2017), K562 e HL-60 (leucemia) (SAYDAM et al., 2003), NCI-H460 (câncer de pulmão) (PHRUTIVORAPONGKUL et al., 2003), L929 *in vivo* em tumor ascítico em ratos (ANTO et al., 1995). Outras atividades citotóxicas *in vitro*, das chalconas contra nove tipos de células de tumores humanos incluindo, carcinoma epidermóide de nasofaringe (KB), osteosarcoma (Hos), melanoma (SKMEL-2) glioblastoma (U87-MG), câncer ovariano (1A9), entre outros, são relatados (XIA et al., 2000).

Diversas chalconas (Figura 7) foram sintetizadas e sua citotoxicidade avaliada *in vitro*, sendo as chalconas (7), (8), (9) e (10) avaliadas frente a célula MCF-7 (adenocarcinoma de mama) com Cl_{50} de $6.875 \pm 0.219 \mu\text{g/mL}$, $7.992 \pm 0.81 \mu\text{g/mL}$, $6.873 \pm 1.2 \mu\text{g/mL}$ e $5.251 \pm 0.67 \mu\text{g/mL}$, respectivamente (SYAM et al., 2012).

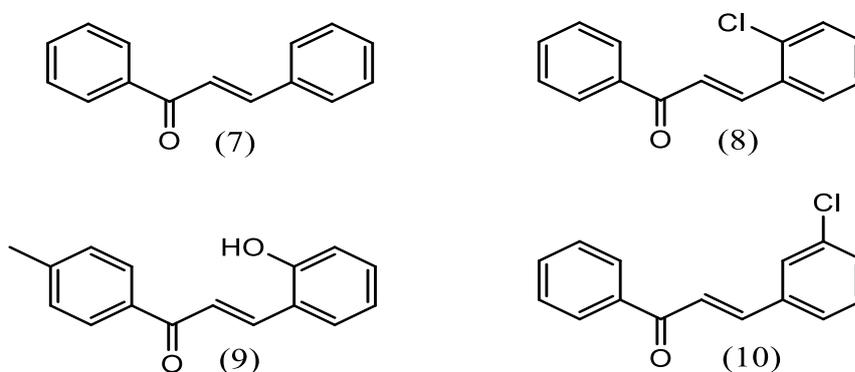


Figura 7 – Chalconas com atividades citotóxicas.
Fonte: SYAM et al., 2012

A busca por produtos de interesse farmacêutico com atividade citotóxica é uma estratégia que auxilia na prospecção de moléculas com atividade antitumoral, cuja notoriedade foi acentuada desde a descoberta do taxol. Fatores como resistência múltipla aos fármacos disponíveis, alta toxicidade e altos custos tornam a procura por novos compostos prioritária na quimioterapia do câncer (NEWMAN & CRAGG, 2016).

Outro fator que desperta interesse para as pesquisas é a alta incidência de novos casos de câncer e sendo a segunda doença que mais mata no mundo (NCI,

2018). Em razão de estratégias de tratamento altamente ineficazes e a resistência de tumores à quimioterapia e radioterapia, e pela incapacidade de medicamentos quimioterápicos não diferenciarem as células saudáveis das células cancerígenas, proporcionando resultado clínico indesejado devido à resistência aos medicamentos e a eventos desfavoráveis (ALARD et al., 2020; FIORICA et al., 2018; YADAV et al., 2017).

Dessa forma faz-se necessário urgentemente uma abordagem promissora para o avanço nas pesquisas de novos princípios ativos mais efetivos. Então o presente trabalho visa sintetizar, avaliar a atividade antimicrobiana e antiproliferativa de chalconas e derivados, com o objetivo de obter novos compostos com atividades biológicas promissoras.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Sintetizar, caracterizar e avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana e antiproliferativa de chalconas e derivados.

3.2 ESPECÍFICOS

- Sintetizar chalconas e derivados, contendo diferentes substituintes;
- Caracterizar as chalconas;
- Avaliar o potencial antimicrobiano *in vitro* contra bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29213); Gram-negativas: *Escherichia coli* (ATCC 8789) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9022);
- Avaliar a atividade antiproliferativa em linhagem tumoral gástrica AGP01;
- Avaliar a toxicidade das chalconas e derivados em linhagem MRC5, de células normais de pulmão;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Procedimentos gerais

Chapa Agitadora com aquecimento (Marca: QUIMIS); Vórtex; Balança analítica; Estufa. Os espectros de RMN¹H e RMN¹³C foram obtidos em espectrômetro de ressonância magnética nuclear Varian Mercury 300 e Bruker Ascend 400 (Programa de Pós-Graduação em Química/ UFPA); Medidor de Ponto de fusão (P.f) (GEHAKA, Modelo: PF-1000). Os deslocamentos químicos foram expressos em valores adimensionais (δ = ppm) em relação a um padrão de referência, tetrametilsilano (TMS). Foi utilizado clorofórmio deuterado adquiridos comercialmente. As constantes de acoplamento (J) foram expressas em Hertz (Hz). As multiplicidades dos sinais foram indicadas como segue: s=simpleto, d=dupleto, dd=duplo dupleto, t=tripleto e m=multiplero.

4.1.2 Reagentes e soluções

Hidróxido de sódio (NaOH) 10%; etanol (EtOH); metanol (MeOH); acetato de etila (AcOEt); clorofórmio (CHCl₃); acetofenonas, Benzaldeídos e solução de ácido acético 25%, H₂O destilada estéril; DMSO; Resazurina (0,01%); Cloranfenicol (250 µg/mL); Penicilina + estreptolisina (10000unit/10mg). Todos PA das marcas Aldrich e Vetec.

4.1.3 Meios de cultura

- Ágar Manitol: meio de cultura destinado ao isolamento de *Staphylococcus aureus*;
- Ágar Sangue: meio de cultura diferencial e não seletivo, rico em nutrientes, utilizado para isolamento de micro-organismos não fastidiosos;
- Ágar Macconkey: meio seletivo para o crescimento de bactérias gram-negativas;
- Ágar Cetrimide: é um meio de cultura destinado ao crescimento de *Pseudomonas*;
- Ágar Muller-Hinton e caldo Mueller-Hinton: são meios de cultura microbiológicos

não seletivos, frequentemente usados para testes de susceptibilidade antimicrobiana.

4.1.4 Bactérias

- *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538);
- *Enterococcus faecalis* (ATCC 29213);
- *Escherichia coli* (ATCC 8789);
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9022).

4.1.5 Células

- Adenocarcinoma Gástrico (AGP01)
- Fibroblasto de pulmão humano (MRC5)

4.1.6 Outros materiais

Becker; Balão de fundo chato e boca esmerilhada (125mL); Funil de vidro; Bastão de vidro; Pipetas de vidro graduadas; Proveta; Tubos p/inóculo; Placas de petri; Placas com 96 poços de fundo chato-TTP; Swab estéril; Ponteiras de 100 e de 1000 µL; Espátula de aço inox; Barra magnética.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Procedimento geral da obtenção das substâncias

Em balão de fundo chato e boca esmerilhada (125mL), colocado em banho de gelo, foram adicionados na sequência: o solvente (15mL, EtOH ou MeOH), cetona (~10mmol), o catalisador (15mL de solução de NaOH 10%) e o aldeído (com excesso de 10%). A mistura de reação foi mantida usando agitador magnético por 3h. Posteriormente, foi resfriada e deixada em freezer durante 24h. Após esse período foi feito a acidificação com ácido acético (25%), só nos compostos fenólicos, em seguida a extração com acetato de etila ou clorofórmio. Foi deixado em temperatura ambiente

para secagem e a evaporação do solvente. Posteriormente o produto foi recristalizado em acetato de etila e metanol (Figura 8).

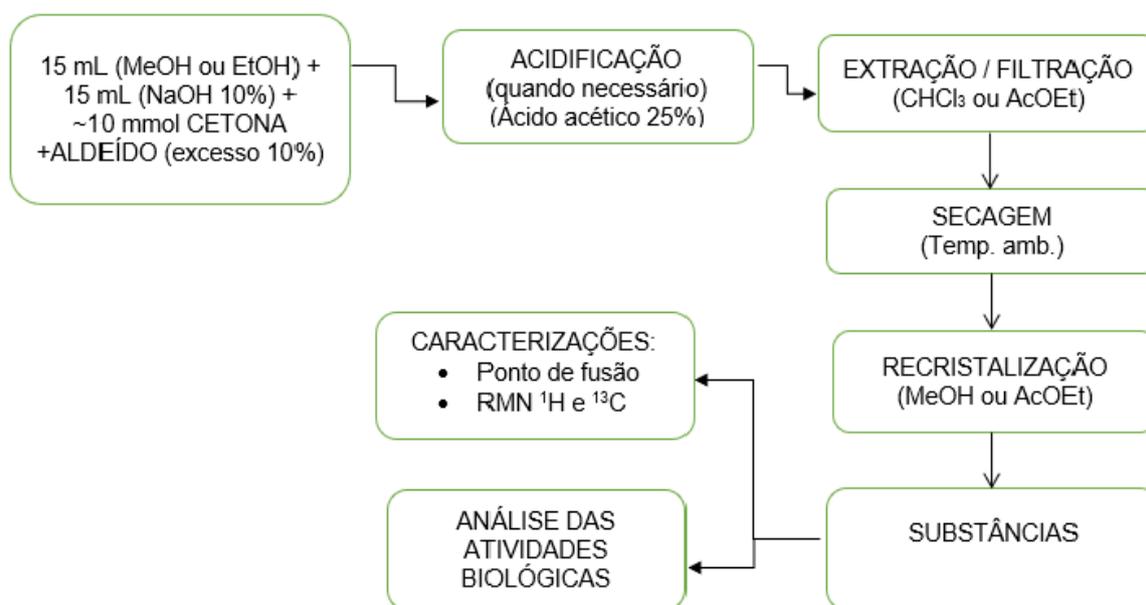


Figura 8 - Esquema do Procedimento geral das sínteses.

4.2.2 Sínteses das chalconas e naftoflavanonas

Foram sintetizadas dez substâncias entre sete chalconas e três naftoflavanonas, tendo suas estruturas químicas básicas citadas na Tabela 1 (p. 42).

4.2.3 Dados espectroscópicos dos compostos sintetizados

- (2E) -1,3-difenilprop-2-en-1-ona (**EBA**): cristal amarelo claro, P.f. experimental 54-55°C, rendimento 91,23% e fórmula molecular $C_{16}H_{14}O$ (208,26 g/mol).

RMN¹H (400MHz; $CDCl_3$) δ (ppm): 7,84 (d, 1H, J=15,6Hz, H-7), 7,56 (d, 1H, J=15,6Hz, H-8), 7,43-8,06 (m, 10H, H-Ar).

RMN¹³C (100MHz; $CDCl_3$) δ (ppm): 138,2 (C1), 128,4 (C2), 128,9 (C3), 128,6 (C4), 128,5 (C5), 128,4 (C6), 144,9 (C7), 122,1 (C8), 190,6 (C9), 130,5 (C1'), 134,9 (C2'), 77,4 (C3'), 77,1 (C4'), 76,8 (C5'), 132,8 (C-6').

- (2E) -1-fenil-3-(2-metóxi-fenil) -prop-2-en-1-ona (**AMB**): cristal amarelo claro, P.f. experimental 58-59°C, rendimento 67,35% e fórmula molecular C₁₆H₁₄O₂ (238,28 g/mol).

RMN¹H (400MHz; CDCl₃) δ_(ppm): 8,15 (d, 1H, J=16Hz, H-7), 7,65 (d, 1H, J=16Hz, H-8), 6,95-8,05 (m, 9H, H-Ar), 3,99 (s,3H, OCH₃).

RMN¹³C (100MHz; CDCl₃) δ_(ppm): 132,5 (C1), 120,7 (C2), 111,2 (C3), 123,9 (C4), 138,5 (C5), 158,8 (C6), 140,4 (C7), 122,8 (C8), 191,1 (C9), 131,8 (C1'), 129,2 (C2'), 77,4 (C3'), 77,8 (C4'), 76,7 (C5'), 128,5 (C-6'), 55,5 (C6-OCH₃).

- (2E) -1-fenil-3-(3-metóxi-fenil) -prop-2-en-1-ona (**MEB**): cristal castanho claro, P.f. experimental 58-59°C, rendimento 65,35% e fórmula molecular C₁₆H₁₄O₂ (238,28 g/mol).

RMN¹H (400MHz; CDCl₃) δ_(ppm): 7,80 (d, 1H, J=16Hz, H-7), 7,36 (d, 1H, J=16Hz, H-8), 6,98-8,05 (m, 9H, H-Ar), 3,88 (s,3H, OCH₃).

RMN¹³C (100MHz; CDCl₃) δ_(ppm): 136,2 (C1), 121,1 (C2), 128,5 (C3), 116,3 (C4), 159,9 (C5), 113,4 (C6), 144,8 (C7), 122,4 (C8), 190,6 (C9), 132,8 (C1'), 129,9 (C2'), 77,3 (C3'), 77,0 (C4'), 76,7 (C5'), 128,6 (C-6'), 55,3 (C5-OCH₃).

- (2E) -1-fenil-3-(4-metóxi-fenil) -prop-2-en-1-ona (**PEB**): cristal amarelo claro, P.f. experimental 71-72°C, rendimento 90,30% e fórmula molecular C₁₆H₁₄O₂ (238,28 g/mol).

RMN¹H (400MHz; CDCl₃) δ_(ppm): 7,81 (d, 1H, J=15,6Hz, H-7), 7,44 (d, 1H, J=15,6Hz, H-8), 7,62-7,64 (d, 2H, H-2 e H-6), 6,95-6,97 (d,2H, H-3 e H-5), 7,50-8,04 (m, 5H, H-Ar), 3,88 (s, 3H, OCH₃).

RMN¹³C (100MHz; CDCl₃) δ_(ppm): 138,5 (C1), 128,4 (C2), 114,4 (C3), 161,7 (C4), 159,9 (C5), 113,4 (C6), 144,8 (C7), 119,8 (C8), 190,6 (C9), 132,5 (C1'), 130,2 (C2'), 77,3 (C3'), 77,0 (C4'), 76,7 (C5'), 128,5 (C-6'), 55,4 (C4-OCH₃).

- (2E) -1-(4-metóxi-fenil) -3-fenil-prop-2-en-1-ona (**4G3**): cristal amarelo claro, P.f. experimental 105-106°C, rendimento 87,93% e fórmula molecular C₁₆H₁₄O₂ (238,28 g/mol).

RMN¹H (400MHz; CDCl₃) $\delta_{(ppm)}$: 7,82 (d, 1H, J=15,6Hz, H-7), 7,57 (d, 1H, J=15,6Hz, H-8), 8,05-8,08 (d, 2H, H-3' e H-5'), 7,00-7,02 (d,2H, H-2' e H-6'), 7,43-7,68 (m, 5H, H-Ar), 3,91 (s, 3H, OCH₃).

RMN¹³C (100MHz; CDCl₃) $\delta_{(ppm)}$: 131,1 (C1), 113,8 (C2), 77,3 (C3), 77,0 (C4), 76,7 (C5), 113,8 (C6), 143,9 (C7), 121,9 (C8), 188,7 (C9), 135,1 (C1'), 128,9 (C2'), 130,8 (C3'), 163,4 (C4'), 130,3 (C5'), 128,3 (C-6'), 55,5 (C4'-OCH₃).

-(2E) -1-(4-metóxi-fenil) -3-(3,4,5-Tri-metóxi-fenil) -prop-2-en-1-ona (**34M**): cristal amarelo intenso, P.f. experimental 129-130°C, rendimento 97,45% e fórmula molecular C₁₉H₂₀O₅ (328,36 g/mol).

RMN¹H (400MHz; CDCl₃) $\delta_{(ppm)}$: 7,73 (d, 1H, J=15,6Hz, H-7), 7,43 (d, 1H, J=15,6Hz, H-8), 8,04-8,07 (d, 2H, H-3' e H-5'), 7,00-7,02 (d,2H, H-2' e H-6'), 6,88 (s,2H,H-2 e H-6), 3,91 (s, 3H, OCH₃), 3,92 (s, 3H, OCH₃), 3,94 (s, 3H, OCH₃).

RMN¹³C (100MHz; CDCl₃) $\delta_{(ppm)}$: 77,3 (C1), 105,6 (C2), 153,4 (C3), 140,3 (C4), 130,8 (C5), 105,6 (C6), 144,1 (C7), 121,2 (C8), 188,7 (C9), 113,8 (C1'), 113,8 (C2'), 131,1 (C3'), 163,4 (C4'), 130,5 (C5'), 113,8 (C-6'), 61,0 (C4'-OCH₃), 56,2 (C3-OCH₃), 55,5 (C4-OCH₃), 55,5 (C5-OCH₃).

-(2E) -1-(4-hidróxi-fenil) -3-(4-metóxi-fenil) -prop-2-en-1-ona (**OPC**): cristal amarelo claro, P.f. experimental 115-129°C e rendimento 74,36% e fórmula molecular C₁₆H₁₄O₃ (254,28 g/mol).

RMN¹H (400MHz; CDCl₃) $\delta_{(ppm)}$: 7,80 (d, 1H, J=15,6Hz, H-7), 7,44 (d, 1H, J=15,6Hz, H-8), 7,99-8,02 (d, 2H, H-2 e H-6), 7,72-7,61 (d,2H, H-3' e H-5'), 6,94-6,97 (H-3-H-5), 7,58-7,62 (H-2'-H-6'), 3,87 (s, 3H, OCH₃).

RMN¹³C (100MHz; CDCl₃) $\delta_{(ppm)}$: 143,1 (C1), 127,7 (C2), 114,4 (C3), 160,3 (C4), 114,4 (C5), 127,5 (C6), 144,2 (C7), 123,3 (C8), 189,2 (C9), 161,6 (C1'), 131,1 (C2'), 130,9 (C3'), 161,6 (C4'), 130,1 (C5'), 131,1 (C-6'), 55,4 (C4-OCH₃).

-Nafto [2,1] - piran-1-ona,2,3-di-hidro-3-(2-metóxi-fenil) (**A1**): cristal amarelo claro, P.f. experimental 141-143°C, rendimento 85,44% e fórmula molecular C₂₀H₁₆O₃ (304,34 g/mol).

RMN¹H (400MHz; CDCl₃) δ(ppm): 6,02 (dd, 1H, J=8,4Hz, H-7), 3,09-3,10 (dd, 2H, J=9,2Hz e J=1,6Hz, H8a e H8b), 6,96-7,12 (m, 4H,H-Ar), 9,54 (ddd, 2H, J=8,8, H-8'), 7,36 (dd, 2H, J=9Hz, H-3'), 7,98 (dd, 2H, J=9Hz, H-4'), 7,80 (ddd, 2H, J=1,2Hz, J=0,6Hz, H-5'), 7,66 (ddd, 1H, J=0,9Hz, H-6'), 7,69 (ddd, 2H, J=3,3Hz, J=1,5Hz, H-7'), 3,88 (s, 3H, OCH₃).

RMN¹³C (100MHz; CDCl₃) δ(ppm): 127,2 (C1), 155,9 (C2), 110,5 (C3), 126,4 (C4), 129,4 (C5), 120,8 (C6), 77,3 (C7), 44,8 (C8), 193,7 (C9), 55,4 (C2-OCH₃), 112,6 (C1'), 155,9 (C2'), 118,9 (C3'), 137,3 (C4'), 129,2 (C4a') 128,3 (C5'), 124,8 (C-6'), 129,6 (C7'), 125,9 (C8'), 131,6 (C8a').

- Nafto [2,1] -piran-1-ona,2,3-di-hidro-3-(3-metóxi-fenil) (**A5**): cristal castanho claro, P.f. experimental 105-106°C, rendimento 93,04% e fórmula molecular C₂₀H₁₆O₃ (304,34 g/mol).

RMN¹H (300MHz; CDCl₃) δ(ppm): 7,08-7,09 (ddd, 2H, H-2 e H-6), 6,93 (ddd, 1H, J=1,8Hz e J=0,6Hz, H-4), 7,39 (ddd, 1H, J=5,4Hz e J=2,4Hz, H-5), 5,57 (dd, 1H, J=3Hz, H-7), 3.20-2,99 (dd, 2H, J=13,20Hz e J=3Hz, H8a e H8b), 3,85 (s, 3H, OCH₃), 7,19 (dd, 2H, J=9Hz, H-3'), 7,93 (dd, 2H, J=9Hz, H-4'), 7,77 (ddd, 2H, J=1,2Hz, J=0,6Hz, H-5'), 7,47 (ddd, 1H, J=0,9Hz, H-6'), 7,66 (ddd, 2H, J=3,3Hz, J=1,5Hz, H-7'), 9,51 (ddd, 2H, J=8,7, H-8').

RMN¹³C (75MHz; CDCl₃) δ(ppm): 139,9 (C1), 111,8 (C2), 159,8 (C3), 113,9 (C4), 129,9 (C5), 118,2 (C6), 79,3 (C7), 45,6 (C8), 192,8 (C9), 55,2 (C3-OCH₃), 112,4 (C1'), 163,6 (C2'), 118,7 (C3'), 137,2 (C4'), 129,1 (C4a') 128,3 (C5'), 124,8 (C-6'), 129,6 (C7'), 125,8 (C8'), 131,3 (C8a').

- Nafto [2,1] -piran-1-ona,2,3-di-hidro-3-(4-metóxi-fenil) (**A3**): cristal amarelo intenso, P.f. 118-121°C, rendimento 85,72% e fórmula molecular C₂₀H₁₆O₃ (304,34 g/mol).

RMN¹H (400MHz; CDCl₃) δ: 5,59 (dd, 1H, J=2,8Hz, H-7), 2,94-3,31 (dd, 2H, J=13,20Hz e J=2,8Hz, H8a e H8b), 8,11 (ddd, 2H, J=8,4, H-8'), 7,21 (dd, 2H, J=9Hz, H-3'), 7,98 (dd, 2H, J=9Hz, H-4'), 7,80 (ddd, 2H, J=1,2Hz, J=0,6Hz, H-5'), 7,55 (ddd, 1H, J=0,9Hz, H-6'), 7,61 (ddd, 2H, J=3,3Hz, J=1,5Hz, H-7'), 7,38-7,49 (d,2H, H-3 e H-5), 7,90-7,93 (H-2-H-6), 3,88 (s, 3H, OCH₃).

RMN¹³C (75MHz; CDCl₃) δ(ppm): 143,1 (C1), 136,5 (C2), 127,7 (C3), 161,8 (C4), 127,5 (C5), 127,8 (C6), 116,0 (C7), 45,5 (C8), 194,5 (C9), 55,4 (C4-OCH3), 114,5 (C1'), 125,1 (C2'), 119,4 (C3'), 137,5 (C4'), 129,2 (C4a'), 128,6 (C5'), 124,7 (C-6'), 129,6 (C7'), 125,8 (C8'), 130,5 (C8a').

4.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os testes para verificação da atividade antimicrobiana das chalconas e naftoflavanonas sintetizadas foram desenvolvidos em parceria com o Laboratório de ensaios *in vitro* de microbiologia – LBEIM, na Universidade Federal do Pará (UFPA), pelo grupo de pesquisa da Prof. Dra. Marta Chagas Monteiro. Para a realização do teste seguiu-se o protocolo de microdiluição.

4.3.1 Testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por microdiluição para bactéria de crescimento aeróbico

Os métodos de diluição em caldo são igualmente aceitáveis para medir quantitativamente a atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano (substâncias sintéticas, extratos vegetais, óleos essenciais) contra um determinado isolado bacteriano. A metodologia básica desse teste deriva-se, em grande parte, das informações obtidas no Estudo Colaborativo Internacional. Embora sejam testes padrões de referência, alguns são suficientemente práticos para merecer uso rotineiro, tanto nos laboratórios clínicos, como nos laboratórios de pesquisa (CLSI M7-A9, 2012). O Método de microdiluição em Caldo envolve o uso de pequenos volumes de caldo, realizados em placas de 96 poços.

4.3.2 Preparo da solução mãe

Pesou-se 1mg em tubo eppendorf, adicionou 100µL de DMSO no eppendorf com a amostra, agitou no vórtex até solubilizar. Em seguida adicionou 900 µL de H₂O destilada estéril, assim obtivemos a concentração de 1mg/mL da amostra.

4.3.3 Preparo das concentrações de trabalho

As concentrações testadas para um determinado agente antimicrobiano devem ser estabelecidas antes do teste. Esse tipo de diluição é chamado de diluição seriada (Figura 9).

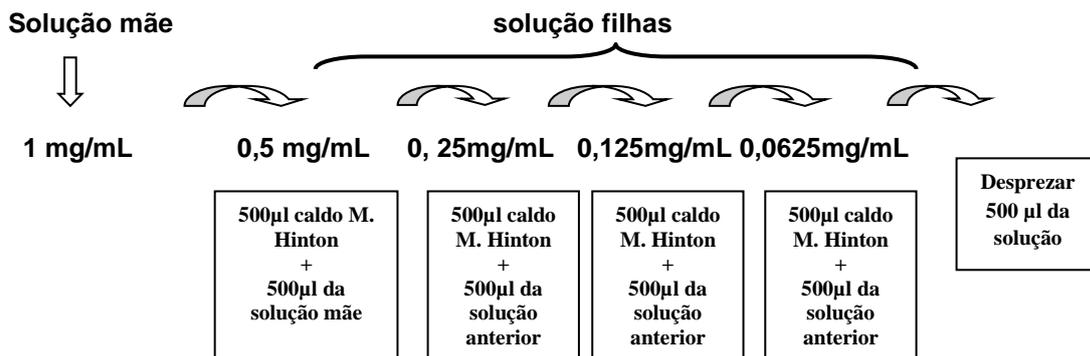


Figura 9 – Esquema de Microdiluição

4.3.4 Preparação do inóculo para testes de microdiluição

O inóculo bacteriano deve ser preparado a partir do cultivo prévio das bactérias em placas de Petri contendo meio específico, para que se tenha certeza de identificação de cada espécie. A bactéria *Staphylococcus aureus* deve ser semeada em meio ágar manitol, *Enterococcus faecalis* em ágar sangue; *Escherichia coli* em ágar Macconkey e *Pseudomonas aeruginosa* em o ágar cetrimide. Em seguida, todas as placas devem ser incubadas a 35°C por 24 horas em estufa. Após o período de incubação, 3 a 4 colônias dessas bactérias são retiradas e transferidas para tubo estéril contendo 1 mL de caldo Mueller-Hinton. A turbidez dessa solução deve ser ajustada em aparelho ELISA ou espectrofotômetro (625nm), de acordo com a solução padrão de McFarland de 0,5 (0,09 a 0,11), correspondendo a 1×10^8 UFC/mL. Em seguida, esta solução deve ser incubada por 1 hora para alcançar o crescimento exponencial das colônias bacterianas. A microdiluição se inicia na proporção de crescimento do micorganismo e na concentração de 10^8 . A partir desta solução

diluições seriadas foram realizadas até a obtenção do inóculo 1×10^3 UFC/mL (CLSI M7-A9, 2012) (Figura 10).

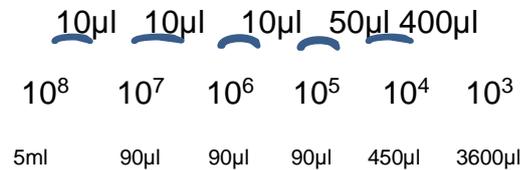


Figura 10 - Esquema de preparo de microdiluições seriadas de inóculos bacterianos.

4.3.5 Microdiluição em caldo

Na placa de microdiluição devem ser distribuídos 100 µL do inóculo (1×10^3 UFC/mL) em todos os poços inclusive nos controles: positivo, negativo e inoculo. Em seguida, acrescenta-se 100 µL da substância ou composto testado nos poços das concentrações previamente estabelecidas. Os poços do controle positivo devem receber 100 µL do antimicrobiano cloranfenicol (100 µg/mL) caso a bactéria seja gram-positiva ou 100µL de penicilina-estreptolisina (10000unit/10mg) caso seja gram-negativa. O controle negativo receberá 100 µL do solvente DMSO (10%) solvente padrão, e o poço do inóculo receberá 100 µL do meio ágar Mueller Hinton, totalizando 200 µL em cada poço. A microplaca de microdiluição deve ser incubada em estufa a 37°C por 24 horas. O teste deve ser realizado em triplicata.

4.3.6 Concentração inibitória mínima (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um micro-organismo em testes de sensibilidade por diluição em ágar ou caldo (CLSI M7-A9, 2012). Para a obtenção de CIM foram utilizados o parâmetro da mudança de coloração obtida no teste colorimétrico utilizando a resazurina. A CIM é definida como a menor concentração encontrada que impede a mudança de cor, total ou parcial, do meio na microplaca analisada. Após o término do tempo de incubação, foram acrescentados 30µL de resazurina a 0,01% em cada poço utilizado na microplaca, sendo necessário um período de 3 horas de incubação, para a realização da leitura da CIM. A resazurina é

um corante de coloração azul, utilizado como indicador por sofrer reação de óxido-redução passando de resazurina a resofurina, indicando a presença de células viáveis através da mudança de coloração. Em seguida foi realizada a leitura em espectrometro para identificação da CIM, considerando-se a manutenção da coloração azul como ausência de crescimento (Figura 11).

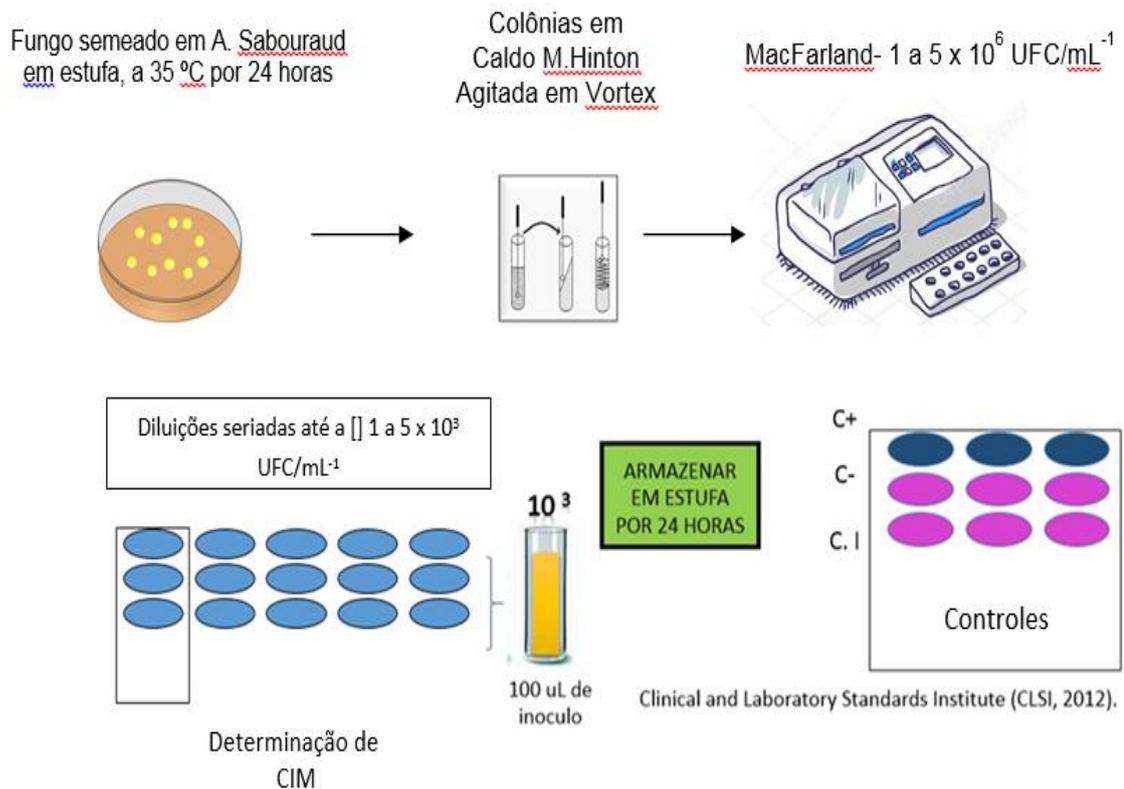


Figura 11 – Esquema geral do ensaio antimicrobiano.

4.3.7 Concentração bactericida mínima (CBM)

Para a obtenção do CBM, foram retirados 10µL de cada poço da placa de microdiluição para serem semeados em placas de Petri contendo ágar Miller Hinton (AMH). Em seguida as placas foram incubadas por 24 horas a 37°C para posterior leitura das Unidades Formadoras de Colônias (UFC). A CBM é considerada a menor concentração do composto que resulta em ausência de crescimento ou o

aparecimento de menos de três colônias, eliminando 99,9% dos micro-organismos (QUADROS et al., 2011).

4.4 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA

A avaliação do potencial citotóxico foi realizada em parceria com o Núcleo de Pesquisa em Oncologia - NPO, pelas pesquisadoras Natasha Costa da Rocha Galucio e Daniele Moysés de Araújo, com o apoio e infraestrutura do Prof. Dr. André Salim Khayat, pertencente a Universidade Federal do Pará.

4.4.1 Teste de viabilidade celular (método MTT)

Um ensaio citotóxico colorimétrico muito aplicado é o ensaio com o sal de tetrazólio MTT - brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio] – um teste que mede a viabilidade celular e sua leitura é realizada em espectrofotômetro de varredura de múltiplos poços, este ensaio é versátil e quantitativo. Avalia a atividade oxidativa mitocondrial, ou seja, o sal é reduzido nas mitocôndrias das células vivas, através da clivagem da enzima succinato desidrogenase, em cristais de formazan, de coloração púrpura (Figura 12); estes cristais são extraídos através da adição de um solvente apropriado. A variável contínua resultante da quantidade de cristais formados é diretamente proporcional ao número de células viáveis presentes no experimento. Os ensaios que medem a atividade metabólica são adequados para analisar a proliferação, viabilidade e citotoxicidade nas células.

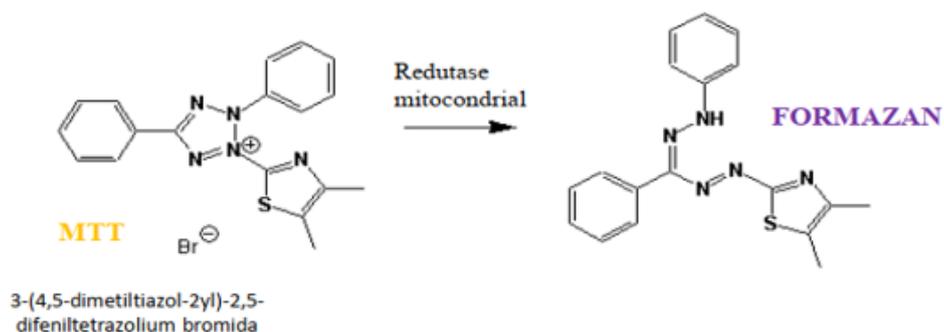


Figura 12 - Redução do MTT por enzimas mitocondriais
Fonte: PETER BRESCIA; PETER BANKS, 2010

A densidade óptica (OD) resultante do teste MTT é determinada em espectrofotômetro (MOSMANN, 1983; TEMPONE et al., 2008). A densidade óptica de cada diluição é lida e comparada com controle negativo de células (100%) o que evidenciará o percentual de sobrevivência em cada diluição. A partir da análise do percentual de sobrevivência das células x diluição das amostras em teste é possível calcular concentração citotóxica 50% (CC₅₀) que mata 50% das células (DAGUANO et al., 2007). O ensaio MTT tem limitações como falta de linearidade frente a densidades celulares elevadas. Esta situação é corrigida mediante padronização da técnica de acordo com a linhagem celular a ser utilizada. Outra limitação está no fato de diferentes linhagens diferirem na capacidade de reduzir o corante. Porém uma grande vantagem, as células mortas não podem interferir nos níveis de absorvância porque apenas as células metabolicamente ativas podem reduzir o sal de tetrazólio ao seu produto formazan. Todavia, pode ocorrer redução do MTT em células em apoptose em estágios iniciais visto que as mitocôndrias permanecem intactas (LOTZE; THOMSON, 2005). Apresenta como vantagens: simplicidade da técnica, o curto prazo de execução e é um ensaio reprodutível. Citado inclusive como teste adequado para o rastreamento e modulação da resistência aos medicamentos em casos clínicos individualizados, como em tratamento de tumores. Neste ensaio as células destes tumores são expostas a diferentes concentrações dos antitumorais, estabelecendo a concentração inibitória mínima. Pode-se inferir que é um excelente teste de triagem que norteia os demais ensaios de toxicidade (KEEPERS et al., 1991; SARGENT, 2003; LOTZE; THOMSON, 2005).

4.4.2 Cultivo celular

As linhagens celulares de câncer gástrico (AGP01) e de fibroblasto de pulmão (MRC5) foram cultivadas em meio DMEM - Dulbecco's modified Eagle's médium (Sigma) - suplementado com 10% de soro fetal bovino – SFB (Laborclin), 100µg/mL de estreptomicina (Sigma) e 60 µg/mL de penicilina (Sigma). As células foram cultivadas em frascos de cultura T-75 em incubadora com atmosfera úmida a 37°C e CO₂ a 5,0%.

As passagens celulares eram realizadas quando se verificava em microscopia óptica a propagação de células por toda superfície de crescimento da garrafa de cultivo; para o procedimento de passagem a cultura era lavada com PBS (Phosphate Buffered

Saline), com o objetivo de retirar os resíduos do SFB, e adicionada tripsina-EDTA para que as células se desprendessem da garrafa de cultivo; após este procedimento adicionava-se novo meio de cultura para ressuspender as células e distribuí-las em outras garrafas de cultura.

4.4.3 Ensaio de viabilidade celular

Inicialmente utilizamos a triagem primária realizada em uma única concentração de 10 μ g/mL, experimento realizado em triplicata, levando em consideração custo e tempo, e que altas concentrações não são de interesse farmacológico.

Posteriormente, as substâncias que apresentaram viabilidade celular abaixo de 50% na linhagem gástrica AGP01 foram escolhidas para os ensaios de investigação da EC₅₀ concentração efetiva, que é obtida a partir de uma curva de concentração resposta, ou seja, a concentração do fármaco que induz 50% do efeito máximo.

O ensaio de viabilidade celular foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Mossman et al. (1983). Para a triagem inicial, as células de AGP01 foram cultivadas em densidade de 2×10^5 em placas de 96 poços e incubadas com as substâncias EBA, AMB, MEB, PEB, 4G3, 34M, OPC, A1, A3 e A5 por 72 h em concentração única de 10 μ g/mL. As substâncias selecionadas (EBA, AMB, MEB, PEB, 34M), foram diluídas em Tween 20 e incubadas em linhagem de câncer gástrico (AGP01) e em linhagem normal de pulmão (MRC5) por 24, 48 e 72 horas nas densidades de 8×10^5 , 6×10^5 , 2×10^5 respectivamente em 96 poços nas concentrações de 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 e 8 μ g/mL para determinar a IC₅₀. Após a remoção das substâncias e da lavagem com solução salina tamponada com fosfato (pH 7,4), foi adicionado 20 μ g/mL/poço (5mg/mL) de brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT) em solução salina tamponada com fosfato. Após 4h de incubação, foi adicionado 100 μ L de DMSO (dimetilsulfóxido) em cada poço para dissolver os cristais azuis escuros e após a diluição do precipitado, as absorbâncias dos poços foram lidas em um espectrofotômetro de varredura de múltiplos poços, utilizando um comprimento de onda $\lambda=570$ nm.

Para a avaliação da atividade antitumoral foram utilizados os valores de IC₅₀ (concentração inibitória 50% - concentração que inibe o crescimento celular em 50%)

e para avaliar a citotoxicidade de células não-tumorais foram usados os valores CC_{50} (concentração citotóxica 50%- concentração que mata 50% das células).

4.4.4 Análise estatística

Todos os testes foram realizados em triplicata, e para a análise estatística foi realizada utilizando ANOVA seguido do teste de Tukey para as comparações múltiplas. As análises foram realizadas no programa GraphPad Prism 6.0®. Os valores de p inferior ou igual a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SÍNTESES DAS CHALCONAS

Sintetizaram-se dez substâncias sendo sete chalconas (EBA, AMB, MEB, PEB, 4G3, 34M, OPC) e três naftoflavanonas (A1, A3, A5), Tabela 1. Para todas as substâncias foram realizadas análises de RMN¹H, RMN¹³C e obtenção do Ponto de fusão.

As substâncias apresentaram rendimentos variando entre 65,35 e 97,45%. Os pontos de fusão obtidos experimentalmente apresentaram-se menores em algumas unidades em °C quando comparados aos dados da literatura, talvez essa divergência seja devido ao uso do solvente ser diferente do citado pela literatura (Tabela 2).

Tabela 1 - Estrutura química das chalconas e naftoflavanonas sintetizadas.

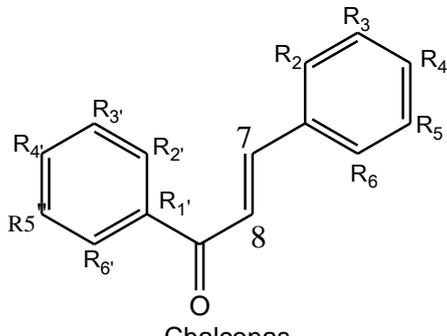
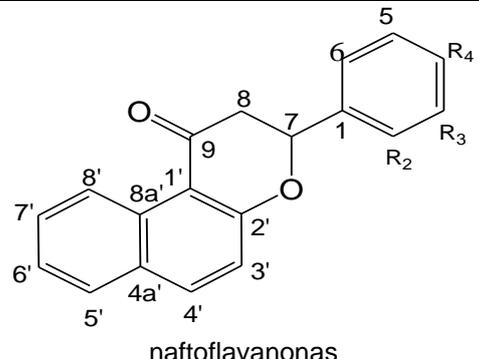
	EBA	AMB	MEB	PEB	4G3	34M	OPC	
 <p>Chalconas</p>	R ₂	H	H	H	H	H	H	
	R ₃	H	H	H	H	OMe	H	
	R ₄	H	H	H	OMe	H	OMe	OMe
	R ₅	H	H	OMe	H	H	OMe	H
	R ₆	H	OMe	H	H	H	H	H
	R _{2'}	H	H	H	H	H	H	H
	R _{3'}	H	H	H	H	H	H	H
	R _{4'}	H	H	H	H	OMe	OMe	OH
	R _{5'}	H	H	H	H	H	H	H
	R _{6'}	H	H	H	H	H	H	H
 <p>naftoflavanonas</p>	A1		A5		A3			
	R ₂	OMe		H		H		
	R ₃	H		OMe		H		
	R ₄	H		H		OMe		

Tabela 2 - Rendimentos e pontos de fusão de chalconas e naftoflavanonas.

Substâncias	Rendimento (%)	P.F. (°C) Experimental	P.F. (°C) Literatura	Nº Registro CHEMCATS
EBA	91,23	54 -55	54 -56	94-41-7
AMB	67,35	58-59	60	5416-70-6
MEB	65,35	58-59	58-59	5470-91-7
PEB	90,30	71-72	73-76	959-33-1
4G3	87,93	105-106	105-107	959-23-9
34M	97,45	129-130	131-132	105686-91-7
OPC	74,36	115-129	185-188	6338-81-4
A1	85,44	141-143	*	28565-19-1
A5	93,04	105-106	*	28656-20-4
A3	85,72	118-121	143	28656-21-5

Legenda - CHEMCATS: número de registro no CAS, obtido através do scifinder,
*P.F. não encontrado na literatura

Para as chalconas os espectros de RMN¹H (400MHz; CDCl₃) (Fig. 13 a Fig. 19, p. 60 a p. 63), foram identificados os sinais relativos aos hidrogênios H-8 e H-7 como um sistema do tipo AB, como um duplete de constante de acoplamento de J~16Hz caracterizando a conformação trans das chalconas. Também, os sinais relativos aos hidrogênios aromáticos e aqueles relativos aos hidrogênios das metóxilas. No anel A das substâncias 4G3, 34M e OPC, foi verificado o sistema AA'BB' de H-3'-H-5' e H-2'-H-6', com os sinais relativos entre (8,5-8,8) e (7,00-7,02) ppm respectivamente. Os hidrogênios H-3-H-5 e H-2-H-6 no anel B, são equivalentes para as estruturas das chalconas PEB e OPC (6,94-6,97), (7,62-7,64).

As demais substâncias que não apresentam substituintes para as estruturas, os sinais relativos hidrogênio aromáticos são observados como multiplete (m, 10H) em (6,95-7,68) ppm.

No espectro de RMN¹³C (100MHz; CDCl₃) das chalconas (Fig. 32 a Fig. 39, p. 73 a p. 76), foram identificados os sinais relativos aos carbonos aromáticos, aos carbonos olefinícos (C7 e C8), aquele relativo ao carbono carbonílico (C9) e aos carbonos na metóxila.

Nas naftoflavanonas os espectros de RMN¹H (300MHz e 400MHz; CDCl₃), foram identificados os sinais relativos aos hidrogênios H-8', H-8 e H-7 (Fig. 20 a Fig. 24, p. 62 a p. 65). Também, os sinais relativos aos hidrogênios aromáticos e aqueles relativos aos hidrogênios da metóxila (δ : 3,88; s; 3H).

No espectro de DEPT observam-se os sinais relativos ao carbono metílico (OCH_3), aqueles relativos aos carbonos metínicos (CH) e ao carbono metilênico (CH_2), totalizando 13 carbonos hidrogenados para a substância de A5 (Fig. 26; p. 71).

No espectro de COSY, para A5 (Fig. 29 e Fig. 30, p. 70 e p. 71), verificam-se as correlações dos sinais relativos aos hidrogênios entre si.

No espectro de HETCOR (J^1) de A5, foram observadas as correlações dos sinais relativos aos hidrogênios com os sinais relativos aos carbonos correspondentes para A5 (Fig. 27 e Fig. 28, p. 68 e p. 69).

Os sinais relativo aos carbonos não hidrogenados de A5, foram atribuídos com base no espectro de HMBC (Fig. 31, p. 73) devido as correlações de J^3 , dessa maneira pode-se atribuir os sinais relativos aos carbonos C-1 (δ 139,9), C-3 (δ 159,8), C-9 (δ 192,8), C-1' (δ 112,4), C-2' (δ 163,5), C-8a' (δ 131,3) e C-4a' (δ 129,1), com isso foi possível atribuir os sinais relativos de todos os carbonos.

5.2 AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA

A atividade antibacteriana das chalconas e derivados é estabelecida a partir de diversos relatos disponíveis na literatura (NIELSEN et al., 2004; NOWAKAWSKA, 2007; KUMAR et al., 2014). De acordo com Nowakawska (2007), a ação antibacteriana decorre da habilidade da porção estrutural cetona ligada aos carbonos α - β insaturados em reagir com o grupo tiol de proteínas essenciais de bactérias. Outros autores reforçam, que o caráter lipofílico das moléculas é essencial para delinear a atividade bacteriana, visto que a presença de grupamentos hidrofóbicos demonstra ser importante para atividade antimicrobiana (BOWDEN et al., 1990; HARAGUCHI et al., 1998).

O resultado da atividade antimicrobiana obtidos para as substâncias **EBA, AMB, MEB, PEB, 4G3, 34M, OPC, A1, A5 e A3** sintetizadas, mostraram que nenhuma substância avaliada apresentou atividade contra as cepas: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas auriginosa* e *Escherichia coli*, com valores de CIM e CBM iguais a $500 \mu\text{g/mL}^{-1}$. Esse resultado deve-se provavelmente aos muitos mecanismos de resistência natural das bactérias. As bactérias Gram-negativas apresentam, na parede celular, uma membrana externa exclusiva desse tipo de bactéria, que contém lipopolissacarídeos e fosfolipídeos adquirindo, portanto, maior

resistência. Além disso, há a presença de porinas, que são proteínas com função seletiva para a passagem de moléculas pequenas.

Bowden et al. (1990), sugeriram que essas substâncias inibem o crescimento de *S. aureus* por interação com um receptor enzimático constituído por duas áreas e uma região lipofílica, associada ao anel A e uma região hidrofílica, que reage com um grupo hidroxila no anel B, presumivelmente pela formação de ligações de hidrogênio.

Nielson et al. (2004), sintetizaram e testaram derivados de licochalcona A e concluíram que a presença do grupo hidroxila na posição C4' foi favorável e ideal para a atividade antibacteriana.

Kumar et al. (2014), analisaram a atividade antimicrobiana de naftoflavanonas sintetizadas, e todas apresentaram atividade leve a boa contra as cepas *E. coli* e *S.aureus* testadas, utilizando o meio de cultura em ágar, na concentração de $250\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ e o DMSO como controle de solvente. As substâncias **A1**, **A5** e **A3**, neste ensaio, nas condições e concentrações testadas não apresentaram atividade.

5.3 AVALIAÇÃO ANTIPROLIFERATIVA

Neste estudo, visando determinar o potencial citotóxico *in vitro* das chalconas e derivados, foram submetidas dez substâncias (**AMB**, **34M**, **MEB**, **PEB**, **EBA**, **OPC**, **A1**, **A3**, **A5** e **4G3**) para avaliação da viabilidade celular através do teste de MTT, sendo realizado através do teste de viabilidade celular (MTT) conforme Mosmann (1983) contra a linhagem AGP01 (adenocarcinoma gástrico). Os resultados foram apresentados como porcentagem da viabilidade celular. Inicialmente realizamos a triagem primária e as células foram tratadas por 72h em uma única concentração de $10\mu\text{g}/\text{mL}$, como mostrado no Gráfico 1, onde cinco chalconas reduziram a viabilidade celular em mais de 50%, sendo essas selecionadas para estudo posterior.

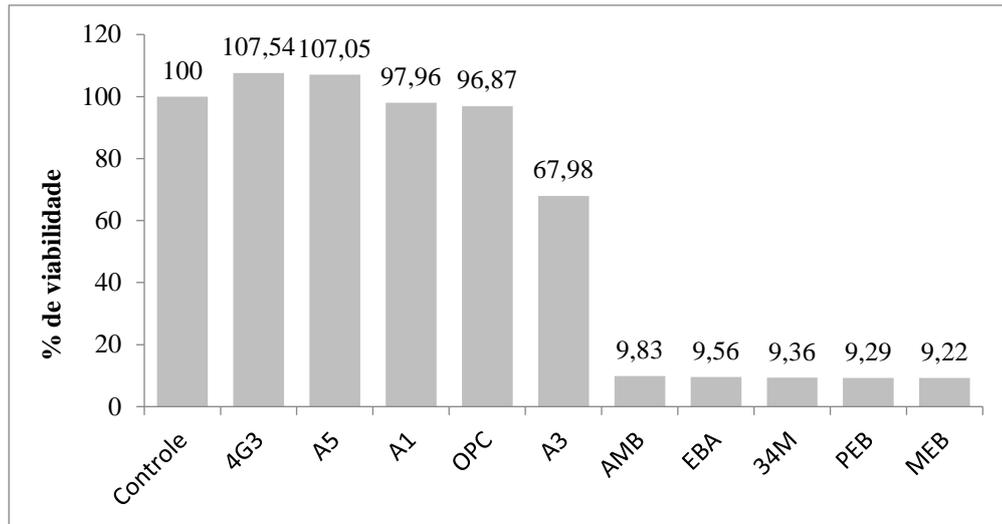


Gráfico 1. Viabilidade celular da linhagem de câncer gástrico AGP01 após 72h de tratamento com as substâncias 4G3, A5, A1, OPC, A3, AMB, EBA, 34M, PEB e MEB na concentração de 10 µg/mL.

Entre as substâncias avaliadas, a **MEB, PEB, 34M, EBA e AMB** foram as que apresentaram maior redução na viabilidade celular de AGP01 respectivamente, todas com redução maior que 90%. Para as substâncias **4G3, A5, A1, OPC e A3** a viabilidade celular foi muito alta em baixa concentração, sendo descartadas para estudo em linhagem normal, visto que compostos em altas concentrações não são de interesse farmacológico (MOSMANN, 1983).

Os compostos com maior redução na viabilidade celular de AGP01 foram selecionados também para estudos com células normais de pulmão (MRC5) em tempos de exposição de 24, 48 e 72h. Os resultados foram tabelados e expressos na metade da concentração inibitório máxima (IC₅₀) como mostrado na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores de IC₅₀ (µM) com intervalo de confiança de 95% das chalconas AMB, 34M, MEB, PEB e EBA nas linhagens AGP01 e MRC5.

Tempo	AMB		34M		MEB		PEB		EBA	
	AGP0	MRC	AGP0	MRC	AGP0	MRC	AGP0	MRC	AGP0	MRC
	1	5	1	5	1	5	1	5	1	5
24h	19,44	7,39	5,77	5,17	7,64	7,46	9,73	21,05	9,5	9,88
48h	5,16	4,66	3,11	3,33	3,86	4,38	5,1	4,75	4,11	2,85
72h	4,86	4,11	2,44	3,07	2,08	3,57	4,99	3,3	4,41	2,75

Todas as chalconas reduziram a viabilidade celular de forma tempo-dependente em ambas as linhagens. Na linhagem de câncer gástrico (AGP01) a chalcona com maior potencial citotóxico foi a **MEB**, tendo uma IC_{50} de 2,08 μ M no tempo de 72 h, apresentando também os menores valores nos outros tempos de tratamento. Apesar das chalconas apresentarem IC_{50} baixo para a linhagem tumoral, elas também foram citotóxicas para a linhagem normal de pulmão. Estudos com outros tipos de células normais ou de câncer podem apresentar resultados melhores comparados com esse em linhagem de câncer gástrico.

A partir da razão entre o IC_{50} MRC5 e o IC_{50} AGP01 calculou-se o índice de seletividade (IS) de cada composto, o que representa a relação entre a dose ativa e a dose tóxica. A literatura considera um bom índice de seletividade valores acima de 3,0 (BÉZIVIN et al., 2003). Dentre as chalconas, a que apresentou o melhor efeito foi a PEB em 24h, com um **IS = 2,17**. Alguns autores consideram um bom índice de seletividade valores acima de 3,0 (BÉZIVIN et al, 2003).

Modzelewska et al. (2006), relataram o potencial efeito inibitório de uma série de bis-chalconas no crescimento da linhagem celular HCT116 (câncer de cólon), cujos resultados evidenciaram a inibição do crescimento celular de HCT116 em comparação com as células normais, com um IC_{50} de 2,8 μ M, resultado muito semelhante encontrando ao nosso trabalho.

Estudos reportados por Echeverria et al. (2009), demonstraram que a 2'-hidroxi-chalconas possuem atividades antineoplásicas e os efeitos antitumorais foram testados em linhagem celular HepG2 (câncer de fígado), com efeito indutor de apoptose e inibição da proliferação celular, entretanto não foram feitos testes em células normais.

Syam et al. (2012) sintetizaram diversas chalconas e avaliaram suas toxicidades *in vitro* frente a célula MCF-7 (adenocarcinoma de mama) com IC_{50} de $6.875 \pm 0.219 \mu$ g/mL, $7.992 \pm 0.81 \mu$ g/mL, $6.873 \pm 1.2 \mu$ g/mL e $5.251 \pm 0.67 \mu$ g/mL, respectivamente da chalcona, 2-cloro-chalcona, 2-hidróxi-3-metil-chalcona, 3-cloro-chalcona, onde quatro chalconas mostraram indução de apoptose em células MCF-7.

Anwar et al. (2018) sintetizaram derivados de chalconas, sendo avaliadas *in vitro* contra a linhagem cancerígena de cólon (WiDr) e de mama (T47D), a 4'-hidróxi-4-cloro-chalcona apresentou IC_{50} de 20,42 μ g/mL contra a linha celular WiDr e IC_{50} de 57,70 μ g/mL para a célula T47D. Porém a 4'-hidróxi-3,4-dimetóxi-chalcona foi a mais seletiva com IS de 60,22. Apesar de um ótimo índice de seletividade contra a linhagem

T47D, ainda apresenta uma concentração alta com IC₅₀ de 44,67, contudo evidencia o potencial das chalconas para um efeito anticâncer. Relataram o efeito de substituintes do anel aromático sobre seu potencial inibitório, observaram que os compostos contendo grupos retiradores de elétrons, (como nitro, flúor, cloro e bromo) mostraram maior potencial inibitório do que aqueles contendo grupos doadores de elétrons (-OH, -OCH₃).

A atividade das chalconas não depende apenas de sua estrutura, podem ter múltiplos alvos e diferentes mecanismos de ação, dependendo da especificidade do tumor. A seletividade das chalconas foi observada por vários trabalhos de pesquisa em diferentes linhagens de células cancerosas (ORLIKOVA et al., 2011; KOTHA et al., 2017; SHARMA et al., 2016). Algumas chalconas tem grande potencial para gerar novas drogas anticancerígenas que podem agir causando danos ao DNA, inibindo a tubulina e fibras do fuso, indução da morte celular, inibindo a produção de vasos sanguíneos dentre outros (DAS; MANNA, 2016). Principalmente aquelas em que há presença de substituinte hidroxila (-OH) e metoxila (-OCH₃), pois a alteração de ambos os anéis influenciou a atividade do composto (DEVI et al. *apud* LAKSHMI, 2018).

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos na pesquisa nos guiaram as seguintes conclusões: Foram sintetizadas dez substâncias a partir da reação de Claisen-Schmidt, que confirmou ser uma boa via sintética para a produção de chalconas e derivados, obtendo bons rendimentos e suas estruturas foram elucidadas através dos métodos físicos de RMN¹H e RMN¹³C. A avaliação da atividade antimicrobiana mostrou que nenhuma substância apresentou bom resultado de CIM e CBM contra as cepas testas. O teste antiproliferativo apresentou resultado significativo, pois cinco chalconas mostraram possuir um grande efeito citotóxico, porém, apesar de apresentarem IC₅₀ baixo para linhagem tumoral, elas também foram citotóxicas para linhagem normal de pulmão, portanto praticamente inviabilizando seu uso como antitumoral contra célula AGP01. Considerando o potencial biológico das chalconas, chegamos à conclusão, que este trabalho foi de grande importância, pois sintetizamos dez substâncias e submetemos à avaliação antimicrobiana e antiproliferativa. Podendo futuramente serem avaliadas em outras linhagens celulares, bem como serem utilizadas como protótipos para busca de substâncias com menor citotoxicidade ou avaliadas em outras atividades biológicas.

REFERÊNCIAS

AHMAD, M. R.; SASTRY, V. G.; BANO, N.; ANWAR, S. Synthesis of novel chalcone derivatives by conventional and microwave irradiation methods and their pharmacological activities. **Arabian Journal of Chemistry**. v. 9, p. 931–935, 2016.

ALARD E, BUTNARIU A-B, GRILLO M, KIRKHAM C, ZINOVKIN DA, NEWNHAM L, MACCIOCHI J & PRANJOL M Z I. Advances in Anti-Cancer Immunotherapy: Car-T Cell, Checkpoint Inhibitors, Dendritic Cell Vaccines, and Oncolytic Viruses, and Emerging Cellular and Molecular Targets. **Cancers**. v. 12, p. 1826, 2020.

ANANDAM, R.; JADAV, S. S.; ALA, V. B.; AHSAN, M. J.; BOLLIKOLLA, H. B. Synthesis of new C-dimethylated chalcones as potent antitubercular agents. **Medicinal Chemistry Research**. v. 27, p. 1690–1704, 2018.

ANWAR, C.; PRASETYO, Y. D.; MATSJEH, S.; HARYADI, W.; SHOLIKHAH, E. N.; NENDROWATI. Synthesis of Chalcone Derivatives and Their *in vitro* Anticancer Test against Breast (T47D) and Colon (WiDr) Cancer Cell Line. **Indonesian Journal of Chemistry**. v. 18, p. 102–107, 2018.

ATTAR, S.; O'BRIEN, Z.; ALHADDAD, H.; GOLDEN, M. L & CALDERÓN-URREA, A. Ferrocenyl chalcones versus organic chalcones: A comparative study of their nematocidal activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 19, p. 2055–2073, 2011.

ANTO et al. Anticancer and antioxidant activity of synthetic chalcones and related compounds. **Cancer Letters**. v. 97, p. 33–37, 1995.

BÉZIVIN, C.; TOMASI, S.; LOHÉZIC-LE, D.; BOUSTIE, F. J. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. **Phytomedicine**. v.10, p. 499-503, 2003. doi:10.1078/094471103322331458

BHATIA, N. M.; MAHADIK, K. R.; BHATIA, M. S. QSAR analysis of 1,3-diaryl-2-propen-1-ones and their indole analogs for designing potent antibacterial agents. **Chemical Papers**. v.63, p. 456–463, 2009.

BHALE, P. S.; CHAVAN, H. V.; DONGARE, S. B.; SHRINGARE, S. N.; MULE, Y. B.; S. NAGANE, S. S.; BANDGAR, B. P. Synthesis of extended conjugated indolyl chalcones as potent anti-breast cancer, anti-inflammatory and antioxidant agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 27, p. 1502–1507, 2017.

BITENCOURT, H. R.; SANTOS, L. S.; SOUZA FILHO, A. P. S. Atividade alelopática de chalcona sintética, de seus precursores e de cetonas e aldeídos relacionados. **Planta Daninha**. v.25, p.747, 2007.

BOWDEN, K.; POZZO, A. D.; DUAH, C. K. Antibacterial activity of a series of substituted (E)-3-(4-phenylbenzoyl) acrylic acids-chalcones, -2-hydroxychalcones and - α -bromo-chalcones; addition of cysteine to substituted 3-benzoylacrylic acids and related compounds. **Journal of Chemical Research**. v. 12, p.2801-2830, 1990.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. P.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**. v. 33, p. 1359-1369, 2010.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE LA & JEMAL A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**. v.68, p. 394–424, 2018.

BRESCIA, P.; BANKS, P. Quantifying Cytotoxicity of Thiostrepton on Mesothelioma Cells using MTT Assay and the Epoch Microplate Spectrophotometer. Disponível em: <<https://www.biotek.com>>. Acesso em: 04 nov. 2019.

CDC. Definition of MRSA. **Centers for Disease Control and Prevention**, 2016. Disponível em: <<http://www.cdc.gov> 2016>. Acesso em 03 jul. 2019.

CHEENPRACHA, S. et al. Anti-HIV-1 protease activity of compounds from boesenbergia pandurata. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 14, p. 1710–1714, 2006.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for dilution anicrobial susceptibility test for bactéria that grow aerbically**. Approved standart: M7-A9, None Edition, v. 32, n. 2, January, 2012.

DEVI, L. D.; ASWINI, R.; KOTHAI, S. SYNTHESIS AND CHARACTERISATION OF CHALCONE BASED COPOLYESTERS AND THEIR ANTICANCER ACTIVITY. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**. v. 9, n. 4, p. 1589-1593, 2018.

DAGUANO, J. K. M. F.; SANTOS, C.; ROGERO, S. O. Avaliação da Citotoxicidade de Biocerâmicas Desenvolvidas para uso em Sistemas de Implantes. **Revista Matéria**, v. 12, n. 1, p. 134–139, 2007.

DAS, M.; MANNA, K. Chalcone Scaffold in anticancer armamentarium: a molecular insight. **Journal of Toxicology**. v. 2016, p. 1–4, 2016.

DECAMP, O.; MORIARTHY, D. J. W. P. A segurança dos probióticos para a aquicultura. **Revista da Associação Brasileira de Criadores de Camarão**. v.8, n.2, p.40-41, 2006.

DE MELLO, T. F. P. et al. Leishmanicidal activity of synthetic chalcones in Leishmania (Viannia) braziliensis. **Experimental Parasitology**. v. 136, n. 1, p. 27–34, 2014.

DELMULLE, L.; BELLAHCÈNE, A.; DHOOGHE, W.; COMHAIRE, F.; ROELEN, F.; HUVAERE, K.; HEYERICK, A.; CASTRONOVO, V.; DE KEKULEIRE, D. Anti-proliferative properties of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus* L.) in human prostate cancer cell lines. **Phytomedicine**. v. 13 (9-10): 732-4, 2006.

DEMAIN, A. L. Prescription for an ailing pharmaceutical industry. **Nature Biotechnology**. v.20, n.4, p.231-235, 2002.

ECHEVERRIA, C.; SANTIBAÑEZ, J. F.; DONOSO-TAUDA, O.; ESCOBAR, C. A.; RAMIREZ-TAGLE, R. Structural Antitumoral Activity Relationships of Synthetic Chalcones. **International journal of molecular sciences**. v. 10, p. 221–231, 2009.

FERLAY, J.; COLOMBET, M.; SOERJOMATARAM, I.; MATHERS, C.; PARKIN, D. M.; PIÑEROS, M.; ZNAOR, A. & BRAY, F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **International Journal of Cancer**. v. 144, p. 1941–1953, 2019.

FERREIRA, M. K. A.; FONTENELLE, R. O. S.; MAGALHÃES, F. E. A.; BANDEIRA, P. N.; S.; MENEZES, J. E. S. A.; SANTOS, H. Chalcones Pharmacological Potential: A Brief Review. **Rev. Virtual Quim**. v. 10, n. 5, 2018.

FERREIRA, A. L.; ROCHA, C. P.; VIEIRA, L. M.; DUSSE, L. M. S.; JUNQUEIRA, D. R. G.; CARVALHO, M. G. Alterações hematológicas induzidas por medicamentos convencionais e alternativos. **Revista Brasileira de Farmácia**. v. 94, p. 94-101. 2013.

FIORICA, F.; TROVÒ, M.; OTTAIANO, A., NASTI, G., CARANDINA, I., MARZOLA, M.; PAOLI, P.D & BERRETTA, M. Can the addition of radiotherapy postoperatively increase clinical outcome of patients with gastric cancer? A systematic review of the literature and meta-analysis. **Oncotarget**. v. 9, p. 10734-10744, 2018.

FU, Y.; LIU, D.; ZENG, H.; REN, X.; SONG, B.; HU, B. New chalcone derivatives: synthesis, antiviral activity and mechanism of action. **Royal Society of Chemistry**. v. 10, p. 24483–24490, 2020.

FUCHS, F.D.; WANNMACHER, L. **Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional**, ed. 2, p.510-520. Editora Guanabara Koogan: Rio de Janeiro-RJ, 1999.

GALUCIO, N. C. R. **Estudos Fitoquímicos, Citotoxicidade e Genotoxicidade de Eleutherine Plicata Herb**. 2014.95f. Dissertação (Mestrado Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Médicas, Belém, 2014.

GAONKAR, S. L.; VIGNESH, U. N. Synthesis and pharmacological properties of chalcones: a review. **Research on Chemical Intermediates**. v. 43, p. 6043–6077, 2017.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**. v. 33, n. 03, p. 667-679, 2010.

HARAGUCHI, H.; TANIMOTO, K.; TAMURA, Y. K.; MIZUTANI, T. **Mode of Antibacterial Action of Retrochalcones from Glycyrrhiza inflata**. **Phytochemistry**, v. 48, n. 1, p.125-129, 1998.

HARVEY, A. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**. v.13, p. 894- 901, 2008.

HSU, Y. L. et al. Chalcone inhibits the proliferation of human breast cancer cell by blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. **Food and Chemical Toxicology**. v.44, p.704–713, 2006.

HIRATA, L. **Superbactérias em ação**. 2008. Disponível em: <www.revistavivasaude.uol.com.br>. Acesso em: 12 dez. 2019.

INCA. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil>>. Acesso em: 02 nov. 2020.

ISMAIL NL, MING-TATT L, LAJIS NL, AKHTAR MN, AKIRA A, PERIMAL EK, ISRAF DA & SULAIMAN MR. Antinociceptive Effect of 3-(2,3-Dimethoxyphenyl)-1-(5-methylfuran-2-yl) prop-2-en-1-one in Mice Models of Induced Nociception. **Molecules**. v. 21, p. 1077, 2016.

JORAY, M. B.; TRUCCO, L. D.; GONZÁLEZ, M. L.; NAPAL, G. N. D.; PALACIOS, S. M.; BOCCO, J. L.; CARPINELLA, M. C. Antibacterial and Cutotoxic Activity of Compounds Isolated from *Flourensia oolepis*. **Evidence-Bases Complementary and Aletrnative Medicine**. v. 125, 2015.

KEEPERS, Y. P.; PIZAO, P. E.; PETERS, G. J.; ARK-OTTE, J.; WINOGRAD, B.; PINEDO, H. M. Comparison of the Sulforhodamine B Protein and Tetrazolium (MTT) Assays for in vitro Chemosensitivity Testing. **European Journal of Cancer**. v. 27, n. 7, p.897-900, 1991.

KOTHA, R. R.; KULKARNI, R. G.; GARIGE, A. K.; NERELLA, S. G.; GARLAPATI A. Synthesis and Cytotoxic Activity of New Chalcones and their Flavonol Derivatives. **Medicinal Chemistry**. v. 7, p. 353-360, 2017.

KOZLOWSKI D.; TROUILLAS, P.; CALLISTE, C.; MARSAL, P.; LAZZARONI, R.; DUROUX, J. Density Functional Theory Study of the Conformational, Electronic, and Antioxidant Properties of Natural Chalcones. **The Journal of Physical Chemistry**. v. 111, p. 1138-1145, 2007.

KUMAR, B.; KUMARI, B.; SINGH, N.; RAM, B.; BALRAM, B. Synthesis, Antibacterial and Antifungal Activity of Flavanones and Chalcones Derived From 2-Hydroxy-Acetonaphthone. **Journal of Applicable Chemistry**. v.3, p.1468-1474, 2014.

LEI, C.; ZHANG, L. B.; YANG J.; GAO, L.X.; LI, J.Y.; LI, J.; HOU, A.J. Macdentichalcone, a unique polycyclic dimeric chalcone from *Macaranga denticulata*. **Tetrahedron Lett**. v. 57, p. 5475–5478, 2016.

LIMA, S. M. A. Avaliação das atividades antimicrobianas e citotóxicas de metabólitos secundários produzidos pelas actinobactérias ACTMS-9H isolada da rizosfera de *Paulinia cupana* Kunth. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2013.

LIN, Y. M. et al. Chalcones and flavonoids as anti-tuberculosis agents. **Bioorganic e Medicinal Chemistry**. v. 10, p. 2795–2802, 2002.

LOTZE, M.T.; THOMSON, A. W. **Measuring Immunity: Basic Science and Clinical Practice**. 1^a ed. Elsevier Science. London: p. 344-346, 2005.

MAHAPATRA, D. K; BHARTI, S. K.; ASATI, V. Anti-cancer chalcones: Structural and molecular target perspectives. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v.98, p.69–114, 2015.

MARRELLI, D.; POLOM, K.; MANZONI, G.; MORGAGNI, P.; BAIOCCHI, G.L. & ROVIELLO, F. Multimodal treatment in gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology**. v.21, p. 7954–7969, 2015.

MARQUINA S, MALDONADO-SANTIAGO M, SANCHEZ-CARRANZA JN, ANTUNEZ-MOJICA M, GONZALEZ-MAYAL, RAZO-HERNANDEZ RS & ALVAREZ L. Design, synthesis and QSAR study of 2'-hydroxy-4'-alkoxy chalcone derivatives that exert cytotoxic activity by the mitochondrial apoptotic pathway. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 27, p. 43–54, 2019.

MASCARELLO, A. et al. Inhibition of Mycobacterium tuberculosis tyrosine phosphatase PtpA by synthetic chalcones: Kinetics, molecular modeling, toxicity and effect on growth. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 18, p. 3783–3789, 2010.

MODZELEWSKA, A.; PETTIT, C.; ACHATANTA, G.; DAVIDSON, N. E.; HUANG, P. and KHAN, S. R. Anticancer activities of novel chalcone and bis-chalcone derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 14: 3491-3495, 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetry assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v 65. p. 55-63, 1983.

MOUTINHO, S. Ação implacável. **Ciência Hoje**, 2015. Disponível em: <<http://cienciahoje.uol.com.br/noticias/2015/01/acao-implacavel>>. Acesso em: 28 nov. 2019.

NARSINGHANI, T.; SHARMA, M.; BHARGAV, S. Synthesis, docking studies and antioxidant activity of some chalcone and aurone derivatives. **Medicinal Chemistry Research**. v. 22, p. 4059–4068, 2013.

NCBI. **National Center for Biotechnology Information**, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/2016>>. Acesso em: 03 jul. 2019.

NCI, Cancer Statistics. **National Cancer Institute**, 2018. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>>. Acesso em: 03 jul. 2019.38

NARENDER, T.; VENKATESWARLU, K.; VISHNU NAYAK, B.; SARKAR, S. A new chemical access for 30-acetyl-40-hydroxychalcones using borontrifluoride–etherate via a regioselective Claisen-Schmidt condensation and its application in the synthesis of chalcone hybrids. **Tetrahedron Letters**. v. 52, p. 5794–5798, 2011.

NEWMAN, J. D.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**. v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NIELSEN, S. F. et al. Antibacterial chalcones-bioisosteric replacement of the 4'-hydroxygroup. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 12, p. 3047-3054, 2004.

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

OLIVELLA, M. S. et al. A comparative study of bacteriostatic activity of synthetic hydroxylated flavonoids. Brazilian Journal of Microbiology. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 32, p. 229-232, 2001.

OLIVEIRA, R. B.; ALVES, R. J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. **Química Nova**. V. 25, p. 976-984, 2002.

ORLIKOVA, B.; TASDEMIR, D.; GOLAIS, F.; DICATO, M. & DIEDERICH, M. Dietary chalcones with chemopreventive and chemotherapeutic potential. **Genes & Nutrition**. v. 6, p. 125-147, 2011.

ORDITURA, M. et al. Treatment of gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology**. v. 20, p. 1635-1649, 2014.

OMS, Antimicrobial resistance. **Organização Mundial da Saúde**. 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/antimicrobial-resistance/en/>>. Acesso em: 03 jul. 2019.

PHRUTIVORAPONGKUL, A.; LIPIPUN, V.; RUANGRUNGSI, N.; KIRTIKARA, K.; NISHIKAWA, K.; MARUYAMA, S.; WATANABE, T.; ISHIKAWA, T. Studies on the Chemical Constituents of Stem Bark of *Miiletia leucantha*: isolation of new chalcones with cytotoxic, anti-herpes Simplex Virus and anti-inflammatory activities. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. v. 51, p. 187-190, 2003.

PLUMMER, M.; DE MARTEL, C.; VIGNAT, J.; FERLAY, J.; BRAY F & FRANCESCHI S. Global burden of cancers attributable to infections in 2012. a synthetic analysis. **The Lancet Glob Health**. v. 4, p. 609-616, 2016.

QIAN, Y.; SHANG, Y.; TENG, Q.; CHANG, J.; FAN, G.; WEI, X.; LI, R., LI, H., YAO, X., DAI, F.; ZHOU, B. Hydroxychalcones as potent antioxidants: Structure-activity relationship analysis and mechanism considerations. **Food Chemistry**. v. 126, p. 241-248, 2011.

QUADROS, A. U; BINI, D; PEREIRA, P. A; MORONI, E. G; MONTEIRO, M. C. Antifungal activity of some cyclooxygenase inhibitors on candida albicans: PGE2-dependent mechanism. **Folia Microbiol**. v. 56, 349-352, 2011.

RAMPA, A.; BARTOLINI, M.; PRUCCOLI, L.; NALDI, M.; IRIEPA, I.; MORALEDA, I.; BELLUTI, F.; GOBBI, S.; TAROZZI, A.; BISI, A. Exploiting the Chalcone Scaffold to Develop Multifunctional Agents for Alzheimer's Disease. **Molecules**. v. 23, n. 1902, 2018.

SANDHAR, H. K.; KUMAR, B.; PRASHER, S.; TIWARI, P.; SALHAN, M.; SHARMA, P. A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 1, p. 25-41, 2011.

SARGENT, J. M. The use of the MTT assay to study drug resistance in fresh tumor samples. **Recent Results Cancer Res**. v. 161, p. 13-25, 2003.

SANTOS et al., 2019. Antiproliferative activity and p53 upregulation effects of chalcones on human breast cancer cells. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**. v. 34, p. 1093–1099, 2019.

SAYDAM, G.; AYDIN, H. H.; SAHIN, F.; KUCUKOGLU, O.; ERCIYAS, E.; TERZIOGLU, E.; BUYUKKECCEI, F.; Omay, S. B. Cytotoxic and inhibitory effects of 4,4'-dihydroxi chalcone (RVC-588) on proliferation of human leukemic HL-60 cells. **Leukemia Research**. v. 27: 57-64, 2003.

SGVA, Superbugs to kill 'more than cancer' by 2050, 2018. Disponível em: <<https://www.bbc.com/news/health-30416844>>. Acesso em: 28 nov. 2019.

SHARMA, H.; PATIL, S.; SANCHEZ, T. W.; NEAMATI, N.; SCHINAZI, R. F.; BUOLAMWINI, J. K. Synthesis, Biological Evaluation and 3D-QSAR Studies of 3-Keto Salicylic Acid Chalcones and Related Amides as Novel HIV-1 Integrase Inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v.19, 2011.

SHARMA R et al., 2016. A Review on Mechanisms of Anti-Tumor Activity of Chalcones. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**. v. 16, p. 200-211, 2016.

SHIBATA, S. Anti-tumorigenic chalcones. **Stem Cells**. v. 12, p.44-52, 1994.

SHIMOKORIYAMA, M. In: Flavanones, chalcones and aurones. Geissman, T. A. **New York: MacMillan Company**. p. 286-313,1962.

SINGH, P.; ANAND, A.; KUMAR, V. Recent developments in biological activities of chalcones: A mini review. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 85, p. 758–777, 2014.

SIVAKUMAR, P.; PRABHAKAR, P.; DOBLE, M. Synthesis, antioxidant evaluation, and quantitative structure-activity relationship studies of chalcones. **Medicinal Chemistry Research**. v. 20, p. 482–492, 2011.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica 2**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002.

SUDHA, V.; GOVINDARAJ, R.; BASKAR, K.; AL-DHABI, N. A.; DURAI PANDIYAN, V. Biological properties of Endophytic Fungi. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 59, n. 103, p. 161-168, 2016.

SUNITHA, V.; KUMAR, A. K.; MAHESH, M.; SHANKARAI AH, P.; JALAPATHI, P.; LINCOLN, C. A. Synthesis and Antimicrobial Evaluation of Bis-3,5-disubstituted

Isoxazoles Based Chalcones. **Russian Journal of General Chemistry**. v. 88, p. 1904–1911, 2018.

SUWITO et al., 2014. Design and Synthesis of Chalcone Derivatives as Inhibitors of the Ferredoxin — Ferredoxin-NADP⁺ Reductase Interaction of *Plasmodium falciparum*: Pursuing New Antimalarial Agents. **Molecules**. V. 19, p. 21473-21488, 2014.

SYAM, S.; ABDELWAHAB, S. I.; AL-MAMARY, M. A. and MOHAN, S. Synthesis of Chalcones with Anticancer Activities. **Molecules**. v.17, p. 6179-6195, 2012.

TADIGOPPULA, N. et al. Synthesis and insight into the structur-activity relationships of chalcones as antimalarial agents. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 56, p. 31–45, 2013.

TANJI, T. Elas estão por toda a parte. **Galileu**, 2015. Disponível em: <<http://revistagalileu.globo.com/Revista/noticias/2015/02/elas-estao-por-toda-parte.html>>. Acesso em: 02 nov. 2019.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**, ed.3. Editora Atheneu: São Paulo, 2001.

TEMPONE, A.G.; SARTORELLI, P.; TEIXEIRA, D.; PRADO, F.O.; CALIXTO, I.A.R.L.; LORENZI, H.; MELHEM, M.S.C. Brazilian flora extracts as source of novel antileishmanial and antifungal compounds. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.103, n.5, p.443-449, 2008.

TOMAR, V.; BHATTACHARJEE, G.; KAMALUDDIN; RAJAKUMAR, S.; SRIVASTAVA, K. & PURI, S. K. Synthesis of new chalcone derivatives containing acridinyl moiety with potential antimalarial activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 45, p. 745–751, 2010.

VANANGAMUDI, G.; SUBRAMANIAN, M.; THIRUNARAYANAN, G. Synthesis, spectral linearity, antimicrobial, antioxidant and insect antifeedant activities of some 2,5-dimethyl-3-thienyl chalcones. **Arabian Journal of Chemistry**. v.10, p.1254–1266, 2017.

VÁSQUEZ-MARTÍNEZ, Y. A. et al. Antimicrobial, Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities of Polyoxygenated Chalcones. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 30, p. 286-304, 2019.

VENTURA, T. L. B.; CALIXTO, S. D.; ABRAHIM-VIEIRA, B. A.; SOUZA, A. M. T.; MELLO, M. V. P.; RODRIGUES, C. R.; MIRANDA, L. S. M.; SOUZA, R. O. M. A.; LEAL, I. C. R.; LASUNSKAIA, E. B.; MUZITANO, M. F. Antimycobacterial and Anti-Inflammatory Activities of Substituted Chalcones Focusing on Anti-Tuberculosis Dual Treatment Approach. **Molecules**. v. 20, p. 8072-8093, 2015.

VIMAL, V.; RAJAN, B. M.; KANNABIAN, K. Antimicrobial activity of marine actinomycete, *Nocardiosis* sp. VITSVK 5 (FJ9773467). **Asian Journal of Medical Sciences**. v. 01, n. 02, p.57-63, 2009.

WANG, T-Y; LI, Q; BI, K-S. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. **Asian Journal of Pharmaceutical**. v.13, p.12-23, 2018.

WINTER, E. et al. Naphthylchalcones induce apoptosis and caspase activation in a leukemia cell line: the relationship between mitochondrial damage, oxidative stress, and cell death. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 18, p. 8026–8034, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Agency for Research on Cancer. **World Cancer Report: 2018**. Disponível em: < https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1>. Acesso em: 13 de jul. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Agency for Research on Cancer. **World Cancer Report: 2014**. Disponível em: <https://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2014> >. Acesso em: 03 nov. 2019.

WU, J.; LI, J.; CAI, Y.; PAN, Y.; YE, F.; ZHANG, Y.; ZHAO, Y.; YANG, S; LI, X. & LIANG, G. Evaluation and discovery of novel synthetic chalcone derivatives as anti-inflammatory agents. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 54, p. 8110–8123, 2011.

XIA, Y.; YANG, Z.-Y.; XIA, P.; BASTOW, K. F.; NAKANISHI, Y.; LEE, K.-H. Antitumor agents. Part 202: Novel 2'-amino chalcones: design, synthesis and biological evaluation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v.10, p. 699-701, 2000.

YADAV, P.; LAL, K.; KUMAR, A.; GURU, S. K.; JAGLAN, S.; BHUSHAN, S. Green synthesis and anticancer potential of chalcone linked-1,2,3-triazoles. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 126, p. 944-953, 2017.

YE, C. L.; LIU, J. W.; WEI, D. Z.; LU, Y. H.; QIAN, F. In vitro anti-tumor activity of 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5' - dimethylchalcone against six established human cancer cell lines. **Pharmacological Research**. v. 50, p. 505–510, 2004.

ZHANG, H.; JIN, H.; JI, L-Z; TAO, K; LIU, W.; ZHAO, H-Y & HOU, T-P. Design, Synthesis, and Bioactivities Screening of a Diaryl Ketone-Inspired Pesticide Molecular Library as Derived from Natural Products. **Chemical Biology & Drug Design**. v. 78, p. 94–100, 2011.

ANEXO – Espectros das substâncias

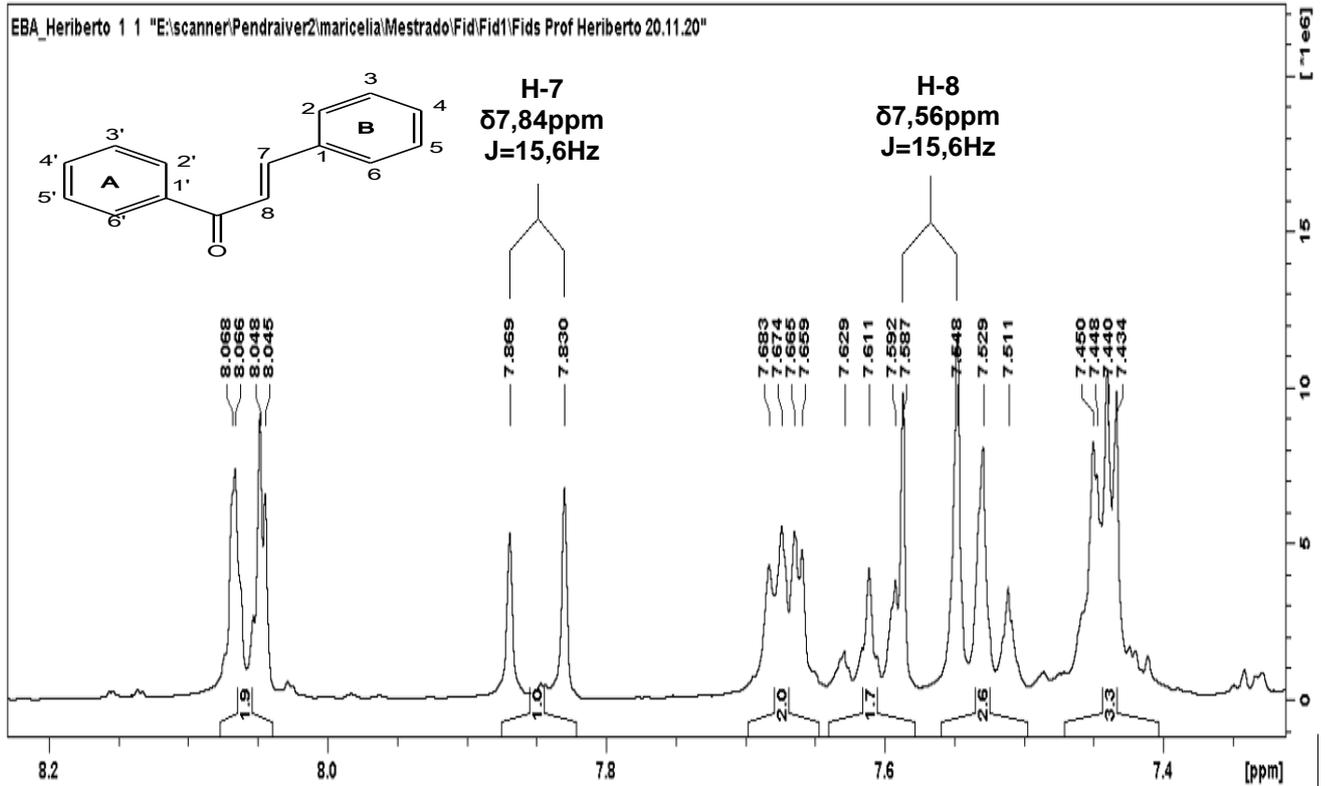


Figura 13 – Expansão do espectro de RMN¹H (400MHz, CDCl₃) de EBA.

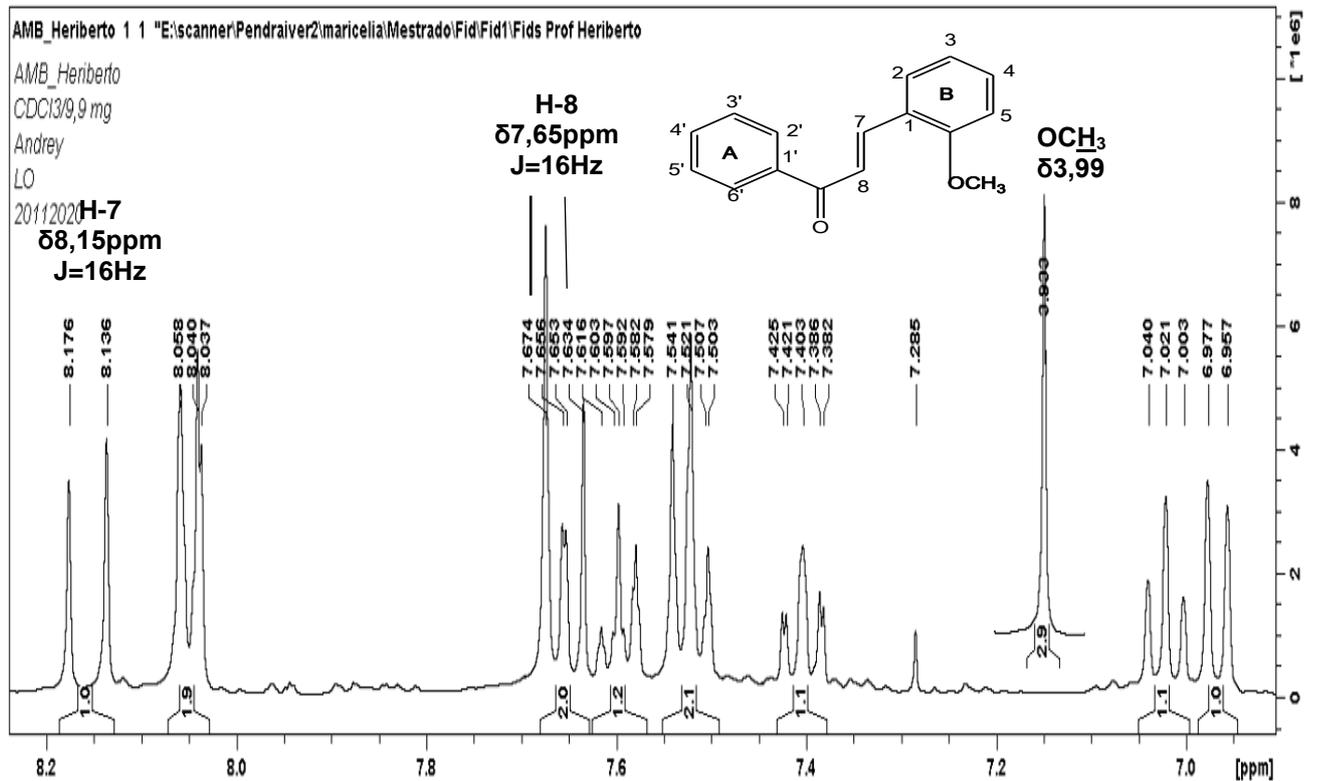


Figura 14 – Expansão do espectro de RMN¹H (400MHz, CDCl₃) de AMB.

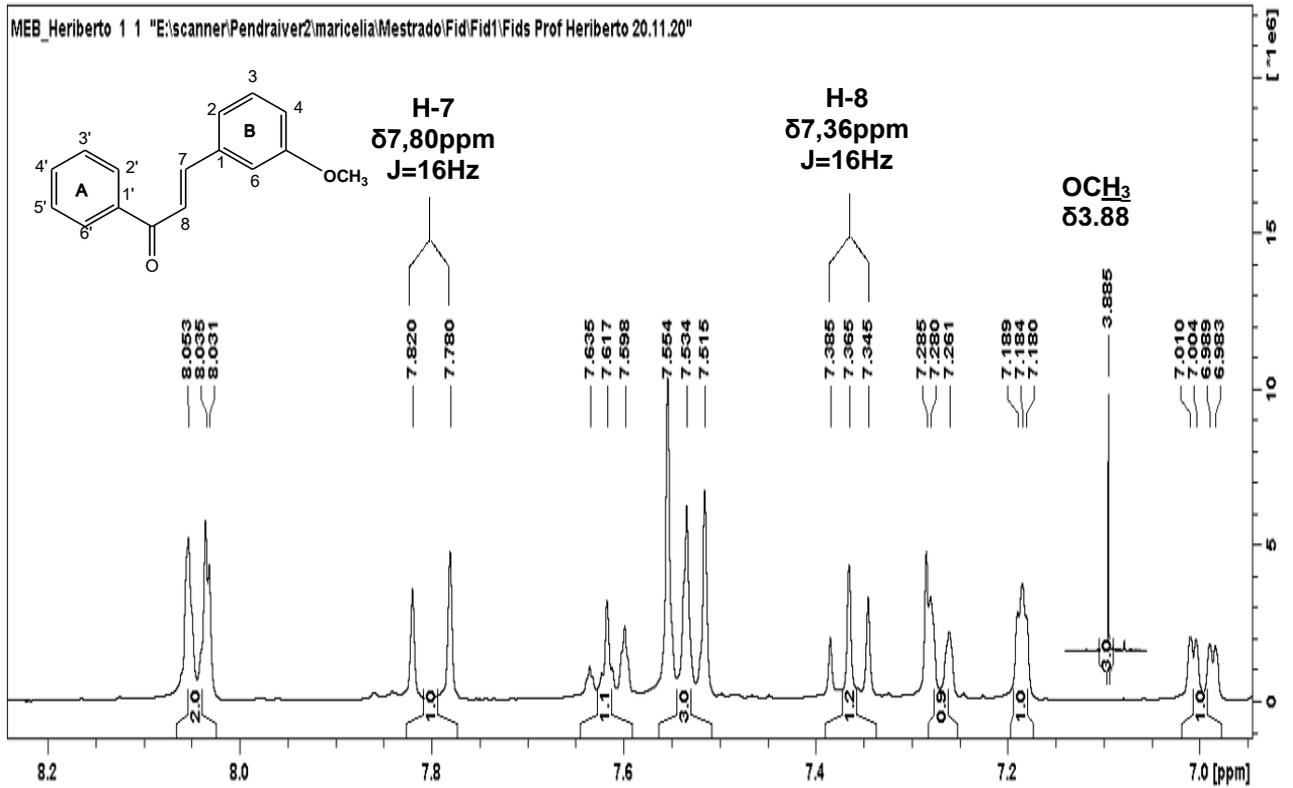


Figura 15 – Expansão do espectro de RMN¹H (400MHz, CDCl₃) de MEB.

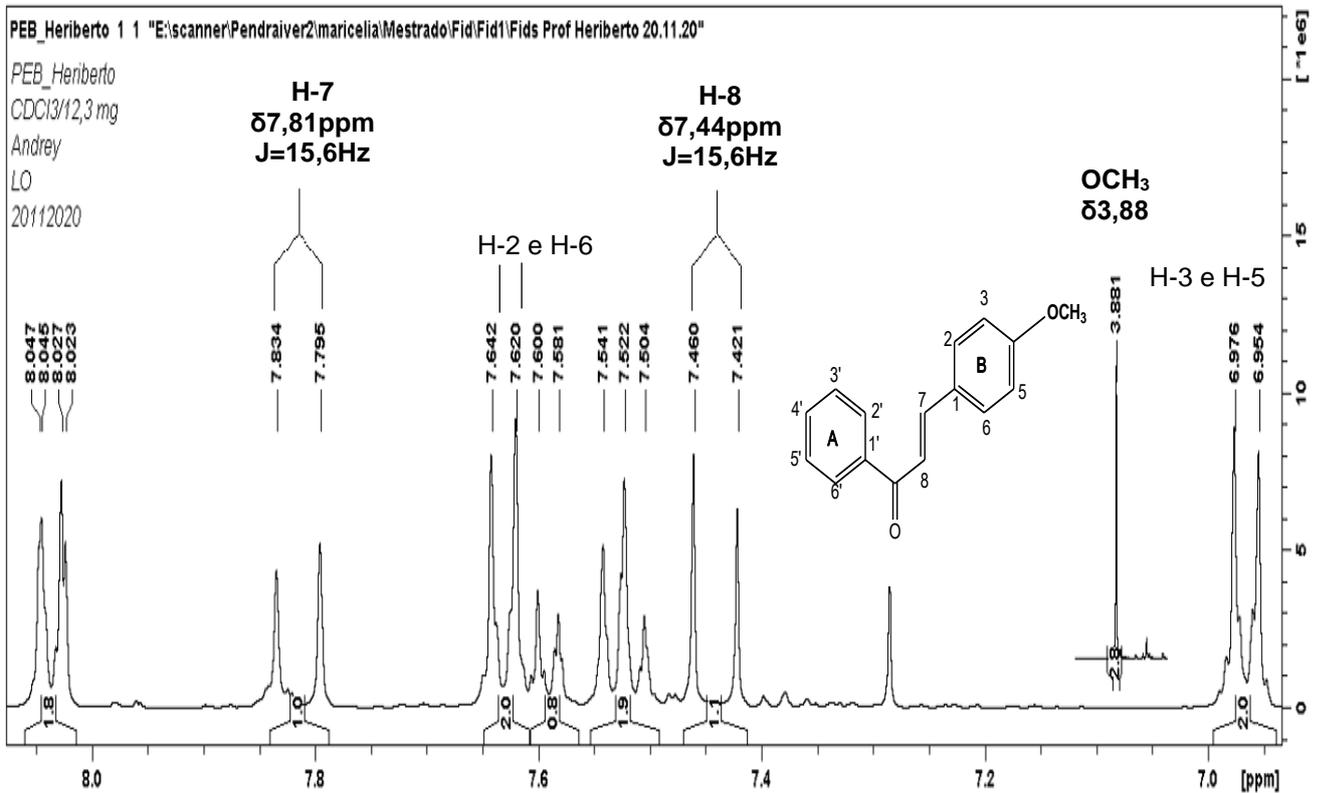


Figura 16 – Expansão do espectro de RMN¹H (400MHz, CDCl₃) de PEB.

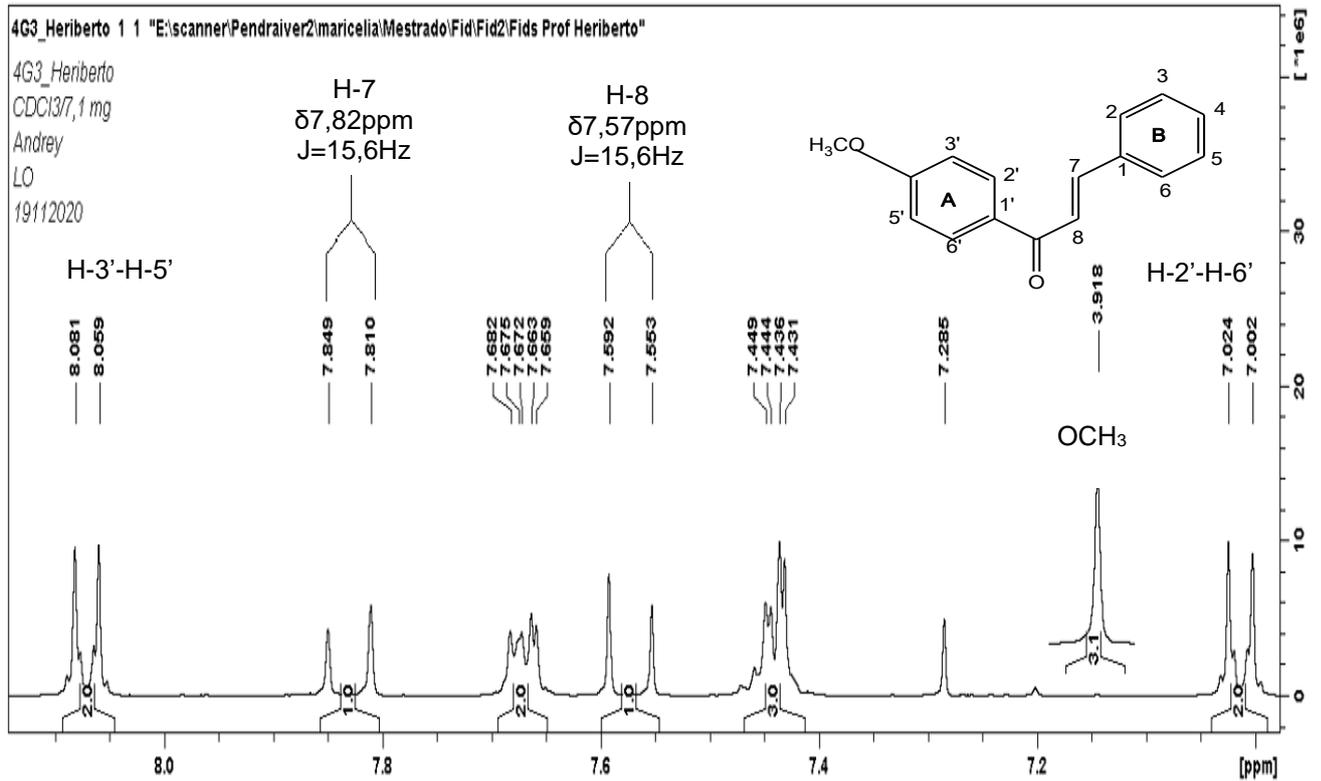


Figura 17 – Expansão do espectro de RMN¹H (400MHz, CDCl₃) de 4G3.

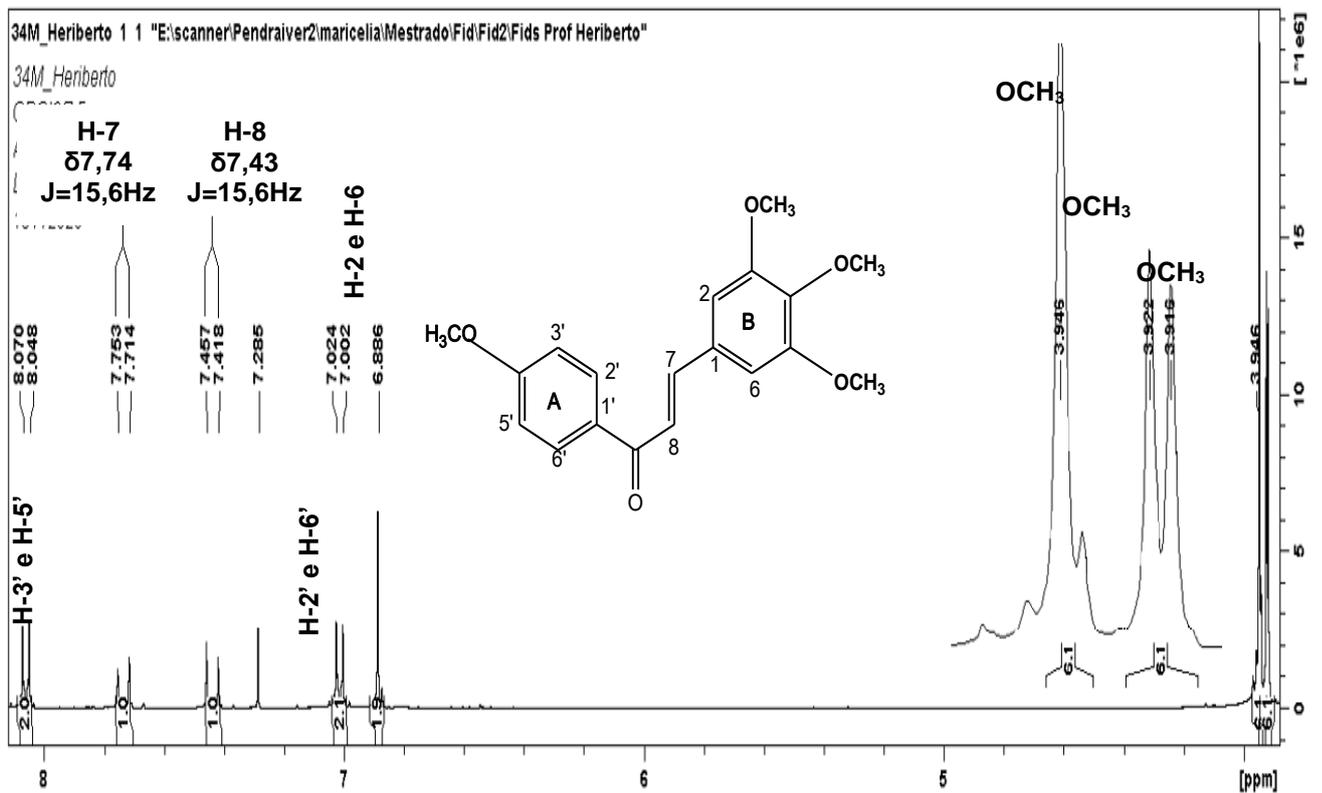


Figura 18 – Expansão do espectro de RMN¹H (400MHz, CDCl₃) de 34M.

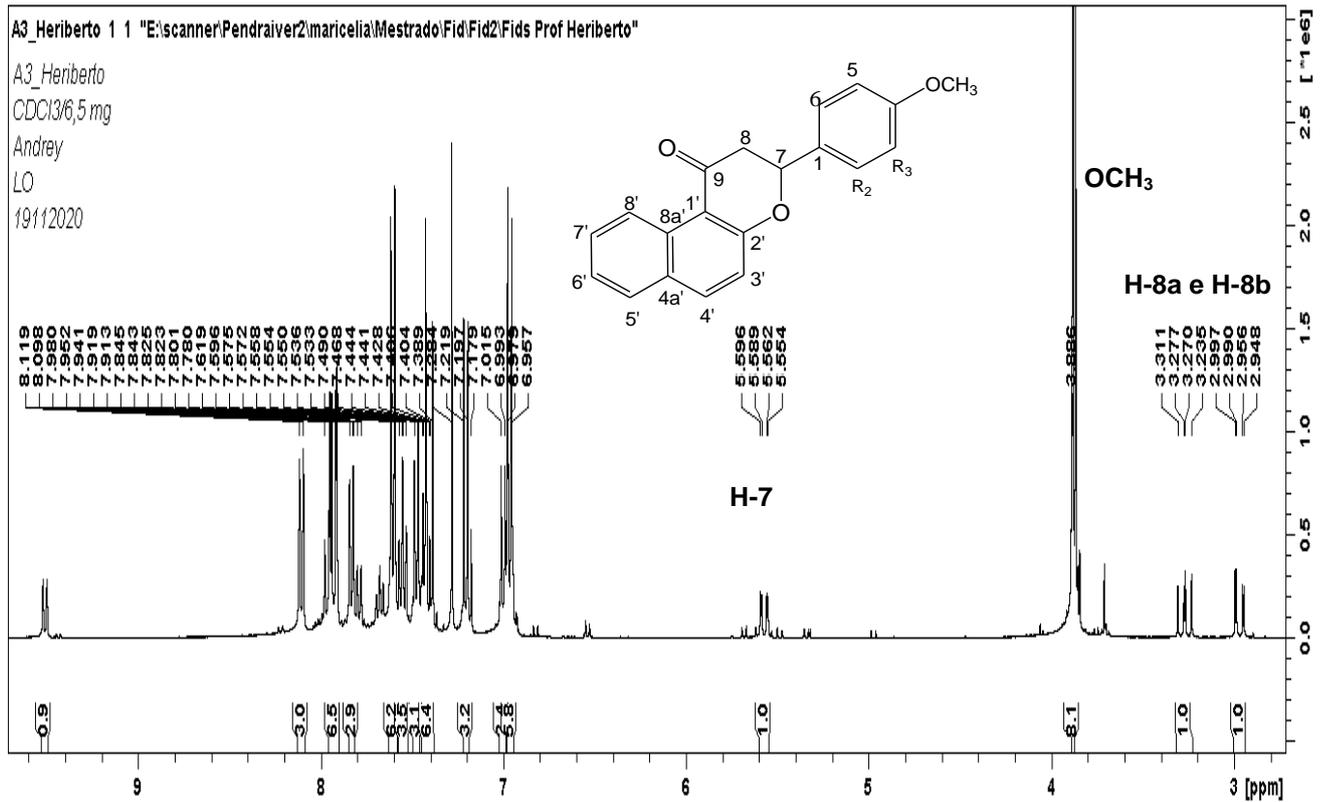


Figura 21 – Espectro de RMN¹H (400MHz, CDCl₃) de A3.

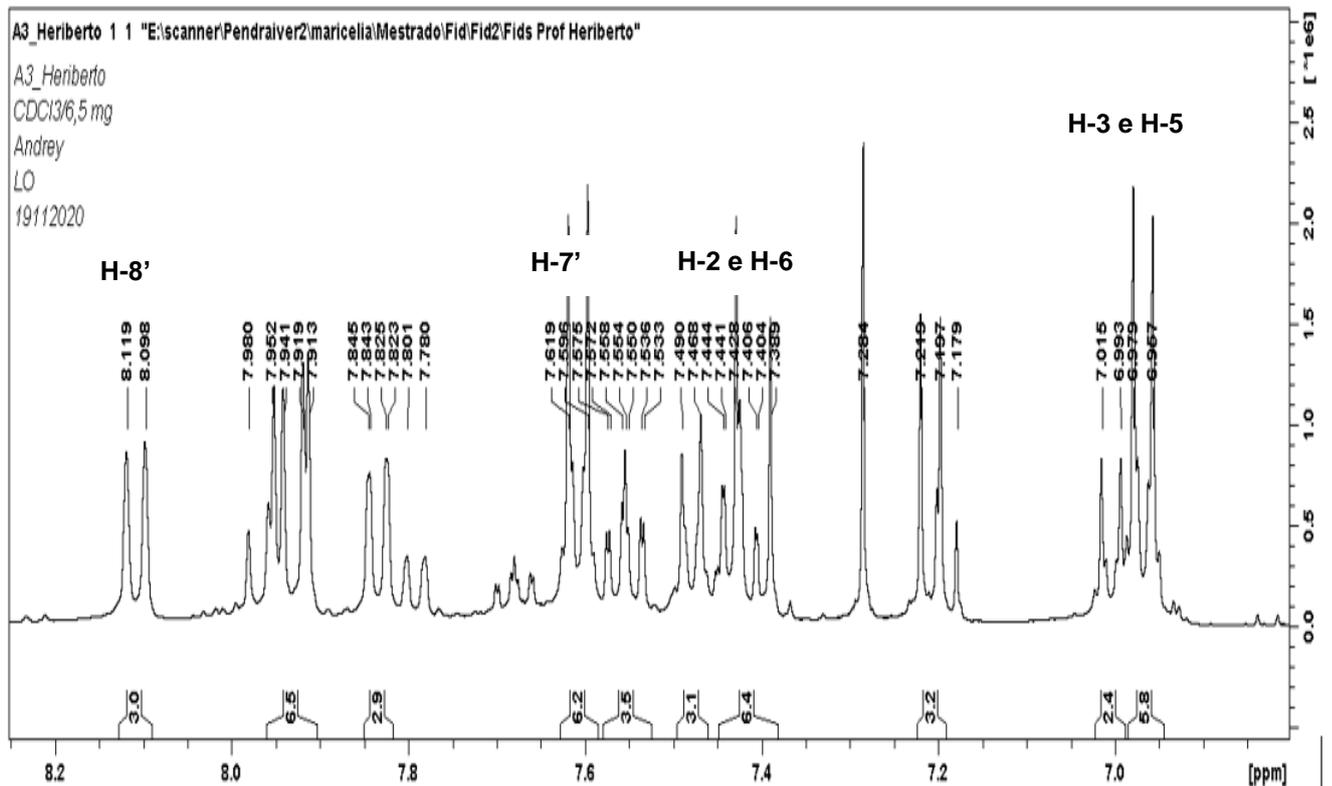


Figura 22 – Expansão do espectro de RMN¹H (400MHz, CDCl₃) de A3

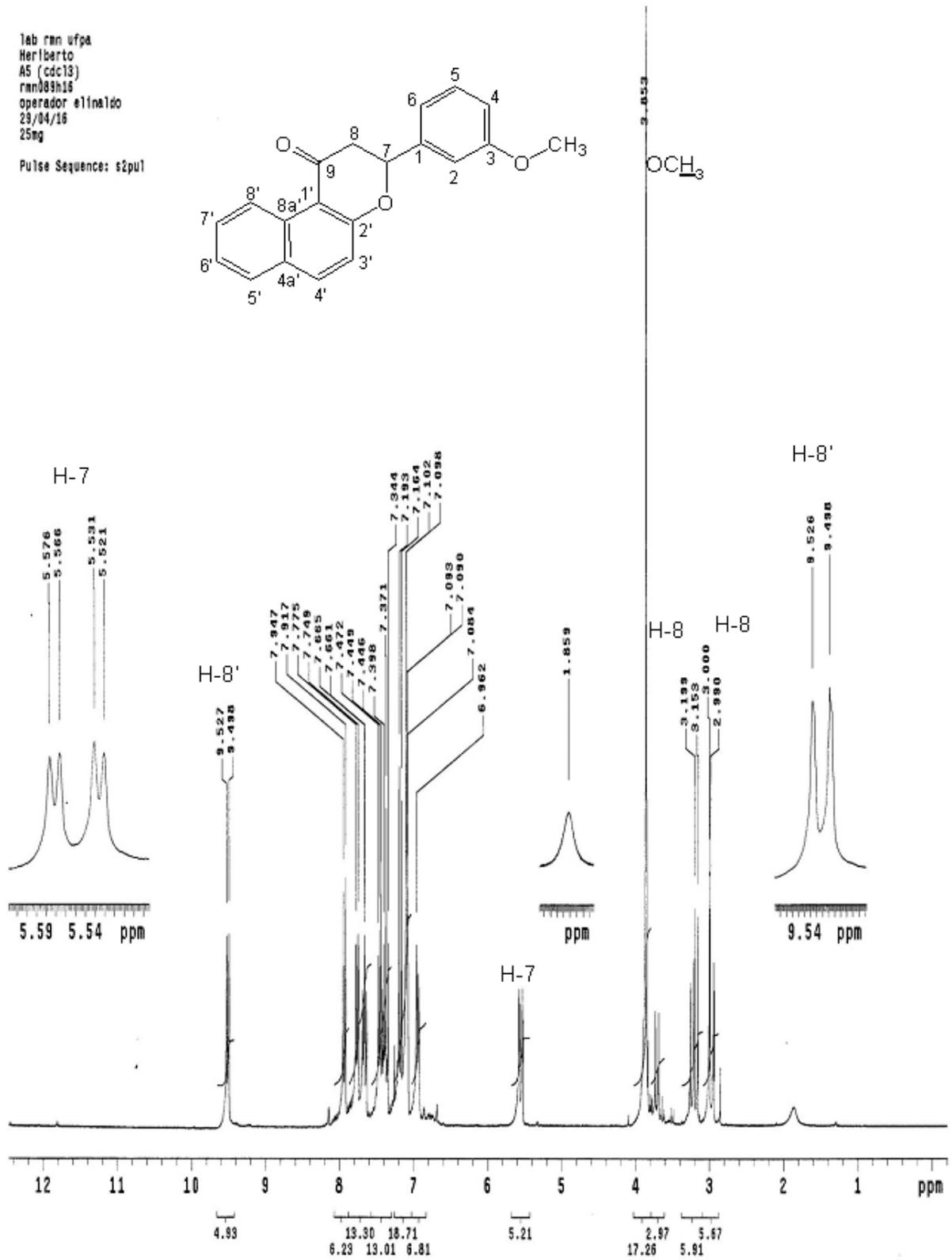


Figura 23 - Espectro RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) de A5.

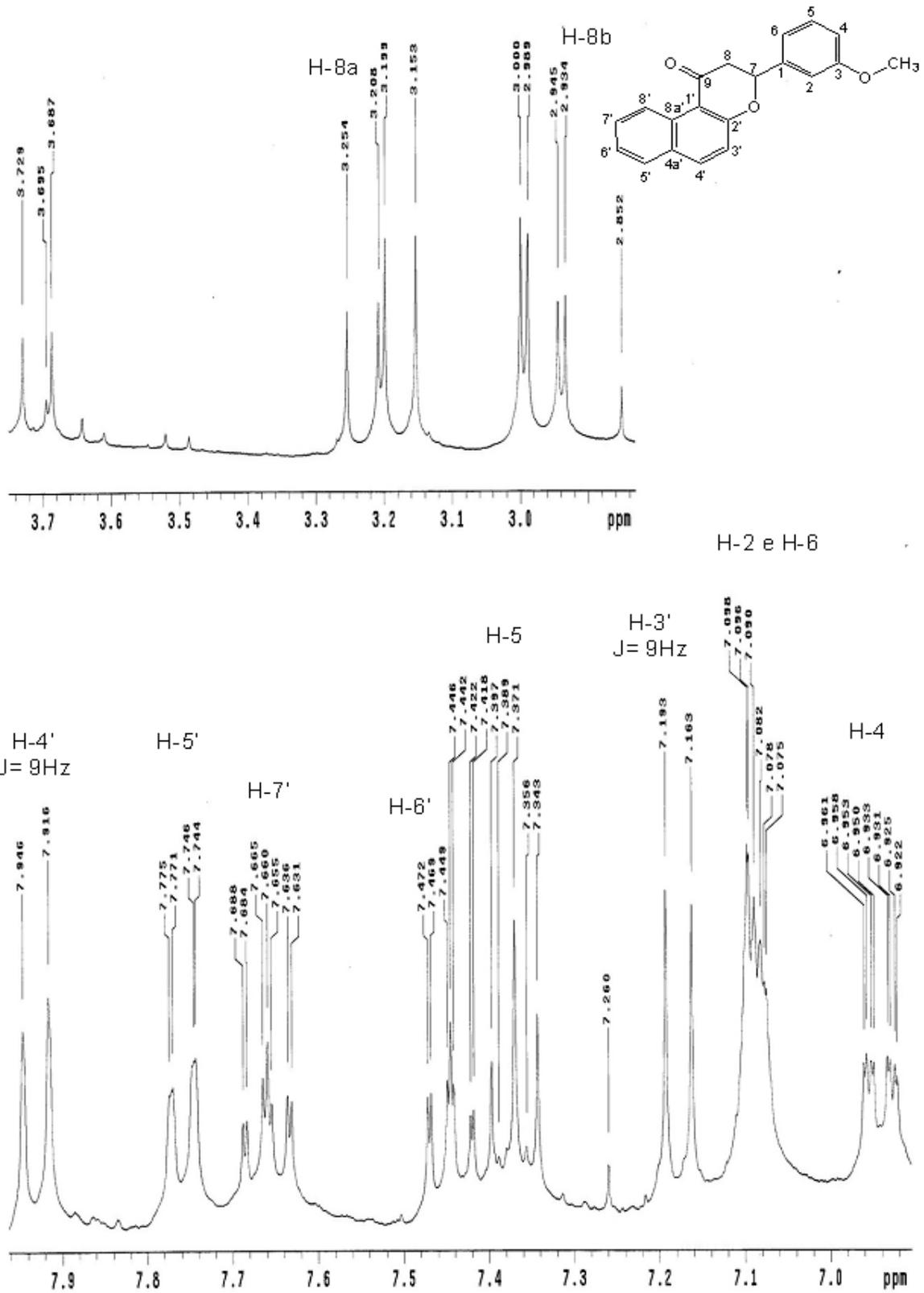


Figura 24 - Expansão do espectro RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) expandido de A5.

lab rnm ufpa
 Heriberto
 A5 (cdc13)
 rnm089c16
 operador elinaldo
 23/04/19
 25mg
 tempo=30min
 Pulse Sequence: s2pul

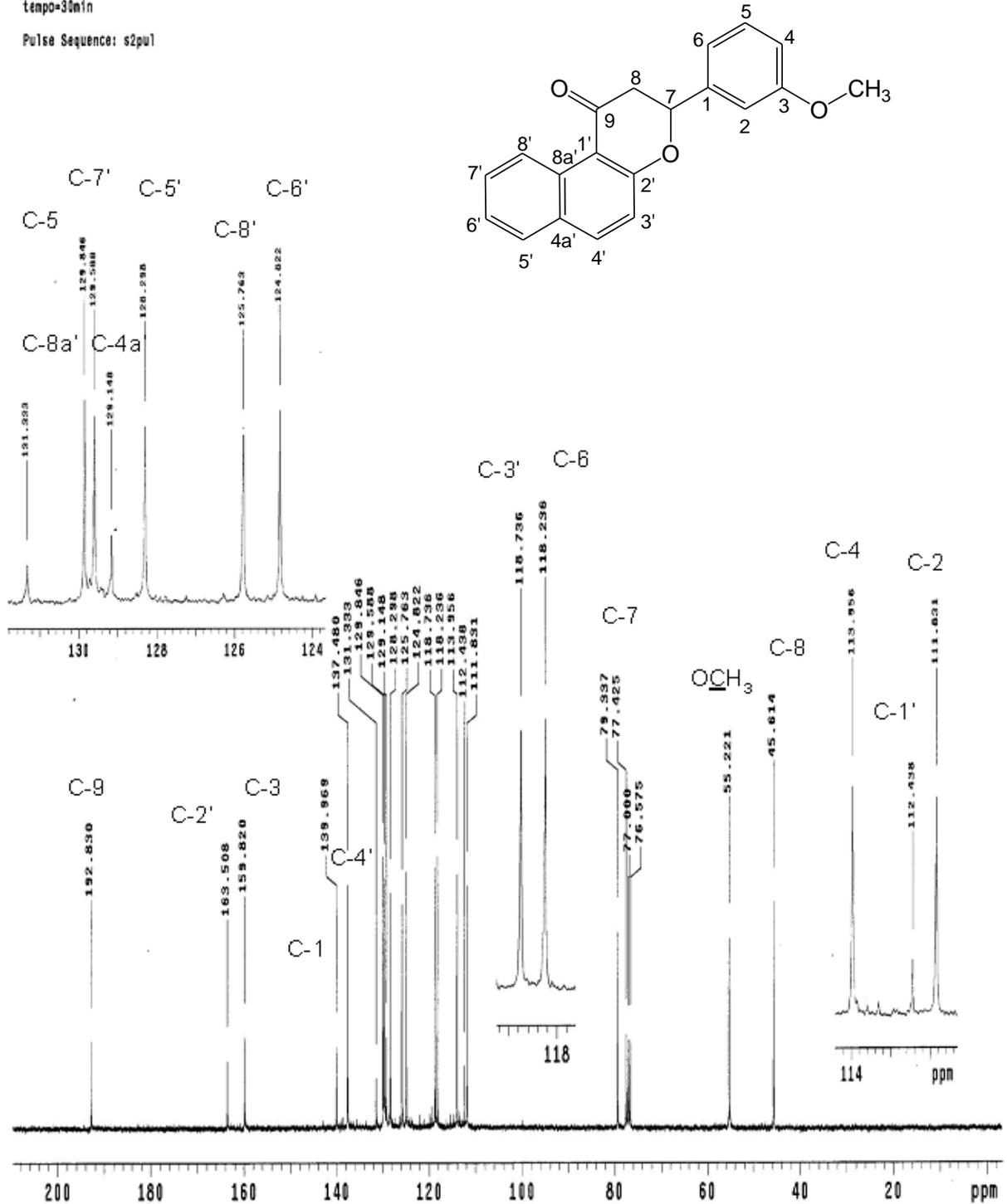


Figura 25 - Espectro RMN ^{13}C (75MHz, CDCl_3) expandido de A5.

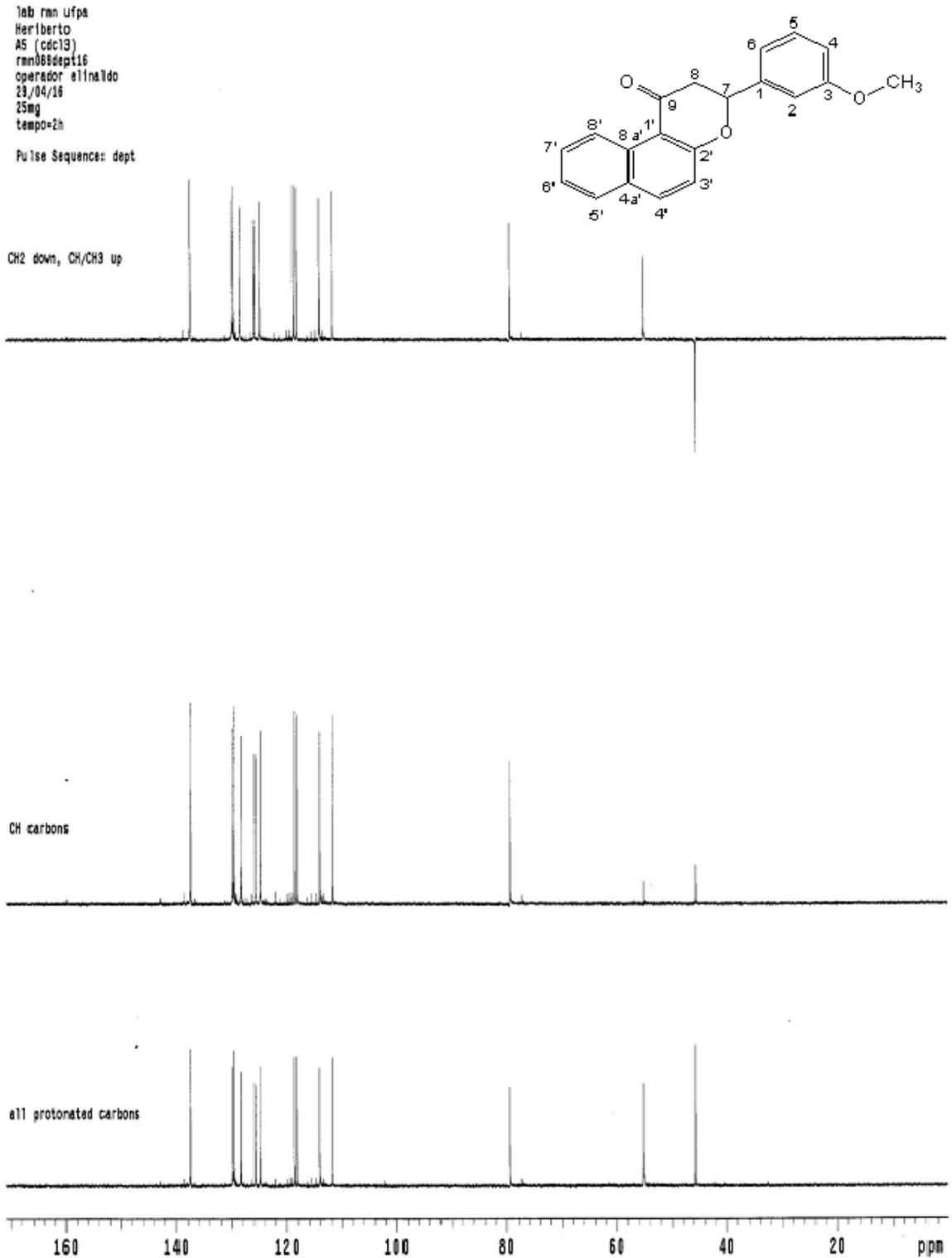


Figura 26 - Espectro DEPT (75MHz, CDCl₃) de A5.

lab run ufpa
Heriberto
A5 (cdc13)
rnn049het16
operador elinaldo
29/04/16
25mg

Pulse Sequence: hetcor
Solvent: CDCl₃
Ambient temperature
Mercury-300BB "mercury300"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.060 sec
Width 17035.8 Hz
2D Width 4498.4 Hz
276 repetitions
256 increments
OBSERVE C13, 75.4520073 MHz
DECOUPLE H1, 300.0488577 MHz
Power 42 dB
on during acquisition
off during delay
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
F1 DATA PROCESSING
Line broadening 0.9 Hz
FT size 2048 x 1024
Total time 22 hr, 43 min, 50 sec

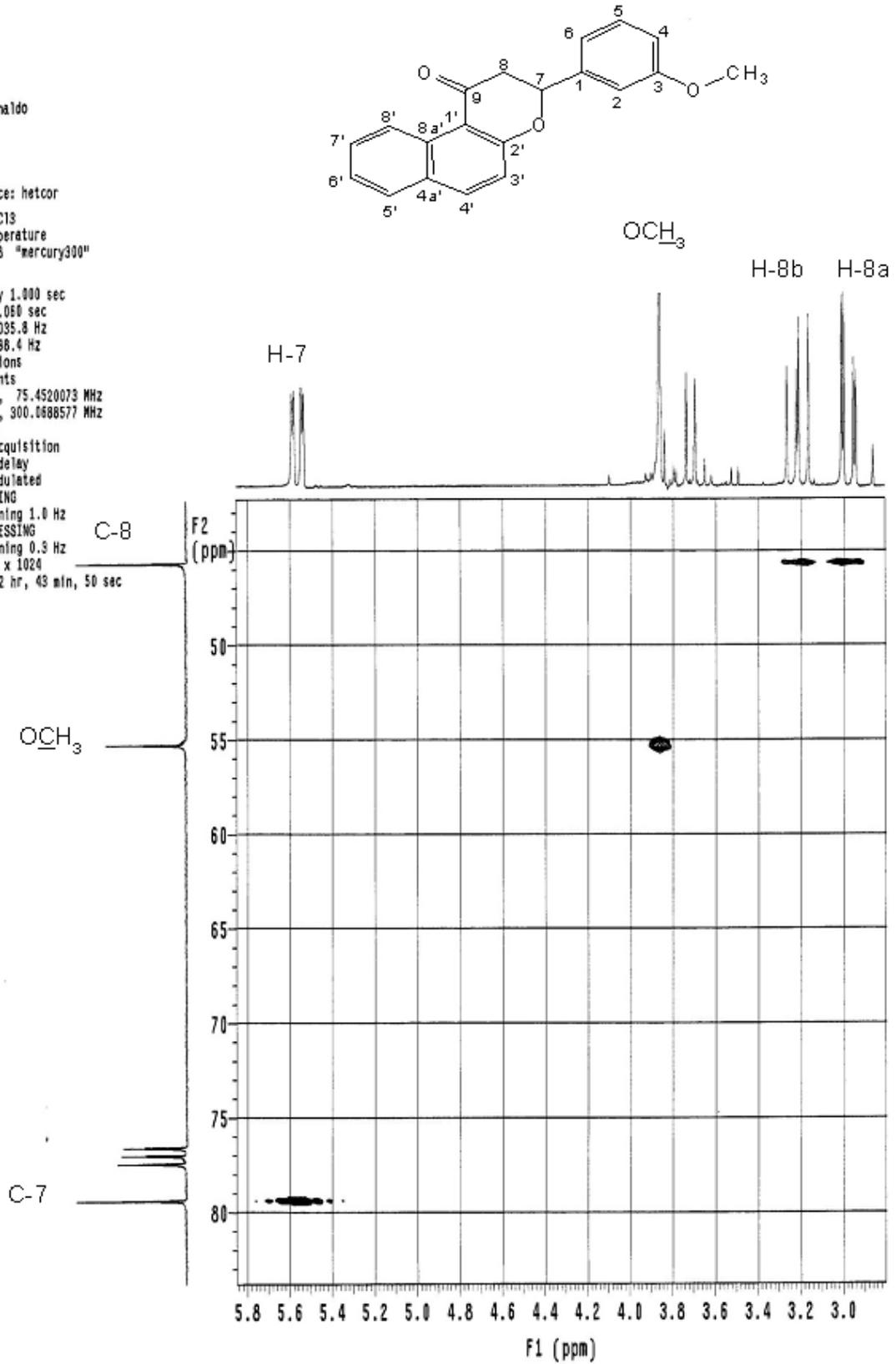


Figura 27 - Correlação HETCOR (75MHz, CDCl₃) de A5.

Tab ran ufa
Heriberto
A5 (cdc13)
ran089het16
operador alinaldo
29/04/16
25mg

Pulse Sequence: hetcor
Solvent: CDCl3
Ambient temperature
Mercury-300BB "mercury300"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.080 sec
Width 17035.8 Hz
2D width 4498.4 Hz
276 repetitions
256 increments
OBSERVE C13, 75.4526073 MHz
DECOUPLE H1, 309.6688577 MHz
Power 42 dB
on during acquisition
off during delay
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
F1 DATA PROCESSING
Line broadening 0.3 Hz
FT size 2048 x 1024
Total time 22 hr, 43 min, 50 sec

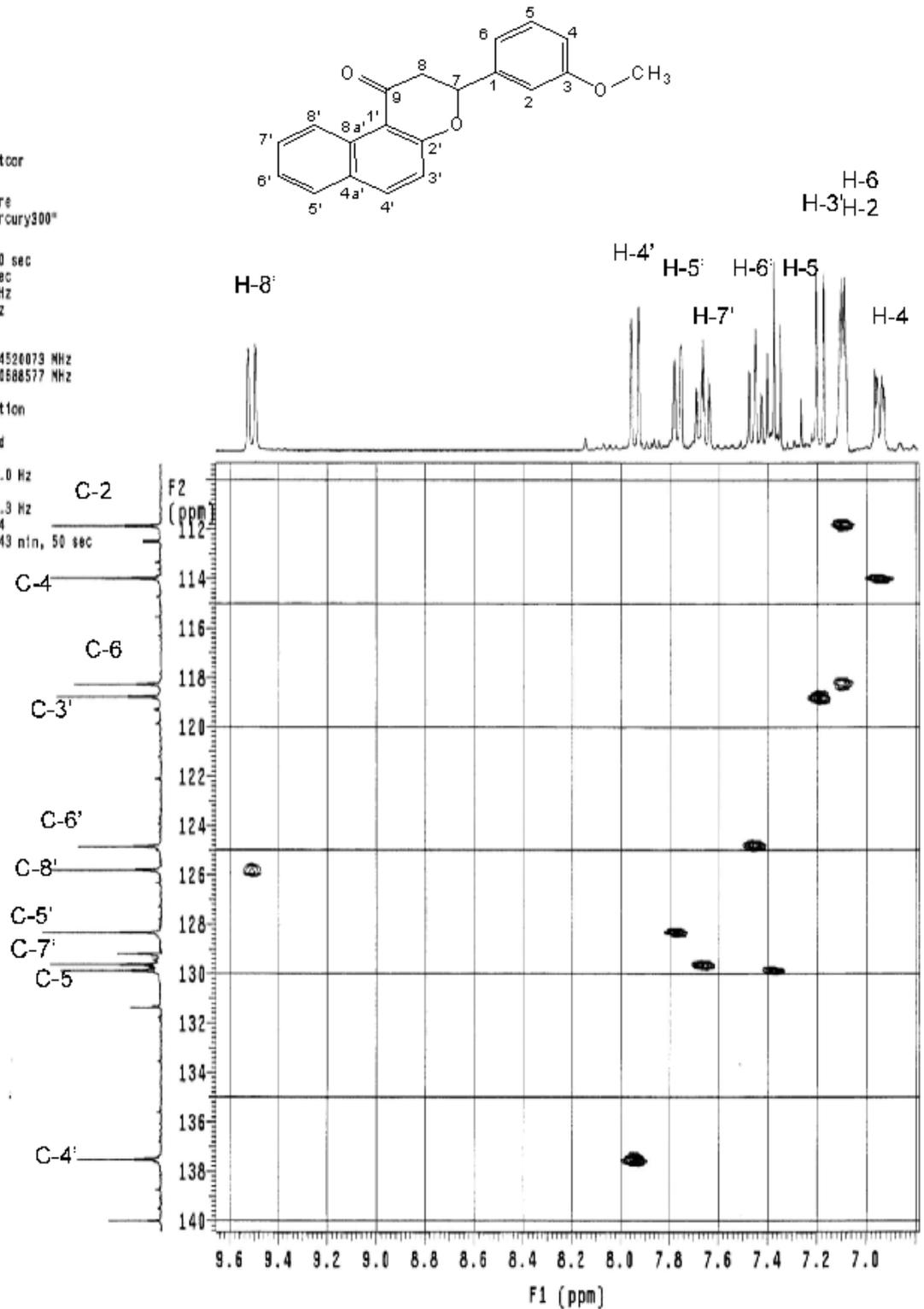


Figura 28 - Correlação HETCOR (75MHz, CDCl₃) expandido de A5.

lab: rmn ufpa
 Heriberto
 A5 (cdc13)
 rmn08scosy16
 operador: elinaldo
 29/04/16
 25mg

Pulse Sequence: relayh
 Solvent: CDCl3
 Ambient temperature
 Mercury-300BB "mercury300"

Relax. delay: 1.000 sec
 COSY 90-90
 Acq. time: 0.134 sec
 Width: 3889.5 Hz
 2D Width: 3889.5 Hz
 12 repetitions
 256 increments
 OBSERVE: H1, 300.0673668 MHz
 DATA PROCESSING
 Sine bell: 0.067 sec
 F1 DATA PROCESSING
 Sine bell: 0.034 sec
 FT size: 1024 x 1024
 Total time: 1 hr, 2 min, 46 sec

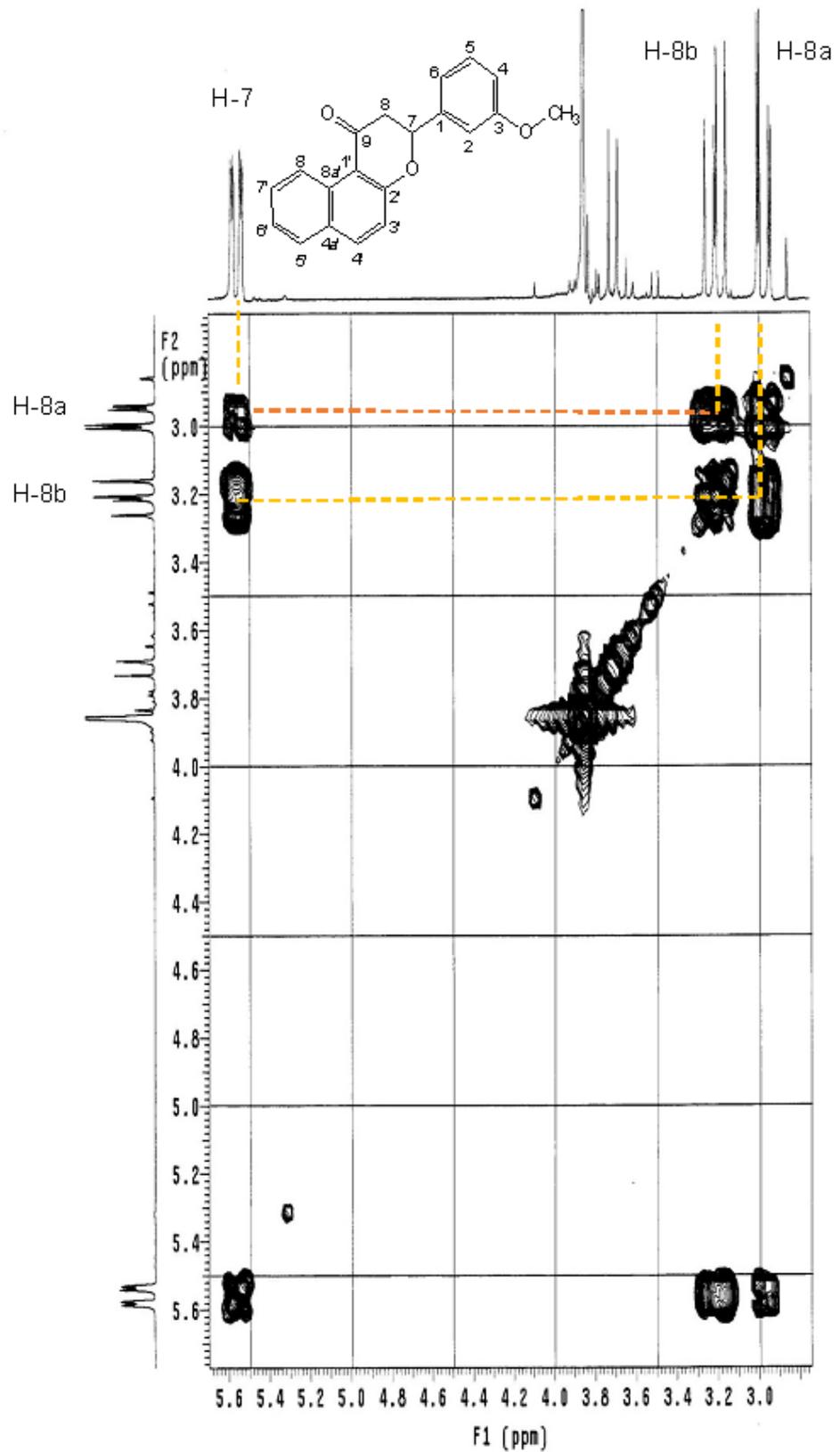


Figura 29 - Expansão do mapa de contornos COSY (300 MHz, CDCl₃) de A5.

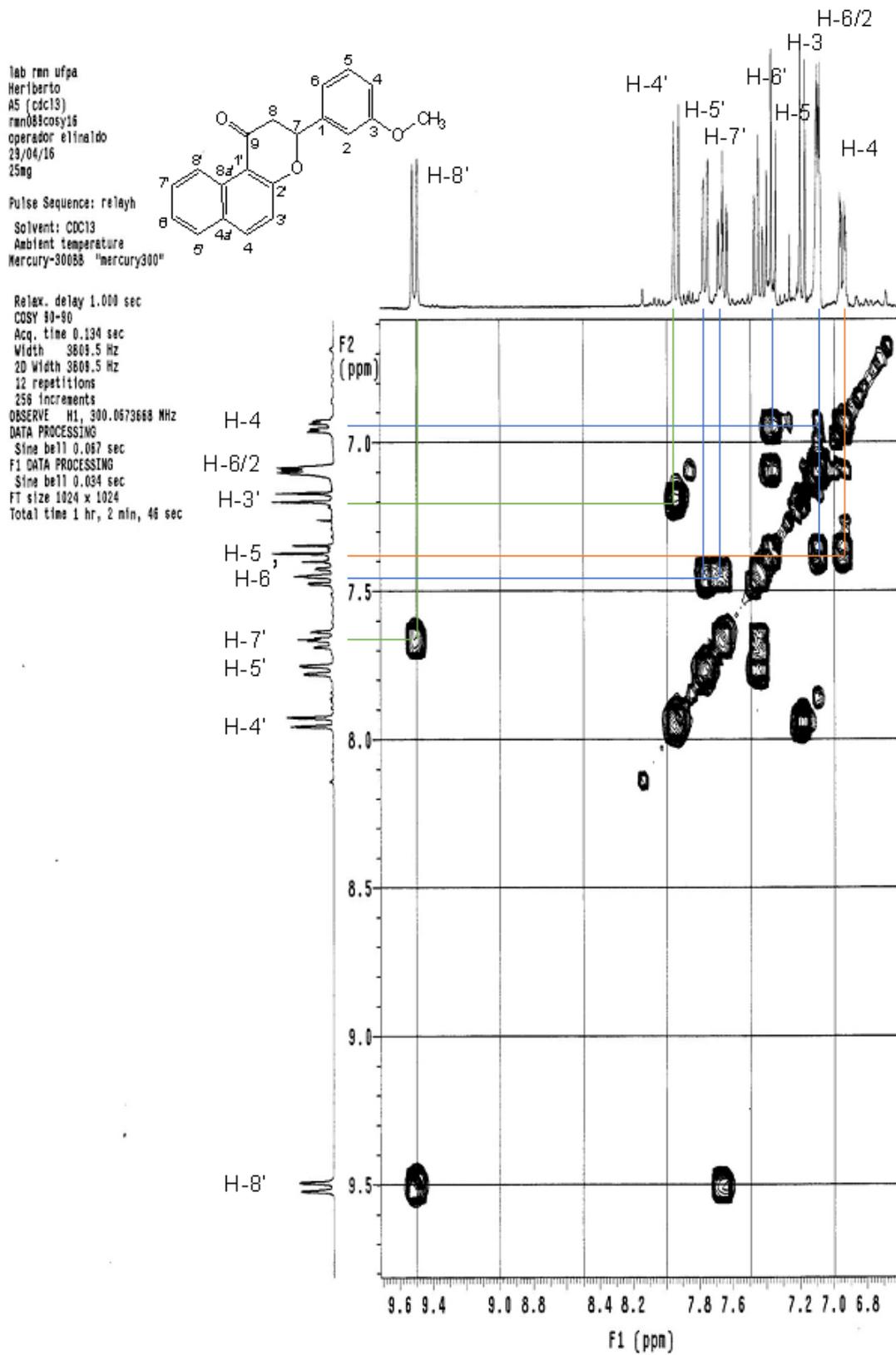
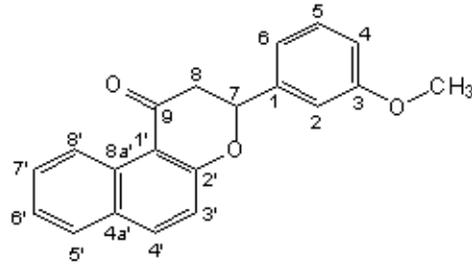


Figura 30 - Expansão do mapa de contornos COSY (300 MHz, CDCl₃) de A5.

lab run ufa
Heriberto
A5 (cdc13)
run083HMBC16
operador elinaldo
29/04/16
25mg

Pulse Sequence: HMBC
Solvent: CDCl₃
Ambient temperature
Mercury-300BB "mercury300"



Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.134 sec
Width 3808.5 Hz
2D Width 18115.4 Hz
220 repetitions
2 x 256 increments
OBSERVE H1, 300.0673668 MHz
DATA PROCESSING
Sine bell 0.067 sec
F1 DATA PROCESSING
Sine bell 0.007 sec
FT size 1024 x 2048
Total time 39 hr, 23 min, 24 sec

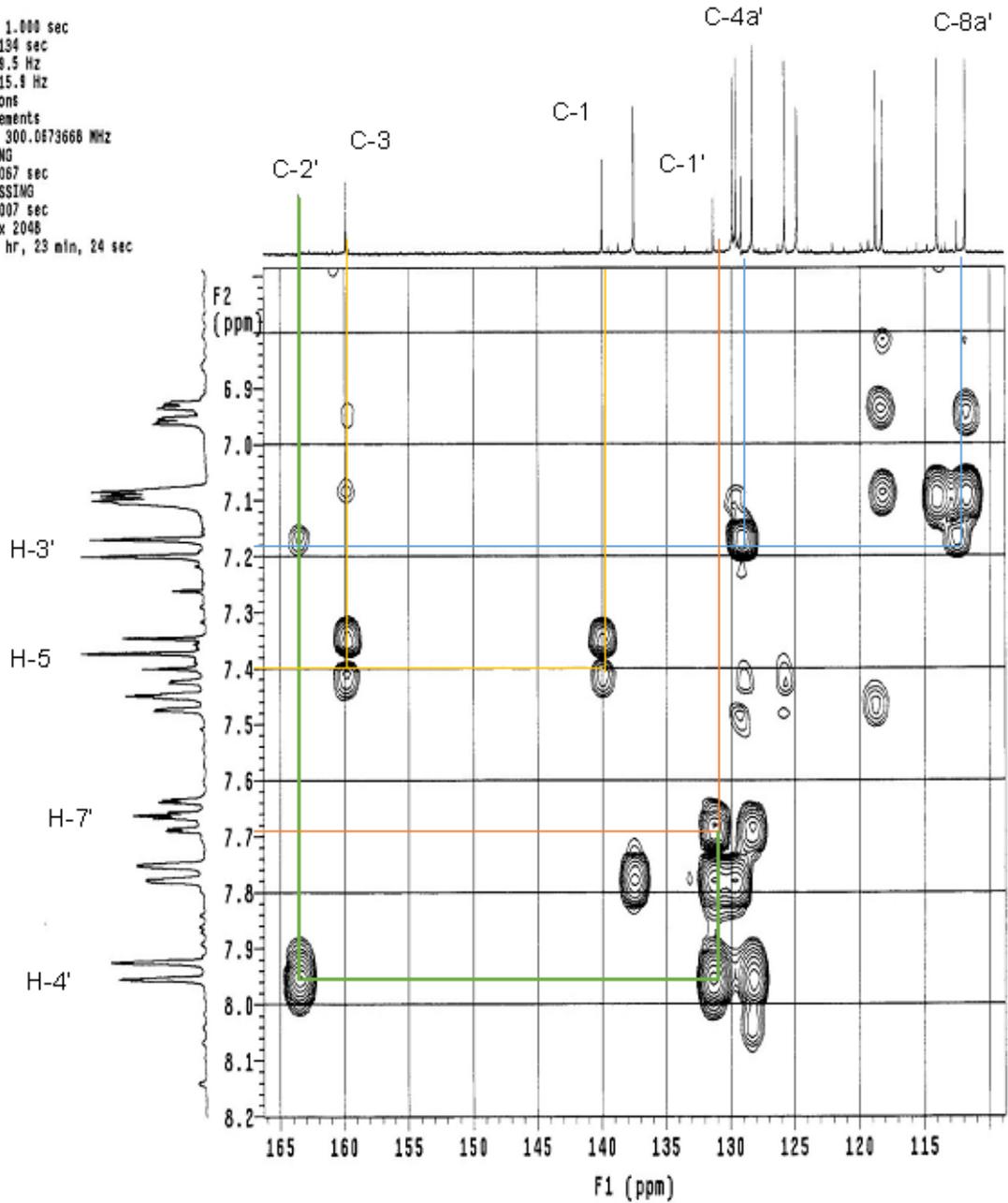


Figura 31 - Espectro de HMBC (300 MHz, CDCl₃) expandido de A5.

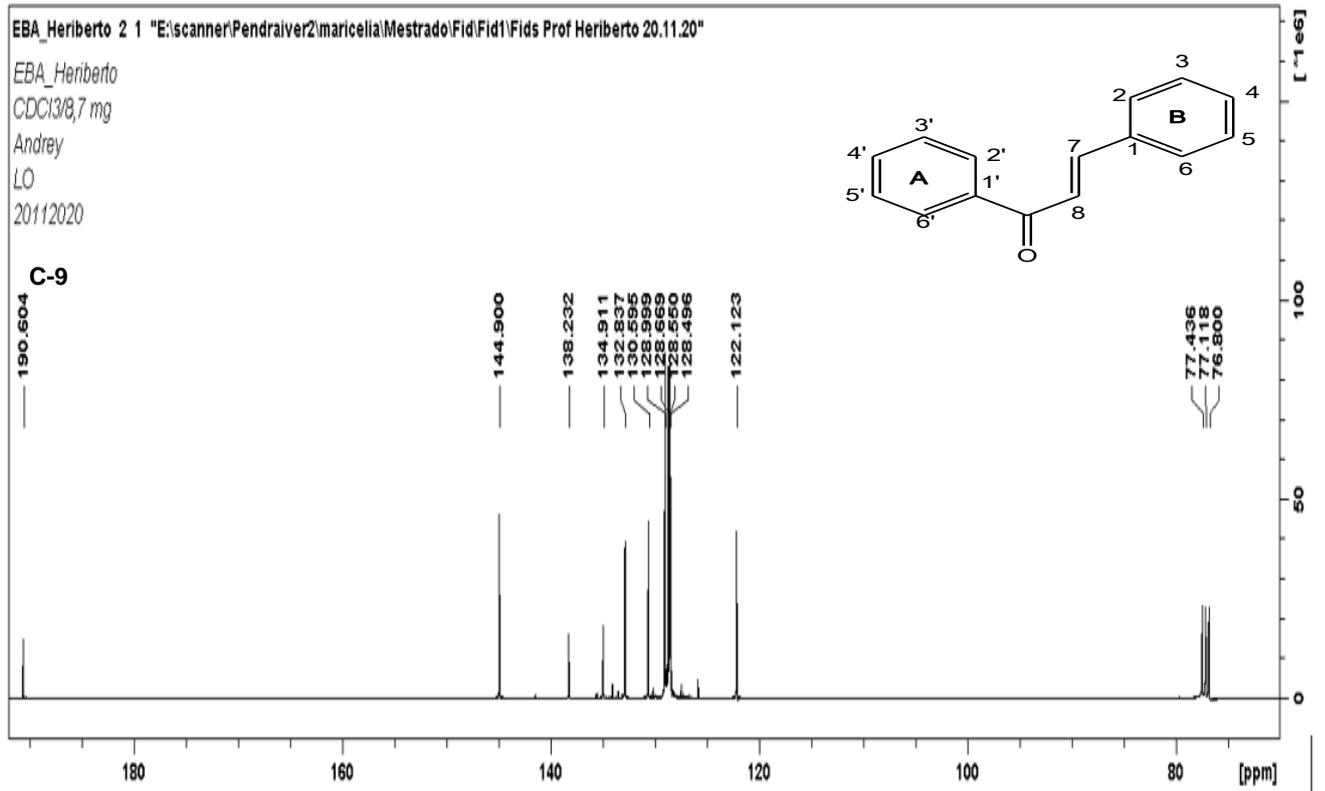


Figura 32 - Espectro RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) expandido de EBA.

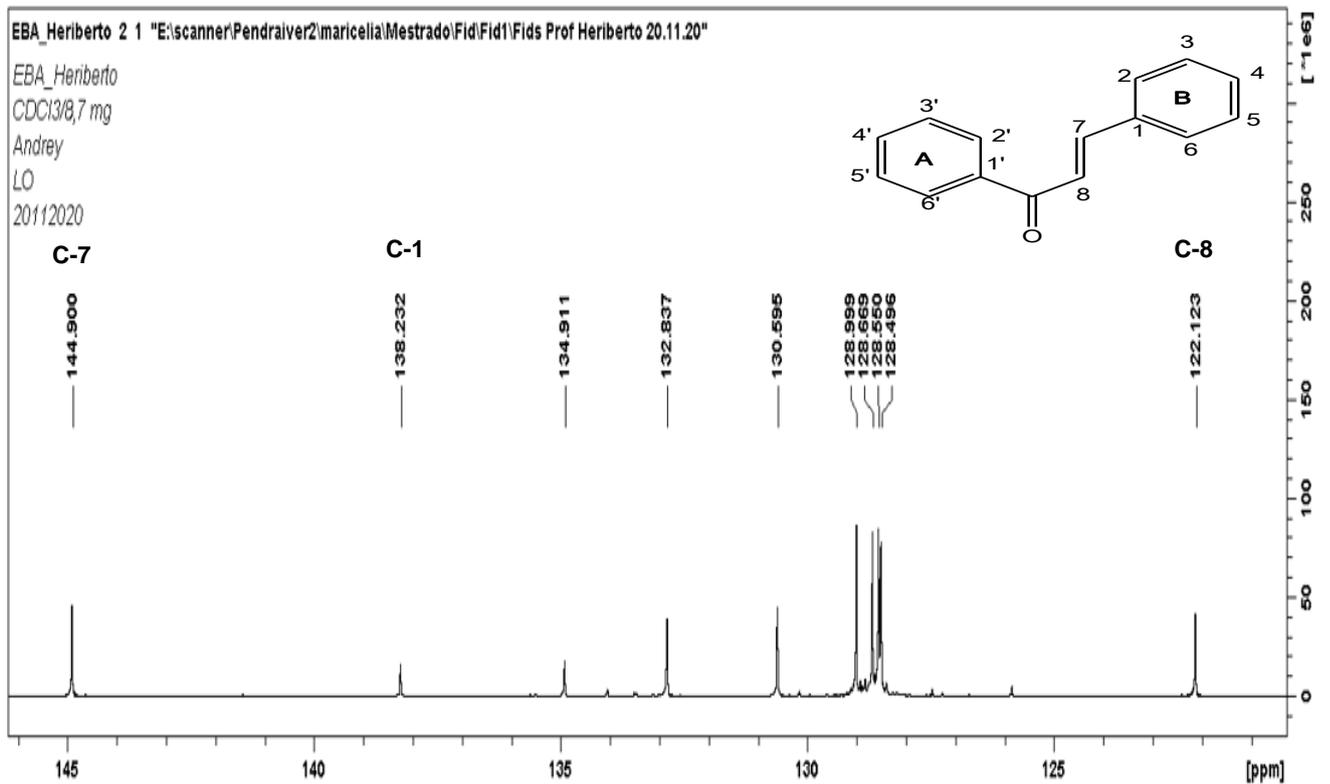


Figura 33 - Espectro RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) expandido de EBA.

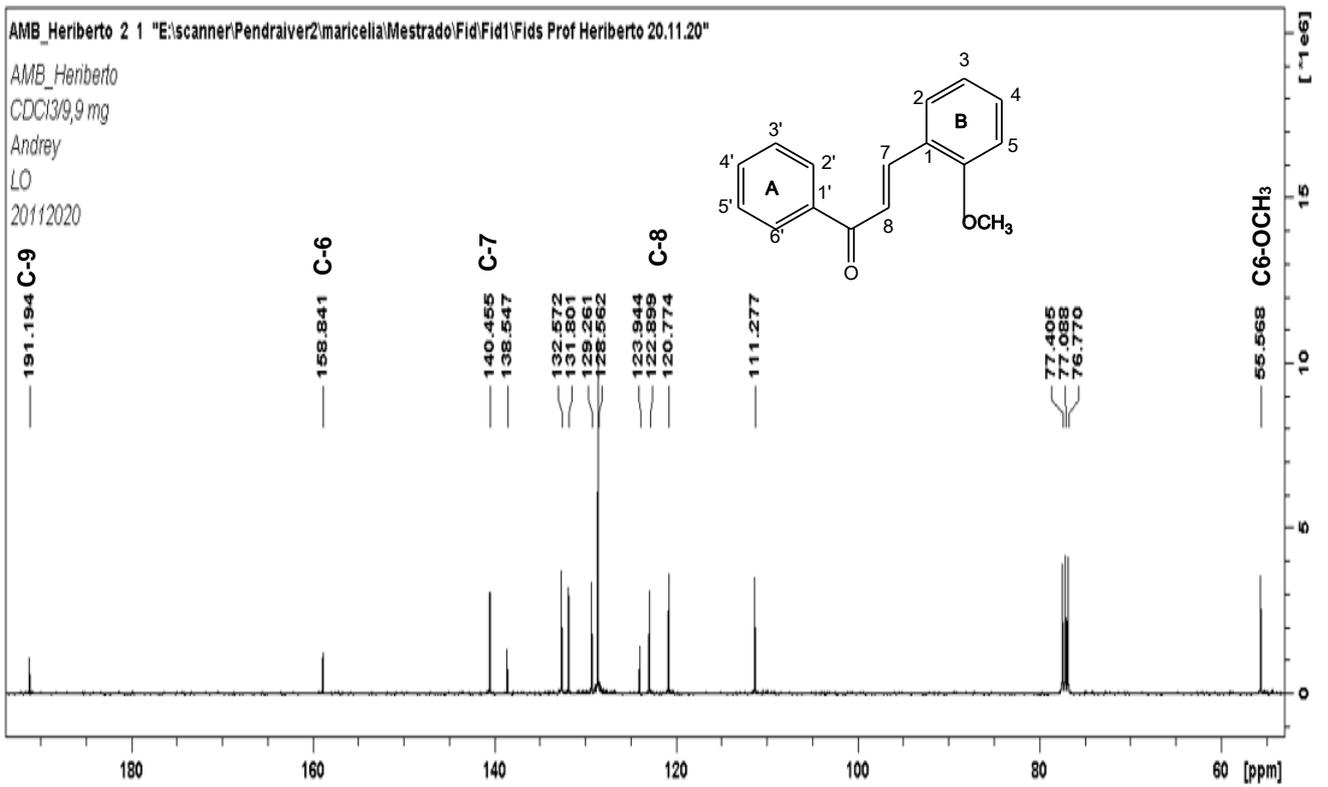


Figura 34 - Espectro RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) expandido de AMB.

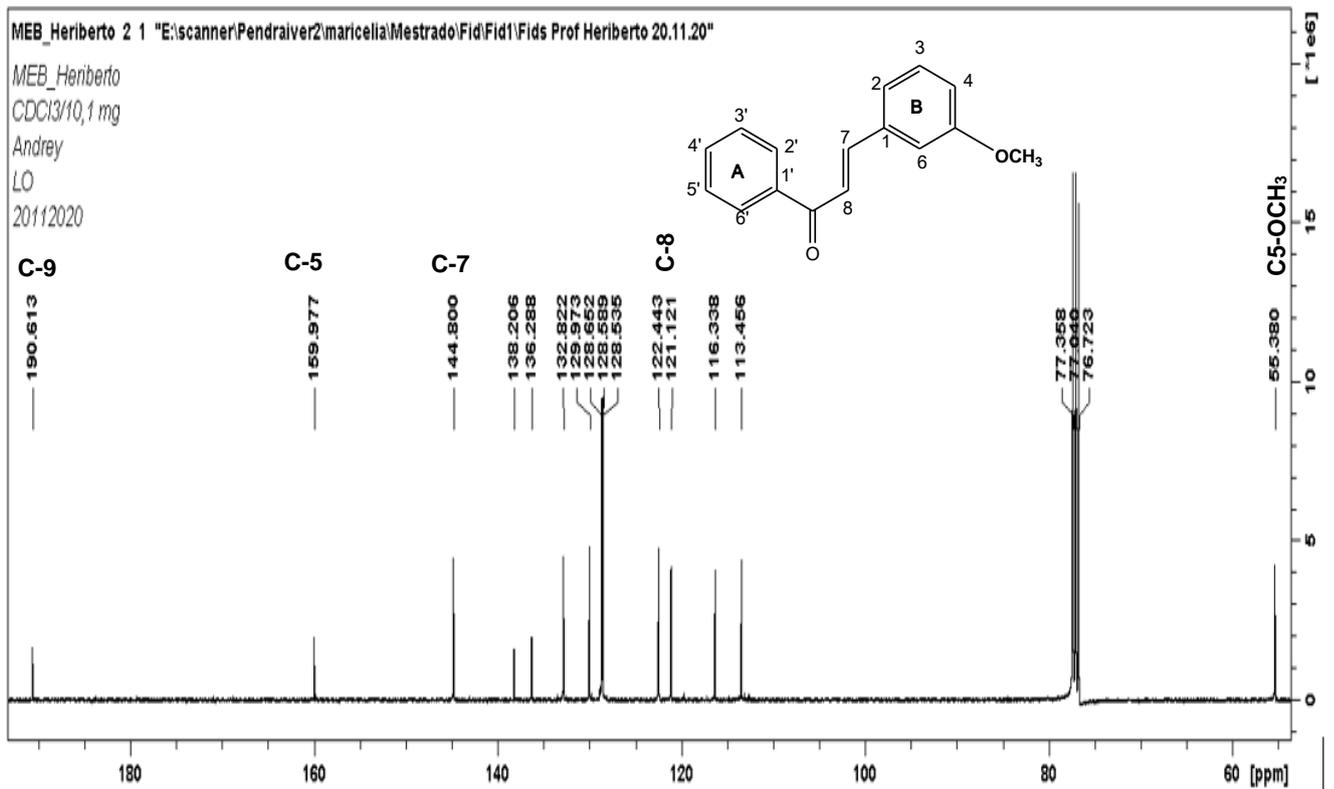


Figura 35 - Espectro RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) expandido de MEB.

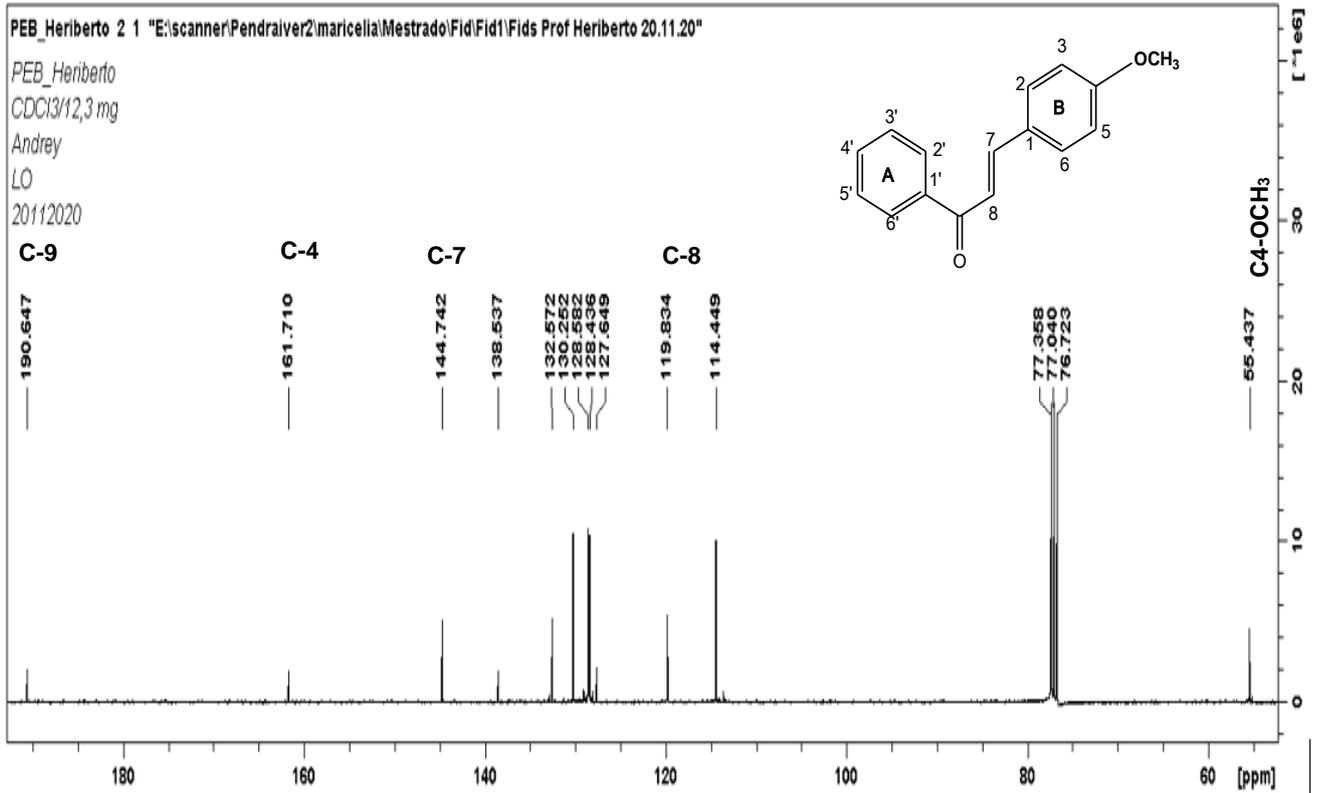


Figura 36 - Espectro RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) expandido de PEB.

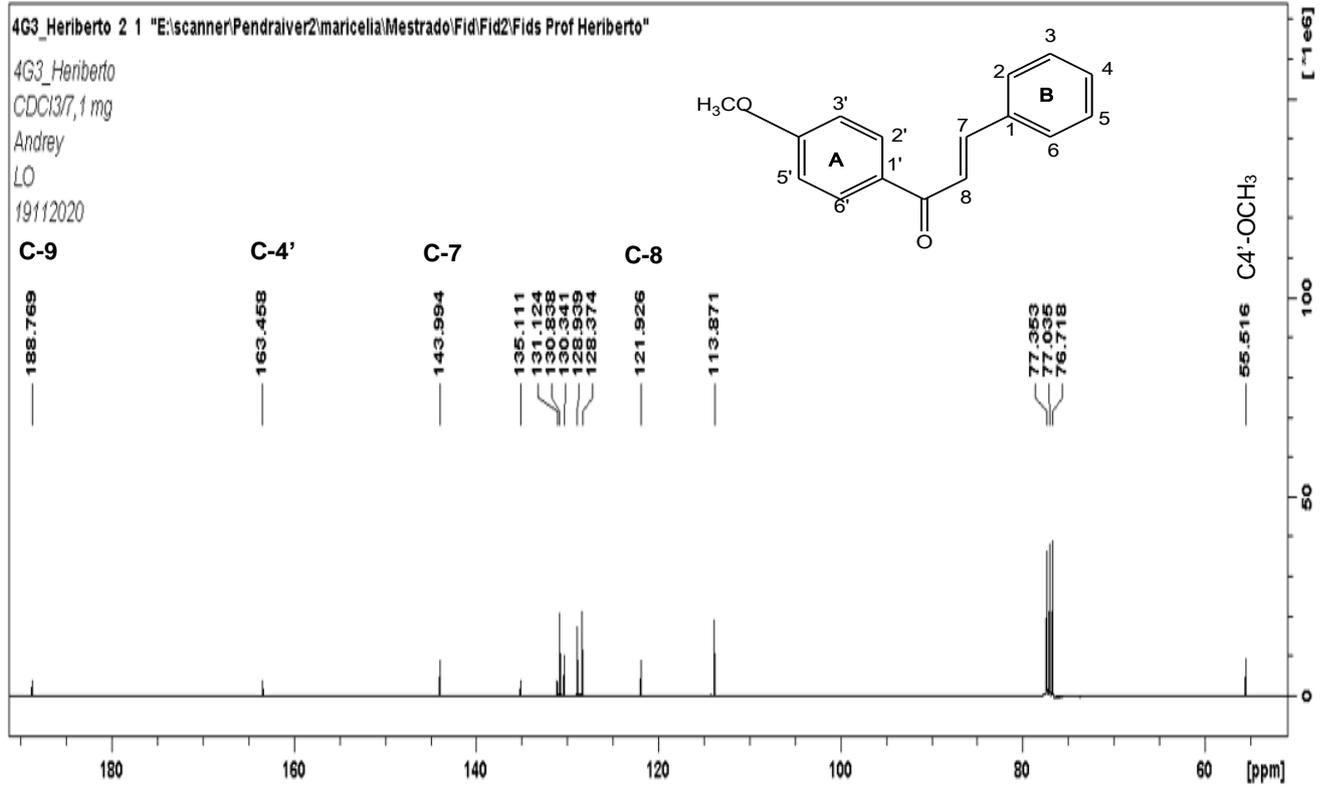


Figura 37 - Espectro RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) expandido de 4G3.

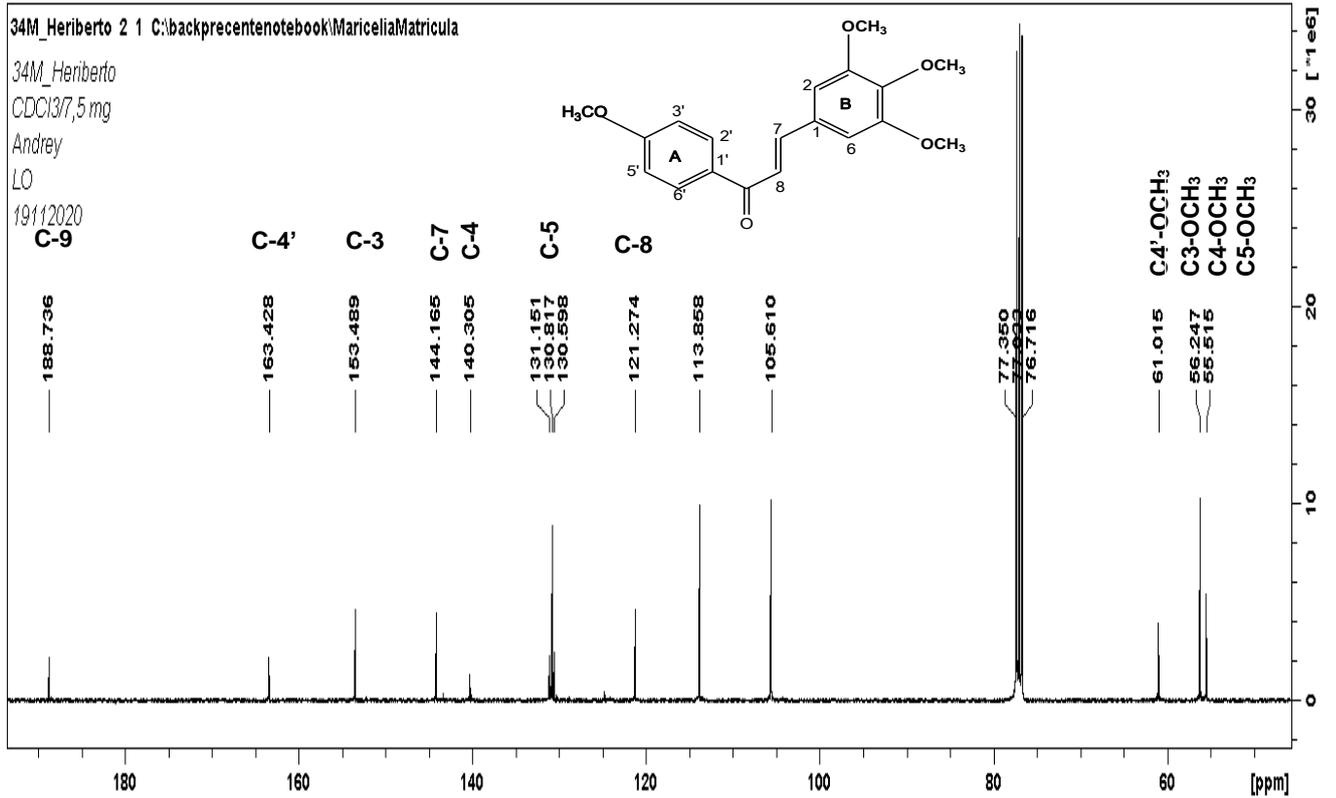


Figura 38 - Espectro RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) expandido de 34M.

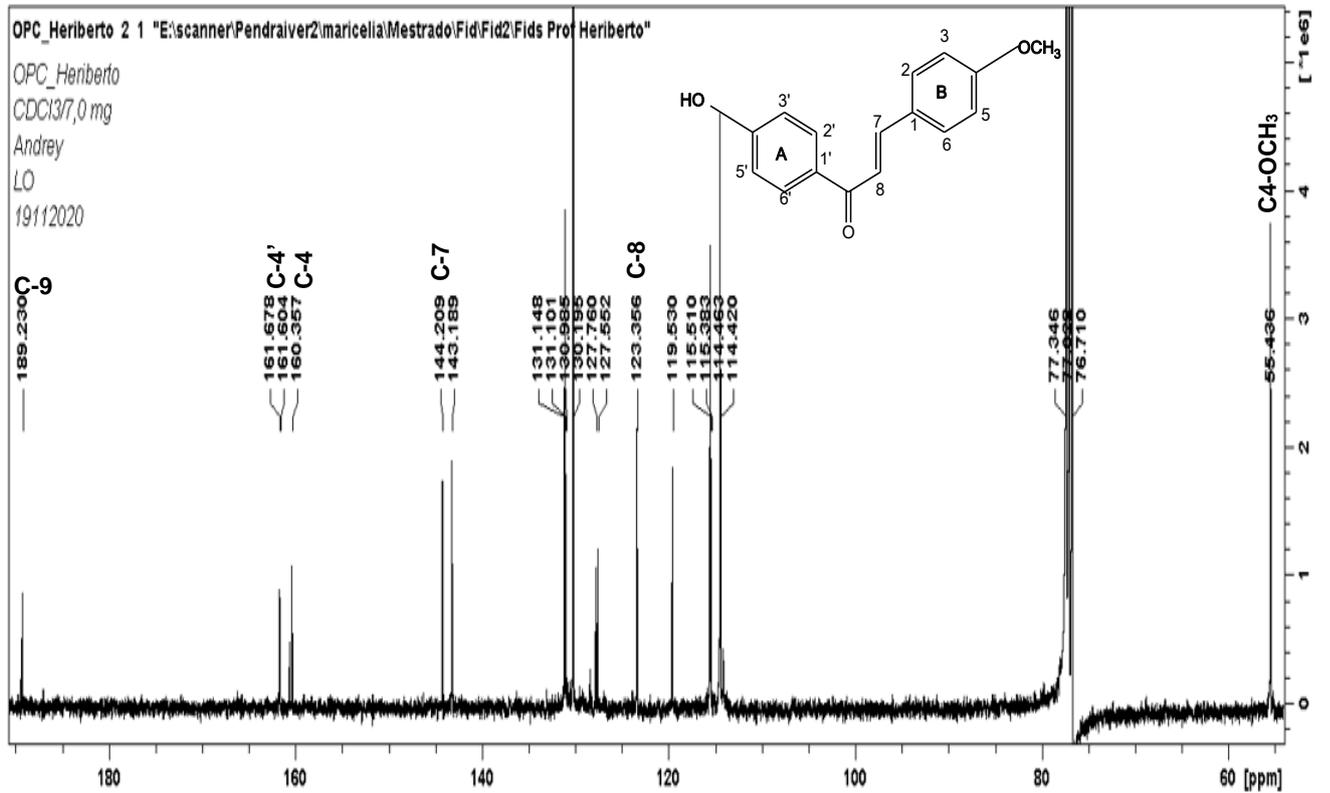


Figura 39 - Espectro RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) expandido de OPC.

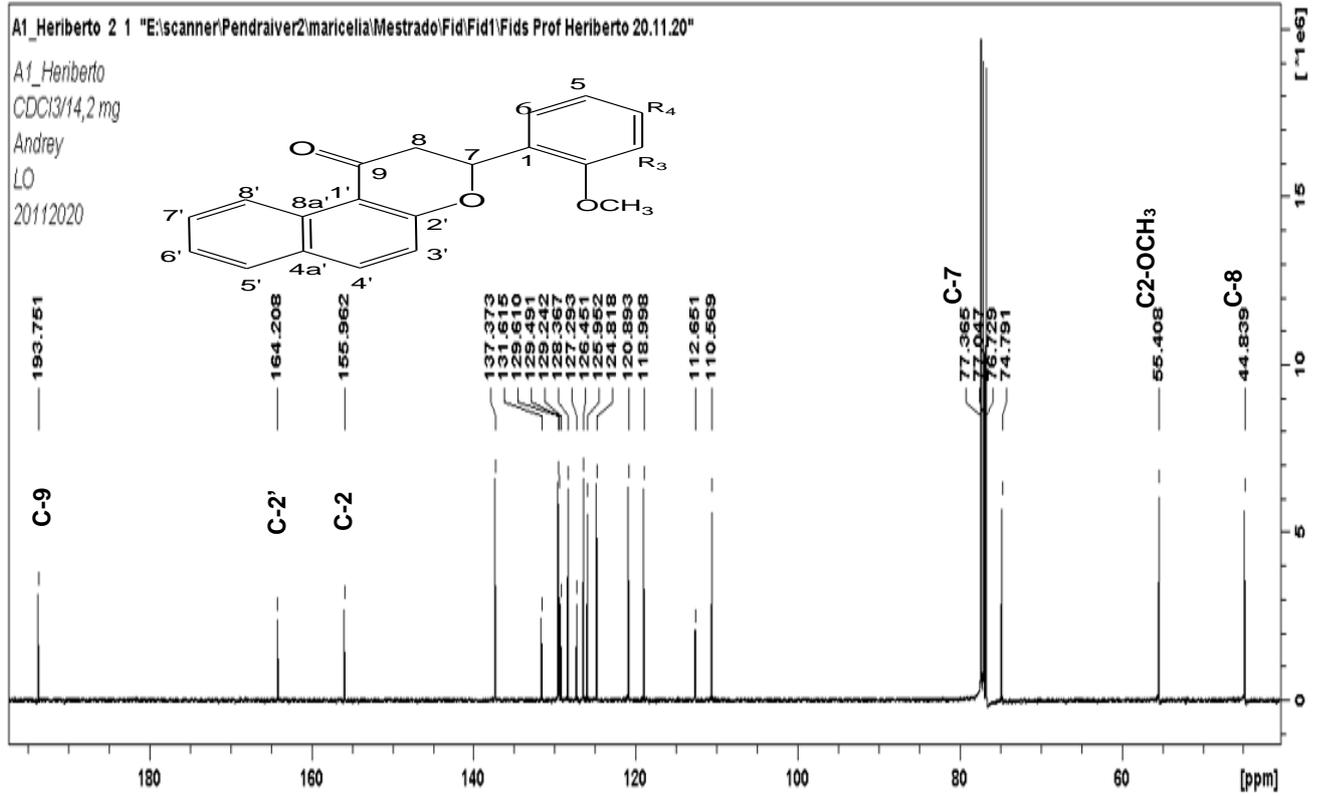


Figura 40 - Espectro RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) expandido de A1.

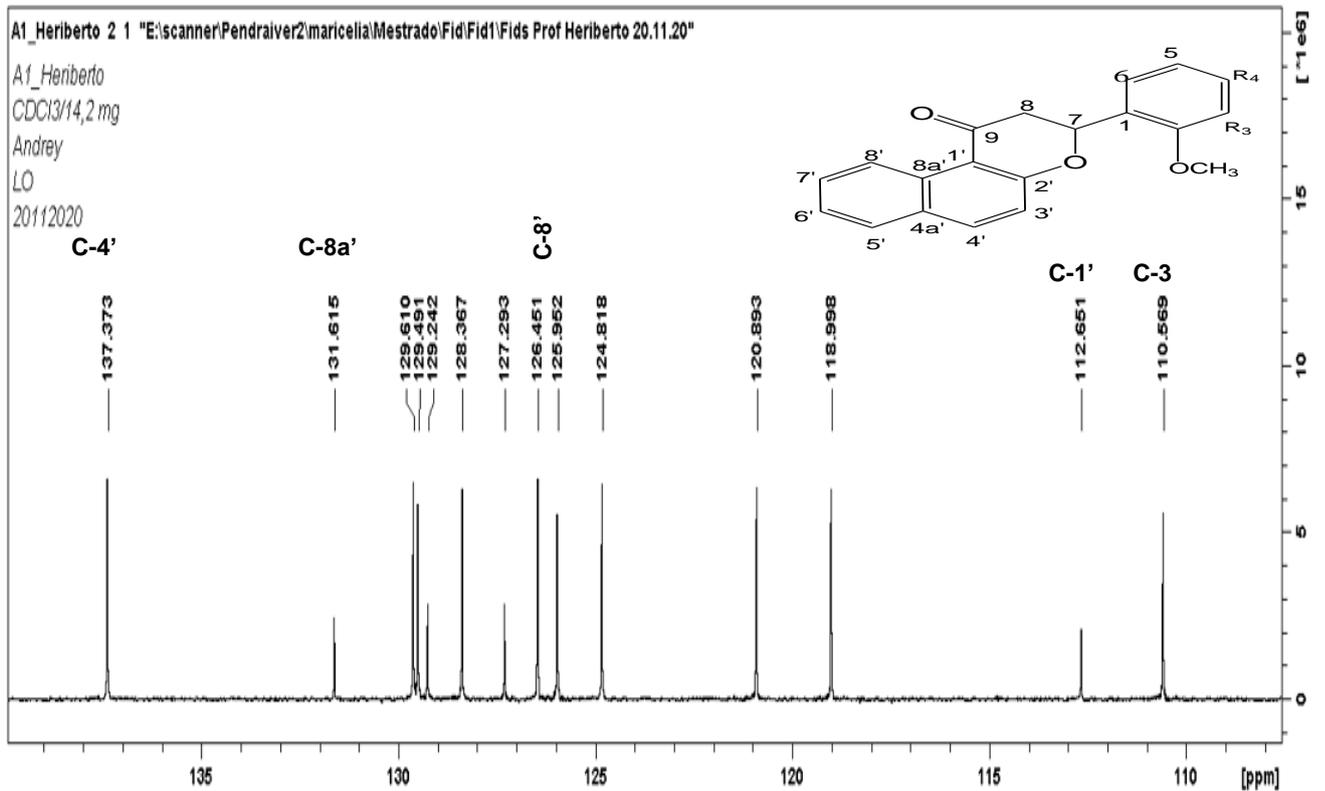


Figura 41 - Espectro RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) expandido de A1.

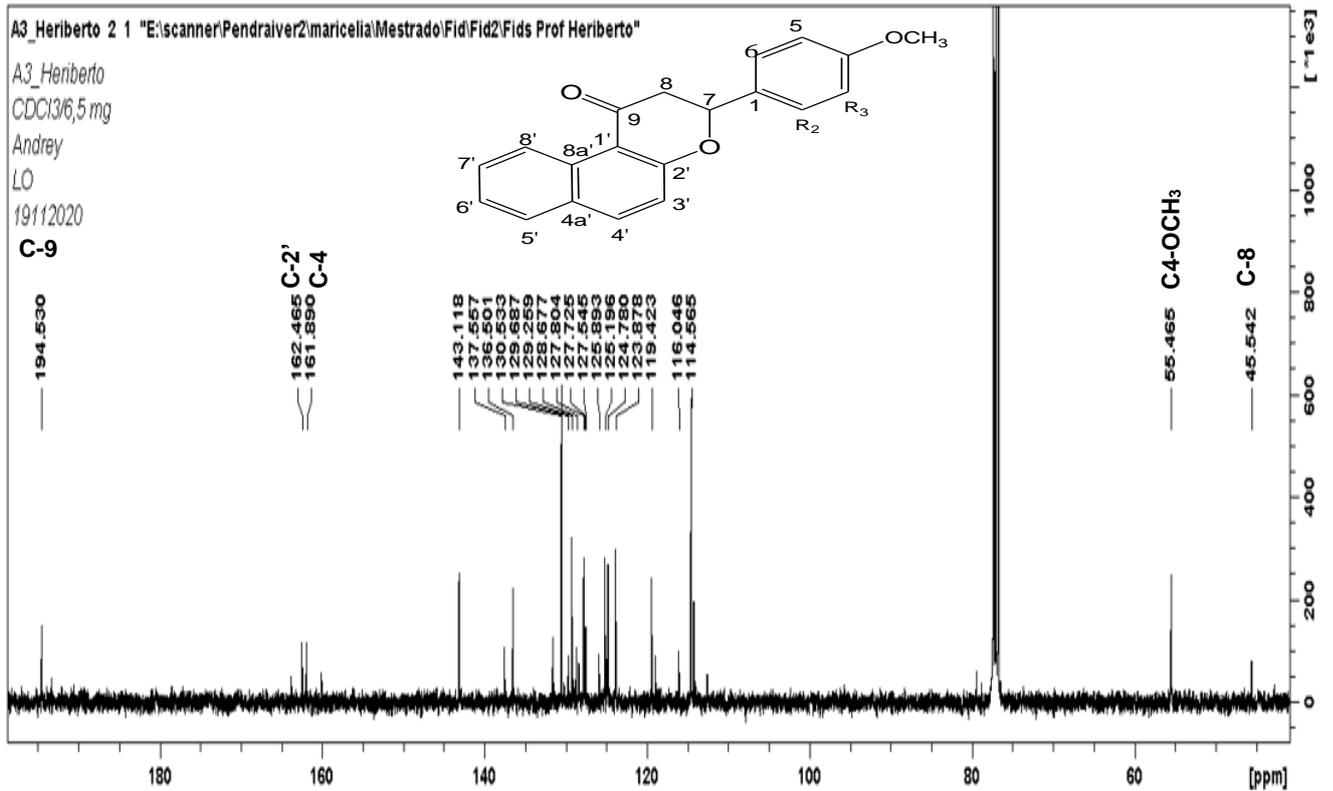


Figura 42 - Espectro RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) expandido de A3.

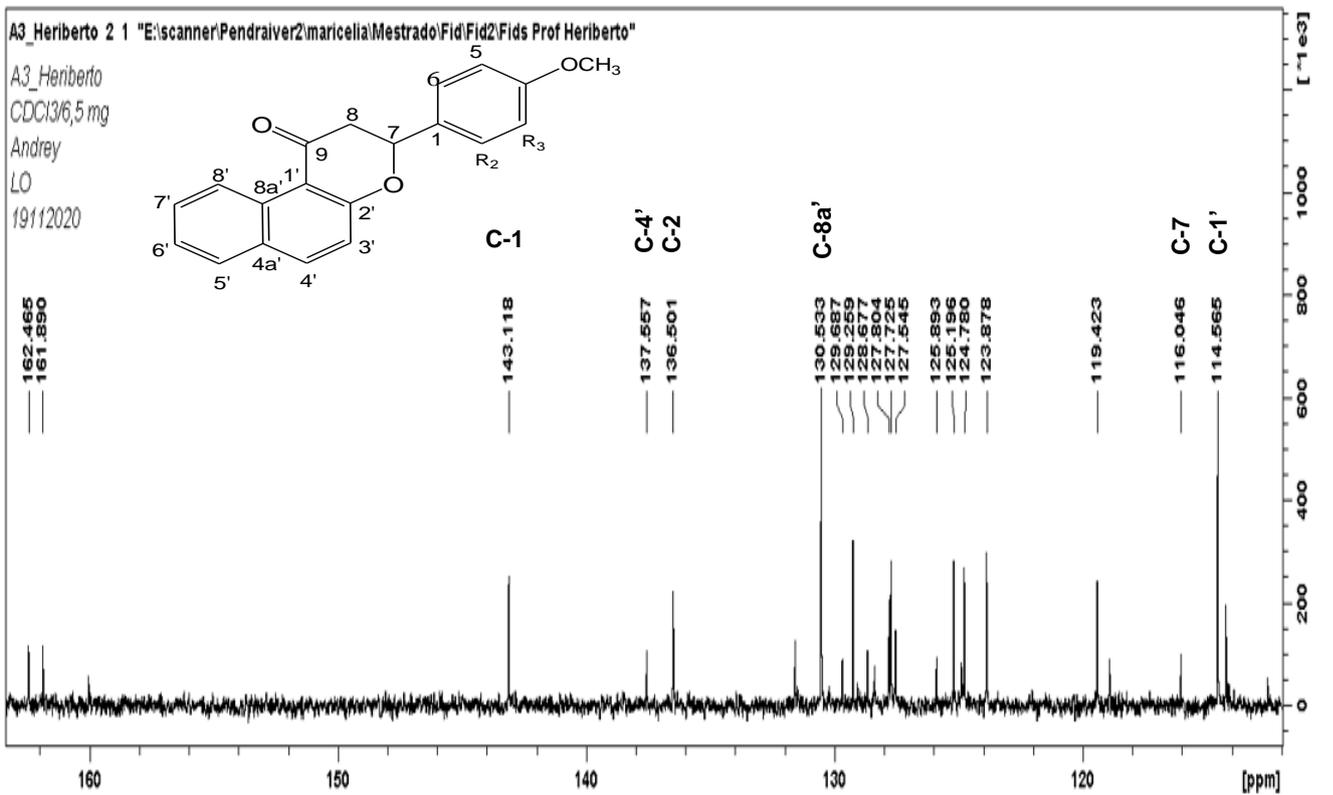


Figura 43 - Espectro RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) expandido de A3.