RAQUEL SABARÁ DA CRUZ

# SÍNTESE DE AMINOCHALCONAS E NITROCHALCONAS COMO POTENCIAIS INIBIDORES DE ALFA-GLICOSIDASES

**ARARAQUARA-SP** 

2013

**RAQUEL SABARÁ DA CRUZ** 

# SÍNTESE DE AMINOCHALCONAS E NITROCHALCONAS COMO POTENCIAIS INIBIDORES DE ALFA-GLICOSIDASES

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica;

Orientador: Prof. Dr. Ian Castro Gamboa

# ARARAQUARA-SP

2013

# SUMÁRIO

RESUMO	4
LISTA DE FIGURAS	5
LISTA DE ESQUEMAS	6
LISTA DE ANEXOS	7
LISTA DE TABELAS	8
SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	9
SUBSTÂNCIAS SINTETIZADAS	11
1. INTRODUÇÃO	13
1.1 DIABETES	13
1.2 Ελαμαρίος μιτιμέλους μις τραταμιεμές το πιαρετές	1/
1.3 INIBIDORES DE α-GLICOSIDASES.	
1.4 Chalconas	
2. OBJETIVOS	22
3. PLANEJAMENTO SINTÉTICO	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 Reagentes e Solventes	23
4.2 Métodos Cromatográficos	24
4.2.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	24
4.2.1b Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP)	24
4.2.2 Cromatografia em Coluna de Fase Normal (CC - FN)	25
4.3 METODOS ESPECTROMETRICOS	25
5. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	25
5.1 SÍNTESE DOS DERIVADOS CHALCÔNICOS SOB CATÁLISE BÁSICA (PH > 10)	25
5.2 Síntese dos derivados chalcônicos sob catálise básica (pH = 10)	26
5.3 Síntese dos derivados chalcônicos sob catálise ácida (pH = 1)	27
5.4 Purificação das chalconas	
5.5 Atividade inibitória sobre α-glicosidases de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
6.1~Obtenção dos derivados chalcônicos sob catálise básica (PH > $10$ ) através da dismutação da 4'-	
6.2 OBTENÇÃO DOS DERIVADOS CHALCONICOS SOB CATALISE BASICA (PH=10)	35
0.5 OBTENÇAU DOS DERIVADOS CHALCONICOS SUB CATALISE ACIDA (PH = 1)	/ ۲
6.5 ATIVIDADE INIBITÓRIA SOBRE Q-GLICOSIDASE DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE	
7. CONCLUSÕES	
RFFRÊNCIAS	
	59

#### RESUMO

A descoberta de agentes hipoglicemiantes constitui ainda um grande desafio no tratamento do diabetes, devido ao elevado índice de efeitos adversos e à baixa eficácia dos fármacos existentes. As alfa-glicosidases, enzimas essenciais ao metabolismo dos açúcares, são alvos terapêuticos estratégicos para a descoberta e desenvolvimento de fármacos antidiabéticos. Na busca de novos modelos estruturais com atividade antidiabética, o presente projeto teve como objetivo a síntese de aminochalconas e nitrochalconas como inibidores potenciais de alfaglicosidases. Para atingir o objetivo delineado foi planejada a síntese de 4'-nitrochalconas através da condensação de Claisen-Schmidt, que conduziriam à obtenção das respectivas 4'aminochalconas na presença de cloreto de estanho II como agente redutor. Ao todo foram sintetizadas 14 substâncias, sendo 6 nitrochalconas e 8 aminochalconas que foram purificadas utilizando-se técnicas cromatográficas tais como Cromatografia em Coluna e Cromatografia em Camada Delgada Preparativa. A identificação espectroscópica foi realizada por Ressonância Magnética Nuclear de <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H. As chalconas sintetizadas foram avaliadas por meio de ensaios de inibição de alfa-glicosidases de Saccharomyces cerevisiae. As substâncias 10 e 14 apresentaram valores de CI<sub>50</sub> (concentração capaz de inibir em 50% a atividade enzimática) de 1,23 e 1,88 µM respectivamente, mostrando-se mais potentes que a acarbose  $(CI_{50} 4,90 \mu M)$ , a qual foi empregada como controle positivo. Os dados de  $CI_{50}$  revelaram que a presença de hidroxilas no anel B, bem como a posição e o número desses substituintes é de fundamental importância para a inibição da atividade enzimática. Em contrapartida, a presença de grupos doadores ou receptores de elétrons no anel A é pouco significativa para a inibição de  $\alpha$ -glicosidases.

### LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: FÁRMACOS HIPOGLICEMIANTES: (7) REPAGLINIDA; (8) METFORMINA; (9) VOGLIBOSE; (10) GLIBENCLAMIDA; (11)	
ROSIGLITAZONA	15
Figura 2: Inibidores de α-glicosidases	17
FIGURA 3: FÁRMACOS INIBIDORES DE GLICOSIDASES DISPONÍVEIS NA TERAPÊUTICA	18
FIGURA 4: ESTRUTURA GERAL DO NÚCLEO CHALCÔNICO	19
FIGURA 5: CHALCONAS QUE APRESENTAM ATIVIDADE ANTIDIABÉTICA	21
FIGURA 6: GRÁFICO REPRESENTATIVO DOS RENDIMENTOS DA REAÇÃO DE DISMUTAÇÃO DA 4'-NITROACETOFENONA (4-NA) EM 4	.'-
AMINOACETOFENONA (4-AA) E ÁCIDO P-NITROBENZÓICO (4-NBA) PROPOSTO POR WAN E CHU (1989)	35

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Biossíntese geral de um flavonóide	19
ESQUEMA 2: SÍNTESE DE CHALCONAS VIA CONDENSAÇÃO ALDÓLICA DE CLAISEN-SCHMIDT	19
ESQUEMA 3: ROTA SINTÉTICA PARA OBTENÇÃO DAS 4'NITROCHALCONAS E 4'AMINOCHALCONAS	23
ESQUEMA 4: PROCEDIMENTO PARA SÍNTESE DOS DERIVADOS CHALCÔNICOS SOB CATÁLISE BÁSICA(PH =10). (A) MEOH, KOH 50%	
(M/V), TEMPERATURA AMBIENTE. (B) HCL 10% (AQ), R1= NO <sub>2</sub> OU NH <sub>2</sub>	27
ESQUEMA 5: PROCEDIMENTO PARA SÍNTESE DOS DERIVADOS CHALCÔNICOS SOB CATÁLISE BÁSICA(PH =10). (A) MEOH, KOH 50%	
(M/v), temperatura ambiente. (b) HCl 10% (aq), R1= NO <sub>2</sub> ou NH <sub>2</sub>	27
ESQUEMA 6: PROCEDIMENTO PARA SÍNTESE DOS DERIVADOS CHALCÔNICOS SOB CATÁLISE BÁSICA(PH =10). (A) MEOH, KOH 50%	
(M/V), TEMPERATURA AMBIENTE. (B) HCL 10% (AQ), R1= NO <sub>2</sub> OU NH <sub>2</sub>	32
Esquema 7: Reação de dismutação da 4'-nitroacetofenona (4-NA) em 4'-aminoacetofenona (4-AA) e ácido p-	
NITROBENZÓICO (4-NBA)	33
ESQUEMA 8: OBTENÇÃO DE AMINOCHALCONAS DERIVADAS DA 4'-AMINOACETOFENONA PRODUZIDA IN SITU ATRAVÉS DA REAÇÃO D	E
DESPROPORCIONAMENTO DA 4'-NITROACETOFENONA	34
ESQUEMA 9: REAÇÃO DE CLAISEN-SCHMIDT ENTRE AMINOACETOFENONA E BENZALDEÍDOS (SOLOMONS, FRYHLE, 2002)	34
ESQUEMA 10: MECANISMO DA REAÇÃO DE CANNIZZARO (MC MURRY, 2005)	36
ESQUEMA 11: MECANISMO DE REAÇÃO DE CONDENSAÇÃO ALDÓLICA EM MEIO ÁCIDO (PATIL, MAHAJAN, KATTI, 2009)	37

#### LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1: ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DA AMINOCHALCONA 1 (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ; 11,7 T)	59
ANEXO 2: ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup> C DA AMINOCHALCONA 1 (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ; 11,7 T)	60
ANEXO 3: ESPECTRO DE DEPT 135° DA AMINOCHALCONA 1 (DMSO- $d_6$ ; 11,7 T)	61
ANEXO 4: ESPECTRO DE NOESY DA AMINOCHALCONA 1 (DMSO-d <sub>6</sub> ; 11,7 T)	62
ANEXO 5: ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DA AMINOCHALCONA 2 (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ; 11,7 T)	63
ANEXO 6: AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE $^{1}$ H DA AMINOCHALCONA 2 (DMSO- $d_{6}$ ; 11,7 T)	64
ANEXO 7: ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup> C DA AMINOCHALCONA 2 (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ; 11,7 T)	65
ANEXO 8: ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DA AMINOCHALCONA 3 (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ; 11,7 T)	66
ANEXO 9: AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE $^{1}$ H da AMINOCHALCONA 3 (DMSO- $d_{6}$ ; 11,7 T)	67
ANEXO 10: ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup> C DA AMINOCHALCONA 3 (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ; 11,7 T)ANEXO 10	68
ANEXO 11: AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE $^{13}$ C da aminochalcona 3 (DMSO- $d_6$ ; 11,7 T)	69
ANEXO 12: ESPECTRO DE RMN DE 1H DA AMINOCHALCONA 4 (DMSO-d <sub>6</sub> ; 11,7 T)	70
ANEXO 13: AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE $^1$ H DA AMINOCHALCONA 4 (DMSO- $d_6$ ; 11,7 T)	71
ANEXO 14: ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup> C DA AMINOCHALCONA 4 (DMSO- $d_6$ ; 11,7 T)	72
ANEXO 15: AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE $^{13}$ C da aminochalcona 4 (DMSO- $d_6$ ; 11,7 T)	73
ANEXO 16: ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DA AMINOCHALCONA 5 (DMSO- $d_6$ ; 11,7 T)	74
Anexo 17: Ampliação do espectro de RMN de $^1$ H da aminochalcona 5 (DMSO- $d_6$ ; 11,7 T)	75
ANEXO 18: ESPECTRO DE RMN DE $^{13}$ C da aminochalcona 5 (DMSO- $d_6$ ; 11,7 T)	76
ANEXO 19: ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DA AMINOCHALCONA 6 (DMSO- $d_6$ ; 11,7 T)	77
ANEXO 20: AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DA AMINOCHALCONA 6 (DMSO- $d_6$ ; 11,7 T)	78
ANEXO 21: ESPECTRO DE RMN DE $\int_{1}^{13}$ C DA AMINOCHALCONA 6 (DMSO- $d_6$ ; 11,7 T)	79
ANEXO 22: ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DA CHALCONA 7 (DMSO- $d_6$ ; 11,7 T)	80
ANEXO 23: AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DA CHALCONA 7 (DMSO- $d_6$ ; 11,7 T)	80
ANEXO 24: ESPECTRO DE RMN DE $\frac{13}{2}$ C DA CHALCONA 7 (DMSO- $d_6$ ; 11,7 T)	81
ANEXO 25: ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DA CHALCONA 8 (DMSO- $d_6$ ; 11,7 T)	81
ANEXO 26: AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DA CHALCONA 8 (DMSO- $d_6$ ; 11,7 T)	82
ANEXO 27: ESPECTRO DE RMN DE $\frac{13}{10}$ C da Chalcona 8 (DMSO- $d_6$ ; 11,7 T)	82
ANEXO 28: ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DA CHALCONA 9 (DMSO- $d_6$ ; 11,7 T)	83
ANEXO 29: AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DA CHALCONA 9 (DMSO- $d_6$ ; 11,7 T)	83
ANEXO 30: ESPECTRO DE RMN DE $\frac{13}{10}$ C da Chalcona 9 (DMSO- $d_6$ ; 11,7 T)	84
ANEXO 31: ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DA CHALCONA 10 (DMSO- $d_6$ ; 11,7 T)	84
ANEXO 32: AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DA CHALCONA 10 (DMSO- $d_6$ ; 11,7 T)	85
ANEXO 33: ESPECTRO DE RMN DE $^{13}$ C DA CHALCONA 10 (DMSO- $d_6$ ; 11,7 T)	85
ANEXO 34: ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DA CHALCONA 11 (DMSO- $d_6$ ; 11,7 T)	86
ANEXO 35: AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DA CHALCONA 11 (DMSO- $d_6$ ; 11,7 T)	86
ANEXO 36: ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DA CHALCONA 12 (DMSO- $d_6$ ; 11,7 T)	87
ANEXO 37: AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DA CHALCONA 12 (DMSO- $d_6$ ; 11,7 T)	87
ANEXO 38: ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup> C DA CHALCONA 12 (DMSO- $d_6$ ; 11,7 T)	88
ANEXO 39: AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup> C DA CHALCONA 12 (DMSO- $d_6$ ; 11,7 T)	88
ANEXO 40: ESPECTRO DE RMN DE <sup>+</sup> H DA AMINOCHALCONA 13 (DMSO- $d_6$ ; 11,7 T)	89
ANEXO 41: AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE <sup>+</sup> H DA AMINOCHALCONA 13 (DMSO- $d_6$ ; 11,7 T)	89
ANEXO 42: ESPECTRO DE RMN DE <sup>+</sup> H DA AMINOCHALCONA 14 (DMSO- $d_6$ ; 11,7 T)	90
ANEXO 43: AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE <sup>+</sup> H DA AMINOCHALCONA 14 (DMSO- $d_6$ ; 11,7 T)	90
ANEXO 44: ESPECTRO DE RMN DE $^{-1}$ C DA CHALCONA 14 (DMSO- $d_6$ ; 11,7 T)	91
Anexo 45: Ampliação do espectro de RMN de $^{\sim}$ C da chalcona 14 (DMSO- $d_6$ ; 11,7 T)	91

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: FÁRMACOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DO DIABETES TIPO 2 (MARCONDES, 2003)	15
TABELA 2: CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS E RENDIMENTOS DOS EXPERIMENTOS DE CROMATOGRAFIA EM COLUNA	
TABELA 3: CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS E RENDIMENTOS DOS EXPERIMENTOS DE CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELAGADA	
Preparativa	29
TABELA 4: CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS E RENDIMENTOS DOS EXPERIMENTOS DE CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELAGADA	
Preparativa	29
TABELA 5: DADOS DE RMN DE <sup>1</sup> H (500 MHz) E RMN DE <sup>13</sup> C (125 MHz) E DO MAPA DE CONTORNOS GHMBC DA	
AMINOCHALCONA 1 (DMSO- $d_6$ ) (ANEXOS 1-4)	40
TABELA 6: DADOS DE RMN DE <sup>1</sup> H (500 MHz) E RMN DE <sup>13</sup> C (125 MHz) E DO MAPA DE CONTORNOS GHMBC DA	
AMINOCHALCONA 2 (DMSO- $d_6$ ) (ANEXOS 5 – 7)	41
TABELA 7: DADOS DE RMN DE <sup>1</sup> H (500 MHz) E RMN DE <sup>13</sup> C (125 MHz) E DO MAPA DE CONTORNOS GHMBC DA	
AMINOCHALCONA 3 (DMSO- $d_6$ ) (ANEXOS 8 – 11)	42
TABELA 8: DADOS DE RMN DE <sup>1</sup> H (500 MHz) E RMN DE <sup>13</sup> C (125 MHz) E DO MAPA DE CONTORNOS GHMBC DA	
AMINOCHALCONA 4 (DMSO- $d_6$ ) (ANEXOS 12 – 15)	43
TABELA 9: DADOS DE RMN DE <sup>1</sup> H (500 MHz) E RMN DE <sup>13</sup> C (125 MHz) E DO MAPA DE CONTORNOS GHMBC DA	
AMINOCHALCONA 5 (DMSO- $d_6$ ) (ANEXOS 16 – 18)	44
TABELA 10: DADOS DE RMN DE <sup>1</sup> H (500 MHz) E RMN DE <sup>13</sup> C (125 MHz) E DO MAPA DE CONTORNOS GHMBC DA	
AMINOCHALCONA 6 (DMSO- $d_6$ ) (ANEXOS 19 – 21)	45
TABELA 11: DADOS DE RMN DE $^{1}$ H (500 MHz) E RMN DE $^{13}$ C (125 MHz) DA	46
TABELA 12: DADOS DE RMN DE <sup>1</sup> H (500 MHz) E RMN DE <sup>13</sup> C (125 MHz) DA NITROCHALCONA 8 (DMSO- $d_6$ ) (AN	EXOS
25 – 27)	47
TABELA 13: DADOS DE RMN DE <sup>1</sup> H (500 MHz) E RMN DE <sup>13</sup> C (125 MHz) DA NITROCHALCONA 9 (DMSO- $d_6$ ) (ANEXOS	s 28 –
30)	48
TABELA 14: DADOS DE RMN DE <sup>1</sup> H (500 MHz) E RMN DE <sup>13</sup> C (125 MHz) DA NITROCHALCONA	49
TABELA 15: DADOS DE RMN DE <sup>1</sup> H (500 MHz) DA NITROCHALCONA 11 (DMSO- $d_6$ ) (ANEXOS 24 – 35)	49
TABELA 16: DADOS DE RMN DE $^{1}$ H (500 MHz) E RMN DE $^{13}$ C (125 MHz) DA	50
TABELA 17: DADOS DE RMN DE <sup>1</sup> H (500 MHz) DA AMINOCHALCONA 13	51
TABELA 18: DADOS DE RMN DE <sup>1</sup> H (500 MHz) E RMN DE <sup>1</sup> C (125 MHz) DA	51
TABELA 19: ATIVIDADE INIBITÓRIA DE 4'-NITRO- E 4'-AMINOCHALCONAS SOBRE $\alpha$ -GLICOSIDASES	52

## SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

 $\lambda$  – comprimento de onda AcOEt – acetato de etila ABS – albumina bovina sérica CC - Cromatografia em Coluna CCD – Cromatografia em Camada Delgada CCDA - Cromatografia em Camada Delgada Analítica CCDP - Cromatografia em Camada Delgada Preparativa CI<sub>50</sub> – Concentração Inibitória a 50% CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência d – dubleto dd - duplo dubleto ddd - duplo duplo dubleto DMSO - dimetilsulfóxido Hex – hexano Hz – hertz J – constante de acoplamento m – multipleto MeOH - metanol MHz – Mega Hertz MM – massa molar mmol – milimol mult. - multiplicidade nm – nanômetro NuBBE - Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais R<sub>f</sub> – fator de retenção RMN de <sup>1</sup>H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio RMN de <sup>13</sup>C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze s – singleto REA - Relação Estrutura Atividade SE – solução enzimática sl - singleto largo SM - solução-mãe SS - solução do substrato

ST - solução tampão

pNF- G – para-nitrofenil- $\alpha$ -D-glicosídeo

T – Tesla

TOTG – Teste Oral de Tolerância à Glicose

 $\delta_C$  – deslocamento químico de carbono

 $\delta_H - deslocamento \ químico \ de \ hidrogênio$ 

# SUBSTÂNCIAS SINTETIZADAS



#### 1. INTRODUÇÃO

#### **1.1 Diabetes**

O diabetes mellitus é um dos maiores e mais dispendiosos problemas de Saúde Pública em crescimento no mundo, afetando aproximadamente dez milhões de brasileiros (SKYLER, 2004; MARCONDES, 2003). A prevalência dessa síndrome em adultos com idade acima de 20 anos era de 4% em 1995, sendo esperado um aumento de 5,4% até 2030 em todo o mundo, principalmente do diabetes tipo II (VIRALLY *et al.*, 2007).

O diabetes mellitus é um conjunto de doenças metabólicas caracterizadas pelo aumento da glicemia como consequência de uma deficiência de secreção de insulina, ou da resistência à ação da insulina. Com base em sua fisiopatologia, o diabetes pode ser classificado em tipo I e tipo II (SKYLER, 2004; MARCONDES, 2003).

O diabetes tipo I é uma doença auto-imune na qual anticorpos agem contra células pancreáticas  $\beta$  causando sua falência, resultando em uma deficiência absoluta de insulina. O diabetes tipo II é uma doença metabólica caracterizada por três anormalidades: (**a**) deficiência relativa de insulina, (**b**) resistência à insulina envolvendo miócitos e (**c**) resistência hepática à insulina levando ao aumento da gliconeogênese (FORD *et al.*, 2002; BEDEKAR, SHAH, KOFFAS, 2010).

O diabetes tipo II é o tipo mais comum de diabetes, acometendo cerca de 90-95% dos pacientes diabéticos diagnosticados e praticamente todos os diabéticos não diagnosticados. A obesidade tem sido apontada como um dos principais fatores de risco para o diabetes tipo II, e estima-se que entre 80 e 90% dos indivíduos acometidos por essa doença são obesos (EMILIEN, MALOTEAUX, PONCHON, 1999; SARTORELLI, FRANCO, 2003)

A grande variação da prevalência do diabetes em diferentes nações tem sido atribuída a uma combinação de diferenças genéticas e fatores ambientais, como dieta, obesidade, sedentarismo e desenvolvimento intra-uterino (ZIMMET *et al.*, 1997).

Diversas pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de avaliar a patogênese do diabetes prospectando medidas profiláticas e-ou curativas (EMILIEN, MALOTEAUX, PONCHON, 1999).

Atualmente o controle dos níveis glicêmicos pós-prandiais no plasma vem associando terapias medicamentosas, nutrição adequada e a prática de exercícios físicos. (KIM, WANG, RHEE, 2004).

#### 1.2 Fármacos utilizados no tratamento do diabetes

Desde a descoberta da insulina por Banting e Best no início do século XX, o tratamento medicamentoso do diabetes tem sofrido mudanças significativas. A última década foi marcada por um grande avanço na terapia farmacológica, com uma série fármacos novos sendo disponibilizados na clínica para o tratamento do diabetes tipo II (UWAIFO, RATNER, 2005).

Atualmente o controle do diabetes tem sido realizado por meio de fármacos pertencentes a cinco classes: sulfoniluréias, inibidores de  $\alpha$ -glicosidase, meglitinidas, biguanidas e tiazolidenidionas (Figura 1, p. 15). Os mecanismos de ação desses fármacos são variados, podendo atuar tanto no aumento da secreção de insulina, na diminuição da absorção de carboidratos, no aumento da captação periférica da glicose ou ainda, diminuindo a produção hepática de glicose (Tabela 1, p. 15) (EMILIEN, MALOTEAUX, PONCHON, 1999; BEDEKAR, SHAH, KOFFAS, 2010).

CLASSE	MECANISMO DE AÇÃO PRINCIPAL	VANTAGEM	EFEITOS ADVERSOS	PRECAUÇÕES
<u>sulfoniluréias</u> gliburida, glipizida glimepirida, clorpropamida, glibenclamida	estimula a secreção de insulina em resposta à ingestão de alimentos	baixo custo	hipoglicemia e ganho de peso	contra-indicação relativa em idosos e na presença de insuficiência hepática
<u>inibidores de a-glicosidase</u> acarbose, voglibose, miglitol	bloqueio enzimático da conversão de carboidratos no intestino	não causa hipoglicemia	flatulência, diarréia e desconforto abdominal	devem ser ingeridas imediatamente antes das refeições
<u>meglitinidas</u> repaglinida nateglinida	estimula a secreção de insulina por elevação aguda da glicemia	baixo risco de hipoglicemia entre as refeições períodos noturnos	hipoglicemia	devem ser ingeridas somente antes das refeições, com a dose podendo variar de acordo com o conteúdo de carboidratos da dieta; contra indicada em caso de insuficiência hepática
<u>biguanidas</u> metformina	diminuição da produção hepática de glicose	não causa hipoglicemia	flatulência, diarréia, desconforto abdominal e raramente acidose láctica	devem ser ingeridas somente antes das refeições; contra indicadas em caso de insuficiência hepática, renal, cardíaca, e respiratória e concomitante com bebidas alcoólicas
<u>tiazolidenidionas</u> rosiglitazona pioglitazona	facilita a captação periférica de glicose	não causa hipoglicemia	ganho de peso e edema	contra- indicadas em caso de doença hepática ou insuficiência cardíaca

Tabela 1: Fármacos utilizados no tratamento do Diabetes tipo 2 (MARCONDES, 2003)





A seleção do fármaco a ser empregado na terapia para o diabetes torna-se complicada quando o paciente sofre de outras complicações tais como alto risco de hipoglicemia, obesidade, pressão alta, ou problemas relacionados à função renal. Assim, o padrão farmacológico para o tratamento do diabetes é individual, podendo ser empregadas associações de diferentes fármacos de modo a melhorar o controle da glicemia nesses pacientes (EMILIEN, MALOTEAUX, PONCHON, 1999).

#### **1.3 Inibidores de α-glicosidases**

As glicosidases e glicosiltransferases compreendem uma classe de enzimas que catalisam a clivagem e a formação de ligações glicosídicas em oligossacarídeos ou glicoconjugados, exercendo papel essencial em uma série de processos bioquímicos tais como no catabolismo/anabolismo de carboidratos, processamento de glicoproteínas e biossíntese de unidades de oligossacarídeos em glicoproteínas ou glicolipídeos (DE MELO, GOMES, CARVALHO, 2006; BHARATHAM *et al.*,2008).

A maioria das glicosidases é específica para a clivagem de uma determinada ligação, dependendo do número, posição ou anomeria dos grupos hidroxila presentes na estrutura molecular. Assim, as glicosidases podem ser classificadas em  $\alpha$  ou  $\beta$ , dependendo do tipo de isômero reconhecido por essas enzimas (DE MELO, GOMES, CARVALHO, 2006).

Os inibidores de glicosidases vêm recebendo considerável atenção nos últimos anos devido ao potencial terapêutico apresentado por esses compostos, as quais podem ser empregadas no tratamento de diversas doenças tais como o diabetes tipo II.

A inibição das α-glicosidases intestinais promove o retardo na captação intestinal dos carboidratos da dieta, uma vez que a clivagem dos dissacarídeos em unidades monossacarídicas fica impossibilitada, levando à redução da glicemia pós-prandial. (LILLELUND *et al.*, 2002; SEO *et al.*, 2005).

Desde o início dos anos 60 uma série de produtos naturais apresentando potente atividade inibitória para  $\alpha$ -glicosidases, vêm sendo isolados de plantas e micro-organismos. Na última

década, novos tipos de inibidores sintéticos e semi-sintéticos foram descobertos e desenvolvidos. Contudo, a maioria dos inibidores de glicosidases que foram desenvolvidos são análogos de carboidratos ("sugar mimics"), os quais requerem inúmeras etapas para sua síntese, tornando o processo longo e dispendioso (LILLELUND *et al.*, 2002; SEO *et al.*, 2005).

Os inibidores de glicosidases que mimetizam carboidratos podem ser classificados dentro de três grandes subclasses estruturais: iminoaçúcares como a nojirimicina (12), tioaçúcares, cujo principal representante é o salacinol (13) e carbaglicosilaminas a exemplo da valienamina (14) (Figura 2, p. 17). Os iminoaçúcares e tioaçúcares são substâncias análogas de carboidratos, possuindo respectivamente um átomo de nitrogênio e um átomo de enxofre substituindo o oxigênio heterocíclico, enquanto as carbaglicosilaminas são glicosilaminas nas quais o oxigênio heterocíclico é substituído por um metileno ou um metino (Figura 2, p. 17). As propriedades farmacológicas apresentadas por essas substâncias se devem à sua semelhança estrutural com a molécula de carboidrato terminal nos substratos naturais (ASANO, 2009).





Atualmente apenas quatro fármacos inibidores de glicosidases estão disponíveis para utilização na terapêutica (Figura 3, p. 18), sendo acarbose (15), voglibose (9), miglitol (16) e N- butil-1-desoxi-nojirimicina (17). Os fármacos 9, 15 e 16 são inibidores de  $\alpha$ -glicosidases intestinais sendo empregados no tratamento do diabetes mellitus tipo II.

O fármaco **17** é utilizado no controle da Doença de Gaucher, uma doença hereditária autossômica recessiva causada por uma mutação no gene GBA, que leva à redução na biossíntese de glicocerebrosidase. A baixa atividade enzimática dessa hidrolase culmina no acúmulo de glicoesfingolipídeos em diferentes partes do corpo, tais como baço, fígado e ossos (DE MELO, GOMES, CARVALHO, 2006).

Figura 3: Fármacos inibidores de glicosidases disponíveis na terapêutica.



#### **1.4 Chalconas**

As chalconas são uma das maiores classes de flavonóides com distribuição ampla em vegetais (NOWAKOWSKA, 2007), sendo precursores comuns dos demais flavonóides, exibindo um amplo espectro de atividades biológicas tais como antineoplásica, antioxidante (ANTO *et al.*, 1995), antifúngica (LAHTCHEV *et al.*, 2008), antibacteriana (BATOVSKA *et al.*, 2009) anti-inflamatória, e anti-hiperglicemiante. É crescente o interesse por esse grupo de substâncias devido a sua potencial utilização terapêutica, o que conduz à busca de derivados sintéticos ou semi-sintéticos estruturalmente correlacionados (DETSI *et al.*, 2009).

As chalconas são flavonóides de cadeia aberta, nos quais os dois anéis aromáticos encontram-se ligados por uma cetona  $\alpha$ , $\beta$ -insaturada, a qual vem sendo relacionada com as propriedades farmacológicas, agindo como uma subunidade farmacofórica potencial (Figura 4, p. 19) (BANDGAR *et al.*, 2010; BATOVSKA *et al.*, 2009).



Os flavonóides são considerados metabólitos especiais de biogênese mista (Esquema 1, p. 19), sendo biossintetizados a partir da via do chiquimato (*p*- cumaroil – CoA) e três unidades de malonil-CoA, o qual é oriundo de unidades de acetil CoA (via do acetato) (Esquema 1, p. 19).

#### Esquema 1: Biossíntese geral de um flavonóide



Após a condensação, o núcleo chalcônico é formado, sofrendo uma ciclização intramolecular espontânea, conduzindo à formação da naringerina (18), um composto flavonóidico da subclasse das flavanonas.

Por outro lado, as chalconas podem ser sintetizadas via condensação aldólica de Claisen-Schmidt entre uma benzofenona e um benzaldeído realizadas sob catálise básica ou ácida (Esquema 2, p. 19) (PATIL, MAHAJAN, KATTI, 2009).

Esquema 2: Síntese de chalconas via condensação aldólica de Claisen-Schmidt



A estrutura simples e a fácil síntese das chalconas as tornam alvos de grande valia para estudos de REA (Relação Estrutura Atividade) e uma vasta quantidade de derivados com inúmeros substituintes nos anéis A e B já têm sido sintetizados com o intuito de avaliar os efeitos que diferentes grupos provocam na atividade farmacológica. Além das modificações realizadas nos anéis aromáticos por meio de diferentes grupos funcionais, outras modificações têm sido feitas na estrutura das chalconas, tais como a substituição dos anéis A ou B por outros heterociclos aromáticos como a piridina, tiofeno, furano e indano, gerando bioisósteros potenciais (ROMAGNOLI *et al.*, 2009; BATOVSKA *et al.*, 2009; VOGEL *et al.*, 2010).

É notável o constante avanço nos estudos farmacológicos com esta classe de compostos, e recentemente estudos realizados por Park *et al.* (2009) registraram uma patente de novos derivados chalcônicos apresentando atividade inibitória potente para glicosidases, podendo ser úteis na prevenção e tratamento de diversas doenças vinculadas à ação dessas enzimas, tais como o diabetes tipo II.

Diversos estudos têm revelado que chalconas naturais ou sintéticas podem auxiliar no tratamento e na prevenção do diabetes uma vez que esses compostos podem atuar nas vias metabólicas de carboidratos, especialmente no metabolismo da glicose. Esses estudos mostram que as chalconas são agentes hipoglicemiantes em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* (DAMAZIO *et al.*, 2010).

Recentemente, Damazio *et al.* (2010) reportaram a síntese de naftilchalconas (**19 e 20**) com atividade anti-hiperglicemiante (Figura 5, p. 21). Também foram realizados estudos *in vivo* e *in vitro* quanto ao potencial anti-hiperglicemiante de nitrochalconas (**23**), onde foi demonstrado que chalconas são capazes de aumentar a secreção de insulina, e que este evento coincide com a diminuição dos níveis séricos de glicose no Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG) (DAMAZIO *et al.*, 2009).

Satyanarayana *et al.* (2004) e Shukla *et al.* (2007) também demonstraram que chalconas ariloxipropanolamínicas são capazes de diminuir os níveis glicêmicos de ratos diabéticos e aminochalconas e chalconas sulfonamídicas (**22-24**) são inibidores de  $\alpha$ -glicosidases potentes (SEO *et al.*, 2005).





A posição dos substituintes presentes nos anéis aromáticos das chalconas está intimamente relacionada à sua atividade anti-hiperglicemiante, estando de acordo com outros estudos que demonstram que a posição dos substituintes nos anéis pode modificar a atividade biológica, assim sendo, o estudo da REA de derivados chalcônicos apresenta-se como um modelo de grande valia para a otimização do potencial antidiabético apresentado por esses compostos (DAMAZIO *et al.*, 2010).

#### **2. OBJETIVOS**

- Sintetizar 4'nitrochalconas e 4'-aminochalconas a partir da reação de condensação aldólica de Claisen- Schmidt;
- (2) Realizar a identificação espectroscópica por meio de Ressonância Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C;
- (3) Avaliar a ação inibitória *in vitro* das substâncias sintetizadas sobre as α-glicosidases de Saccharomyces cerevisiae;
- (4) Estabelecer uma Relação Estrutura Atividade a partir dos dados de  $CI_{50}$  obtidos.

### 3. PLANEJAMENTO SINTÉTICO

A síntese das nitrochalconas e aminochalconas foi planejada com base na reação de condensação aldólica de Claisen – Schmidt. A reação se processa na presença de um catalisador que pode ser um ácido ou uma base. Quando o catalisador de escolha é uma base a reação procede à temperatura ambiente; quando um ácido é usado como catalisador, a reação deve ser realizada sob aquecimento (refluxo).

As 4' nitrochalconas foram obtidas através da reação de entre a 4' nitroacetofenona e benzaldeídos com diferentes substituintes. Planejou-se obter as aminochalconas em uma segunda etapa de síntese a partir das 4' nitrochalconas, as quais seriam submetidas a reações de redução na presença de cloreto de estanho II di-hidratado, conduzindo às respectivas 4' aminochalconas (esquema 3 p. 23).





#### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.1 Reagentes e Solventes

Os reagentes utilizados na preparação dos derivados chalcônicos foram adquiridos comercialmente da Aldrich<sup>®</sup>. Os reagentes utilizados foram: *p*-fluoraldeído, *p*-tolualdeído, *m*-hidroxibenzaldeído, *p*-hidroxibenzaldeído, *o*-hidroxibenzaldeído, benzaldeído, 2,3-diidroxibenzaldeído; 2,4- diidroxibenzaldeído; 3,4- diidroxibenzaldeído; 2,5-

diidroxibenzaldeído; 2-hidroxi-3-fluoraldeído; 2-hidroxi-5-fluoraldeído, 2-hidroxi-3metilbenzaldeído, 2-hidroxi- 5-metilbenzaldeído, *p*-nitroacetofenona e *p*- aminoacetofenona.

Os solventes empregados nas técnicas de purificação por Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA), Cromatografia em Coluna (CC) e Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP), foram obtidos do Laboratório de Destilação de Solventes do Instituto de Química (UNESP- Araraquara), e os solventes empregados nas reações foram adquiridos da marca Synth<sup>®</sup>.

#### 4.2 Métodos Cromatográficos

#### 4.2.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

#### 4.2.1a Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA)

Para realização da Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) foram utilizadas cromatoplacas de gel de sílica em folhas de alumínio de 250  $\mu$ m (Whatman<sup>®</sup>), tendo sido empregada como fase móvel diversas proporções de Hex:AcOEt de acordo com as características de polaridade de cada chalcona. Após o desenvolvimento das cromatoplacas estas foram secas e reveladas. A revelação das cromatoplacas foi efetuada por meio de inspeção em luz ultravioleta, nos comprimentos de onda curto (254 nm) e longo (365 nm), e uso de solução de anisaldeído sulfúrico.

#### 4.2.1b Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP)

Para as purificações por Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP) foram utilizadas placas de vidro de 20 cm<sup>2</sup> impregnadas com gel de sílica 60 PF  $_{254}$ , com 0,75 mm de espessura. As placas foram desenvolvidas em sistema solvente Hex:AcOEt em diversas proporções, de acordo com a polaridade de cada chalcona previamente analisada por meio de CCDA.

#### 4.2.2 Cromatografia em Coluna de Fase Normal (CC - FN)

Na separação por Cromatografia em Coluna de Fase Normal, empregou-se como suporte cromatográfico gel de sílica com tamanho de partícula de 60-200 mesh, (Acros Organics<sup>®</sup>), sendo esta suspensa em hexano e em seguida transferida para uma coluna de vidro, mantendo-se o fluxo até o empacotamento completo da fase estacionária.

#### 4.3 Métodos Espectrométricos

Os derivados chalcônicos tiveram suas estruturas moleculares determinadas por meio das análises dos espectros de RMN de <sup>13</sup>C e RMN de <sup>1</sup>H. Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetro Varian<sup>®</sup> INOVA 11,7 T operando a 500 MHz para o núcleo de <sup>1</sup>H e a 125 MHz para o núcleo de <sup>13</sup>C. O solvente utilizado na dissolução das amostras para a obtenção dos espectros foi o dimetilsulfóxido hexadeuterado (DMSO –  $d_6$ ).

#### 5. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

#### 5.1 Síntese dos derivados chalcônicos sob catálise básica (pH > 10)

Os derivados chalcônicos **1–6** foram sintetizados de acordo com a reação de condensação aldólica cruzada de Claisen-Schmidt utilizando-se a *p*-nitroacetofenona, metanol, KOH e diferentes benzaldeídos (Rao *et al.*, 2004; Satyanarayana *et al.*, 2004). Todas as conversões planejadas foram acompanhadas por CCDA utilizando-se como sistema solvente Hex:AcOEt em diferentes proporções.

Para a síntese das 4'-aminochalconas foram utilizadas quantidades equimolares de *p*nitroacetofenona e diferentes benzaldeídos. A rota sintética para a obtenção das substâncias sintetizadas nessa condição está demonstrada no esquema 8 pg. 34.

Em um balão reacional, 3,0 g (18,2 mmol) de *p*-nitroacetofenona foram dissolvidos em 30,0 mL de metanol grau CLAE. Em seguida, 25,0 mL de uma solução metanólica de KOH 50% (m/v) foram lentamente adicionados, mantendo-se agitação constante por 10 minutos. Posteriormente, adicionou-se 18,2 mmol dos respectivos aldeídos solubilizados em 10,0 mL de MeOH, e a reação foi mantida à temperatura ambiente sob agitação magnética durante 72 horas.

Após este período, o meio reacional foi vertido em um béquer contendo aproximadamente 400 mL de gelo e 100,0 mL de água deionizada, sendo mantida sob agitação branda por 10 minutos. Logo, a mistura foi acidificada com solução aquosa de HCl 10% até pH 3. Após a acidificação, observou-se a formação de um precipitado amarelo e a mistura heterogênea foi mantida à 5°C durante 24 horas, sendo submetida à filtração simples com papel de filtro pregueado. O precipitado formado foi seco em estufa com circulação de ar à 40°C durante 24 horas e posteriormente purificado por meio de técnicas cromatográficas.

#### 5.2 Síntese dos derivados chalcônicos sob catálise básica (pH = 10)

Os derivados chalcônicos **7–8** e **11–14** foram sintetizados sob catálise básica em pH 10. Para a síntese dessas substâncias empregou-se além da 4'-nitroacetofenona a 4'aminoacetofenona, conduzindo diretamente às aminochalconas desejadas (WAN, CHU, 1989).

Em um balão reacional, 2,0 g de acetofenona (12,1 mmol de *p*-nitroacetofenona ou 14,8 mmol de *p*-aminoacetofenona) foram dissolvidos em 30,0 mL de metanol grau CLAE. Em seguida preparou-se uma solução de KOH 50% (m/v) a qual foi lentamente adicionada à reação até pH 10, mantendo-se agitação constante por 10 minutos. Posteriormente, adicionou-se 18,2 mmol dos respectivos aldeídos solubilizados em 10,0 mL de MeOH. O pH da reação foi reajustado para 10 com solução de KOH 50% (m/v) e a reação foi mantida à temperatura ambiente sob agitação magnética durante 72 horas.

Após este período, o meio reacional foi vertido em um béquer contendo aproximadamente 400 mL de gelo e 100,0 mL de água deionizada, sendo mantida sob agitação branda por 10 minutos. Logo, a mistura foi acidificada com solução aquosa de HCl 10% até pH 3. Após a acidificação, observou-se a formação de um precipitado amarelo e a mistura heterogênea foi mantida à 5°C durante 24 horas, sendo submetida à filtração simples. O precipitado formado foi seco em estufa com circulação de ar à 40°C durante 24 horas e posteriormente purificado por meio de técnicas cromatográficas.

Esquema 4: Procedimento para síntese dos derivados chalcônicos sob catálise básica(pH =10). (a) MeOH, KOH 50% (m/v), temperatura ambiente. (b) HCl 10% (aq), R1= NO<sub>2</sub> ou NH<sub>2</sub>



#### 5.3 Síntese dos derivados chalcônicos sob catálise ácida (pH = 1)

Os derivados chalcônicos 9 e 10 foram obtidos por meio da reação de condensação aldólica em meio ácido (pH = 1), empregando-se quantidades catalíticas de ácido sulfúrico e excesso de benzaldeído (SEO *et al.*, 2010).

Em um balão reacional 2,0 g (14,5 mmol) de benzaldeído e 1,0 g (6,05 mmol) de nitroacetofenona foram dissolvidos em 30 mL de metanol. Após a completa solubilização dos reagentes, uma solução diluída de ácido sulfúrico (0,5 mL de ácido em 5 mL de metanol) foi adicionada ao balão em banho de gelo, sob constante agitação. Após a adição do ácido, a reação foi mantida sob refluxo e agitação durante 24 horas. Ao término da reação, o precipitado formado foi submetido à filtração simples. O pó foi lavado diversas vezes com água destilada e em seguida foi seco em estufa com circulação de ar à 40°C durante 24 horas.

Esquema 5: Procedimento para síntese dos derivados chalcônicos sob catálise básica(pH =10). (a) MeOH, KOH 50% (m/v), temperatura ambiente. (b) HCl 10% (aq), R1= NO<sub>2</sub> ou NH<sub>2</sub>



#### 5.4 Purificação das chalconas

Para a purificação dos derivados chalcônicos **1–6** foram utilizadas técnicas de Cromatografia em Coluna de Fase Normal (CC-FN) seguida de Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP).

Essas substâncias foram primeiramente submetidas à CC, utilizando-se como fase móvel a mistura de Hex:AcOEt, com gradiente de polaridade (95: 5 a 5:95 Hex:AcOEt), obtendo-se várias frações que foram reunidas de acordo com o grau de pureza e o fator de retenção ( $R_f$ ), segundo os seus respectivos perfis cromatográficos delineados por CCDA.

A Tabela 2 (p. 28) apresenta os dados referentes às dimensões das colunas utilizadas na purificação, bem como a massa de cada amostra aplicada, a quantidade de frações coletadas e o rendimento de cada produto obtido após esta etapa de purificação.

Tabela 2: Condições experimentais e rendimentos dos experimentos de Cromatografia em Coluna					
AMINOCHALCONA	MASSA DE AMOSTRA (g)	DIMENSÕES DA COLUNA (cm)	VOLUME DE ELUENTE (mL)	№ DE FRAÇÕES COLETADAS	RENDIMENTO (%)
1	2,4	23 x 3	70	14	62,5
2	5,4	27 x 5	135	13	31,5
3	9,4	32 x 5	160	17	17,0
4	4,5	27 x 5	135	10	22
5	3,3	25 x 5	135	21	33
6	4,0	25 x 5	135	18	18,8

Os produtos obtidos após a realização da CC não apresentou pureza adequada, sendo assim submetido à purificação por meio de CCDP. As placas cromatográficas utilizadas foram previamente ativadas em estufa à 70°C por 1 hora. A massa obtida após a CC-FN foi dissolvida em uma quantidade mínima de acetato de etila e em seguida aplicou-se de 25 a 30 mg de produto bruto por placa, as quais foram desenvolvidas em sistema solvente Hex:AcOEt em proporções variadas (Tabela 3, p. 29).

AMINOCHALCONA	MASSA DE AMOSTRA (g)	FASE MÓVEL HEX: AcOEt	RENDIMENTO (%)	RENDIMENTO GLOBAL (%)
1	1,54	65:35	15	9,33
2	1,66	70:30	26	8,19
3	1,60	80:20	22	3,74
4	0,52	60:40	7,0	1,54
5	1,05	50:50	21	6,93
6	0,75	55:45	20	3,76

Tabela 3: Condições experimentais e rendimentos dos experimentos de Cromatografia em Camada Delagada Preparativa

Para a purificação dos derivados chalcônicos obtidos por catálises básica (pH=10) e ácida (pH=1) foi empregada apenas Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP) (Tabela 4, p. 29)

MASSA DE AMOSTRA FASE MÓVEL **RENDIMENTO CHALCONA** APLICADA (g) Hex: AcOEt (%) 7 0.5 7:3 64% 8 0,5 7:3 68% 9 0,5 7:3 80% 11 0,5 48% 4:1 0,5 47% 3:1 12 13 0,5 4:145% 14 0,5 7,0% 1:1

Tabela 4: Condições experimentais e rendimentos dos experimentos de Cromatografia em Camada Delagada Preparativa

A chalcona **10** mostrou elevado grau de pureza, por meio da análise de CCDA após a etapa de precipitação, não sendo necessária a purificação por CCDP.

#### 5.5 Atividade inibitória sobre α-glicosidases de Saccharomyces cerevisiae

O ensaio cromogênico de inibição com α-glicosidase de *Saccharomyces cerevisiae* foi desenvolvido segundo inúmeros métodos descritos na literatura (BALL *et al.*, 2008; Du *et al.*, 2006; GONÇALVES, LAJOLO & GENOVESE, 2010; PINTO *et al.*, 2008; PINTO *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2004; WATANABE *et al.*, 1997; WORTHINGTON, 1993), sendo realizadas modificações que culminaram no estabelecimento de um protocolo dividido em sete etapas:

Etapa 1- Preparo de uma solução tampão fosfato pH 7 (ST). Consistiu na dissolução de 13,79 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (fosfato monobásico de sódio monobásico

monoidratado) e 14,19 g  $Na_2HPO_4.7H_2O$  (fosfato de sódio bibásico heptaidratado) em quantidade suficiente para 1,0 L de solução aquosa.

Etapa 2- Preparo da solução enzimática 0.7 U (SE). Foi realizada com a solubilização de 100, 0 mg de albumina bovina sérica (ABS), 10,0 mg de azida sódica (NaN<sub>3</sub>) e 4,00 mg de  $\alpha$ -glicosidase (1000 U) em tampão fosfato pH 7 (etapa 1), quantidade suficiente para 50,0 mL.

**Etapa 3- Preparo da solução do substrato 5,0 mM (SS).** Consistiu na solubilização de 15,0 mg de *para*-nitrofenil-α-D-glicosídeo (pNF-G) em 15,0 mL de solução tampão fosfato pH 7 (etapa 1).

As soluções preparadas segundo as etapas 1-3 foram armazenadas em temperaturas inferiores a 10 °C e ao abrigo da luz por ao máximo de três dias.

Etapa 4- Preparo das amostras e controles positivos. O controle positivo (acarbose) foi dissolvido em CHCl<sub>3</sub>:DMSO (1:4; 2:3; 1:1; 3:2 e 4:2), DMSO:H<sub>2</sub>O (1:4; 2:3; 1:1; 3:2 e 4:2), MeOH:H<sub>2</sub>O (1:4; 2:3; 1:1; 3:2 e 4:2), EtOH:H<sub>2</sub>O (1:4; 2:3; 1:1; 3:2 e 4:2) e 1,2,3-propanotriol (glicerina) :H<sub>2</sub>O (1:4; 2:3; 1:1; 3:2 e 4:2), DMSO, 1,2,3-propanotriol, EtOH, MeOH e H<sub>2</sub>O . Dentre estes, DMSO foi selecionado devido a sua maior capacidade de solubilizar a acarbose e as amostras, não havendo precipitação após a adição da SE e SS.

Uma alíquota de 6,5 mg de acarbose (MM= 645,6 g/mol) foi solubilizada em 1,0 mL de DMSO, em microtubos tipo Eppendorf, conduzindo a uma concentração inicial de 10 mM. Esta solução foi denominada de solução-mãe (SM). Uma alíquota de 100,0  $\mu$ L desta solução foi diluída, seriadamente, em oito concentrações de 1,0 mM (+ 900  $\mu$ L), 500  $\mu$ M, 250  $\mu$ M, 125  $\mu$ M, 62,5  $\mu$ M e 31,2  $\mu$ M, 16,2  $\mu$ M, 8,1  $\mu$ M.

**Etapa 5- Período de incubação amostras-enzima (incubação e leitura I).** Três alíquotas de 20,0 μL destas diluições seriadas foram adicionadas a microplacas de 96 poços, sendo misturadas com 90,0 μL de SE e mantidas no interior do leitor de microplacas

(espectrofotômetro) durante cinco minutos a 37 °C, sendo realizada a leitura em 405 nm. Para as absorções dos poços que continham ST+DMSO e SE, denominou-se A405 (branco I), e para àquelas referentes aos poços que continham somente as amostras e SE foram nomeadas de A405 (amostra I).

#### Etapa 6- Período de incubação amostras-enzima-substrato (incubação e leitura

**II**). Após a obtenção de A405 (amostra I) e A405 (branco I), os poços receberam 90,0 μL de SS. A microplaca foi incubada a 37 °C por mais cinco minutos. Após este período, as absorções referentes aos poços que continham ST+DMSO, SE e SS foram chamados de A405 (branco II) e para àquelas referentes aos poços que continham amostras, SE e SS foram denominadas de A405 (branco II).

As leituras foram realizadas a 405 nm, comprimento de onda de absorção máxima do *p*-nitrofenolato, produto produzido da hidrólise do pNF-G, o qual apresenta coloração amarela, segundo o esquema 6, p. 32 (BINDER & ROBIT, 1983)

**Etapa 7- Tratamento dos dados.** Os dados de absorção foram compilados e tratados em programa Microsoft Office Excel 2007. A porcentagem de inibição de  $\alpha$ -glicosidase foi expressa como sendo;

% *de inibição* = 
$$\frac{\Delta A405 \text{ (branco)} - \Delta A405 \text{ (amostra)}}{\Delta A405 \text{ (branco)}} X 100$$

na qual  $\Delta$  A405 (branco) = A405 (branco II) – A405 (branco I) e  $\Delta$  A405 (amostra) = A405 (amostra II) – A405 (amostra I).

A média obtida dos valores de porcentagem de inibição, obtidos em três experimentos independentes, foram correlacionados às respectivas concentrações finais (100  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 12,5  $\mu$ M, 6,25  $\mu$ M e 3,12  $\mu$ M, 1,62  $\mu$ M, 0,81  $\mu$ M. através de gráficos. O valor de CI<sub>50</sub>, concentração capaz de inibir 50 % da atividade enzimática foi obtido através de regressão linear dos gráficos construídos.

Esquema 6: Procedimento para síntese dos derivados chalcônicos sob catálise básica(pH =10). (a) MeOH, KOH 50% (m/v), temperatura ambiente. (b) HCl 10% (aq), R1= NO<sub>2</sub> ou NH<sub>2</sub>



#### 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

# 6.1 Obtenção dos derivados chalcônicos sob catálise básica (pH > 10) através da dismutação da 4'-nitroacetofenona

Na proposta inicial, a síntese de aminochalconas foi planejada em duas etapas, sendo iniciada pela reação de condensação entre a 4'-nitroacetofenona e benzaldeídos mono- e dihidroxilados, a qual conduziria a obtenção de 4'-nitrochalconas. Esses nitroderivados seriam submetidos a reações de redução na presença de cloreto de estanho II di-hidratado, culminando nas 4'-aminochalconas mono- e di-hidroxiladas (Esquema 3, p. 23).

As condições reacionais foram pré-otimizadas, observando-se de maneira preliminar que a natureza do grupo substituinte no benzaldeído não altera de maneira significativa os rendimentos obtidos. Dessa forma, a reação aldólica cruzada entre a 4'-nitroacetofenona e os diferentes benzaldeídos foram realizadas inicialmente sob catálise básica ( $13 \le pH \le 14$ ), buscando a obtenção das 4'-nitrochalconas planejadas.

Após as etapas de precipitação e de purificações por CC e CCDP, os produtos foram analisados por RMN, observando-se a obtenção de 4'-aminochalconas e *não* de derivados 4'nitrochalcônicos como delineados inicialmente. Interessantemente, o meio reacional mostrou capacidade redutora, o que pode ser atribuído a reação de dismutação da 4'-nitroacetofenona (WAN & CHU, 1989).

Wan e Chu (1989) descreveram a reação de dismutação do tipo redox da 4'nitroacetofenona (4-NA) em 4'-aminoacetofenona (4-AA) e ácido *p*-nitrobenzóico (4-NBA), com rendimentos aproximados de 57 % e 37 %, respectivamente (Esquema 7, p. 33). Segundo estes autores, 4-NA na presença de bases fortes não geravam produtos característicos de uma condensação aldólica, mas produzem reação semelhantes a Reação de Cannizzaro em pH superiores a 11,5 (Figura 9, p.34) (WAN & XU, 1989).





Assim, o baixo rendimento na obtenção das aminochalconas não se deve somente às etapas de purificação, mas também ao desproporcionamento da 4-NA em pH fortemente básico. Após a conversão da 4-NA em 4-AA, sugere-se que esta reaja com o benzaldeído, através de uma Reação de Claisen-Schmidt, uma reação de condensação aldólica cruzada (Esquema 8, p. 34).



Esquema 8: Obtenção de aminochalconas derivadas da 4'-aminoacetofenona produzida in situ através da reação de desproporcionamento da 4'-nitroacetofenona

A primeira etapa da reação de condensação aldólica de Claisen-Schmidt é a desprotonação da cetona. O catalisador básico remove o hidrogênio alfa ácido da molécula para formar um carbânion que é estabilizado por ressonância. Em seguida, o carbânion realiza um ataque nucleofílico ao carbono carbonílico do aldeído, formando um íon alcóxido (intermediário tetraédrico). O íon alcóxido, ao ser protonado por um dos hidrogênios da água, gera o produto da condensação e regenera o catalisador básico. A chalcona é formada após a etapa de desidratação, onde um hidrogênio ácido é abstraído da posição alfa eliminando o grupo de saída – OH (esquema 9 p. 34).





Segundo Wan e Chu, um meio reacional com pH inferior a 11 não promove a dismutação da 4-NA, inferindo que as reações planejadas inicialmente poderiam ocorrer neste pH e conduziriam a obtenção de nitrochalconas (Figura 6, p. 35).

Figura 6: Gráfico representativo dos rendimentos da reação de dismutação da 4'-nitroacetofenona (4-NA) em 4'-aminoacetofenona (4-AA) e ácido p-nitrobenzóico (4-NBA) proposto por Wan e Chu (1989)



6.2 Obtenção dos derivados chalcônicos sob catálise básica (pH=10)

Os derivados chalcônicos **7–8** e **11–14** foram sintetizados sob catálise básica em pH 10 com rendimentos entre 7 e 68 %.

Como anteriormente discutido, 4'-nitroacetofenona em pHs superiores a 11,5 realiza reação de dismutação do tipo redox levando à formação de 4'-aminoacetofenona e ácido *p*-nitrobenzóico. A 4'-aminoacetofenona formada conduz diretamente à formação das aminochalconas reduzindo o rendimento final da reação de condensação aldólica para produção de 4'-nitrochalconas (Esquema 8, pg. 34). Além da reação de dismutação que ocorre com a 4'-nitroacetofenona, em presença de soluções básicas altamente concentradas, os benzaldeídos sofrem auto-redox do tipo Cannizzaro levando à formação de misturas de álcool benzílico e ácido benzóico (Esquema 10, pg 36).

Esquema 10: Mecanismo da reação de Cannizzaro (Mc Murry, 2005)



Os produtos gerados por meio das reações de dismutação da 4'-nitroacetofenona e benzaldeído foram os principais responsáveis pelos baixos rendimentos e dificuldade de purificação observados durante a síntese das substâncias **1–6**. A partir dessas constatações experimentais, a metodologia empregada inicialmente foi otimizada de modo a diminuir a formação desses subprodutos facilitando a purificação, e consequentemente os rendimentos.

De acordo com Wan e Chu (1989), em pH abaixo de 11,5 não ocorre a reação de dismutação da 4'-nitroacetofenona e nesse pH também não ocorre a reação de Cannizzaro, assim, optou-se por realizar as reações subsequentes com pH entre 7 e 10 (WAN e CHU 1989).

Na busca de maiores rendimentos, a estequiometria da reação foi alterada, empregando-se excesso de um dos reagentes ao invés de quantidades equimolares. Essa alteração foi feita em virtude da natureza reversível da reação de condensação de Claisen-Schmidt. Optou-se pelo emprego de excesso de benzaldeído devido à maior facilidade de remoção deste reagente do produto bruto durante as etapas de purificação.

Todas as reações realizadas sob catálise básica (pH = 10) conduziram às respectivas 4'nitrochalconas, no entanto, a etapa de redução das nitrochalconas com cloreto de estanho não foi possível, assim as 4'-aminochalconas foram obtidas reagindo-se diretamente a 4'aminoacetofenona com os respectivos benzaldeídos nas condições apresentadas.

#### 6.3 Obtenção dos derivados chalcônicos sob catálise ácida (pH = 1)

A reação de condensação de Claisen-Schmidt em meio básico apresenta algumas limitações quando se trata de hidroxibenzaldeídos. Segundo Patil e colaboradores (2009) a presença de grupos fenóis dificulta a condensação aldólica em meio básico, reduzindo consideravelmente o rendimento da reação. Patil e colaboradores (2009) sugerem que esta redução na reatividade deve-se à facilitação da deslocalização dos elétrons no ânion fenolato quando comparado ao fenol. Dessa forma, a reação de condensação sob catálise ácida torna-se uma alternativa àquelas catalisadas em meio básico e que empregam hidroxibenzaldeídos (PATIL, MAHAJAN, KATTI, 2009).

A reação em meio ácido foi empregada para a síntese das substâncias **9** e **10** partindose da 4'-nitroacetofenona, com rendimentos de 80% e 95% respectivamente.

Os procedimentos envolvendo condensações aldólicas sob catálise ácida e com excesso de benzaldeído culminaram em uma maior facilidade de purificação, uma vez que se notou uma diminuição na formação de subprodutos, àquelas produzidas por dismutação em pH básico.

O mecanismo de reação de condensação aldólica cruzada em meio ácido está exposto abaixo.








### 6.4 Identificação estrutural das aminochalconas <u>1-14</u>

A análise dos espectros de RMN mono e bidimensionais permite caracterizar a substância **1** como pertencente à classe das chalconas (Tabela 5, p. 40; ANEXOS 1-4, p. 59-62).



O espectro de RMN de <sup>13</sup>C apresentou 11 sinais referentes a 15 carbonos, destacandose os sinais em  $\delta_C$  185,9,  $\delta_C$  122,4 e  $\delta_C$  141,3 atribuídos aos carbonos C- $\beta$ ' (C=O), C- $\alpha$  (C=C) e C- $\beta$  (C=C), respectivamente. Esses três sinais e o par de dubletos em  $\delta_H$  7,62 e  $\delta_H$  7,85 com constante de acoplamento de 16,0 Hz, observados no espectro de RMN de <sup>1</sup>H, evidenciam a presença de uma cetona  $\alpha$ , $\beta$ -insaturada. Este conjunto de observações podem caracterizar a substância 1 como sendo um produto oriundo da condensação aldólica cruzada entre a 4'aminoacetofenona e benzaldeído.

Os sinais de maior amplitude em  $\delta_{\rm C}$  128,4,  $\delta_{\rm C}$  128,8,  $\delta_{\rm C}$  131,1 e  $\delta_{\rm C}$  112,7 observados no espectro de RMN de <sup>13</sup>C, os quais foram atribuídos aos pares de carbonos C-2/C-6 (anel B), C-3/C-5 (anel B), C-2'/C-6' (anel A) e C-3'/C-5'(anel A) respectivamente.

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H e o mapa de contornos *g*COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H apresentaram dubletos em  $\delta_{\rm H}$  7,91 (H-2' e H-6') e  $\delta_{\rm H}$  6,62 (H-3' e H-5'), os quais correlacionaram-se e exibiram constantes de acoplamento de 8,5 Hz, sugerindo um anel A *para*-dissubstituído.

O singleto largo em  $\delta_{\rm H}$  6,11 (2H) foi atribuído aos hidrogênios 4'-NH<sub>2</sub>, pertencente a uma amina primária, caracterizando a substância 1 como uma aminochalcona. Outro fato que corroborou a redução do grupo nitro e a consequente obtenção de aminochalconas foi a análise do espectro de NOESY. Neste, a irradiação no sinal com absorção em  $\delta_{\rm H}$  6,11 provocou um ganho de intensidade no dubleto em  $\delta_{\rm H}$  6,62, inferindo uma interação espacial entre os hidrogênios azometilênicos (4'-NH<sub>2</sub>) e os hidrogênios metínicos H-3' e H-5'.

Contudo, o mapa de contornos *g*HMBC exibiu a correlação entre os sinais em  $\delta_H$  6,11 (4'-NH<sub>2</sub>) e  $\delta_C$  112,7, atribuído aos carbonos C-3' e C-4', confirmando a presença de uma amina no anel A da aminochalcona **1**.

Esses dados espectroscópicos comparados aos apresentados por Ritshchev concluem que a substância **1** pode ser caracterizada como sendo 4'-aminochalcona (RTISHCHEV *et al.*, 2001).

Posição	δ <sub>C</sub>	$\delta_{\rm H}$ ; mult.; $J$ (Hz) <sup>*</sup>	gHMBC
1	135,1	-	Η-α
2 e 6	128,4	7,82; dd; 2,0 e 8,0	Η-β
3 e 5	128,8	7,43; dd; 8,0 e 8,0	H-3; H-4 e H-5
4	129,9	7,41; m	H-2 e H-6
1'	125,3	_	H-3' e H-5'
2' e 6'	131,1	7,91; d; 8,5	H-2'e H-6'
3' e 5'	112,7	6,62; d; 8,5	H-3' e H-5'
4'	153,9	_	H-2'e H-6'
α	122,1	7,85; d; 16,0	-
β	141,3	7,62; d; 16,0	H-2 e H-6
β'	185,9	_	H-2'; H-6'; H-α e
			Η-β
4'-NH <sub>2</sub>	_	6,11; sl	_

Tabela 5: Dados de RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz) e RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz) e do mapa de contornos gHMBC da aminochalcona 1 (DMSO-*d*<sub>6</sub>) (Anexos 1-4)

\*Atribuição realizada através da análise do mapa de contornos gHMQC

Os espectros de RMN mono e bidimensionais das substâncias 2–6 apresentaram-se muito similares àqueles apresentados pela aminochalcona 1.

Além dos sinais típicos que confirmam a natureza chalcônica da substância 2 (Tabela 6, p.41; ANEXOS 5-7, p. 63-65), os espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C apresentam sinais em  $\delta_{\rm H}$  2,32 (s, 3H) e  $\delta_{\rm C}$  21,0, indicando a presença de um grupo metila no anel B (4-CH<sub>3</sub>).



Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H e *g*COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H da aminochalcona **2** apresentaram dois pares dubletos em  $\delta_{\rm H}$  6,62 e 7,90 (*J*= 9,0 Hz) e  $\delta_{\rm H}$  7,70 e 7,23 (*J*= 8,0 Hz), os quais foram atribuídos aos hidrogênios pertencentes aos anéis *para*-dissubstituídos A e B, respectivamente.

Posição	δ <sub>C</sub>	$\delta_{\rm H}$ ; mult.; $J({\rm Hz})^*$	gHMBC
1	132,4	_	H-3; H-5 e H-α
2 e 6	128,4	7,70; d; 8,0	Н-2; Н-6 е Н-β
3 e 5	129,4	7,23; d; 8,0	H-3; H-5 e 4-CH <sub>3</sub>
4	139,9	_	H-2; H-6 e 4-CH <sub>3</sub>
1'	125,4	_	H-3' e H-5'
2' e 6'	131,0	7,90; d; 9,0	H-2' e H-6'
3' e 5'	112,7	6,62; d; 9,0	H-3'; H-5' e 4'-NH <sub>2</sub>
4'	153,8	_	H-2' e H-6'
α	121,3	7,78; d; 16,0	_
β	141,4	7,57; d; 16,0	_
β'	185,9	_	Н-2'; Н-6'; Н-α е
			Η-β
4'-NH <sub>2</sub>	-	6,11; sl	_
4-CH <sub>3</sub>	21,0	2,32; s	H-3 e H-5

Tabela 6: Dados de RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz) e RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz) e do mapa de contornos gHMBC da aminochalcona 2 (DMSO- $d_6$ ) (Anexos 5 – 7)

\*Atribuição realizada através da análise do mapa de contornos gHMQC

O conjunto de dados apresentados na tabela 5 conjuntamente com àqueles descritos por Yi e colaboradores permitem identificar a substância **2** como sendo a 4'-amino-4-metilchalcona (YI *et al.*, 2005).



A análise dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H e RMN de <sup>13</sup>C permitiram caracterizar a substância **3** como pertencente à classe das aminochalconas fluoradas (Tabela 7, p.42; ANEXOS 8-11, p. 66-69). Salientando-se para o sinal em 7,25 (J= 9,0 e 9,0 Hz) que foi atribuído aos hidrogênios H-3/H-5. A multiplicidade apresentada por este sinal, duplo dubleto, deve-se aos acoplamentos hidrogênio-flúor e hidrogênio - hidrogênio.

O espectro de RMN de <sup>13</sup>C apresentou cinco dubletos provenientes do acoplamento carbono-flúor, sendo eles 131,8 (J= 2,6 Hz), 130,7 (J= 8,0 Hz), 115,8 (J=21,1 Hz), 163,8 (J=246 Hz) e 122,3 (J=1,7 Hz), sendo este último um acoplamento a longa distância, o qual foi conseqüente da coplanaridade e conjugação entre o anel aromático B e a enona.

Posição	$\delta_{\rm C}$ ; mult.; <i>J</i> (Hz)	$\delta_{\mathrm{H}}$ ; mult.; $J$ (Hz) <sup>*</sup>	gHMBC
1	131,8; d; 2,6 <sup>**</sup>	_	Н-3; Н-5 е Н-α
2 e 6	130,7; d; 8,0 <sup>**</sup>	7,91; d; 9,0 <sup>****</sup>	Н-2; Н-6 е Н-β
3 e 5	115,8; d; 21,2 <sup>**</sup>	7,25; dd; 9,0 e 9,0*****	H-3' e H-5'
4	163,0; d; 246,0 <sup>**</sup>	_	H-2; H-3; H-5 e H-6
1'	125,3	_	H-2' e H-6'
2' e 6'	131,1	7,91; dd; 2,0 e 8,0 <sup>****</sup>	H-2' e H-6'
3' e 5'	112,7	6,62; dd; 2,0 e 8,0	H-3'; H-5'e 4'-NH <sub>2</sub>
4'	153,9	_	H-2' e H-6'
α	122,3; d; 1,7 <sup>***</sup>	7,81; d; 16,0	_
β	140,1	7,60; d; 16,0	H-2 e H-6
β'	185,8	_	H-2'; H-6'; H-α e
			Η-β
4'-NH <sub>2</sub>	_	6,13; sl	_

Tabela 7: Dados de RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz) e RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz) e do mapa de contornos gHMBC da aminochalcona 3 (DMSO- $d_6$ ) ( Anexos 8 – 11)

\*Atribuição realizada por meio da análise do mapa de contornos gHMQC;

\*\* Dubletos proveniente do acoplamento carbono-flúor;

\*\*\* Dubleto proveniente do acoplamento a longa distância carbono-flúor;

\*\*\*\* Valores intercambiáveis;

\*\*\*\*\* Duplo dubleto proveniente do acoplamento hidrogênio-flúor.

O conjunto de dados apresentados na tabela 7 conjuntamente com àqueles descritos por Prasad e co-autores permitem identificar a substância **3** como sendo a 4'-amino-4fluorchalcona (PRASAD *et al.*, 2009).

A análise dos espectros de RMN mono e bidimensionais das substâncias **4–6** e sua comparação com dados espectroscópicos da literatura, indicaram as seguintes estruturas moleculares, 4'-amino-2-hidroxichalcona (**4**; ANSARI *et al.*, 2005), 4'amino-3-hidroxichalcona (**5**; ULLAH *et al.*, 2007) e 4'-amino-4-hidroxichalcona (**6**; SEO *et al.*, 2005).



Tabela 8: Dados de RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz) e RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz) e do mapa de contornos gHMBC da aminochalcona 4 (DMSO-*d*<sub>6</sub>) (Anexos 12 – 15)

Posição	$\delta_{\mathrm{C}}$	$\delta_{\rm H}$ ; mult.; $J$ (Hz) <sup>*</sup>	gHMBC
1	121,9	-	H-3; H-5 e H-α
2	159,2	-	H-4, H-6 e H-β
3	116,7	6,90; d; 8,0	H-5
4	131,1	7,15; dd; 8,0 e 8,0	Н-6
5	118,0	6,73; dd; 8,0 e 8,0	H-3
6	128,6	7,70; d; 8,0	Н-4 е Η-β
1'	125,8	-	H-3' e H-5'
2' e 6'	130,7	7,84; dd; 2,0 e 8,0	H-2' e H-6'
3' e 5'	112,7	6,60; dd; 2,0 e 8,0	H-3'; H-5' e 4'-NH <sub>2</sub>
4'	153,5	-	H-2' e H-6'
α	120,5	7,79; d; 15,5	Η-β
β	137,9	7,91; d; 15,5	Н-6 е Н-α
β'	186,4	-	H-2'; H-6'; H-α e
			Η-β
4'-NH <sub>2</sub>	-	6,04; sl	

\*Atribuição realizada por meio da análise do mapa de contornos gHMQ



Tabela 9: Dados de RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz) e RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz) e do mapa de contornos gHMBC da aminochalcona 5 (DMSO-*d*<sub>6</sub>) (Anexos 16 – 18)

Posição	$\delta_{\mathrm{C}}$	$\delta_{\rm H}$ ; mult.; $J$ (Hz) <sup>*</sup>	gHMBC
1	136,3	-	H-5 ou H-6 e H-α
2	117,4	6,82; m	H-4 ou H-6
3	158,1	-	H-4 ou H-5
4	114,9	7,18; m	-
5	129,7	7,18; m	-
6	119,2	7,18; m	H-2 e H-4 ou H-5
1'	125,3	-	H-3' e H-5'
2' e 6'	131,1	7,87; d; 9,0	H-2' e H-6'
3' e 5'	112,8	6,60; d; 9,0	H-3'; H-5' e 4'-NH <sub>2</sub>
4'	153,8	-	H-2' e H-6'
α	122,1	7,71; d; 16,0	-
β	141,8	7,48; d; 16,0	H-6
β'	186,0	-	Н-2'; Н-6'; Н-α е
			Η-β
4'-NH <sub>2</sub>	-	6,11; sl	-

\*Atribuição realizada por meio da análise do mapa de contornos de gHMQC;



Tabela 10: Dados de RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz) e RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz) e do mapa de contornos gHMBC da aminochalcona 6 (DMSO-*d*<sub>6</sub>) (Anexos 19 – 21)

Posição	$\delta_{\rm C}$	$\delta_{\rm H}$ ; mult.; $J$ (Hz) <sup>*</sup>	gHMBC
1	125,4	_	H-3; H-5 e H-α
2 e 6	130,4	7,60; d; 8,5	H-2, H-6 e H-β
3 e 5	116,0	6,78; d; 8,5	H-3 e H-5
4	160,8	_	H-2 e H-6
1'	125,7	_	H-3' e H-5'
2' e 6'	130,8	7,85; d; 8,5	H-2' e H-6'
3' e 5'	112,7	6,59; d; 8,5	H-3'; H-5' e 4'-NH <sub>2</sub>
4'	153,5	-	H-2' e H-6'
α	118,2	7,58; d; 16,0	Η-β
β	142,1	7,51; d; 16,0	H-2 e H-6
β'	186,0	-	H-2'; H-6'; H-α e
			Η-β'
4'-NH <sub>2</sub>	-	6,03; sl	-

\*Atribuição realizada por meio da análise do mapa de contornos gHMQC;



Tabela 11: Dados de RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz) e RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz) da nitrochalcona 7 (DMSO- $d_6$ ) ( Anexos 22 – 24)

Posição	δ <sub>C</sub>	$\delta_{\rm H}$ ; mult.; <i>J</i> (Hz)
1	121,1	_
2	158,6	_
3	116,6	6,94; d; 8,0
4	132,6	7,28; dd; 8,0 e 8,0
5	118,9	6,84; dd; 8,0 e 8,0
6	129,1	7,84; dd; 8,0 e 1,5
1'	141,6	_
2' e 6'	129,6	8,28; d; 9,0
3' e 5'	123,8	8,37; d; 9,0
4'	149,6	_
α	120,3	7,86; d; 16,0
β	142,9	8,09; d; 16,0
β'	188,7	-



Tabela 12: Dados de RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz) e RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz) da nitrochalcona 8 (DMSO-*d*<sub>6</sub>) (Anexos 25 – 27)

Posição	$\delta_{\mathrm{C}}$	$\delta_{\rm H}$ ; mult.; $J$ (Hz)
1	135,6	-
2	115,4	7,25; dd; 2,0 e 1,5
3	157,7	-
4	118,3	6,9; ddd; 9,0; 2,0 e 2,5
5	129,9	7,27; dd; 8,0 e 9,0
6	120,1	7,33; d; 8,0
1'	142,4	-
2' e 6'	129,8	8,34; d; 9,0
3' e 5'	123,8	8,37; d; 9,0
4'	149,8	-
α	121,7	7,70; d; 16,0
β	145,8	7,83; d; 16,0
β'	188,4	-



Tabela 13: Dados de RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz) e RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz) da nitrochalcona 9 (DMSO-*d*<sub>6</sub>) (Anexos 28 – 30)

Posição	$\delta_{\mathrm{C}}$	$\delta_{\mathrm{H}}$ ; mult.; $J$ (Hz) <sup>*</sup>
1	131,6	_
2 e 6	131,6	7,69; d; 8,5
3 e 5	116,7	6,78; d; 8,5
4	163,7	-
1'	143,3	-
2' e 6'	129,6	8,30; d; 9,0
3' e 5'	123,8	8,4; d; 9,0
4'	149,5	-
α	116,7	7,62; d; 15,5
β	146,7	7,72; d; 15,5
β'	187,8	-



Tabela 14: Dados de RMN de  $^{1}$ H (500 MHz) e RMN de  $^{13}$ C (125 MHz) da nitrochalcona10 (DMSO- $d_6$ ) (Anexos 31 – 33)

Posição	$\delta_{\mathrm{C}}$	$\delta_{\rm H}$ ; mult.; $J$ (Hz)
1	126,0	_
2	115,7	7,27; d; 2,5
3	146,6	-
4	149,3	-
5	115,8	6,80; d; 8,5
6	118,2	7,20; dd; 8,5 e 2,5
1'	142,9	-
2' e 6'	129,6	8,29; d; 9,0
3' e 5'	123,8	8,34; d; 9,0
4'	149,6	-
α	122,7	7,59; d; 15,5
β	145,67	7,65; d; 15,5
β'	188,1	-



Tabela 15: Dados de RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz) da nitrochalcona 11 (DMSO-*d*<sub>6</sub>) (Anexos 24 – 35)

Posição	$\delta_{\rm H}$ ; mult.; $J$ (Hz)
3	6,92; dd; 9,0 e 5,0
4	7,14; m
6	7,80; dd; 10,0 e 3,0
2' e 6'	8,36; d; 9,0
3' e 5'	8,32; d; 9,0
α	7,90; d; 16,0
β	8,03; d; 16,0



Tabela 16: Dados de RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz) e RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz) da nitrochalcona 12 (DMSO- $d_6$ ) (Anexos 36 – 39)

Posição	$\delta_{\mathrm{C}}$	$\delta_{\rm H}$ ; mult.; $J$ (Hz)
1	120,7	-
2	155,5	_
3	116,2	6,84; d; 8,0
4	133,3	7,11; dd; 8,0 e 2,0
5	127,9	_
6	128,6	7,70; d; 2,0
1'	142,8	_
2' e 6'	129,6	8,37; d; 9,0
3' e 5'	123,8	8,30; d; 9,0
4'	149,6	_
α	120,2	7,82; d; 16,0
β	141,1	8,07; d; 16,0
β'	188,5	_
5-CH <sub>3</sub>	19,9	2,25; s



Tabela 17: Dados de RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz) da aminochalcona 13 (DMSO- $d_6$ ) (Anexos 40 – 41)

$(DMSO-a_6)$ (Allexus 40 – 41)				
Posição	$\delta_{\rm H}$ ; mult.; $J$ (Hz)			
3	6,90; dd; 9,0 e 5,0			
4	7,03; m			
6	7,69; dd; 10,0 e 3,0			
2' e 6'	7,89; d; 9,0			
3' e 5'	6,61; d; 9,0			
α	7,82; d; 16,0			
β	7,85; d; 16,0			
4'-NH <sub>2</sub>	6,09; sl			



Tabela 18: Dados de RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz) e RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz) da aminochalcona 14 (DMSO- $d_6$ ) (Anexos 42 – 45)

Posição	δ <sub>C</sub>	$\delta_{\rm H}$ ; mult.; $J$ (Hz) <sup>*</sup>
1	136,5	_
2 e 6	106,4	6,62; d; 2,5
3 e 5	158,9	_
4	104,8	6,34; dd; 2,0 e 2,0
1'	125,4	_
2' e 6'	130,9	7,87; d; 8,5
3' e 5'	112,7	6,61; d; 8,5
4'	153,8	-
α	121,6	7,38; d; 15,5
β	142,2	7,61; d; 15,5
β'	188,9	_
4'-NH <sub>2</sub>	-	6,13; sl

#### 6.5 Atividade inibitória sobre α-glicosidase de Saccharomyces cerevisiae

As chalconas 1-10 e 14 tiveram sua atividade inibitória sobre  $\alpha$ -glicosidases de *Saccharomyces cerevisiae* avaliada por ensaios espectrofotométricos.

Os resultados foram expressos em concentração capaz de inibir em 50% a atividade enzimática ( $CI_{50}$ ) e estão demonstrados na Tabela 19 p. 52.

$\begin{array}{c} R_{4} \\ R_{3} \\ R_{1} \\ R_{1} \\ R_{2} \\ R_{1} \end{array}$							
Substância	R	<b>R</b> <sub>1</sub>	$\mathbf{R}_2$	$\mathbf{R}_3$	$\mathbf{R}_4$	CI <sub>50</sub> (µM)	
1	$NH_2$	Н	Н	Н	Н	> 100	
2	$NH_2$	Н	Н	$CH_3$	Н	> 100	
3	$NH_2$	Н	Н	F	Н	> 100	
4	$NH_2$	OH	Н	Н	Н	4,48	
5	$NH_2$	Н	OH	Н	Н	7,71	
6	$NH_2$	Н	Н	OH	Н	5,06	
7	$NO_2$	OH	Н	Н	Н	6,67	
8	$NO_2$	Н	OH	Н	Н	8,44	
9	$NO_2$	Н	Н	OH	Н	6,88	
10	$NO_2$	Н	OH	OH	Н	1,23	
14	$NH_2$	Н	OH	Н	OH	1,88	
acarbose	_	_	_	_	_	5,90	

Tabela 19: Atividade inibitória de 4'-nitro- e 4'-aminochalconas sobre α-glicosidases

As chalconas **4**, **10** e **14** apresentaram os melhores resultados de inibição enzimática, com CI<sub>50</sub> inferiores ao controle positivo. As substâncias com ausência de hidroxilas no anel B (**1–3**) demonstraram baixa atividade (CI<sub>50</sub>>100), enquanto as chalconas mono-hidroxiladas no anel B (**4–9**) apresentaram CI<sub>50</sub> semelhante ao controle positivo, e as chalconas dihidroxiladas **10** (CI<sub>50</sub> 1,23  $\mu$ M) e **14** (CI<sub>50</sub> 1,88  $\mu$ M) mostraram-se 3 a 4 vezes mais potentes quando comparadas à acarbose (CI<sub>50</sub> 5,90  $\mu$ M).

Os valores de  $CI_{50}$  das chalconas hidroxiladas revelam que a posição dos grupos fenólicos também interfere na atividade. De acordo com os resultados, a inibição das  $\alpha$ -

glicosidases é maior quando a hidroxila está presente na posição 2 (4 e 7) comparativamente às posições 3 (5 e 8) e 4 (6 e 9).

Esses dados em conjunto revelam que a presença de hidroxilas no anel B, bem como a posição e o número desses substituintes é de fundamental importância para a inibição da atividade enzimática de  $\alpha$ -glicosidases.

As aminochalconas mono-hidroxiladas (4–6) mostraram-se, ligeiramente mais potentes quando comparadas às nitrochalconas (7–9), permitindo inferir que a presença de grupos doadores ou receptores de elétrons no anel A também interferem ligeiramente na inibição de  $\alpha$ -glicosidases.

Segundo SIM *et al.* (2010) fármacos contendo um nitrogênio em sua estrutura como a acarbose e o miglitol são protonados no sítio ativo da enzima, inibindo a glicosidase devido à habilidade em mimetizar a forma e a carga do estado de transição previsto para a hidrólise enzimática. Possivelmente, o nitrogênio presente nas aminochalconas sofre esse mesmo processo, culminando em uma maior atividade dessas chalconas.

Os resultados obtidos no ensaio permitem inferir que o grupo farmacofórico das chalconas sintetizadas consiste no anel B hidroxilado, uma vez que se constatou que a inibição de  $\alpha$ -glicosidases é influenciada pela presença, número e posição de grupamentos hidroxilas no anel B sendo menos influenciada por grupos doadores ou receptores de elétrons no anel A.

### 7. CONCLUSÕES

As modificações realizadas na metodologia inicialmente adotada para a síntese das aminochalconas impediu a reação de Cannizzaro e a dismutação da 4'- nitroacetofenona, permitindo assim, a obtenção dos produtos desejados com menor grau de dificuldade de purificação e maiores rendimentos.

A catálise ácida mostrou-se uma alternativa viável para a síntese de hidroxichalconas comparativamente à reação de condensação aldólica cruzada sob catálise básica.

Os resultados do ensaio bioquímico demonstraram o amplo potencial farmacológico dotado por essa classe de substâncias, revelando dados preliminares de REA "Relação Estrutura Atividade".

Os dados de  $CI_{50}$  para inibição de  $\alpha$ -glicosidases mostraram que as chalconas **10** ( $CI_{50}$ 1,23  $\mu$ M) e **14** ( $CI_{50}$  1,88  $\mu$ M) foram mais potentes que a acarbose ( $CI_{50}$  4,90  $\mu$ M), sendo que as chalconas **4–9** apresentaram valores de  $CI_{50}$  próximos ao do controle positivo.

O conjunto de dados obtidos revelaram que a presença de hidroxilas no anel B, bem como a posição e o número desses substituintes é de fundamental importância para a inibição da atividade enzimática. Em contrapartida, a presença de grupos doadores ou receptores de elétrons no anel A revelou ser de menor importância para a inibição de  $\alpha$ glicosidases.

## REFERÊNCIAS

ANSARI, F. L. *et al.* Combinatorial synthesis and antibacterial evaluation of an indexed chalcone library. **Chemistry & Biodiversity**, v. 2, p. 1656-1664, 2005.

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

ASANO, N. Sugar-mimicking glycosidase inhibitors: bioactivity and application. Cellular and Molecular Life Sciences, v. 66, p. 1479-1492, 2009.

BALL, A. L. *et al.* A microtitre plate assay for measuring glycosidase activity. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 23, p. 131–135, 2008.

BANDGAR, B. P. *et al.* Synthesis and biological evaluation of simple methoxylated chalcones as anticancer, anti-inflammatory and antioxidant agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 1364-1370, 2010.

BATOVSKA, D. *et al.* Examination of growth inhibitory properties of synthetic chalcones for which antibacterial activity was predicted. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 2211-2218, 2009.

BEDEKAR, A.; SHAH, K.; KOFFAS, M. Natural products for type II diabetes treatment. Advances in Applied Microbiology, v. 71, p. 21-73, 2010.

BHARATHAM, K. *et al.* Binding mode analyses and pharmacophore model development for sulfonamide chalcone derivatives, a new class of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. Journal of Molecular Graphics and Modelling, v. 26, p. 1202-1212, 2008.

BINDER, T. P. & ROBIT, J. F. *p*-Nitrophenyl α-D-glucopyranoside, a new substrate for glucansucrases. **Carbohydrate Research**, v. 124, p. 287–299, 1983.

BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v.28, p.25-30. 1995.

DAMAZIO, R. G. *et al.* Nitrochalcones: Potential *in vivo* insulin secretagogues. **Biochimie**, v. 91, p. 1493-1498, 2009.

DE MELO, E. B.; GOMES, A. S.; CARVALHO, I. α- and β-Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. **Tetrahedron**, v. 62, p. 10277-10302, 2006.

DETSI, A. *et al.* Natural and synthetic 2-hydroxy-chalcones and aurones: Synthesis, characterization and evaluation of the antioxidant and soybean lipoxygenase inhibitory activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 8073-8085, 2009.

DU, Z-H. *et al.* α-Glucosidase inhibition of natural curcuminoids and curcumin analogs. **European journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, p. 213–218, 2008.

EMILIEN, G.; MALOTEAUX, J. M.; PONCHON, M. Pharmacological management of diabetes: Recent progress and future perspective in daily drug treatment. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 81, n. 1, p. 37-51, 1999.

FORD, E. S.; GILES, W. H.; DIETZ, W. H. Prevalence of the metabolic syndrome among US nutrition examination survey adults: Findings from the third national health and nutrition examination survey. **Journal of the American Medical Association**, v. 287, n. 3, p. 356-359, 2002.

GONÇALVES, A. E. S. S.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Chemical composition and antioxidant/antidiabetic potential of Brazilian native fruits and commercial frozen pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 4666–4674, 2010.

KIM, Y. M.; WANG, M. H.; RHEE, H. A novel α-glucosidase inhibitor from pine bark. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 715-717, 2004.

LILLELUND, V. H. *et a.l.* Recent developments of transition-state analogue glycosidase inhibitors of non-natural product origin. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 2, p. 515-553, 2002.

MARCONDES, J. A. M. Diabete melito: Fisiopatologia e tratamento. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, v. 5, n. 1, p. 18-26, 2003.

MC MURRY, J. Química Orgânica. 6. ed. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2005.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 26, p. 211-219, 2004.

MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL-RUIZ, J. J.; GÓMEZ-BARRIO, A. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**, v. 86, p. 999-1002, 2000.

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

PARK, K. H. *et al.* Novel chalcone derivatives pharmaceutically acceptable salt, method for preparation and uses thereof. US 2009/0252694 A1, 8 out. 2009.

PATIL, C. B.; MAHAJAN, S. K.; KATTI, S. A. Chalcone: A versatile molecule. Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, v. 1, n. 3, p. 11-22, 2009.

PINTO, M. S. *et al.* Evaluation of antiproliferative , anti-type 2 diabetes, and antihypertension potentials of ellagitannins from strawberries (*Fragaria* x *ananassa* Duch.) using *in vitro* models. **Journal of Medicinal Foods**, v. 13, p. 1027–1035, 2010.

PINTO, M. S. *et al.* Functionality of bioactive compounds in Brazilian strawberry (*Fragaria* x *ananassa* Duch.) cultivars: evaluation of hyperglycemia and hypertension potential using *in vitro* models. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 4386–4392, 2008.

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

RAO, Y. K.; FANG, S. H.; TZENG, Y. M. Differential effects of synthesized 20-oxygenated chalcone derivatives: modulation of human cell cycle phase distribution. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 2679-2686, 2004.

ROMAGNOLI, R. *et al.* Hybrid α-bromoacryloylamido chalcones. Design, synthesis and biological evaluation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, p. 2022-2028, 2009.

RTISHCHEV *et al.* Spectral properties and photochemical activity of chalcone derivatives. **Russian Journal of General Chemistry**, v. 71, p. 1271-1281, 2001.

SARTORELI, D. S.; FRANCO, L. J. Tendências do diabetes mellitus no Brasil: o papel da transição nutricional. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 1, p.29-36, 2003.

SATYANARAYANA, M. *et al.* Synthesis and antihyperglycemic activity of chalcone based aryloxypropanolamines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 883-889, 2004.

SEO, W. D. *et al.* Sulfonamide chalcone as a new class of α-glucosidase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, p. 5514-5516, 2005.

SEO, W. D. *et al.* Evaluation of anti-pigmentary effect of synthetic sulfonylamino chalcone. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 2010–2017, 2010.

SHUKLA, P. *et al.* Chalcone based aryloxypropanolamines as potential antihyperglycemic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, p. 799-802, 2007.

SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994, 387p.

SIM, L. *et al.* New glucosidase inhibitors from an ayurvedic herbal treatment for type 2 diabetes: structures and inhibition of human intestinal maltase-glucoamylase with compounds from salacia reticulate. **Biochemistry**, v. 49, p. 443-451, 2010.

SKYLER, J. S. Diabetes mellitus: Pathogenesis and treatment strategies. Journal of Medicinal Chemistry, v. 47, n. 17, p. 4113-4117, 2004.

ULLAH, A. *et al.* Combinatorial, lead identification, and antitumor study of a chalcone-based positional-scanning library. **Chemistry & Biodiversity**, v. 4, p. 203-214, 2007.

UWAIFO, G. I.; RATNER, R. E. Novel pharmacologic agents for type 2 Diabetes. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 34, p. 155-197, 2005.

VOGEL, S. *et al.* Synthesis, cytotoxicity, anti-oxidative and anti-inflammatory activity of chalcones and influence of A-ring modifications on the pharmacological effect. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 2206-2213, 2010.

WAN, P; XU, X. Disproportionation of 4-nitroacetophenone to 4-aminoacetophenone and 4nitrobenzoic acid. **Journal of Organic Chemistry**, v. 54, p. 4473-4474, 1989.

WANG, Y. *et al.* Synergetic inhibition of metal ions and genistein on  $\alpha$ -glucosidase. **FEBS** Letters, v. 576, p. 46–50, 2004.

WATANABE, J.; KAWABATA, J.; KURIHARA, H.; NIKI, R. Isolation and identification of a  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from Tochu-cha. **Bioscience, Biotechnolology and Biochemistry**, v. 61, p. 177–178, 1997.

WORTHINGTON, V. Maltase-α-glucosidase. In: Worthington Enzyme Manual: Worthington Biochemical Corp.: Freehold, Nova Jersey, p. 261–267, 1993.

YI F. *et al.* Solid phase synthesis of aminochalcones. **Journal of Chemical Research**, v. 5, p. 311-312, 2005.

ZIMMET, P. Z.; McCARTY, D. J.; COURTEN, M. P. The global epidemiology of noninsulin-dependent diabetes mellitus and the metabolic syndrome. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 11, p. 60-68, 1997.

# ANEXOS



Anexo 1: Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da aminochalcona 1 (DMSO-*d*<sub>6</sub>; 11,7 T)



Anexo 2: Espectro de RMN de <sup>13</sup>C da aminochalcona 1 (DMSO-*d*<sub>6</sub>; 11,7 T)







Anexo 4: Espectro de NOESY da aminochalcona 1 (DMSO-*d*<sub>6</sub>; 11,7 T)

...

3





64







Anexo 8: Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da aminochalcona 3 (DMSO-*d*<sub>6</sub>; 11,7 T)



Anexo 9: Ampliação do espectro de RMN de <sup>1</sup>H da aminochalcona 3 (DMSO-*d*<sub>6</sub>; 11,7 T)











Anexo 12: Espectro de RMN de 1H da aminochalcona 4 (DMSO-d<sub>6</sub>; 11,7 T)











Anexo 15: Ampliação do espectro de RMN de <sup>13</sup>C da aminochalcona 4 (DMSO-*d*<sub>6</sub>; 11,7 T)


Anexo 16: Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da aminochalcona 5 (DMSO-*d*<sub>6</sub>; 11,7 T)



Anexo 17: Ampliação do espectro de RMN de <sup>1</sup>H da aminochalcona 5 (DMSO-*d*<sub>6</sub>; 11,7 T)



Anexo 18: Espectro de RMN de <sup>13</sup>C da aminochalcona 5 (DMSO-d<sub>6</sub>; 11,7 T)



Anexo 19: Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da aminochalcona 6 (DMSO-*d*<sub>6</sub>; 11,7 T)











Anexo 22: Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da chalcona 7 (DMSO-*d*<sub>6</sub>; 11,7 T)







Anexo 24: Espectro de RMN de <sup>13</sup>C da chalcona 7 (DMSO-*d*<sub>6</sub>; 11,7 T)

Anexo 25: Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da chalcona 8 (DMSO-*d*<sub>6</sub>; 11,7 T)





Anexo 26: Ampliação do espectro de RMN de <sup>1</sup>H da chalcona 8 (DMSO-*d*<sub>6</sub>; 11,7 T)

Anexo 27: Espectro de RMN de <sup>13</sup>C da chalcona 8 (DMSO-*d*<sub>6</sub>; 11,7 T)





Anexo 28: Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da chalcona 9 (DMSO-*d*<sub>6</sub>; 11,7 T)

Anexo 29: Ampliação do espectro de RMN de <sup>1</sup>H da chalcona 9 (DMSO-*d*<sub>6</sub>; 11,7 T)





Anexo 30: Espectro de RMN de <sup>13</sup>C da chalcona 9 (DMSO-*d*<sub>6</sub>; 11,7 T)

Anexo 31: Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da chalcona 10 (DMSO-*d*<sub>6</sub>; 11,7 T)





Anexo 32: Ampliação do espectro de RMN de <sup>1</sup>H da chalcona 10 (DMSO-*d*<sub>6</sub>; 11,7 T)

Anexo 33: Espectro de RMN de <sup>13</sup>C da chalcona 10 (DMSO-*d*<sub>6</sub>; 11,7 T)





Anexo 34: Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da chalcona 11 (DMSO-*d*<sub>6</sub>; 11,7 T)

Anexo 35: Ampliação do espectro de RMN de <sup>1</sup>H da chalcona 11 (DMSO-*d*<sub>6</sub>; 11,7 T)





Anexo 36: Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da chalcona 12 (DMSO-*d*<sub>6</sub>; 11,7 T)

Anexo 37: Ampliação do espectro de RMN de <sup>1</sup>H da chalcona 12 (DMSO-*d*<sub>6</sub>; 11,7 T)





Anexo 38: Espectro de RMN de <sup>13</sup>C da chalcona 12 (DMSO-*d*<sub>6</sub>; 11,7 T)

Anexo 39: Ampliação do espectro de RMN de <sup>13</sup>C da chalcona 12 (DMSO-d<sub>6</sub>; 11,7 T)





Anexo 40: Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da aminochalcona 13 (DMSO-*d*<sub>6</sub>; 11,7 T)

Anexo 41: Ampliação do espectro de RMN de <sup>1</sup>H da aminochalcona 13 (DMSO-d<sub>6</sub>; 11,7 T)





Anexo 42: Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da aminochalcona 14 (DMSO-*d*<sub>6</sub>; 11,7 T)

Anexo 43: Ampliação do espectro de RMN de <sup>1</sup>H da aminochalcona 14 (DMSO-d<sub>6</sub>; 11,7 T)





Anexo 44: Espectro de RMN de <sup>13</sup>C da chalcona 14 (DMSO-*d*<sub>6</sub>; 11,7 T)

Anexo 45: Ampliação do espectro de RMN de <sup>13</sup>C da chalcona 14 (DMSO-*d*<sub>6</sub>; 11,7 T)

