



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



**PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE DERIVADOS
DE ÁCIDOS BORÔNICOS COMO INIBIDORES DA PROTEASE PRINCIPAL DE
SARS-COV-2**

VOLUME I

JULIANA ROMANO LOPES

ORIENTADOR: PROF. DR. JEAN LEANDRO DOS SANTOS

Araraquara- SP
2024



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



**PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE DERIVADOS
DE ÁCIDOS BORÔNICOS COMO INIBIDORES DA PROTEASE PRINCIPAL DE
SARS-COV-2**

JULIANA ROMANO LOPES

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador(a): Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

ARARAQUARA- SP
2024

L864p Lopes, Juliana Romano.
Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de derivados de ácidos borônicos como inibidores da protease principal de SARS-CoV-2 / Juliana Romano Lopes. – Araraquara, 2024.
2 v. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Jean Leandro dos Santos.

1. COVID-19. 2. Enzimas proteolíticas. 3. Proteases – Inibidores. 4. Chalcona. 5. Medicamentos – Desenvolvimento. I. Santos, Jean Leandro dos, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030078P6
Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de derivados de ácidos borônicos como inibidores da protease principal de SARS-CoV-2

AUTORA: JULIANA ROMANO LOPES

ORIENTADOR: JEAN LEANDRO DOS SANTOS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Ciências Farmacêuticas, área: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. JEAN LEANDRO DOS SANTOS (Participação Virtual)
Departamento de Farmacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Prof. Dr. DIOGO TEIXEIRA CARVALHO (Participação Virtual)
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. MARIA EMILIA DA SILVA PEREIRA DE SOUSA (Participação Virtual)
Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Dra. PAULA ABOUD BARBUGLI (Participação Virtual)
Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese / Faculdade de Odontologia do Campus de Araraquara da Unesp

Prof. Dr. RAFAEL MAFRA DE PAULA DIAS (Participação Virtual)
Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos / Universidade Federal de São João del-Rei- UFSJ

Araraquara, 28 de março de 2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

Aos meus pais, ao meu marido Guilherme e ao meu filho Eduardo que são a base da minha vida pessoal e profissional.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos, por todo apoio, ensinamento e confiança. Por acreditar que sou capaz de realizar coisas que eu mesma não acreditava e por me ajudar a sempre evoluir.

Aos meus amigos de laboratório (LAPDESF): João, Aline, Andressa, Chiba, Felipe, Maiara, Any, Pamela, Bianca.... E tantos outros que estiveram presentes durante meu mestrado/doutorado e estão agora em outros lugares. Sou muito grata por cada um de vocês, pela colaboração, apoio, aprendizado e amizade. Aos doutores João e Aline, meus “veteranos” da pós-graduação, agradeço tanto por toda ajuda e amizade. Vocês fazem parte da minha vida acadêmica e pessoal, são meus grandes amigos, aqueles que sempre posso buscar apoio quando preciso para qualquer questão, seja uma reação que não funcionou ou um problema pessoal. Obrigada pelas risadas, pela cantoria no laboratório, por nossos almoços no Gehards, por me acolherem toda vez que eu chorei, pelos artigos que escrevemos juntos, pelos nossos churrascos, bar do meio, boteco da 10, entre tantas rsrs e por acreditarem em mim. Muito obrigada.

À Dra. Paula Aboud Barbugli e ao Freddy Humberto Marin por sua parceria, acolhimento, auxílio no laboratório de cultivo celular na Faculdade de Odontologia (FOAr-UNESP) e aprendizado. Sem vocês o trabalho não teria chegado onde chegou. Muito obrigada.

À Dra. Emilia Sousa, que tive o prazer de ter como supervisora durante o período de internacionalização na Universidade do Porto (Portugal). Obrigada por todo aprendizado e confiança para realização do trabalho. Ainda que o tempo tenha sido curto, levarei para sempre a Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto no meu coração.

Ao laboratório de Química Orgânica e Farmacêutica (LQOF) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Porto, a todos com quem pude partilhar um tempo junto ao laboratório: Márcia, Joana, Claudia, Margaria, Mariana, Ana Laura, Francisca, Érica, Nuno... Obrigada por me receberem tão bem e estarem sempre dispostos a ajudar. Um agradecimento muito especial à Dra. Sara, Gisela e Liliana, por todo suporte no laboratório.

À CAPES pelo apoio financeiro cedido.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento: 88887.503193/2020-00; CAPES/PRINT – Código de Financiamento: 88887.916247/2023-00”

RESUMO

O SARS-CoV-2, causador da COVID-19, é um vírus do gênero β -coronavírus identificado em 2019. Até o mês de Agosto de 2023 estima-se mais de 769 milhões de casos confirmados de COVID-19 e mais de 6 milhões de mortes relacionadas a infecção por esse novo coronavírus no mundo. Com aprovação das vacinas, a letalidade da COVID-19 diminuiu consideravelmente atingindo atualmente um patamar de 1,9%, mas a infecção pelo vírus ainda é comum mesmo em pessoas com esquema vacinal completo. A grande circulação do vírus causa também o aparecimento de diferentes cepas, que pode representar uma preocupação futura. Poucas intervenções terapêuticas são possíveis para o tratamento da COVID-19. O Paxlovid, um dos únicos medicamentos efetivos contra o vírus foi aprovado recentemente no Brasil, mas ainda apresenta incertezas frente ao seu uso no tratamento de casos severos. O planejamento e desenvolvimento de novos compostos antivirais frente a SARS-CoV-2 e outros coronavírus é de grande importância para que haja diferentes alternativas para o tratamento da COVID-19, bem como, no aparecimento de novos vírus desse gênero. A protease principal desses coronavírus ($3CL^{pro}$) é essencial para as etapas de replicação viral e constitui um alvo potencial *para* o planejamento de compostos ativos. O composto FL-166, identificado em estudos frente ao vírus SARS-CoV, demonstrou um valor potente de $K_i = 40$ nM. Com base em sua estrutura química, derivados de ácidos borônicos foram planejados com uso de *docking* molecular e sintetizados. Dos 34 compostos sintetizados, 16 foram avaliados em estudos de inibição enzimática frente as proteases $3CL^{pro}$ e PL^{pro} de SARS-CoV-2 e apresentaram atividade de inibição $<5\%$, com isso, não foram selecionados para determinação de IC_{50} . Dessa forma, conclui-se que os derivados de ácidos borônicos neste estudo foram inativos frente a inibição do alvo proposto.

Palavras-chave: COVID-19; enzimas proteolíticas; proteases - inibidores; chalcona; medicamentos - desenvolvimento.

ABSTRACT

SARS-CoV-2, which causes COVID-19, is a virus of the β -coronavirus genus identified in 2019. To date (August 2023) there are an estimated 769 million confirmed cases of COVID-19 and more of 6 million deaths related to infection by this new coronavirus in the world. With the approval of vaccines, the lethality of COVID-19 has decreased considerably, currently reaching a level of 1.9%, but infection with the virus is still common even in people with a complete vaccination schedule. The large circulation of the virus also causes the appearance of different strains, which may represent a future concern. Few therapeutic interventions are possible for the treatment of COVID-19. Paxlovid, one of the only effective drugs against the virus, was recently approved in Brazil, but there are still uncertainties regarding its use in the treatment of severe cases. The planning and development of new antiviral compounds against SARS-CoV-2 and other coronaviruses is of great importance so that there are different alternatives for the treatment of COVID-19, as well as the appearance of new viruses of this type. The main protease of these coronaviruses (3CL^{pro}) is essential for viral replication steps and constitutes a potential target for designing active compounds. The FL-166 compound, identified in studies against the SARS-CoV virus, demonstrated a potent K_i value = 40 nM. Based on this chemical structure, derivatives of boronic acids were designed using molecular docking and synthesized. Of the 34 synthesized compounds, 16 were evaluated in enzymatic inhibition studies against the SARS-CoV-2 proteases 3CL^{pro} and P1^{pro} and showed inhibition activity <5%, therefore, they were not selected for IC_{50} determination. Therefore, it is concluded that the boronic acid derivatives in this study were inactive against the inhibition of the proposed target.

Keywords: COVID-19; proteolytic enzymes; protease inhibitors; chalcone; drug development.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida do vírus SARS-CoV-2. _____	2
Figura 2. Estrutura da protease principal de SARS-CoV-2, 3CL ^{pro} . _____	6
Figura 3. Etapas de proteólise e hidrólise da protease principal de SARS-CoV-2. _____	7
Figura 4. Compostos GRL-0920 e 9a, inibidores da protease principal de SARS-CoV-2. _____	8
Figura 5. Inibidores de proteases derivados de ácidos borônicos. A) Inibidor da protease de HIV; B) Inibidor da protease flaviviral. _____	9
Figura 6. Derivados de ácido borônico avaliados frente a protease de SARS-CoV e SARS-CoV-2. _____	10
Figura 7. Metodologia sintética para obtenção dos derivados de amida. _____	13
Figura 8. Metodologia sintética para obtenção dos derivados de ésteres. _____	15
Figura 9. Metodologia sintética para obtenção das chalconas. _____	16
Figura 10. Metodologia sintética para obtenção das hidrazidas funcionalizadas _____	18
Figura 11. Metodologia sintética para obtenção dos derivados de N-acil-hidrazonas _____	19
Figura 12. Metodologia sintética para obtenção dos derivados borilados. _____	20
Figura 13. FL-166, um derivado de ácido borônico, inibidor da 3CL ^{pro} de SARS-CoV. _____	24
Figura 14. Docking da molécula FL-166 na protease principal de SARS-CoV-2. _____	25
Figura 15. Modificações estruturais propostas no protótipo FL-166. _____	25
Figura 16. Modificações estruturais propostas com base no protótipo FL-166. _____	27
Figura 17. Imagem 3D das interações entre o derivado de amida contendo o grupo nitro substituído no anel benzênico _____	28
Figura 18. Nas figuras A e B foram sobrepostos os derivados de N-acil-hidrazona (moléculas em branco) e FL-166 (molécula em rosa) _____	29
Figura 19. Modificações estruturais propostas com base no protótipo FL-166. _____	30
Figura 20. Sobreposição entre os derivados de amidas e 3CL ^{pro} no sítio de SARS-CoV-2. _____	31
Figura 21 Sobreposição entre os derivados de N-acil-hidrazonas e 3CL ^{pro} no sítio de SARS-CoV-2. _____	32
Figura 22. A) Sobreposição entre os derivados de cetonas alfa-beta insaturadas e 3CL ^{pro} no sítio de SARS-CoV-2. _____	33
Figura 23. Moléculas iniciais planejadas para síntese. _____	34
Figura 24. Figura 3D do docking molecular de derivados da série das amidas sobrepostos com o protótipo FL-166. _____	35
Figura 25. Figura 3D do docking molecular de derivados da série das N-acil-hidrazonas sobrepostos com o protótipo FL-166. _____	36
Figura 26. Mecanismo de formação de amida com uso de agente acoplante (EDC). _____	37
Figura 27. Mecanismo de formação dos derivados de ésteres e amida (FL-166). _____	38
Figura 28. Mecanismo de formação das chalconas por meio da condensação de Claisen-Schmidt catalisada por meio básico. _____	47
Figura 29. Mecanismo da reação de borilação de Miyaura. _____	48
Figura 30. Mecanismo geral para formação das N-acil-hidrazonas, via catalise ácida. _____	59
Figura 31. N-acil-hidrazonas e suas isomerias e confôrmeros possíveis. _____	60
Figura 32. Chalconas avaliadas como inibidoras da interação MDM2-p53 e seus valores de IC ₅₀ frente a diferentes modelos celulares de câncer de mama e células normais _____	77
Figura 33. Chalconas avaliadas como inibidoras da interação MDM2-p53 e seus valores de IC ₅₀ frente a diferentes modelos celulares de câncer de mama e células normais _____	78
Figura 34. Chalconas avaliadas frente ao modelo celular de câncer de cólon, inibidoras do proteossoma 20S _____	78
Figura 35. Chalconas derivatizadas com ácidos borônicos frente ao modelo celular de câncer de mama, avaliadas como inibidoras da polimerização da tubulina. _____	79
Figura 36. Chalconas avaliadas frente ao modelo celular de câncer de cavidade oral, inibidoras da interação MDM2-p53. _____	80
Figura 37. Estrutura geral do núcleo das xantonas _____	80
Figura 38. Representação de uma possível rota sintética para síntese de uma xantona. _____	81
Figura 39. Semelhança estrutural entre os núcleos das chalconas e xantonas. _____	82
Figura 40. Metodologia sintética para obtenção do composto 2,7-dihidroxi-9H-xanten-9-ona (74) _____	83
Figura 41. Metodologia sintética para obtenção do composto 9-oxo-9H-xanteno-3,6-diil bis(trifluorometanossulfonato) (75) _____	83
Figura 42. Metodologia sintética para obtenção dos compostos 2,7-dibromo-9H-xanten-9-ol (78), ácido 2,7-dibromo-9H-xanteno-9-carboxílico (79) e 2,7-dibromo-9H-xanteno-9-ona (81). _____	84

Figura 43. Metodologia sintética para obtenção dos derivados ácido 2,7-bis(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-9H-xanteno-9-carboxílico (82), 2,7-bis(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-9H-xanten-9-ona (83) e 3,6-bis(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-9H-xanten-9-ona (84)	86
Figura 44. Metodologia sintética para obtenção dos compostos ácido 2,7-diborono-9H-xanteno-9-carboxílico (85) ácido (9-oxo-9H-xanteno-2,7-diil)diborônico (86) e ácido (9-oxo-9H-xanteno-3,6-diil)diborônico (87)	87
Figura 43. Imagem de microscopia dos compostos (34) e (34') frente aos modelos celulares NOK-si e SCC-25, nas concentrações de 6,25 µg/mL and 3,12 µg/mL, respectivamente, após 24 horas de incubação.	92
Figura 44. Avaliação da capacidade de inibição dos compostos (32), (34), (34') e (42) frente a citocina inflamatória TNF α , avaliados nas concentrações de 2 e 4 µg/mL. Controle (CT) = macrófagos não estimulados com LPS	94
Figura 45. Avaliação da capacidade de inibição dos compostos (32), (34), (34') e (42) frente a citocina inflamatória IL-6, avaliados nas concentrações de 2 e 4 µg/mL. Controle (CT) = macrófagos não estimulados com LPS.	95
Figura 46. Avaliação da capacidade de inibição dos compostos (32), (34), (34') e (42) frente a citocina inflamatória IL-1 β , avaliados nas concentrações de 2 e 4 µg/mL. Controle (CT) = macrófagos não estimulados com LPS.	96
Figura 47. Avaliação da capacidade de inibição dos compostos (32), (34), (34') e (42) frente a citocina inflamatória IL-8, avaliados nas concentrações de 2 e 4 µg/mL. Controle (CT) = macrófagos não estimulados com LPS	97
Figura 48. Curva analítica dos padrões obtida experimentalmente.	99
Figura 51. Estruturas de ressonância das xantonas	103
Figura 52. Espectro de RMN de ^1H do composto 3,6-dihidroxixantona (74) em DMSO-d $_6$.	105
Figura 53. Espectro de RMN de ^1H do composto 3,6-ditrifilixantona (75) em DMSO-d $_6$.	106
Figura 54. Espectro de RMN de ^1H do composto 3,6-bis(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-9H-xanten-9-ona (84) em CDCl $_3$ -d $_6$.	107
Figura 55. Transesterificação do éster borônico na presença de DEA, levando a formação do intermediário boro-DEA. A adição de HCl leva a obtenção do ácido borônico por meio da hidrólise.	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização estrutural de (6) , (7) e (8) por RMN de ^1H , DEPT-Q, HSQC e HMBC em DMSO- d_6 .	41
Tabela 2. Caracterização estrutural de (9) , (10) e (11) por RMN de ^1H , DEPT-Q, HSQC e HMBC em DMSO- d_6 .	42
Tabela 3. Caracterização estrutural de (13) por RMN de ^1H , DEPT-Q, HSQC e HMBC em DMSO- d_6 .	44
Tabela 4. Caracterização estrutural de (17) , (18) e (19) por RMN de ^1H , DEPT-Q, HSQC e HMBC em DMSO- d_6 .	46
Tabela 5. Caracterização estrutural de (31) , (32) , (33) e (40) por RMN de ^1H , DEPT-Q, HSQC e HMBC em DMSO- d_6 .	50
Tabela 6. Caracterização estrutural de (34) , (35) , (36) e (42) por RMN de ^1H , DEPT-Q, HSQC e HMBC em DMSO- d_6 .	53
Tabela 7. Caracterização estrutural de (37) e (38) por RMN de ^1H , DEPT-Q, HSQC e HMBC em DMSO- d_6 .	55
Tabela 8. Caracterização estrutural de (31)' , (32)' e (33)' por RMN de ^1H , DEPT-Q, HSQC e HMBC em DMSO- d_6 .	57
Tabela 9. Caracterização estrutural de (35)' , (34)' e (36)' por RMN de ^1H , DEPT-Q, HSQC e HMBC em DMSO- d_6 .	58
Tabela 10. Caracterização estrutural de (60) , (61) , (65) e (69) por RMN de ^1H , DEPT-Q, HSQC e HMBC em DMSO- d_6 .	Erro! Indicador não definido.
Tabela 11. Caracterização estrutural de (66) , (67) , (68) e (70) por RMN de ^1H , DEPT-Q, HSQC e HMBC em DMSO- d_6 .	Erro! Indicador não definido.
Tabela 12. Caracterização estrutural de (62) , (63) , (64) e (71) por RMN de ^1H , DEPT-Q, HSQC e HMBC em DMSO- d_6 .	Erro! Indicador não definido.
Tabela 13. Caracterização estrutural de (79) , (81) e (81b) por RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC e HMBC em DMSO- d_6 e CDCl_3 - d_6 .	104
Tabela 14. Caracterização estrutural de (85) , (86) e (87) por RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC e HMBC em DMSO- d_6 .	108

LISTA DE ABREVEATURAS

OMS	Organização Mundial da Saúde
SARS	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome</i>
MERS	<i>Middle East Respiratory Syndrome</i>
TMPRSS-2	Serino protease transmembrânica 2
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
3CLpro	<i>3C-Like protease</i>
PLpro	<i>Papain-like protease</i>
XP	<i>Extra Precision</i>
SP	<i>Standard Precision</i>
RMSD	<i>Root Mean Square Derivation</i>
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
IV	Espectrofotometria na região do Infravermelho
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
HOBt	Hidroxibenzotriazol
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d6	Dimetilsulfóxido deuterado
DMF	Dimetilformamida
THF	Tetrahidrofurano
DS	<i>Docking Score</i>
CCP	Câncer de Cabeça e Pescoço
HNC	<i>Head and Neck Cancer</i>
SI	<i>Selectivity Index</i>
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
SnAR	<i>Substituição Nucleofílica Aromática</i>
DEA	<i>Dietanolamina</i>
LPS	<i>Lipopolissacarídeo</i>

SUMÁRIO

Resumo	5
Abstract	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE ABREVEATURAS	10
PARTE A	12
1. Introdução	1
1.1 Epidemiologia	1
1.2 O vírus SARS-CoV-2 e a doença COVID-19	1
1.3 Tratamento atual	3
1.4 A protease principal (3CL ^{pro}) de SARS-CoV-2	5
1.5 Ácidos borônicos em inibidores de 3CL ^{pro} de SARS-CoV e SARS-CoV-2	8
2. Objetivos	11
2.1 Objetivos gerais	11
2.2 Objetivos específicos	11
3. Metodologia	11
3.1 Modelagem Molecular	11
3.2 Métodos de Purificação	12
<input type="checkbox"/> <i>Biotage® IsoleraTM</i>	12
<input type="checkbox"/> <i>Coluna de bancada</i>	12
<input type="checkbox"/> <i>Cromatografia em camada delgada (CCD)</i>	12
<input type="checkbox"/> <i>Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</i>	12
3.4 Metodologia sintética	13
3.4.1 <i>Reações de acoplamento para obtenção de amidas</i>	13
3.4.2 <i>Reações de acoplamento para obtenção de ésteres</i>	14
3.4.3 <i>Reação de Claisen-Schmidt para obtenção de chalconas</i>	16
3.4.4 <i>Reações para obtenção dos derivados de N-acil-hidrazonas</i>	17
3.4.5 <i>Borilação de Miyaura</i>	20
3.5 Ensaio de inibição enzimática	21
3.5.1 <i>Ensaio de inibição de 3CL^{pro} de SARS-CoV-2</i>	21
3.5.2 <i>Ensaio de inibição de PL^{pro} de SARS-CoV-2</i>	22
4. Resultados e Discussão	23
4.1 Ancoramento molecular	23
4.1.1 <i>Planejamento dos compostos</i>	23
4.2 Síntese e caracterização dos compostos finais	37
4.2.1 <i>Síntese e caracterização dos compostos finais derivados de amida e ésteres</i>	37
4.2.2 <i>Síntese e caracterização dos compostos finais derivados de chalconas</i>	47
4.2.3 <i>Síntese e caracterização dos compostos finais derivados de derivados de N-acil-hidrazonas</i>	59
4.3 Avaliação enzimática dos compostos frente as proteases de SARS-CoV-2	68

5.	Conclusões.....	68
6.	Referências.....	68
PARTE B		72
1.	Introdução.....	73
1.1	Epidemiologia.....	73
1.2	Fisiopatologia e Tratamento atual.....	74
1.3	Chalconas como <i>scaffold</i> no desenvolvimento de compostos anticâncer.....	76
1.4	Xantonas como <i>scaffold</i> no desenvolvimento de compostos anticâncer.....	80
	Objetivos.....	82
2.1	Objetivos gerais.....	82
2.2	Objetivos específicos.....	82
3.	Metodologia	83
3.1	Metodologia sintética.....	83
3.1.1	<i>Síntese do composto 2,7-dihidroxi-9H-xanten-9-ona</i>	83
3.1.2	<i>Síntese do composto 9-oxo-9H-xanteno-3,6-diil bis(trifluorometanossulfonato)</i>	
3.1.3	<i>Síntese da série de xantonas bromadas</i>	84
3.1.4	<i>Síntese das xantonas derivadas de éster borônico</i>	85
3.1.5	<i>Síntese das xantonas derivadas de ácido borônico</i>	86
3.2	Protocolo de teste de MTT.....	87
3.1	Avaliação da atividade anti-inflamatória.....	88
3.2	Determinação do Coeficiente de Partição (Log P).....	88
4	Resultados e discussão.....	89
4.1	Avaliação <i>in vitro</i> dos compostos frente aos modelos celulares de câncer de cabeça e pescoço	89
4.2	Avaliação <i>in vitro</i> da atividade anti-inflamatória dos compostos.....	93
4.3	Determinação do Coeficiente de Partição (Log P).....	98
4.4	Síntese e caracterização os derivados xantônicos.....	102
5.	Conclusão	109
6.	Referências.....	110

PARTE A

1. INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA

A síndrome respiratória aguda grave (do inglês, *Severe Acute Respiratory Syndrome* – SARS) foi relatada inicialmente na China, em novembro de 2002. Semanas após esse primeiro relato, a SARS já havia se espalhado por mais de 30 países, totalizando 8422 casos e 916 mortes (WHO, 2003). Em 2003 o agente patológico causador da SARS foi identificado, sendo denominado de SARS-CoV, um vírus pertencente à família *Coronaviridae* (Ksiazek *et al.*, 2003). Após a contenção da epidemia de SARS em 2003, no ano de 2012 um outro coronavírus levou ao primeiro caso de síndrome respiratória do Oriente Médio (do inglês, *Middle East Respiratory Syndrome* – MERS) na Arábia Saudita. Apesar da alta taxa de letalidade próximo de 34%, a MERS-CoV se restringiu principalmente aos países do Oriente Médio, totalizando 2519 casos e 866 mortes desde 2012, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 2023a).

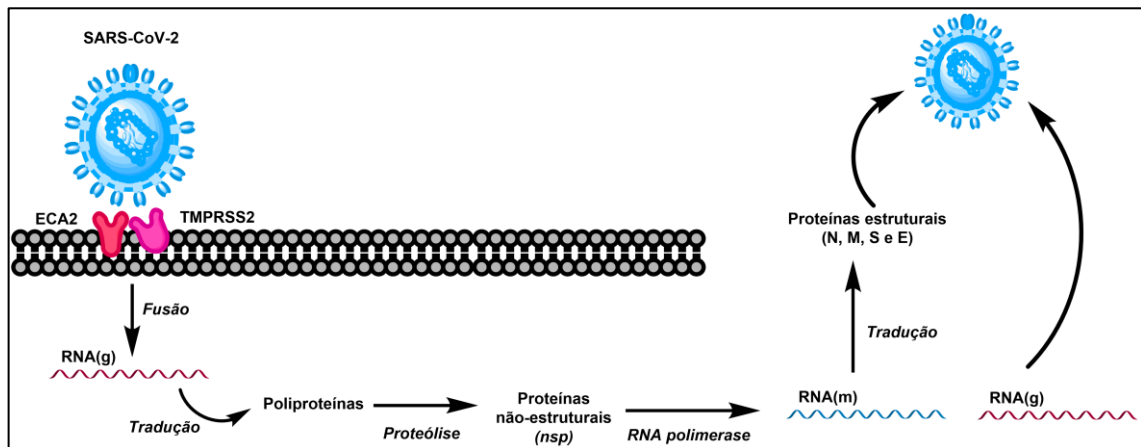
Em 2019, um novo coronavírus foi identificado após uma série de casos de uma “pneumonia atípica” na cidade de Wuhan, China (Zhou *et al.*, 2020; Ren *et al.*, 2020). O vírus então identificado como 2019-nCoV passou a ser denominado de SARS-CoV-2 após sua sequência genômica ser analisada, compartilhando 79,6% de identidade com a sequência de SARS-CoV (Zhou *et al.*, 2020). A doença causada pela infecção por SARS-CoV-2 recebeu o nome de COVID-19. Até o presente momento (agosto de 2023) houveram mais de 769 milhões de casos confirmados de COVID-19 e mais de 6 milhões de mortes no mundo (WHO, 2023b). Apenas no Brasil, foram relatados mais de 37 milhões de casos e mais de 700 mil mortes decorrentes da COVID-19, uma letalidade de 1,9% (WHO, 2023b; Ministério da Saúde Brasil, 2020).

1.2 O VÍRUS SARS-COV-2 E A DOENÇA COVID-19

Os coronavírus fazem parte da subfamília *Coronavirinae*, pertencente à família *Coronaviridae*, e são agrupados em quatro gêneros: α -coronavirus, β -coronavirus, δ -coronavirus e γ -coronavirus (Pillaiyar *et al.*, 2020). Os vírus capazes de infectar humanos estão divididos entre os gêneros α -coronavirus e β -coronavirus, sendo HCoV-229E e HCoV-NL63 pertencentes aos α -coronavirus e HCoV-HKU1, SARS-Cov-1, SARS-CoV-2 e MERS-CoV aos β -coronavirus (Pillaiyar *et al.*, 2020; De groot *et al.*, 2011). Os coronavírus possuem quatro grandes proteínas estruturais, sendo elas: proteína de nucleocapsídeo (N), proteína “*spike*” (S), proteína de membrana (M) e proteína de envelope (E) (Pillaiyar *et al.*, 2020; De groot *et al.*, 2011). A infecção por esses vírus se inicia através do reconhecimento da proteína “*spike*” com receptores celulares. Os coronavírus que infectam humanos utilizam receptores de entrada diferentes, sendo estes: aminopeptidase (HCoV-229E); ácido siálico 9-O-acetilado (HCoV-NL6 e H-CoV-HKU1); enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) (SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 e HCoV-NL63) e dipeptidil peptidase 4 (MERS-CoV) (Pillaiyar *et al.*, 2020).

O ciclo de infecção desses vírus ocorre de maneira similar. Com destaque para o vírus SARS-CoV-2, sua entrada nas células é auxiliada pelo receptor ECA2 e co-receptor serino protease transmembrana tipo II (TMPRSS2). Seu RNA (+) genômico passa pelo processo de tradução levando a formação de cadeias de poliproteínas (pp1a e pp1ab), que são posteriormente processadas por duas proteases: “3C-like” (3CL^{pro}) e “papain-like” (PL^{pro}) (De wit *et al.*, 2016). Com o auxílio das proteases, essas poliproteínas são clivadas em proteínas não-estruturais (nsp) que compõem o complexo replicase-transcriptase viral (De wit *et al.*, 2016). Esse complexo leva a formação de RNA (-), o que gera novas fitas de RNA (+) genômico por processos de replicação e a síntese de proteínas estruturais através da tradução de mRNA (+) subgenômico (De wit *et al.*, 2016). As proteínas virais formadas e o RNA genômico constituem os novos vírions, que são liberados das células infectadas por um processo de exocitose (De wit *et al.*, 2016). A Figura 1 representa esquematicamente as etapas do ciclo de vida do vírus SARS-CoV-2.

Figura 1. Ciclo de vida do vírus SARS-CoV-2.



Fonte: Elaborado pelo autor

A forma de transmissão desse vírus, assim como o SARS-CoV e MERS-CoV, se dá por contato direto através de gotículas de aerossol, rota-fecal oral e por fômites intermediários de pacientes sintomáticos e assintomáticos durante o período de incubação (Helmy *et al.*, 2020). Os sintomas da COVID-19 diferem de pessoa *para* pessoa. De acordo a OMS, os sintomas podem incluir, de maneira geral: febre, tosse seca, diarreia, dor de garganta, dor de cabeça e perda do olfato/paladar (WHO, Coronavirus disease COVID-19). Em 2020, um dos primeiros estudos demonstrando as características clínicas de pacientes hospitalizados com COVID-19 na China foi publicado (Huang *et al.*, 2020). De 41 pacientes, 13 (32%) apresentavam alguma doença subjacente como diabetes, hipertensão ou doença cardiovascular. A média de idade foi de 49 anos e os sintomas mais comum foram: febre (98% dos pacientes), tosse (76% dos pacientes) e fadiga (44% dos pacientes) (Huang *et al.*, 2020). Os sintomas graves da COVID-19 são caracterizados por linfopenia, complicações tromboembólicas, problemas cardíacos agudos, lesão renal e hepática e choque séptico (Berlin *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2020).

A infecção por SARS-CoV-2 é caracterizada por desencadear uma resposta imune excessiva denominada de “tempestade de citocinas”, considerada a principal causa de gravidade da doença e morte em pacientes com COVID-19 (Hu; Huang; Yin, 2020). A tempestade de citocinas leva a ativação de um alto nível de células imunes e produção excessiva de citocinas inflamatórias e mediadores químicos (Hu; Huang; Yin; 2020). Durante as infecções causadas por SARS-CoV e MERS-CoV, demonstrou-se também um aumento no nível de diferentes citocinas inflamatórias, porém essas citocinas diferem-se de acordo com cada vírus (Hu; Huang; Yin; 2020). Especificamente *para* SARS-CoV-2, durante um quadro de COVID-19 severa ou grave, os níveis das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, G-CSF, IP-10, MCP-1, MIP1A, TNF- α e INF- γ foram encontrados aumentados (Hu; Huang; Yin; 2020; Chen *et al.*, 2020).

A COVID-19 também demonstrou uma condição particular denominada de “pós COVID” ou “COVID longa” caracterizada pela OMS como indivíduos que apresentam infecção provável ou comprovada pelo vírus SARS-CoV-2, geralmente 3 meses após o início da COVID-19 com sintomas que durem pelo menos 2 meses e que não podem ser explicados por um diagnóstico alternativo (WHO, 2021). Os sintomas da COVID longa são extensos, tendo como exemplos: febre, fadiga, confusão mental, dor de cabeça, perda do olfato/paladar, distúrbios de memória, falta de ar, dor no peito, entre outros (Brodin *et al.*, 2022; Montani *et al.*, 2022; Yong, 2021). Os verdadeiros impactos da COVID-19 a longo prazo ainda estão sendo estudados e algumas pesquisas demonstram que mesmo pacientes que não apresentaram uma forma grave da doença, apresentaram um aumento no risco diversos distúrbios e doenças neurológicos (Xu *et al.*, 2022).

1.3 TRATAMENTO ATUAL

A forma mais eficiente de impedir a infecção pelo vírus SARS-CoV-2 e o desencadeamento de formas graves da COVID-19 é por meio da vacinação. Em um estudo de meta-análise, Zheng e colaboradores (2021) demonstraram que a efetividade das vacinas Pfizer-BioNTech foi de 91,2%, Moderna 98,1% e CoronaVac 65,7% (Zheng *et al.*, 2021). Nesse mesmo estudo, os autores verificaram que em populações totalmente vacinadas, a efetividade da vacina contra a infecção por SARS-CoV-2, diminuição da hospitalização relacionada a COVID-19, diminuição da admissão em unidade de terapia intensiva e diminuição dos casos de morte foi de 89,1%, 97,2%, 97,4% e 99,0%, respectivamente (ZHENG, et al. 2021). Quanto a taxa de vacinação do mundo, 70,1% da população mundial recebeu pelo menos uma dose da vacina COVID-19 (*Our World in Data*, 2023). No Brasil, o número de pessoas vacinadas contra COVID-19, com pelo menos as duas doses (ou dose única), era de mais de 176 milhões em março de 2023 (*Our World in Data*, 2023). O perfil de vacinação no Brasil teve um grande aumento do período de janeiro de 2021 até março de 2022, porém, a tendência de vacinação da população segue em declínio (*Our World in Data*, 2023).

Em 22 de março de 2022 foram administradas mais de 182 mil doses por dia (todas as doses foram consideradas, incluindo doses de reforço) *para* mais de 35 mil doses por dia em 22 de março de 2023 (*Our World in Data*, 2023). No mundo, o país que mais possui pessoas não vacinadas é a Índia, com mais de 389 milhões de pessoas que não receberam nenhuma dose da vacina contra COVID-19 (*Our World in Data*, 2023). No Brasil, estima-se que mais de 25 milhões de pessoas não

receberam nenhuma dose da vacina (*Our World in Data*, 2023). Apesar da grande efetividade das vacinas, sua cobertura não se dá de maneira total e bem distribuída em todo mundo. A falta de imunizantes em alguns países, bem como a impossibilidade de realizar a vacinação ou até mesmo, o desejo de não realizar a imunização contra COVID-19 são alguns fatores que reforçam a necessidade de outras abordagens terapêuticas para o tratamento da forma grave dessa doença (Altman *et al.*, 2023; Razai *et al.*, 2021).

O tratamento da COVID-19 até o presente momento apresenta poucas alternativas. No Brasil, foi aprovado pela ANVISA para uso a dexametasona, um anti-inflamatório da classe dos corticoides, o anticorpo monoclonal tocilizumabe, antagonista do receptor de IL-6 e o baricitinibe, inibidores de JAK1 e JAK2 para o tratamento de COVID-19 grave/pacientes hospitalizados (ANVISA, 2023). Quanto aos antivirais, quatro fármacos foram aprovados para o tratamento da COVID-19 no Brasil, pela ANVISA, sendo eles: remdesivir, molnupiravir e nirmaltrevir/ritonavir e sotrovimabe. O fármaco sotrovimabe é um exemplo de anticorpo monoclonal, inibidor da proteína spike do vírus. Em 2022, o FDA retirou a autorização do uso de sotrovimabe para o tratamento de COVID-19 em todo território dos EUA, uma vez que a proporção dos casos dessa doença estava sendo causados por mais de 50% pela subvariante Omicron BA.2 e esse fármaco se mostrou ineficaz contra essa subvariante (Takashita *et al.*, 2022; FDA News Release, 2022). Porém, no Brasil, ele ainda continua sendo aprovado para o tratamento da COVID-19.

Atualmente, no mundo, existem apenas três antivirais derivados de moléculas pequenas e 11 anticorpos monoclonais que são comercializados para o tratamento de COVID-19. Considerando as moléculas antivirais pequenas, duas tem como alvo a enzima RNA-dependente RNA polimerase (RdRp) do vírus SARS-CoV-2, sendo elas o remdesivir e molpuniravir, ambos análogos de nucleosídeos. Para pacientes com COVID-19 leve ou moderada, o remdesivir não oferece benefício significativo. Para indivíduos com alto risco de hiperinflamação, diagnosticada precocemente durante a doença (menos ou até 10 dias) e que requerem suplementação com oxigênio, o remdesivir é capaz de encurtar o tempo de recuperação (Young; Tan; Leo; 2021; Beigel *et al.*, 2020). O molpuniravir é indicado para pacientes com COVID-19 leve ou moderada, em adultos, com início da administração imediata dentro de 5 dias após o início dos sintomas. Esse fármaco não é indicado *para* menores de 18 anos, pois pode afetar o crescimento ósseo e cartilaginoso (Saravolatz, Depcinski, Sharma, 2023). Apesar de não apresentar interações medicamentosas com outros fármacos e possuir reações adversas leves, como diarreia, náuseas e tontura, apresenta apenas 30% de capacidade em reduzir hospitalização e morte (Saravolatz, Depcinski, Sharma, 2023). O medicamento Paxlovid, constituído pelos fármacos nirmatrelvir-ritonavir, atua como inibidor da protease principal (3CL^{pro}) de SARS-CoV-2. Nirmatrelvir atua como inibidor da atividade de 3CL^{pro}, com um IC₅₀ de 4 nM frente a essa protease (Duveau, Thomas; 2022). Ritonavir é um inibidor da protease do HIV-1 e sua administração em conjunto com o nirmaltrevir é feita com objetivo de inibir o citocromo P450 (CYP3A), responsável por metabolizar o fármaco inibidor da protease. O ritonavir não apresenta atividade contra a protease de SARS-CoV-2. Esse medicamento apresenta uma potente eficácia no tratamento de COVID-19, tendo capacidade de reduzir as hospitalizações/mortes em até 88% (Saravolatz, Depcinski, Sharma, 2023). Sua administração é recomendada para pacientes com COVID-19 leve ou moderada, com pacientes

com idade mínima de 12 anos, dentro de 5 dias após o início dos sintomas. Apesar de sua maior efetividade quando comparado aos outros antivirais de COVID-19, apresenta extensas interações medicamentosas (Saravolatz, Depcinski, Sharma, 2023). Além disso, o tratamento com Paxlovid apresentou um fenômeno denominado de “*rebound*”, caracterizado como a volta da infecção viral uma vez que o paciente já estava curado após o uso do medicamento (Rubin, 2022). O motivo pelo qual essa condição ocorre ainda não está claro, mas sugere-se que o Paxlovid pode suprimir temporariamente a replicação viral, porém, caso o paciente não consiga desenvolver uma resposta imune eficaz durante esse tempo, pode levar ao rebote viral de SARS-CoV-2 após o finalizar o tempo de tratamento (WANG, et al. 2022).

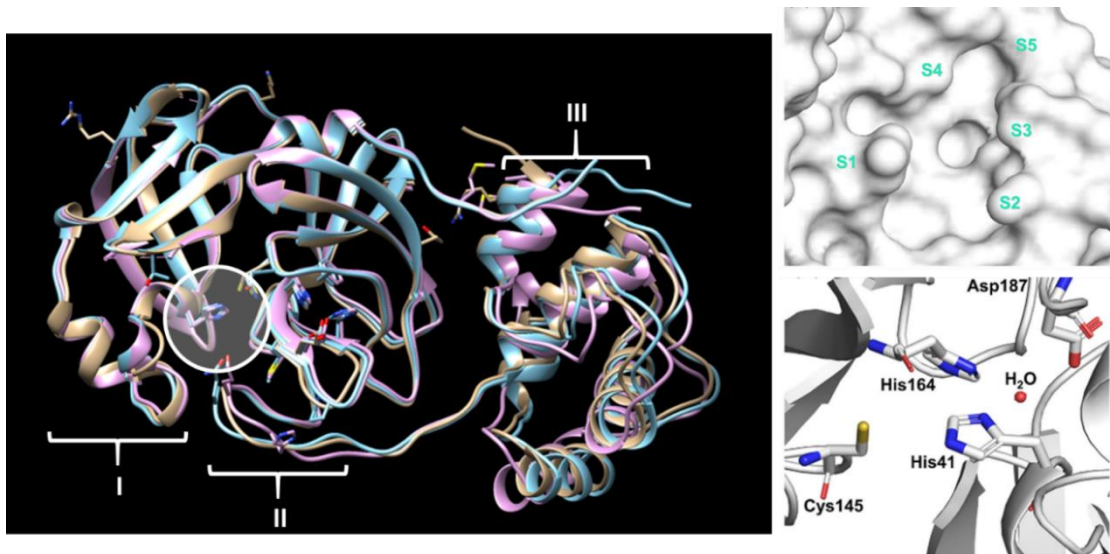
Considerando os fármacos aprovados até o presente momento, ressalta-se que apesar da eficácia no tratamento de COVID-19 ainda apresentam limitações. O planejamento e desenvolvimento de novos antivirais para SARS-CoV-2 é de grande importância para a identificação de moléculas mais potentes e seguras. Proteínas que desempenham papéis fundamentais no ciclo de vida de SARS-CoV-2 foram identificadas como importantes alvos para o desenvolvimento de novas moléculas no tratamento de COVID-19 (Liu *et al.*, 2020). O planejamento de compostos visando esses alvos podem levar à descoberta de novos antivirais contra SARS-CoV-2, podendo inclusive, apresentar espectro de ação ampliado para atuar frente a outros coronavírus como SARS-CoV e MERS-CoV, a exemplo da protease principal dos coronavírus, a 3CL^{PRO}.

1.4 A PROTEASE PRINCIPAL (3CL^{PRO}) DE SARS-COV-2

A protease principal dos coronavírus denominada de M^{PRO} ou 3CL^{PRO} tem um papel fundamental no ciclo de vida desses vírus, sendo responsável pela clivagem das cadeias de poliproteínas para formação do complexo replicase-transcriptase viral. Desta forma, essa protease se torna um alvo promissor para o desenvolvimento de novas estratégias frente aos coronavírus, uma vez que sua inibição interfere nos processos de replicação e transcrição dos vírus.

A estrutura de 3CL^{PRO} de SARS-CoV consiste em três domínios e seu sítio ativo é localizado em uma região entre o domínio I e II, que podem ser divididos em cinco sub-bolsões denominados S1, S2, S3, S4 e S5 (Figura 2) (Hu *et al.*, 2022). O sítio catalítico dessa protease contém a cisteína catalítica 145 (Cys-145) que junto com a histidina 41 (His-41) formam uma díade catalítica (Figura 2) (Hu *et al.*, 2022).

Figura 2. Estrutura da protease principal de SARS-CoV-2, 3CL^{pro}.

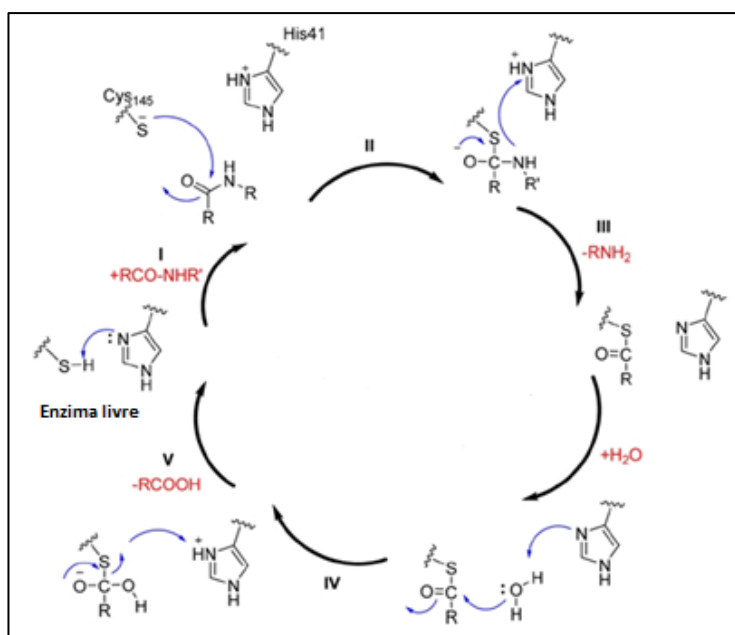


Fonte: Adaptado de Hu *et al.*, 2020

A estrutura cristalográfica da 3CL^{pro} de SARS-CoV-2, depositada no banco de dados do *Protein Data Bank* (PDB), permitiu uma avaliação quanto sua similaridade entre as outras proteases principais dos coronavírus SARS-CoV e MERS-CoV. Com o alinhamento dessas estruturas utilizando o software Chimera, identificou-se que a 3CL^{pro} de SARS-CoV possui 96% de similaridade com a de SARS-CoV-2; de 306 aminoácidos, apenas 12 resíduos são diferentes, tendo a região do sítio ativo conservada. Em relação a 3CL^{pro} de MERS-CoV, a protease principal de SARS-CoV-2 apresenta 46% de similaridade (He *et al.*, 2020; Banerjee, *et al.*, 2021).

O processo catalítico pela qual a 3CL^{pro} é responsável se denomina proteólise (Figura 3). A histidina (HIS-41) abstrai um próton da cisteína catalítica (CYS-145), levando a formação do tiolato (etapa I), forma reativa da cisteína, que atua como nucleófilo na presença do substrato (etapa II). Após o ataque do tiolato ao carbono carbonílico do substrato, há a saída da porção *N*-terminal do substrato, levando a formação da ligação enxofre-carbono (etapa III). Na presença de água, a histidina é responsável por sua ativação, desprotonando a molécula após seu ataque nucleofílico ao carbono carbonílico (etapa IV). A ligação carbono-enxofre é então clivada pela formação da ligação dupla entre o carbono-oxigênio (etapa V). A abstração do próton pelo átomo de enxofre da protease, leva a seu reestabelecimento após o processo de hidrólise (Pillaiyar *et al.*, 2016).

Figura 3. Etapas de proteólise e hidrólise da protease principal de SARS-CoV-2.



Fonte: Adaptado de Pillaiyar *et al.*, 2016

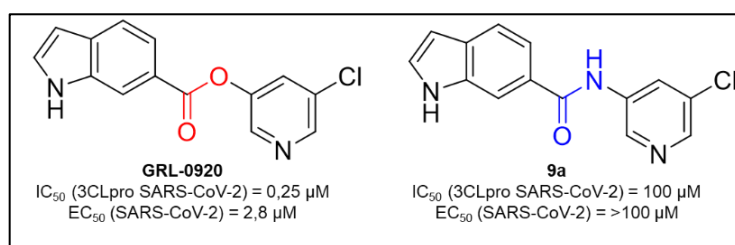
Os inibidores da protease principal do coronavírus podem ser classificados em dois tipos: peptidomiméticos e as denominadas “*small molecules*”, em que se enquadram todas as moléculas cuja estrutura química não deriva de um peptídeo (Liu *et al.*, 2020). Os compostos peptidomiméticos são estruturas derivadas de peptídeos contendo um grupo eletrofílico denominado de “*warhead*”, capaz de promover uma ligação covalente reversível ou irreversível com a cisteína catalítica da protease (Liu *et al.*, 2020). Compostos derivados de moléculas pequenas não-peptídicas interagem principalmente com resíduos da região catalítica da protease por meio de ligações de hidrogênio, ligações hidrofóbicas e forças de van der Waals (Liu *et al.*, 2020). Porém, podem também apresentar a capacidade de formar uma ligação covalente com a cisteína catalítica.

Compostos que atuam de maneira covalente e não covalente apresentam vantagens e desvantagens quanto a sua administração. Normalmente, os inibidores covalentes conseguem uma inibição mais potente do alvo, mas, apresentam um tempo de residência maior e podem levar a uma maior toxicidade (Cesco *et al.*, 2017). Os inibidores não covalentes por outro lado, apresentam uma inibição mais fraca do alvo, o que torna esses compostos mais toleráveis e passíveis de administração por períodos mais longos (Cesco *et al.*, 2017). Porém, pode ser necessário uma dosagem alta ou uma administração desses compostos múltiplas vezes (Cesco *et al.*, 2017).

Neste trabalho, exploramos as moléculas pequenas como potenciais inibidoras da 3CL^{pro} de SARS-CoV-2, uma vez que são estruturas simples do ponto de vista sintético, podem apresentar valores interessantes de inibição frente ao alvo e ao vírus, além de serem estruturas versáteis, que muitas vezes podem ser reposicionadas frente a outro alvo. Dentre as diferentes moléculas pequenas relatadas até o presente momento, destaca-se o composto **GRL-0920** (Figura 4), identificado como inibidor da protease principal de SARS-CoV-2, com IC₅₀ = 0,25 μM (Gosh *et al.*, 2021). Posteriormente, esse composto havia sido identificado em 2008, como inibidor da protease principal

de SARS-CoV, com $IC_{50} = 0,2 \mu\text{M}$ (Ghosh *et al.*, 2008), reforçando a semelhança estrutural das proteases tal qual resultou em sua inibição com um valor de IC_{50} muito similar, pelo menos composto. Além disso, essa pequena molécula se mostrou capaz de inibir ambos os vírus SARS-CoV e SARS-CoV-2, com valores de $EC_{50} = 6,9$ e $2,8 \mu\text{M}$, respectivamente (Ghosh *et al.*, 2008; Ghosh *et al.*, 2021). A troca do grupo éster por um derivado contendo um grupo amida levou a formação do composto (**9a** – Figura 4) que apresentou valores de IC_{50} e $EC_{50} > 100 \mu\text{M}$ (Ghosh *et al.*, 2021). O modo de interação do composto **GRL-0920** com a protease se dá através do ataque nucleofílico entre a cisteína catalítica, na forma de tiolato, com a carboníla do grupo éster, levando a formação de uma ligação covalente entre a cisteína e o carbono carbonílico (aduto de tioéster). Desta forma, considera-se que derivados não peptídicos podem ser uma classe interessante de compostos a ser explorada para a inibição da protease de SARS-CoV-2.

Figura 4. Compostos **GRL-0920** e **9a**, inibidores da protease principal de SARS-CoV-2.



Fonte: Adaptado de Gosh *et al.*, 2021.

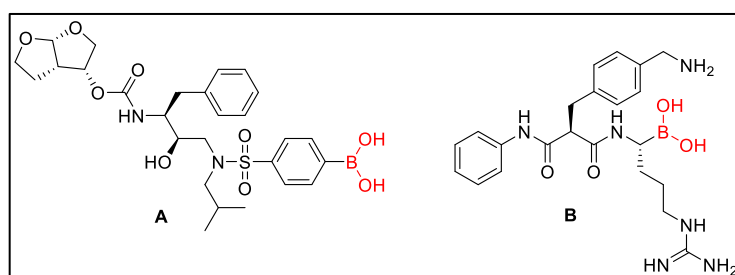
1.5 ÁCIDOS BORÔNICOS EM INIBIDORES DE 3CL^{PRO} DE SARS-COV E SARS-COV-2

Os ácidos borônicos apresentam uma química muito característica, o que confere a esse grupo uma grande aplicabilidade dentro da Síntese Orgânica, Organocatálise e Química Medicinal. O átomo de boro em compostos organoborados apresenta hibridização do tipo sp^2 , tendo um orbital p desocupado responsável por seu caráter de ácido de Lewis (Prates *et al.*, 2021). Os ácidos borônicos são estáveis em pH fisiológico, o que muitas vezes torna sua aplicação mais interessante do ponto de vista do planejamento de fármacos como por exemplo, na troca biosstérica entre o grupo ácido carboxílico ($pK_a = 4-5$) por um ácido borônico ($pK_a = 8-9$) (Plescia, Moitessier; 2020). Além disso, o ácido borônico também pode afetar as propriedades físico-químicas das moléculas, como por exemplo, levando a um aumento da solubilidade (Plescia, Moitessier; 2020). Consequentemente pode trazer implicações nos valores de coeficiente de partição (LogP) e coeficiente de distribuição (LogD), importantes parâmetros farmacocinéticos (Plescia, Moitessier; 2020).

Os ácidos borônicos e derivados, como os benzoboroxóis, constituem uma importante classe de compostos na Química Medicinal, sendo que representantes dessa classe podem ser encontrados na terapia, a exemplo do antineoplásico bortezomib (Velcade®), antifúngico (tavaborol - Kerydin®) e no antiinflamatório usado para tratamento de dermatite atópica crisaborol (Eucrisa®) (Fernandes *et al.*, 2019). Uma importante característica dos ácidos borônicos e principal motivo que são explorados na Química Medicinal, é a capacidade desses compostos em realizar interações covalentes reversíveis.

O boro interage com resíduos de aminoácidos que são capazes de doar um par de elétrons, considerando seu caráter de ácido de Lewis. Desta forma, compostos que contêm ácido borônico em sua estrutura podem atuar como inibidores de proteases, mais comumente, inibidores de serino e treonino proteases (Smoum *et al.*, 2012). Derivados de ácidos borônicos atuando como potentes inibidores de proteases foram relatados em diferentes estudos. Windsor e colaboradores (2018) utilizaram como protótipo o composto darunavir, que contém um grupo anilina e substituíram o grupamento amina por um ácido borônico *para* avaliar sua potencialidade frente a protease de HIV. O derivado borônico apresentou inibição na ordem de picomolar ($K_i = 0,5 \text{ pM}$), enquanto o darunavir apresentou $K_i = 10 \text{ pM}$ (Figura 5; A) (Windsor *et al.*, 2018). Em outro estudo, Nitsche e colaboradores (2016) descrevem a atividade de outros derivados de ácido borônico contra a protease flaviviral, apresentando valores de $K_i = 0,051, 0,082 \text{ e } 0,040 \text{ }\mu\text{M}$ contra as proteases dos vírus da dengue, Nilo e Zika, respectivamente (Figura 5; B) (Nitsche *et al.*, 2016).

Figura 5. Inibidores de proteases derivados de ácidos borônicos. A) Inibidor da protease de HIV; B) Inibidor da protease flaviviral.



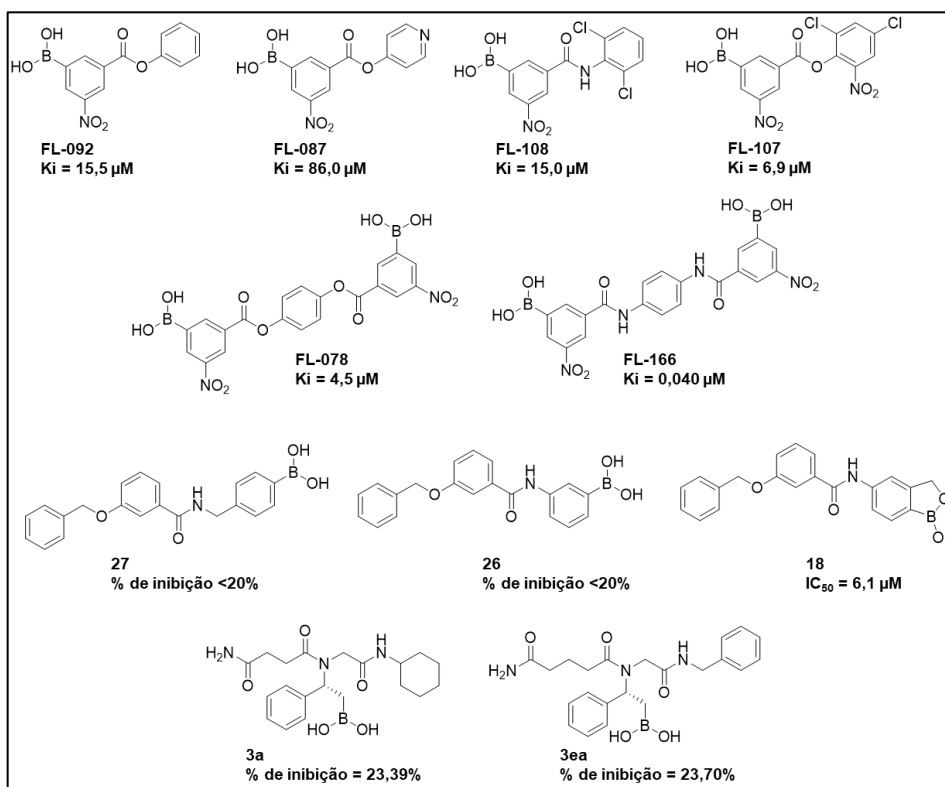
Fonte: Adaptado de Windsor *et al.*, 2018; Nitsche *et al.*, 2016.

Quanto a protease principal de SARS-CoV, um único estudo com derivados de ácidos borônicos foi publicado em 2004. Bacha e colaboradores (2004), identificaram compostos de ácido aril borônicos bi-funcionalizados capazes de inibir a protease principal de SARS-CoV. Os autores realizaram diferentes otimizações estruturais e relataram a maior constante de inibição (K_i) quando substituíram os grupos ésteres (**FL-078**, $K_i = 4,5 \text{ }\mu\text{M}$) por amidas (**FL-166**, $K_i = 40 \text{ nM}$) (Figura 6) (Bacha *et al.*, 2004). Experimentos de titulação isotérmica indicaram que esses inibidores se ligam reversivelmente a 3CL^{pro} de maneira favorável do ponto de vista termodinâmico, implicando no estabelecimento de fortes interações com a protease (Bacha *et al.*, 2004). Além dessas estruturas, moléculas menores foram sintetizadas em uma série de análogos contendo apenas um ácido borônico na estrutura, como exemplo os compostos **FL-087** ($K_i = 66 \text{ }\mu\text{M}$), **FL-092** ($K_i = 15,5 \text{ }\mu\text{M}$), **FL-108** ($K_i = 15,0 \text{ }\mu\text{M}$) e **FL-107** ($K_i = 6,9 \text{ }\mu\text{M}$) (Bacha *et al.*, 2004) (Figura 6). As moléculas menores não apresentaram um valor de K_i tão potente quanto as estruturas de maior peso molecular, o que pode ser justificado pela menor quantidade de interações com os resíduos de aminoácidos do sítio da protease, porém, estas funcionam muito bem como fragmentos moleculares.

Frente ao vírus SARS-CoV-2, destaca-se apenas dois trabalhos que avaliaram moléculas contendo ácidos borônicos em sua estrutura como possíveis inibidores da protease principal. Kühl e colaboradores (2022), avaliaram uma série de compostos derivados de benzoboroxóis e apenas dois

derivados de ácidos borônicos (**26** e **27** – Figura 6) frente a protease principal de SARS-CoV-2. Os derivados de ácidos borônicos apresentaram uma fraca inibição da protease (<20%), quando testados em uma concentração fixa de 50 μM e, portanto, seus valores de IC_{50} não foram determinados. Curiosamente, a troca do ácido borônico por um benzoboroxol na estrutura do composto (**26**) resultou no composto (**18** - Figura 6), que apresentou um valor de $\text{IC}_{50} = 6,1 \mu\text{M}$ frente a 3CL^{pro} de SARS-CoV-2 (Kühl *et al.*, 2022). A região exata da protease em que o composto (**18**) atua é desconhecida pelos autores, porém, estudos usando espectrometria de massas indicaram que não há a formação de ligação covalente entre o grupo benzoboroxol e a 3CL^{pro} (Kühl *et al.*, 2022). Fassi e colaboradores (2023), com base nos estudos de Bacha e colaboradores (2004) sintetizaram uma série de ácidos β -amido borônicos, com objetivo de avaliar a capacidade do grupamento ácido borônico em realizar uma interação covalente com o resíduo de treonina (Thr-25) no sítio ativo da protease. Dois compostos, (**3a**) e (**3ea**) (Figura 6), foram avaliados em ensaios enzimáticos em uma concentração fixa de 20 μM , com uma porcentagem de inibição de 23,39 e 23,70% frente a 3CL^{pro} de SARS-CoV-2 (Fassi *et al.*, 2023). Por conta do baixo valor de atividade de inibição, os autores não deram continuidade com posteriores estudos.

Figura 6. Derivados de ácido borônico avaliados frente a protease de SARS-CoV e SARS-CoV-2.



Fonte: Adaptado de Bacha *et al.*, 2004; Kühl *et al.*, 2022; Fassi *et al.*, 2023.

Até o presente momento, apenas os trabalhos de Kühl e colaboradores (2022) e Fassi e colaboradores (2023) foram publicados explorando derivados de ácidos borônicos como inibidores da protease de SARS-CoV-2, o que demonstra a necessidade de mais estudos para avaliar se de fato, os

ácidos borônicos e seus derivados podem ser um *scaffold* interessante para o desenvolvimento de inibidores da 3CL^{pro}.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho visou o planejamento, síntese e avaliação farmacológica de inibidores da protease principal (3CL^{pro}) de SARS-CoV-2 que possam se constituir novos candidatos à fármacos para tratamento da COVID-19.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Modelagem molecular com o uso do *docking* convencional para seleção dos compostos mais promissores frente as interações com a 3CL^{pro} de SARS-CoV-2.
- Síntese, purificação e caracterização estrutural das moléculas selecionadas.
- Estudo *in vitro* da capacidade de inibição dos compostos sintetizados frente a protease de SARS-CoV-2.

3. METODOLOGIA

3.1 MODELAGEM MOLECULAR

Os experimentos de modelagem molecular foram realizados utilizando o software Maestro[®] 2018-4 (Schrödinger, 2017a) em um computador com sistema operacional Windows 7 Home Premium, processador Intel Core I7-4790 com memória de 16 Gb e placa de processamento gráfico Nvidia Gforce GTX 980.

Para o estudo computacional frente a protease principal de SARS-CoV-2, a estrutura cristalográfica de 3CL^{pro} ou M^{pro} de SARS-CoV-2, foi obtida no banco de dados PDB, sob o código 6YB7 (Owen *et al.*, 2020) com resolução de 1,25 Å.

As estruturas foram importadas para o software isoladamente e preparadas para o estudo de ancoragem molecular utilizando a função *Protein Preparation Wizard*. O seguinte protocolo foi executado: (i) remoção das moléculas de água; (ii) adição de átomos de hidrogênio; (iii) preenchimento de cadeias laterais incompletas; (iv) minimização de energia utilizando o campo de força OPLS3. A caixa de interação ("*grid*") foi definida pelo *Receptor Grid Generation* (Schrödinger, 2017b), com dimensões de 10 Å x 10 Å x 10 Å. Com a conclusão do preparo das proteínas, os ligantes foram desenhados e importados no formato SDF para o software Maestro[®] e sua preparação se deu através da função *Ligand Preparation (LigPrep)* a fim de realizar a minimização de energia utilizando campo de força OPLS3, e obter a simulação dos possíveis estados de ionização em pH 7 ± 2 (SCHRÖDINGER, 2017c). Para a realização do ancoramento molecular utilizou-se a função *Glide* em modo *Extra Precision (XP)* e *Standard Precision (SP)*, gerando de 10 a 20 poses por molécula.

Para determinar a eficiência de todos os parâmetros utilizados neste estudo, o modelo foi validado por *redocking*, em que os ligantes originais das proteínas foram removidos e seguidamente, ancorados no mesmo sítio enzimático. A qualidade deste resultado foi analisada pelo cálculo *Root Mean Square Deviation* (RMSD) entre o ligante co-cristalizado e o “redocado”. O valor obtido é considerado de confiança quando o RMSD for inferior a 2 Å (Yusuf *et al.*, 2008).

3.2 MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO

3.2.1 Biotage® Isolera™

A purificação dos compostos obtidos foi realizada através de cromatografia com o uso do Biotage® Isolera™, utilizando a coluna Biotage® SNAP ULTRA 10g (HP-Sphere 25 µm), por um método isocrático com acetato de etila, hexano e diclorometano como eluentes, fluxo de 36 mL/min e detecção no comprimento de onda fixo em 254 nm.

3.2.2 Coluna de bancada

A cromatografia em coluna de bancada foi realizada utilizando como eluentes solventes orgânicos de diferentes polaridades como fase móvel e sílica flash como fase estacionária. A altura e diâmetro da coluna foram definidos de acordo com a necessidade para cada composto a ser purificado.

3.2.3 Identificação estrutural em Cromatografia em camada delgada (CCD)

As análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas em cromatoplasmas de alumínio (AL TLC- Merck®) de sílica-gel 60 F254 para o acompanhamento das reações. A visualização das substâncias foi realizada em câmara de luz ultravioleta (254 e 365 nm).

3.2.4 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

Espectroscopia na região do infravermelho (IV). As análises de espectrofotometria foram realizadas na faixa de absorção de 4.000 a 400 cm⁻¹, região do infravermelho (IV), através de um espectrofotômetro IR Prestige-21 Shimadzu®, utilizando pastilhas KBr.

3.2.5 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

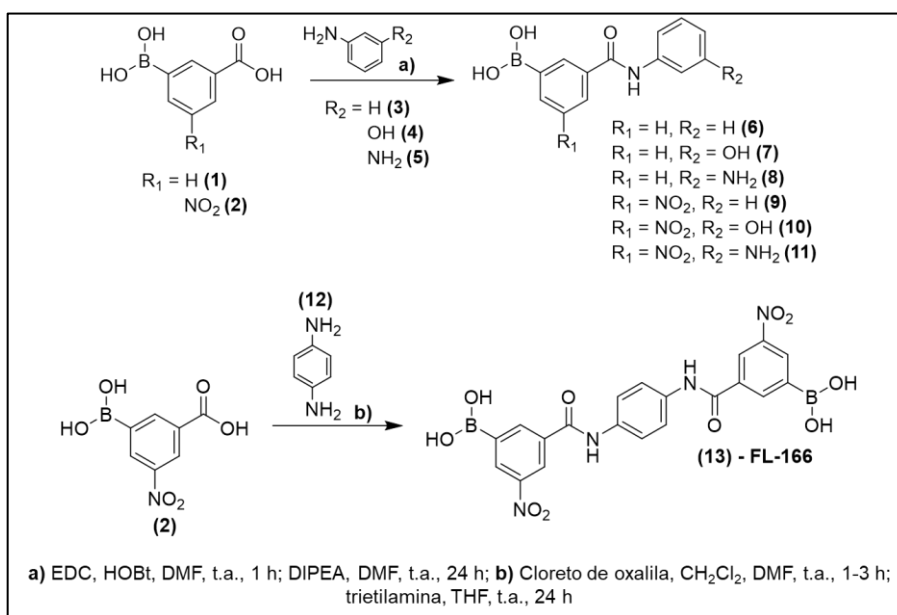
As análises de RMN de ¹H, DEPT-Q e bidimensionais (Bruker 600 e Bruker 300, operando a 600 MHz e 300 MHz, respectivamente, para o núcleo de ¹H e TMS como referência interna e a 150 MHz e 75 MHz para DEPT-Q) foram realizadas utilizando solvente dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*₆) e clorofórmio deuterado (CDCl₃-*d*₆) O equipamento está lotado no Instituto de Química da UNESP de Araraquara.

3.3 METODOLOGIA SINTÉTICA

3.4.1 Reações de acoplamento para obtenção de amidas

Para obtenção dos derivados de amidas realizou-se o acoplamento entre os respectivos derivados aminados e o reagente carboxilado, com o uso de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), hidroxibenzotriazol (HOBT) como agentes acoplantes e *N,N'*-diisopropiletilamina (DIPEA) como base (Figura 7).

Figura 7. Metodologia sintética para obtenção dos derivados de amida.



Procedimento experimental

Em um balão de fundo redondo de 10 mL (balão A) adicionou-se 200 mg (1 eq. mol^{-1}) de ácido 3-borônico benzóico (1) ou ácido 3-nitro-5-borônico benzóico (2), 2 eq. mol^{-1} de EDC, 2 eq. mol^{-1} de HOBT e 5 mL de dimetilformamida (DMF) anidra. A mistura reacional foi mantida a temperatura ambiente sob agitação durante 1 h em atmosfera inerte de N_2 . Em um segundo balão de fundo redondo de 10 mL (balão B), adicionou-se $1,2 \text{ eq. mol}^{-1}$ do respectivo reagente aminado (3), (4) ou (5) $1,2 \text{ eq. mol}^{-1}$ de DIPEA e 4 mL de DMF anidro. A mistura reacional do balão B foi então adicionada gota a gota ao balão A. A reação foi mantida a temperatura ambiente sob agitação durante 24 h em atmosfera inerte de nitrogênio (N_2). O acompanhamento reacional foi feito por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando acetato de etila:hexano como fase móvel e revelação sob luz ultravioleta (254 nm) até que o consumo dos reagentes indicasse o término da reação. O agente revelador de amins primárias 2,2-diidroxi-hidrindeno-1,3-diona (ninidrina) também foi empregado durante o acompanhamento reacional por CCD. Esse revelador é responsável por provocar uma coloração rosa intensa na CCD quando em contato com compostos que contém amins livres em sua estrutura, mas pode também, corar grupamentos amida levando a observação de uma coloração rosa menos intensa. Ao final da reação, o meio reacional foi diluído com 150 mL de acetato de etila para extração líquido/líquido. A fase orgânica foi lavada três vezes com 80 mL de água destilada. Posteriormente a

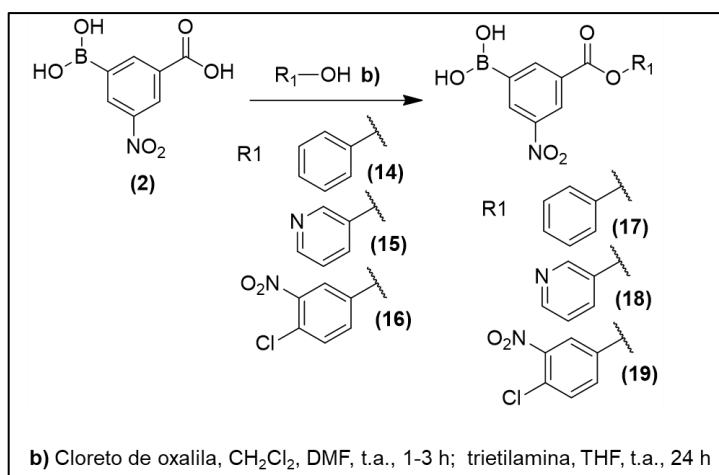
fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e a solução filtrada. Em seguida o solvente foi evaporado a pressão reduzida levando a um sólido branco. A última etapa consistiu na purificação de cada produto por meio de cromatografia de coluna de bancada. Os compostos foram avaliados individualmente para escolha da melhor fase móvel e altura da coluna. Ao final da purificação, os produtos ácido (3-(fenilcarbamoil)fenil)borônico (**6**), ácido (3-((3-hidroxifenil)carbamoil)fenil)borônico (**7**), ácido (3-((3-aminofenil)carbamoil)fenil)borônico (**8**), ácido (3-nitro-5-(fenilcarbamoil)fenil)borônico (**9**), ácido (3-((3-hidroxifenil)carbamoil)-5-nitrofenil)borônico (**10**) e ácido (3-((3-aminofenil)carbamoil)-5-nitrofenil)borônico (**11**) foram obtidos com rendimentos variando entre 15 a 25 %.

Para obtenção do composto ácido (((1,4-fenilenobis(azanodiiil))bis(carbonil))bis(5-nitro-3,1-fenileno))diborônico (**13**), adicionou-se em um balão de 10 mL (balão A) adicionou-se 300 mg (1,42 mmol) de ácido 3-nitro-5-borônico benzóico (**2**), 245 μ L (2,36 mmol) de cloreto de oxalila, 3 gotas de DMF e 5 mL de diclorometano (CH_2Cl_2). A mistura reacional foi mantida a temperatura ambiente sob agitação durante 1-3 h em atmosfera inerte de N_2 . Em um segundo balão de fundo redondo de 10 mL (balão B), adicionou-se 80 mg (0,74 mmol) de *p*-fenilenodiamina (**12**), 200 μ L (4,85 mmol) de trietilamina e 5 mL de tetrahidrofurano (THF). Ao final da reação do balão A, indicada por acompanhamento por CCD, o solvente foi evaporado à pressão reduzida levando a remoção do excesso de cloreto de oxalila com a formação de um sólido de cor amarelada. O sólido foi ressuspenso em THF *para* solubilização do reagente clorado. O balão B foi colocado em banho de gelo e a solução contendo o reagente clorado foi adicionada gota a gota ao meio reacional do balão B. A reação foi mantida a temperatura ambiente sob agitação durante 24 h em atmosfera inerte de N_2 . O acompanhamento reacional foi feito por CCD utilizando hexano:acetato de etila como fase móvel e revelação sob luz ultravioleta (254 nm) até que o consumo dos reagentes indicasse o término da reação. Ao final da reação, o solvente foi evaporado a pressão reduzida e o meio reacional diluído com 150 mL de acetato de etila para extração líquido/líquido. A fase orgânica foi lavada três vezes com 80 mL de água destilada. Posteriormente a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e a solução filtrada. Em seguida o solvente foi evaporado a pressão reduzida. A última etapa consistiu na purificação do composto por meio de cromatografia de bancada, utilizando como eluentes: (9:1) acetato de etila e hexano, levando a obtenção de um sólido amarelado, com rendimento de 12%.

3.4.2 Reações de acoplamento para obtenção de ésteres

Para obtenção dos derivados de ésteres realizou-se o acoplamento entre os respectivos derivados hidroxilados e o reagente contendo a função ácido carboxílico, com o uso de cloreto de oxalila, DMF como catalisador e trietilamina como base (Figura 8).

Figura 8. Metodologia sintética para obtenção dos derivados de ésteres.



Procedimento experimental

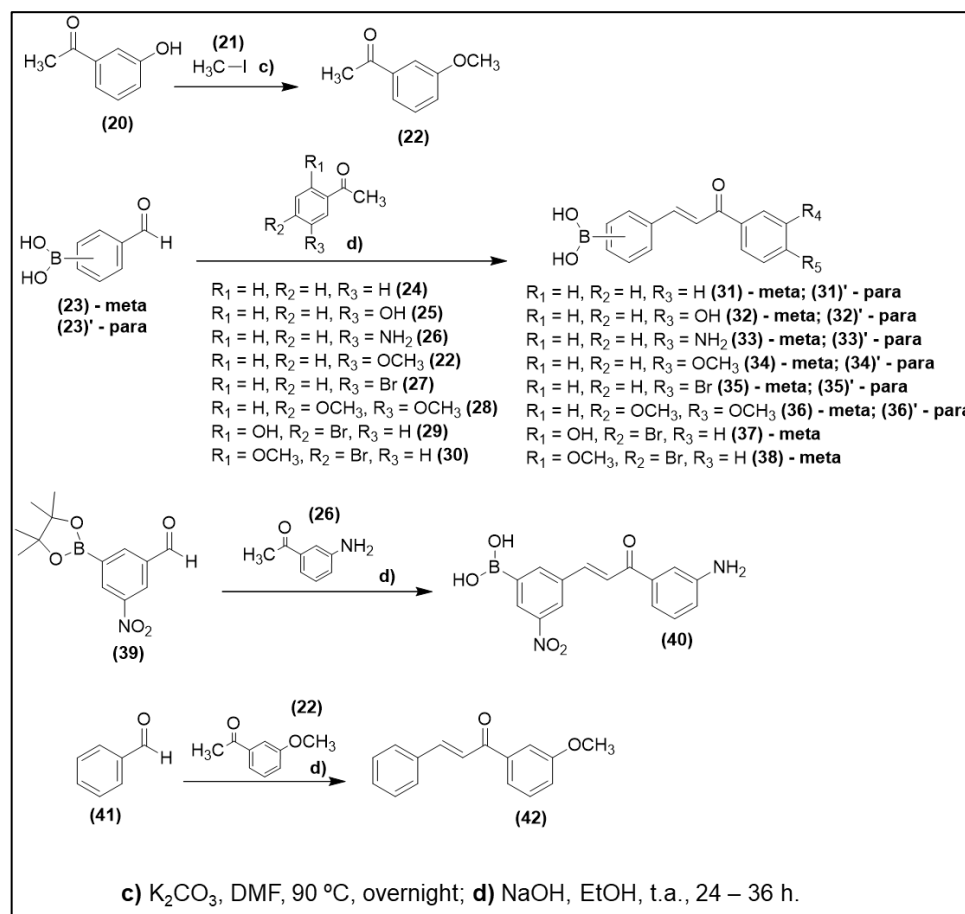
Em um balão de fundo redondo de 10 mL (balão A) adicionou-se 200 mg (1 eq.mol⁻¹) de ácido 3-nitro-5-borônico benzóico (**2**), 2 eq.mol⁻¹ de cloreto de oxalila, 3 gotas de DMF e 5 mL de diclorometano (CH₂Cl₂). A mistura reacional foi mantida a temperatura ambiente sob agitação durante 1-3 h em atmosfera inerte de N₂. Em um segundo balão de fundo redondo de 10 mL (balão B), adicionou-se 1,2 eq.mol⁻¹ do respectivo reagente hidroxilado (**14**), (**15**) ou (**16**), 2 eq.mol⁻¹ de trietilamina e 5 mL de THF. Ao final da reação do balão A, indicada por acompanhamento por CCD, o solvente foi evaporado a pressão reduzida levando a remoção do excesso de cloreto de oxalila com a formação de um sólido de cor amarelada. O sólido foi ressuspensionado em THF para solubilização do reagente clorado. O balão B foi colocado em banho de gelo e a solução contendo o reagente clorado foi adicionada gota a gota ao meio reacional do balão B. A reação foi mantida a temperatura ambiente sob agitação durante 24 h em atmosfera inerte de N₂. O acompanhamento reacional foi feito por CCD utilizando hexano:acetato de etila como fase móvel e revelação sob luz ultravioleta (254 nm) até que o consumo dos reagentes indicasse o término da reação.

Ao final da reação, o solvente foi evaporado a pressão reduzida e o meio reacional diluído com 150 mL de acetato de etila para extração líquido/líquido. A fase orgânica foi lavada três vezes com 80 mL de água destilada. Posteriormente a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e a solução filtrada. Em seguida o solvente foi evaporado a pressão reduzida levando a um sólido branco. A última etapa consistiu na purificação de cada produto por meio de cromatografia com o uso do Biotage® Isolera™. Os compostos foram avaliados individualmente para escolha da melhor fase móvel. Ao final da purificação, os produtos ácido (3-nitro-5-(fenoxicarbonil)fenil)borônico (**17**), ácido (3-nitro-5-((piridin-3-iloxi)carbonil)fenil)borônico (**18**) e ácido (3-((4-cloro-3-nitrofenoxi)carbonil)-5-nitrofenil)borônico (**19**) foram obtidos com rendimentos variando entre 12 a 15%.

3.4.3 Reação de Claisen-Schmidt para obtenção de chalconas

Para obtenção dos derivados de chalconas realizou-se a reação de Claisen-Schmidt entre as respectivas cetonas funcionalizadas e os aldeídos, com uso de hidróxido de sódio (NaOH) como base e etanol (EtOH) como solvente (Figura 9).

Figura 9. Metodologia sintética para obtenção das chalconas.



Procedimento experimental

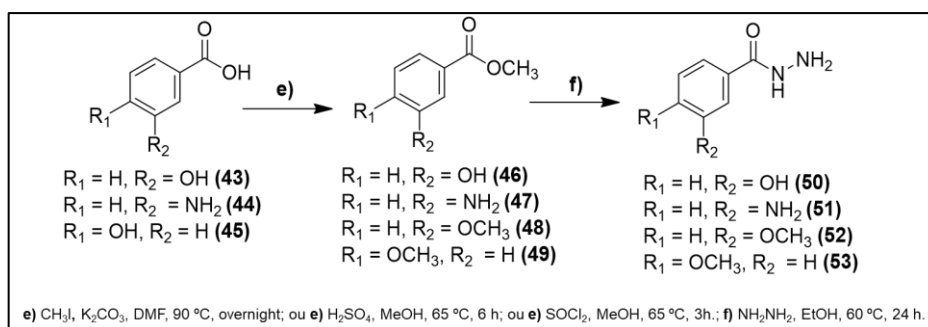
Para obtenção do intermediário 1-(3-metoxifenil)etan-1-ona (22), adicionou-se em um balão de fundo redondo de 25 mL, 400 mg (3 mmol) do reagente 3-hidroxiacetofenona (20), 1g (0,7 mmol) de carbonato de potássio (K₂CO₃) e 8 mL de DMF anidro. A mistura reacional foi mantida sob agitação e temperatura ambiente por 30 minutos. Após esse tempo, adicionou-se 500 µL (8 mmol) do reagente iodo metano (21). A mistura reacional foi mantida sob agitação e temperatura de 90 °C durante pelo menos 12 horas (*overnight*). O acompanhamento reacional foi feito por CCD utilizando hexano:acetato de etila como fase móvel e revelação sob luz ultravioleta (254 nm) até que o consumo dos reagentes indicasse o término da reação. Ao final da reação o meio reacional foi diluído com 150 mL de acetato de etila para extração líquido/líquido. A fase orgânica foi lavada três vezes com 80 mL de água destilada. Posteriormente a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e a solução filtrada. Em seguida o solvente foi evaporado a pressão reduzida levando a obtenção de um óleo amarelo, o intermediário (22), puro, com rendimento de 60%.

Para obtenção das chalconas ácido (*E*)-(3-(3-oxo-3-fenilprop-1-en-1-il)fenil)borônico, ácido (*E*)-(3-(3-(3-hidroxifenil)-3-oxoprop-1-en-1-il)fenil)borônico, ácido (*E*)-(3-(3-(3-hidroxifenil)-3-oxoprop-1-en-1-il)fenil)borônico, ácido (*E*)-(3-(3-(3-hidroxifenil)-3-oxoprop-1-en-1-il)fenil)borônico e ácido (*E*)-(3-(3-(3,4-dimetoxifenil)-3-oxoprop-1-en-1-il)fenil)borônico, ácido (*E*)-(3-(3-(4-bromo-2-hidroxifenil)-3-oxoprop-1-en-1-il)fenil)borônico e ácido (*E*)-(3-(3-(4-bromo-2-metoxifenil)-3-oxoprop-1-en-1-il)fenil)borônico (**31** - **38**), ácido (*E*)-(4-(3-oxo-3-fenilprop-1-en-1-il)fenil)borônico, ácido (*E*)-(4-(3-(3-hidroxifenil)-3-oxoprop-1-en-1-il)fenil)borônico, ácido (*E*)-(4-(3-(3-aminofenil)-3-oxoprop-1-en-1-il)fenil)borônico, ácido (*E*)-(4-(3-(3-metoxifenil)-3-oxoprop-1-en-1-il)fenil)borônico, ácido (*E*)-(4-(3-(3-bromofenil)-3-oxoprop-1-en-1-il)fenil)borônico e ácido (*E*)-(4-(3-(3,4-dimetoxifenil)-3-oxoprop-1-en-1-il)fenil)borônico (**31'** - **36'**), ácido (*E*)-(3-(3-(3-aminofenil)-3-oxoprop-1-en-1-il)-5-nitrofenil)borônico (**40**) e (*E*)-1-(3-metoxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona (**42**), em um balão de fundo redondo de 10 mL preparou-se uma solução de NaOH (1M) em meio de etanólico e adicionou-se as respectivas cetonas funcionalizadas (**24** - **30**) (1 eq.mol⁻¹). Em seguida, os respectivos aldeídos (**23**), (**23'**), (**39**) e (**41**) (1 eq.mol⁻¹) foram solubilizados em 4 mL de EtOH e adicionados gota a gota ao meio reacional. A reação foi mantida sob agitação em temperatura ambiente por 24 até 36 h. O acompanhamento reacional foi feito por CCD utilizando hexano:acetato de etila como fase móvel e revelação sob luz ultravioleta (254 nm) até que o consumo dos reagentes indicasse o término da reação. Ao final da reação, o pH do meio reacional foi ajustado com uso de uma solução de ácido clorídrico (HCl) 10% e vertido em gelo em um béquer. O béquer contendo o precipitado formado foi mantido em refrigeração *overnight*. O precipitado foi filtrado com uso de um funil de Büchner e lavado com água gelada. A última etapa consistiu na purificação de cada produto por meio de cromatografia em coluna de bancada. Os compostos foram avaliados individualmente para escolha da melhor fase móvel, sendo esta sempre com o uso dos solventes acetato de etila e e hexano. Ao final da purificação, os produtos (**31** - **38**), (**31'** - **36'**), (**40**) e (**42**) foram obtidos com rendimentos variando entre 20 a 40 %.

3.4.4 Reações para obtenção dos derivados de N-acil-hidrazonas

Para obtenção dos derivados de N-acil-hidrazona realizou-se a reação entre as respectivas hidrazidas funcionalizadas e os aldeídos com uso de ácido acético (CH₃COOH) como catalisador e etanol (EtOH) como solvente (Figura 11). Para a síntese de algumas hidrazidas funcionalizadas realizou-se primeiramente uma reação de esterificação no respectivo reagente de ácido carboxílico e em seguida, a reação com hidrazina levando a obtenção da hidrazida (Figura 10).

Figura 10. Metodologia sintética para obtenção das hidrazidas funcionalizadas



Procedimento experimental

Para obtenção do intermediário 3-hidroxibenzoato de metila (**46**), adicionou-se em um balão de 25 mL, 500 mg do reagente ácido 3-hidroxibenzoico (**43**) (3 mmol), 400 μL (7 mmol) de ácido sulfúrico (H_2SO_4) e 8 mL de metanol (MeOH). A reação foi mantida sob agitação e temperatura de 65 $^\circ C$ durante 6 h. O acompanhamento reacional foi feito por CCD utilizando hexano:acetato de etila como fase móvel e revelação sob luz ultravioleta (254 nm) até que o consumo dos reagentes indicasse o término da reação. Ao final da reação o solvente foi evaporado a pressão reduzida e o meio reacional diluído com 150 mL de acetato de etila para extração líquido/líquido. Realizou-se uma extração, adicionando solução de bicarbonato de sódio até a total neutralização do excesso de H_2SO_4 . Posteriormente a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e a solução filtrada. Em seguida o solvente foi evaporado a pressão reduzida levando a obtenção de um sólido branco, o intermediário (**46**) puro com rendimento de 70%.

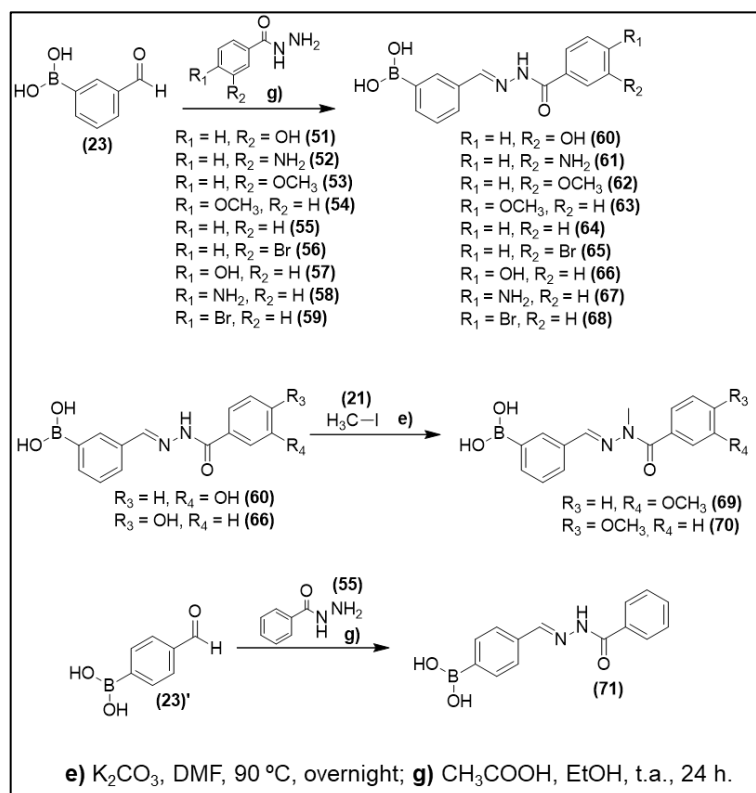
Para obtenção do intermediário 3-metil aminobenzoato (**47**) adicionou-se em um balão de 25 mL, 500 mg do reagente ácido 3-aminobenzoico (**44**) (3 mmol) e 8 mL de MeOH anidro. A reação foi mantida sob agitação a temperatura ambiente e adicionada em banho de gelo. Após o balão estar em banho de gelo, adicionou-se 300 μL (7 mmol) de cloreto de tionila ($SOCl_2$) e a reação foi mantida no banho de gelo, sob constante agitação, durante 15 minutos. Após esse tempo a reação foi mantida a temperatura ambiente por mais 15 minutos e por fim, colocada sobre temperatura de 65 $^\circ C$ durante 3 h. O acompanhamento reacional foi feito por CCD utilizando hexano:acetato de etila como fase móvel e revelação sob luz ultravioleta (254 nm) até que o consumo dos reagentes indicasse o término da reação. Ao final da reação o solvente foi evaporado a pressão reduzida e o meio reacional diluído com 150 mL de acetato de etila para obtenção do sal formado. O sal foi filtrado por funil de Büchner e lavado com acetato de etila gelado. Para obtenção do composto na sua forma neutra, realizou-se posteriormente uma extração quimicamente ativa, adicionando solução de bicarbonato de sódio. Posteriormente a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e a solução filtrada. Em seguida o solvente foi evaporado a pressão reduzida levando a obtenção de óleo amarelo, o intermediário (**48**), puro, com rendimento de 70%.

Para obtenção dos intermediários 3-metoxibenzohidrazida (**48**) e 4-metil metoxibenzoato (**49**), adicionou-se em um balão de fundo redondo de 25 mL, 1 eq.mol⁻¹ dos respectivos compostos hidroxilados (**43**) e (**45**), 2 eq.mol⁻¹ de K_2CO_3 e 8 mL de DMF anidro. A mistura reacional foi mantida sob agitação e temperatura ambiente por 30 minutos. Após esse tempo, adicionou-se 2 eq.mol⁻¹ do

reagente iodo metano (**21**). A mistura reacional foi mantida sob agitação e temperatura de 90 °C durante pelo menos 12 horas (*overnight*). O acompanhamento reacional foi feito por CCD utilizando hexano:acetato de etila como fase móvel e revelação sob luz ultravioleta (254 nm) até que o consumo dos reagentes indicasse o término da reação. Ao final da reação o meio reacional foi diluído com 150 mL de acetato de etila para extração líquido/líquido. A fase orgânica foi lavada três vezes com 80 mL de água destilada. Posteriormente a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e a solução filtrada. Em seguida o solvente foi evaporado a pressão reduzida levando a obtenção dos produtos de interesse (**48**) e (**49**), ambos sólidos brancos com rendimentos de 80 e 85%.

Para obtenção dos intermediários 3-hidroxibenzohidrazida (**50**), 3-aminobenzohidrazida (**51**), 3-metoxibenzohidrazida (**52**) e 4-aminobenzohidrazida (**53**), adicionou-se em um balão de 10 mL os respectivos ésteres (**46 - 49**) (1 eq.mol⁻¹), 10 eq.mol⁻¹ de hidrato de hidrazina e 8 mL de EtOH. A reação foi mantida sob agitação e temperatura de 80 °C durante 8-24 h. O acompanhamento reacional foi feito por CCD utilizando hexano:acetato de etila como fase móvel e revelação sob luz ultravioleta (254 nm) até que o consumo dos reagentes indicasse o término da reação. Ao final da reação o solvente foi evaporado a pressão reduzida e o meio reacional diluído com 150 mL de acetato de etila para extração líquido/líquido. A fase orgânica foi lavada três vezes com 80 mL de água destilada. Posteriormente a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e a solução filtrada. Em seguida o solvente foi evaporado a pressão reduzida levando a obtenção dos produtos de interesse (**50- 53**) com rendimentos entre 40 e 60%.

Figura 11. Metodologia sintética para obtenção dos derivados de N-acil-hidrazonas



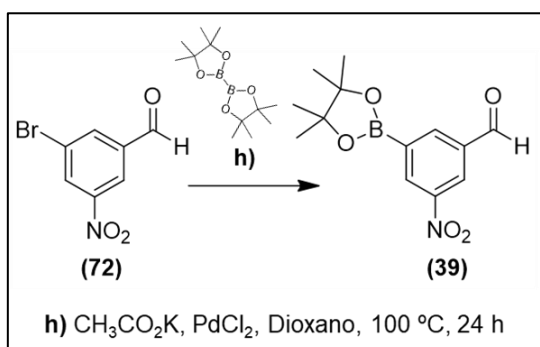
Procedimento experimental

Para obtenção dos derivados de N-acil-hidrazona ácido (E)-3-((2-benzoilhidrazono)metil)fenil)borônico, ácido (E)-3-((2-(3-hidroxibenzoil)hidrazono)metil)fenil)borônico, ácido (E)-3-((2-(3-aminobenzoil)hidrazono)metil)fenil)borônico, ácido (E)-3-((2-(3-metoxibenzoil)hidrazono)metil)fenil)borônico, ácido (E)-3-((2-(3-bromobenzoil)hidrazono)metil)fenil)borônico, ácido (E)-3-((2-(4-hidroxibenzoil)hidrazono)metil)fenil)borônico, ácido (E)-3-((2-(4-aminobenzoil)hidrazono)metil)fenil)borônico, ácido (E)-3-((2-(4-metoxibenzoil)hidrazono)metil)fenil)borônico, ácido (E)-3-((2-(4-bromobenzoil)hidrazono)metil)fenil)borônico e ácido (E)-4-((2-benzoilhidrazono)metil)fenil)borônico (**60 - 68**), adicionou-se em um balão de 10 mL as respectivas N-acil-hidrazidas (**51 - 59**) (1 eq.mol⁻¹), o reagente ácido (3-formilfenil)borônico (**23**) (1 eq.mol⁻¹), 6 mL de EtOH e 4 gotas de ácido acético. A reação foi mantida sob agitação e temperatura ambiente durante 24 h. O acompanhamento reacional foi feito por CCD utilizando hexano:acetato de etila como fase móvel e revelação sob luz ultravioleta (254 nm) até que o consumo dos reagentes indicasse o término da reação. Após o termino da reação, o meio reacional foi vertido em um béquer com gelo. O béquer contendo o precipitado formado foi mantido em refrigeração overnight. O precipitado foi filtrado com uso de um funil de Büchner e lavado com água gelada para obtenção dos compostos finais puros (**60 - 68**), todos sólidos brancos, com rendimento médio de 60%. A síntese do composto final (**71**) foi realizada da maneira anteriormente descrita (metodologia **g**), alterando apenas o reagente borônico, sendo este o ácido (4-formilfenil)borônico (**23**)'. Para obtenção dos compostos finais (**69**) e (**70**) realizou-se uma reação de metoxilação dos derivados hidroxilados de N-acil-hidrazonas (**60**) e (**66**), com uso de iodometano, sendo esta metodologia anteriormente descrita (metodologia **e**).

3.4.5 Borilação de Miyaura

Para obtenção dos derivados contendo o grupo nitro substituído no anel benzênico, realizou-se uma reação de Borilação de Miyaura para substituição do átomo de bromo por grupo dioxaborolano (Figura 12).

Figura 12. Metodologia sintética para obtenção dos derivados borilados.



Procedimento experimental

Para obtenção do intermediário 3-nitro-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)benzaldeído (**39**), adicionou-se em um balão de fundo redondo de 25 mL, 300 mg (1 mmol) do reagente 3-bromo-5-nitrobenzaldeído (**72**), 670 mg (2 mmol) do reagente bis(pinacolato)diboro, 200 mg (2 mmol) de acetato de potássio (CH₃CO₂K), 40 mg (0,25 mmol) de cloreto de paládio (PdCl₂) e 8 mL de dioxano anidro. A reação foi mantida sob agitação e temperatura de 100 °C durante 24 h. O acompanhamento reacional foi feito por CCD utilizando hexano:acetato de etila como fase móvel e revelação sob luz ultravioleta (254 nm) até que o consumo dos reagentes indicasse o término da reação. Ao final da reação o solvente foi evaporado a pressão reduzida e o meio reacional diluído com 200 mL de metanol para filtração por celite. Após a filtração para remoção do catalisador, o filtrado foi evaporado a pressão reduzida e o meio reacional diluído com 150 mL de acetato de etila para extração líquido/líquido. A fase orgânica foi lavada três vezes com 80 mL de água destilada. Posteriormente, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e a solução filtrada. Em seguida o solvente foi evaporado a pressão reduzida levando a obtenção de um sólido marrom. A última etapa consistiu na purificação do composto por meio de cromatografia com o uso do Biotage® Isolera™. Ao final da purificação, o intermediário (**39**) foi obtido com rendimento de 55%.

3.5 ENSAIOS DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA

Os compostos sintetizados foram avaliados através de estudos enzimáticos afim de identificar sua capacidade de inibição da proteína alvo do estudo, a protease principal de SARS-CoV-2 (3CL^{pro}) além da outra protease do vírus, a PL^{pro}. Os ensaios foram realizados pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Rafael V. C. Guido, da Universidade de São Paulo (USP), São Carlos, Brasil. Os compostos foram solubilizados em DMSO e avaliados no ensaio pontual de inibição na concentração de 40 µM para ambas as proteases.

3.5.1 Ensaio de inibição de 3CL^{pro} de SARS-CoV-2

O clone da enzima Mpro foi realizada pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Rafael V. C. Guido, da Universidade de São Paulo (USP), São Carlos, Brasil, utilizando o modelo de cDNA viral (GenBank MT126808.1), gentilmente cedido pelo Dr. Edison Durigon (Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil), este foi utilizado como molde para a amplificação da região alvo a partir de iniciadores específicos para a região codificadora de Mpro (resíduos 3264-3569), na região N terminal foi inserida uma calda 6XHis-tag seguido por um sítio de clivagem de protease TEV (ENLYFQ ↓ GAM). Usando o método LIC, esse gene foi inserido no plasmídeo pET_M11, esses plasmídeos foram transformados em células DH5α E. coli competentes, os clones positivos foram selecionados e confirmados. Para a produção de proteína, células E. coli BL21 foram transformadas com os respectivos plasmídeos e cultivados em meio auto-indutor ZYM-5052, acrescido de 1 mM do antibiótico canamicina a 37 °C e 200 RPM até uma densidade ótica a 600 nm de 0,8, seguido por expressão a 18 °C, 200 RPM por 16 h. As células foram separadas do meio por centrifugação a 5.000 x g por 40 min a 4 °C, ressuspensas em tampão de lise (20 mM Tris pH 7,8, 150 mM NaCl, 1

mM DTT), rompidas por sonicação e o lisado foi *separado* por centrifugação a 12.000 x g por 30 min a 4°C. A enzima Mpro foi purificada em 4 etapas, a calda 6XHis-tag não auxiliou no processo de purificação pois sofreu autoclivagem durante a expressão. O primeiro passo utilizado foi afinidade em resina de níquel *para separar* a calda e uma pequena parcela de proteínas não clivadas. A fração não ligada foi então submetida ao processo de precipitação com 1 M de Sulfato de Amônio, o precipitado foi *separado* por centrifugação a 12.000 x g por 30 min a 4°C, ressuspendido em tampão de gel filtração (20 mM Tris pH 7,8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) e purificado por cromatografia de exclusão molecular usando uma coluna HiLoad Superdex 200 26/1000 (GE Healthcare). Após a cromatografia de exclusão molecular, o tampão da proteína foi trocado por 20 mM Tris pH 8,0, 1 mM DTT e, em seguida, injetada em uma coluna Mono-Q 5/50 GL (GE Healthcare). A proteína foi eluída usando um gradiente linear de tampão contendo 20 mM Tris pH 8,0, 1 M NaCl e 1 mM DTT. Os ensaios enzimáticos de inibição foram realizados usando como concentração final por reação, 20 µM do substrato FRET DABCYL-KTSAVLQ ↓ SGFRKM-E (EDANS) -NH₂, 0,015 µM da proteína Mpro e os potenciais inibidores foram testados inicialmente a uma concentração de 10 µM. A reação foi conduzida em tampão de reação (20 mM Tris pH 7,3, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,01% Triton) e incubada com cada potencial inibidor a 37°C por 10 min, após a incubação o substrato foi adicionado e a atividade enzimática medida pela fluorescência em leitor de microplacas SpectraMax Gemini EM (λ excitação / λ emissão de 360/460 nm) a cada 30 s durante 30 min. Os compostos que mostraram inibição superior a 80% em relação a atividade da enzima nativa foram submetidos a ensaios de determinação do valor de IC₅₀.

3.5.2 Ensaio de inibição de PL^{pro} de SARS-CoV-2

O clone da enzima PL^{pro} foi feito por colaboradores do grupo do Prof. Dr. Rafael V. C. Guido, da Universidade de São Paulo (USP), São Carlos, Brasil, utilizando o modelo de cDNA viral (GenBank MT126808.1), este foi utilizado como molde para a amplificação da região alvo a partir de iniciadores específicos *para* a região codificadora de PL^{pro} (resíduos 1564-1879), na região C-terminal foi inserida uma calda 6XHis-tag. Usando o método de enzimas de restrição, esse gene foi inserido no plasmídeo pET_{28a}. *Para* a produção de proteína, células E. coli BL21 foram transformadas com os respectivos plasmídeos e cultivados primeiramente em 5 mL de meio LB (Lysogen Broth), contendo os antibióticos canamicina (50µg/mL) e clorafenicol (34µg/mL). Esse meio com saturação de células foi então inoculado em 1 L de meio de cultura LB suplementado com os mesmos antibióticos nas mesmas proporções, este foi incubado a 37 °C sob agitação de 200 rpm até atingir a DO entre 0,6 e 0,8. Nesse momento foi adicionado 0,5 mM de IPTG (isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo) utilizado *para* induzir a expressão, essa que foi realizada a temperatura de 18 °C em agitação de 200 rpm por aproximadamente 16 h. A purificação da enzima PL^{pro} foi padronizada utilizando a estratégia de afinidade da calda de histidina pela coluna de níquel. Após o período de expressão, as células foram *separadas* do meio por centrifugação a 5.000 x g por 40 min a 4°C, ressuspendidas em tampão de lise (50 mM Tris pH 8,5, 150 mM NaCl, 10 mM imidazol e 1 mM DTT), rompidas por sonicação e o lisado foi *separado* por centrifugação a 12.000 x g por 30 min a 4°C, o sobrenadante foi utilizado na primeira etapa de purificação. A suspensão solúvel contendo o pull de

proteínas foi então levada a primeira etapa de purificação por afinidade em coluna de níquel do tipo His-trap HP e eluída com o tampão de eluição (50 mM Tris pH 8,5, 150 mM NaCl, 250 mM imidazol e 1 mM DTT). Para garantir uma boa razão de pureza foi realizada subsequente uma etapa de gel filtração em coluna do tipo superdex 75 (Tampão da gel filtração: 50 mM Hepes pH 7,4, 100 mM NaCl, e 1 mM DTT). Os ensaios enzimáticos de inibição foram realizados usando como concentração final por reação, 20 μ M do substrato FRET-peptide Abz-TLKGG APIKEDDPS-EDDnp, o ensaio foi padronizado utilizando 70 nM da enzima PLpro e os potenciais inibidores foram testados inicialmente a uma concentração de 10 μ M. A reação foi carregada em tampão de reação (50 mM HEPES pH 7,5, 5 mM DTT, 0,01% Triton) e incubada com cada potencial inibidor a 37°C por 30 min, após a incubação o substrato foi adicionado e a atividade enzimática medida pela fluorescência em leitor de microplacas SpectraMax Gemini EM (λ excitação / λ emissão de 320/420 nm) a cada 30 s durante 30 min. Todos os compostos que mostraram inibição superior a 80% em relação a atividade da enzima nativa foram submetidos a ensaios de IC_{50} . Para as medidas de IC_{50} , diferentes amostras de reação foram pré-incubadas com diferentes concentrações dos inibidores pré-selecionados (Seriada 1/2 partindo de 40 μ M até 11 nM) a 37° C por 30 min. A diluição do composto foi feita em DMSO e reações controle contendo o mesmo volume de DMSO sem a presença do inibidor foram realizadas na presença e ausência da proteína. As medidas de fluorescência foram realizadas no leitor de microplacas SpectraMax Gemini EM utilizando o mesmo λ excitação / λ emissão mencionado anteriormente, a cada 30 s durante 30 min a 37° C. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e as velocidades iniciais foram derivadas da inclinação da fase linear de cada reação. O gráfico de inibição e o valor de IC_{50} foi obtido usando Origin Pro 9.5.1 Software (OriginLab).

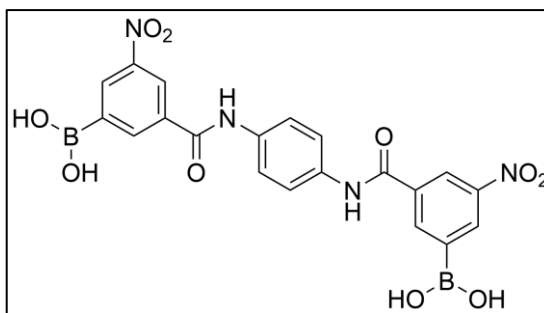
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2 ANCORAMENTO MOLECULAR

4.1.1 Planejamento dos compostos

Com base nos resultados obtidos do estudo de Bacha e colaboradores (2004) o composto FL-166 (Figura 13) apresentou uma potente inibição frente a protease principal de SARS-CoV ($K_i = 40$ nM) e foi selecionado como protótipo desse projeto.

Figura 13. FL-166, um derivado de ácido borônico, inibidor da 3CL^{pro} de SARS-CoV.



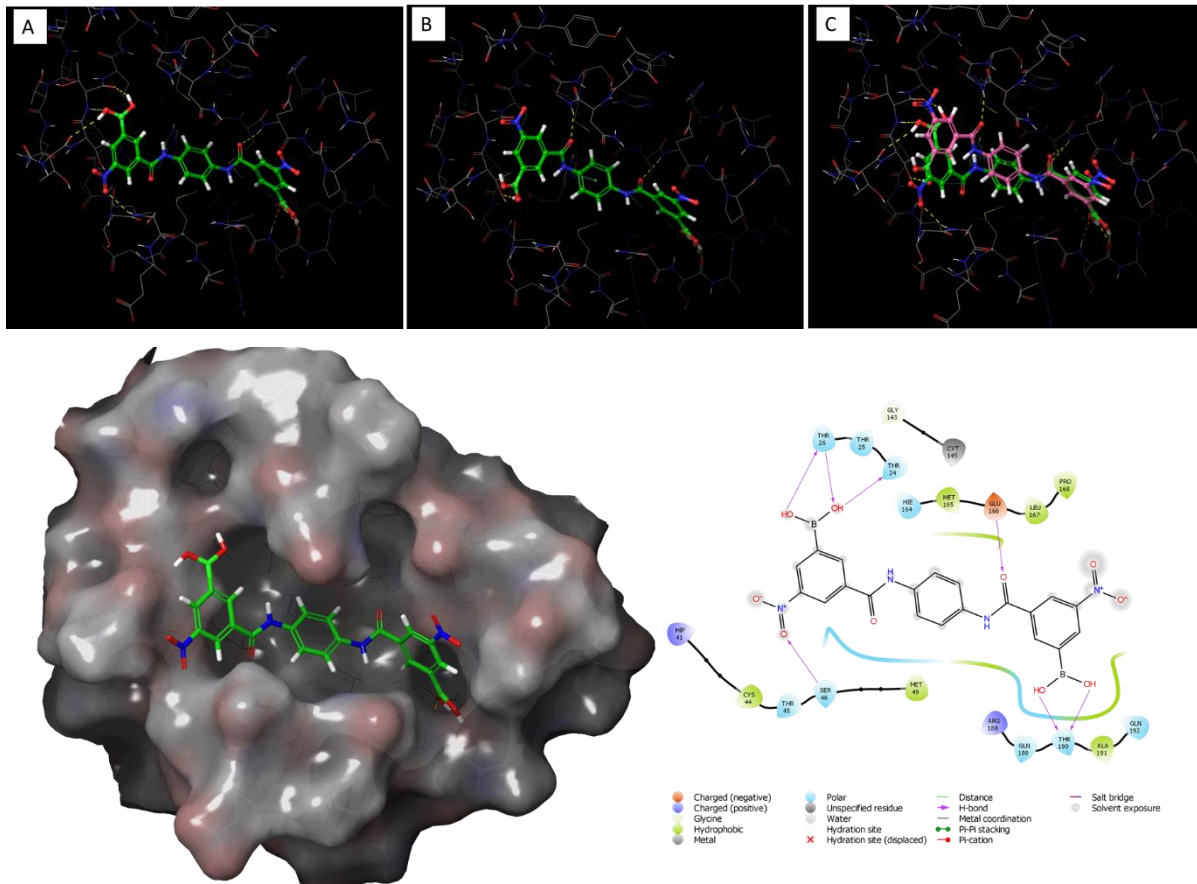
Fonte: Bacha, et al. (2004).

Estudos preliminares de modelagem molecular foram realizados para melhor compreensão das interações que esse composto seria capaz de realizar no sítio de 3CL^{pro} de SARS-CoV-2 com base no modelo computacional e identificar regiões passíveis de otimização estrutural.

Foram geradas 10 poses da estrutura FL-166 que mantiveram uma grande semelhança na ocupação da cavidade da protease principal do SARS-CoV-2 (Figura 14 – C). Duas poses principais foram observadas, uma em que ambos os grupos ácido borônico e nitro realizam interações de hidrogênio com resíduos de aminoácidos da protease, sendo esta pose de maior energia (DS = -7.89) (Figura 14 – A) e na segunda pose, apenas o ácido borônico realiza interações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos e o grupo nitro mantém-se exposto ao solvente (DS = -7.83). Em ambas as poses, as hidroxilas dos ácidos borônicos conseguem realizar interações de hidrogênio com a cadeia lateral das treoninas (Thr-25 e Thr-190) em duas regiões opostas da protease (Figura 14). Os ácidos borônicos são relatados por formarem interações do tipo covalente reversível com treoninas, mecanismo pelo qual o fármaco Bortezomib® atua. Uma hipótese é que esse tipo de interação covalente reversível pudesse ser formada entre o ácido borônico e uma das treoninas do sítio catalítico de 3CL^{pro}. Desta forma, acredita-se que sejam interações fundamentais que devem ser preservadas nos derivados de ácidos borônicos.

Em ambas as poses oxigênio das carbonila de um dos grupos amida participa de interações de hidrogênio com os resíduos de ácido glutâmico (Glu-166). Por fim, na pose representada em Figura 17 – B, observa-se a formação de uma ligação de hidrogênio entre o outro oxigênio do grupo amida e um resíduo de glicina (Gly-143) e interações do tipo $\pi\pi$ staking e cátion- π entre o anel benzênico central da estrutura química e a histidina catalítica (His-41).

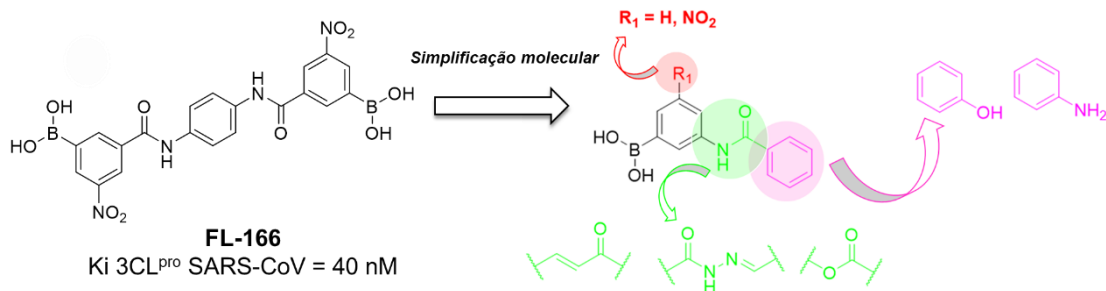
Figura 14. Docking da molécula FL-166 na protease principal de SARS-CoV-2. Os tracejados em amarelo representam as interações entre os grupos químicos e os resíduos de aminoácidos. A) Pose de melhor energia obtida (DS = -7.89). B) Pose da segunda melhor energia obtida (DS = -7.83). C) Sobreposição entre as poses.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Com base nos resultados preliminares obtidos no experimento de modelagem molecular, modificações estruturais foram propostas tendo a molécula FL-166 como protótipo, com objetivo de planejar novos derivados contendo a função ácido borônico em sua estrutura (Figura 15).

Figura 15. Modificações estruturais propostas no protótipo FL-166.



Com base na estratégia de simplificação molecular, o objetivo foi gerar moléculas de menor peso molecular, considerando os derivados de amidas e ésteres como possíveis fragmentos para o

reconhecimento do sítio ativo de 3CL^{pro} tendo como base os resultados obtidos no estudo de Bacha e colaboradores (2004). Além disso, o grupamento amida do protótipo também foi substituído pelos grupos *N*-acil hidrazona e carbonila alfa-beta insaturada (chalconas), estruturas muito exploradas em moléculas não peptídicas como inibidoras de cisteíno proteases, como por exemplo a cisteíno protease de *Trypanosoma cruzi* (cruzaina) (Oliveira *et al.*, 2022; Mahapatra *et al.*, 2015), *Leishmania infantum* (cisteína proteinase B – CPB) (Clementino *et al.*, 2021; Mahapatra *et al.*, 2015) e de *Plasmodium falciparum* (falcipaina) (Li Qin *et al.*, 2020). Além disso, as carbonilas alfa-beta insaturadas foram relatadas em um estudo anterior por sua capacidade de inibição frente a protease principal de SARS-CoV, em diferentes chalconas de produtos naturais, com valores de IC₅₀ entre 10 até 50 µM (Park *et al.*, 2016). Em um estudo recente, Alaaeldin e colaboradores (2022) planejaram e sintetizaram um composto híbrido de ciprofloxacino com uma chalcona, com valor de IC₅₀ de 0,6 µM frente a 3CL^{pro} de SARS-CoV-2 (Alaaeldin *et al.*, 2022).

O anel benzênico (destacado em rosa – Figura 15), teve como substituintes propostos inicialmente os anéis fenol e anilina, explorando a substituição desses grupos na posição *meta* e *para* do anel benzênico. O objetivo era fazer com que esses compostos fossem capazes de formar uma interação de hidrogênio com o resíduo de ácido glutâmico (Glu-166), da mesma forma que o protótipo FL-166 realiza. Esses grupos também foram explorados do ponto de vista sintético por permitirem um ponto de funcionalização adicional na molécula, permitindo otimizações futuras.

Foram propostos derivados com e sem o grupo nitro na estrutura com o objetivo de avaliar a real importância desse grupo na atividade de inibição da protease, considerando que os nitroaromáticos podem induzir efeitos de genotoxicidade/mutagenicidade.

O ácido borônico foi mantido na mesma posição que a do protótipo FL-166 e explorado apenas como um único grupo, com o objetivo de avaliar a necessidade de se manter os dois grupos. Como relatado anteriormente por Bacha e colaboradores (2004), as moléculas menores não apresentaram valores de K_i tão expressivos, porém, identificar esses fragmentos pode ser uma estratégia interessante para futuras otimizações. Por fim, avaliou-se por meio do *docking* molecular se o ácido borônico dos derivados propostos seriam capazes de realizar interações com as treoninas, assim como o protótipo FL-166.

Docking molecular das estruturas planejadas

A partir da estrutura geral do protótipo FL-166 foram planejados derivados de ésteres, amidas, *N*-acil hidrazonas e chalconas. Realizou-se modificações estruturais e substituições entre grupos bioisósteros visando a identificação de novos compostos capazes de inibir a 3CL^{pro} de SARS-CoV-2. O ancoramento (*docking*) molecular foi realizado buscando identificar quais possíveis estruturas seriam mais promissoras frente ao alvo de interesse, apresentando melhor complementaridade com a estrutura da protease e valores de *docking score* (DS) similares ou melhores que aquele identificado para o protótipo. Além disso, buscou-se compreender quais padrões de interação o ácido borônico apresentaria nesses compostos.

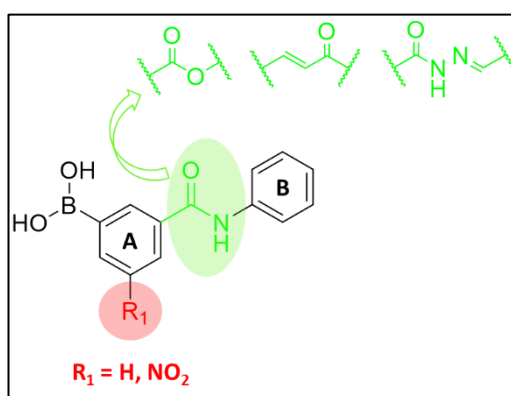
A modelagem molecular é constituída por um conjunto de ferramentas amplamente utilizadas no planejamento de fármacos com a finalidade de, baseado em um modelo computacional, auxiliar e

otimizar o processo de desenvolvimento de compostos bioativos através da compreensão das possíveis interações moleculares com o alvo de interesse (San'tanna, 2009; Barreiro *et al.*, 1997). As modificações buscaram abranger grupos capazes de proporcionar incremento nas interações através da exploração de regiões do sítio ativo da enzima em estudo. De forma complementar a análise visual, os valores de DS foram usados *para* auxiliar na seleção dos compostos *para* a etapa de síntese orgânica. O DS é função de pontuação empírica gerada pelo programa Glide que se relaciona com a energia livre de interação do ligante. Diferentes contribuições são levadas em consideração *para* gerar esse valor, como campo de força (interações eletrostáticas e de van der Waals) e penalidades ou contribuições que influenciam na interação entre o ligante e a enzima (FRIESNER *et al.*, 2006). Quanto menor seu valor, entende-se que as interações entre determinada pose do ligante e a enzima estão sendo mais favorecidas (Friesner *et al.*, 2006).

Avaliação do grupo nitro nas estruturas planejadas

Inicialmente o ancoramento molecular foi realizado com o objetivo de avaliar a necessidade da presença do grupo nitro nos derivados de amidas, ésteres, *N*-acil-hidrazonas e chalconas, bem como as interações que esse grupo estaria realizando com os aminoácidos do sítio ativo da protease. Para isso, planejou-se pequenas moléculas contendo um anel benzênico, denominado de anel A, substituído com um ácido borônico e um grupo nitro nas mesmas posições do protótipo FL-166. A outra série de compostos foi desenhada com um átomo de hidrogênio substituído no lugar do grupo nitro. O outro anel benzênico das estruturas, denominado de anel B, foi avaliado sem nenhuma substituição (Figura 16).

Figura 16. Modificações estruturais propostas com base no protótipo FL-166.

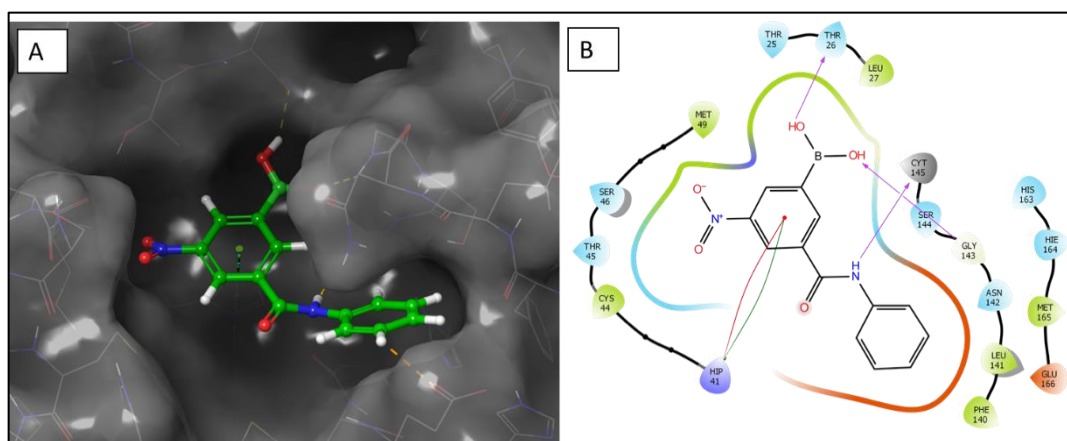


Os resultados demonstraram que para os derivados de amida, a presença do grupo nitro no anel benzênico foi essencial para que essas pequenas moléculas conseguissem adotar poses similares ao protótipo FL-166, em que o ácido borônico consegue realizar pelo menos uma interação de hidrogênio com as treoninas da tríade (Thr-24, Thr-25 e Thr-26). Porém, o nitro não realizou nenhum tipo de interação de hidrogênio, ficando apenas exposto ao solvente (Figura 17). Em contrapartida, a falta do grupo nitro na estrutura derivada de amida faz com o que o ácido borônico adote como pose preferencial uma interação de hidrogênio com uma cisteína (Cys-44) no bolsão inferior ao da tríade

de treoninas na protease. Destaca-se que em termos de energia, a substituição do grupo nitro pelo átomo de hidrogênio gerou uma diminuição no valor de DS de -4,57 para -4,79.

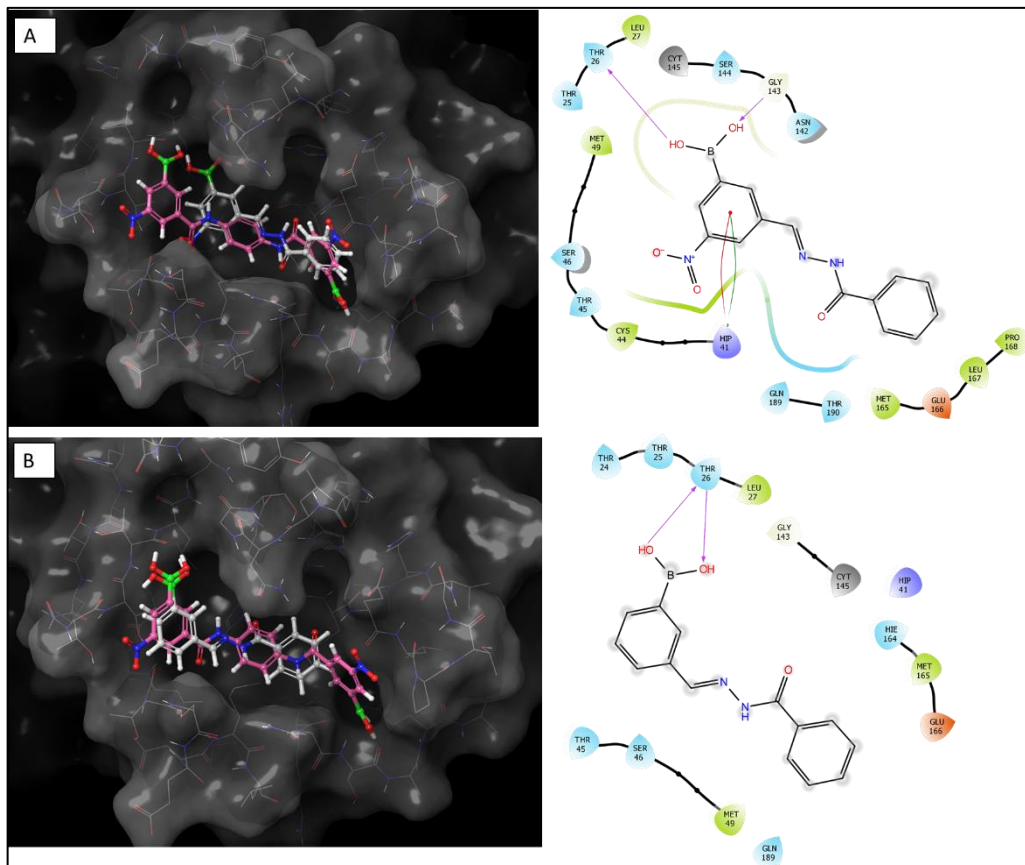
Os derivados contendo grupo éster apresentaram poses e valores de *docking score* similares aos derivados de amidas. Os derivados de éster que não continham o grupo nitro em suas estruturas geraram poses muito diversas, diferentes do protótipo FL-166 e sem um padrão definido. Com base nesses resultados, sugere-se que manter o grupo nitro na estrutura desses derivados possa favorecer melhores poses dentro do sítio ativo da protease, ainda que o grupo nitro não realize nenhum tipo de interação relevante com nenhum aminoácido.

Figura 17. A) Imagem 3D das interações entre o derivado de amida contendo o grupo nitro substituído no anel benzênico. B) Imagem 2D demonstrando as interações que esse composto realiza com o sítio da protease, sendo essas: ligação de hidrogênio (setas em roxo) com os resíduos de aminoácidos Thr-26, Cys-145, Gly-145 e interações do tipo π - π stacking e cátion- π (setas em verde e vermelho) entre o anel benzênico A e a histidina (Hip).



Quanto aos derivados da série das *N*-acil-hidrazonas, a presença do grupo nitro nas estruturas fez com que a incidência de poses permanecesse constante, normalmente com o ácido borônico no anel benzênico A fazendo pelo menos uma interação de hidrogênio com uma das treoninas da tríade (Thr-24, Thr-25 e Thr-26). Os derivados sem o grupo nitro na estrutura também foram capazes de apresentar poses muito semelhantes ao do protótipo FL-166. Em relação a energia, a substituição do grupo nitro pelo átomo de hidrogênio nessa série de compostos gerou uma diminuição no valor de DS de -2,93 para -3,47. A sobreposição entre os derivados de *N*-acil-hidrazonas com e sem grupo nitro e o protótipo FL-166 foi realizada (Figura 18). Observa-se que a pose adotada por ambos os compostos e o FL-166 é bastante semelhante (Figura 18). Por fim, nessa série de derivados, sugere-se que a presença do grupo nitro não influencia em maiores interações com a proteína e nem em melhores valores de DS.

Figura 18. Nas figuras A e B foram sobrepostos os derivados de N-acil-hidrazona (moléculas em branco) e FL-166 (molécula em rosa). A) O derivado de N-acil-hidrazona contendo o grupamento nitro realiza interações de hidrogênio (setas em roxo) com os resíduos de aminoácidos Thr-26 e Gly-143 e interações do tipo π - π stacking e cátion- π (setas em verde e vermelho) entre o anel benzênico A e a histidina (Hip). B) O derivado de N-acil-hidrazina sem o grupamento nitro realiza duas interações de hidrogênio (setas em roxo) com os resíduos de aminoácidos Thr-26.



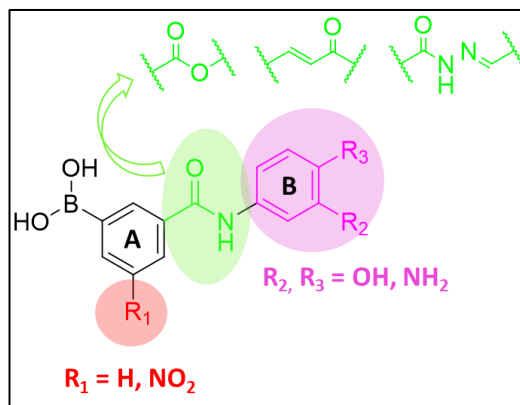
Os derivados de chalconas contendo o grupamento nitro foram os que apresentaram os maiores valores de energia, com poses similares ao do protótipo FL-166, em que o ácido borônico realiza duas interações de hidrogênio com o resíduo de Thr-26 da tríade (Thr-24, Thr-25 e Thr-26). Apesar disso, as poses preferenciais adotadas por essas moléculas apresentam uma torção dentro do sítio, que dentro do modelo computacional pode ser permitido, mas sugere-se que a rigidez e a conformação adotada por essas moléculas podem não favorecer uma boa interação com o alvo. Por fim, os derivados de chalconas que não apresentaram o grupamento nitro em suas estruturas, não conseguiram gerar boas poses e realizaram interações intermoleculares com outras regiões da protease. Os estudos de ancoramento molecular seguiram para essa série de compostos, com o objetivo de identificar modificações estruturais que permitissem uma melhor interação desse *scaffold* com o alvo.

Escolha da posição dos substituintes no anel benzênico B

Durante a etapa do planejamento das estruturas, objetivou-se explorar o anel benzênico B com grupamentos que fossem capazes de realizar interações de hidrogênio com a proteína e principalmente manter a interação de hidrogênio que o protótipo FL-166 realiza com o resíduo de

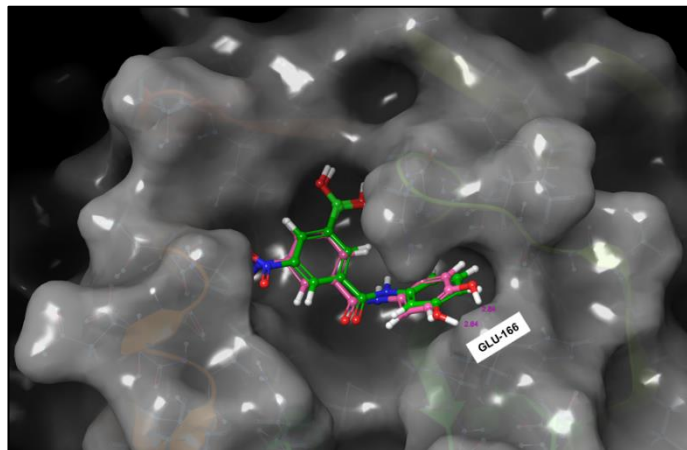
ácido glutâmico (Glu-166). Com isso, durante essa etapa de ancoramento molecular, explorou-se grupos mais simples como aminas e hidroxilas, para posteriormente identificar possibilidades de trocas bioisostéricas. Por fim, avaliou-se por meio do estudo computacional qual posição de substituição no anel benzênico B seria mais promissora para melhor definição dos compostos a serem sintetizados (Figura 19).

Figura 19. Modificações estruturais propostas com base no protótipo FL-166.



Para os derivados do grupo amida, investigou-se tanto a substituição com grupo nitro e sem nitro, uma vez que os resultados do estudo computacional anterior demonstraram que ao manter esse grupo, as moléculas apresentarem melhores poses dentro do sítio ativo. De maneira geral, a substituição do anel benzênico B com os grupos hidroxila ou amina, nas posições *orto* ou *para*, resultou em interações de hidrogênio com o resíduo de Glu-166 (Figura 20). Para os derivados do grupo éster, investigou-se os derivados apenas com grupo nitro, uma vez que apresentaram um melhor resultado no estudo de ancoramento anterior. Assim como as amidas, a substituição do anel benzênico B com os grupos hidroxila ou amina, nas posições *meta* ou *para*, resultou em interações de hidrogênio com o resíduo de Glu-166. Considerando os derivados de amidas e ésteres, o modelo computacional demonstrou que a substituição dos grupos OH e NH₂ em ambas as posições (*meta* ou *para*), fez com que as estruturas químicas apresentassem um comportamento similar dentro do sítio ativo da protease.

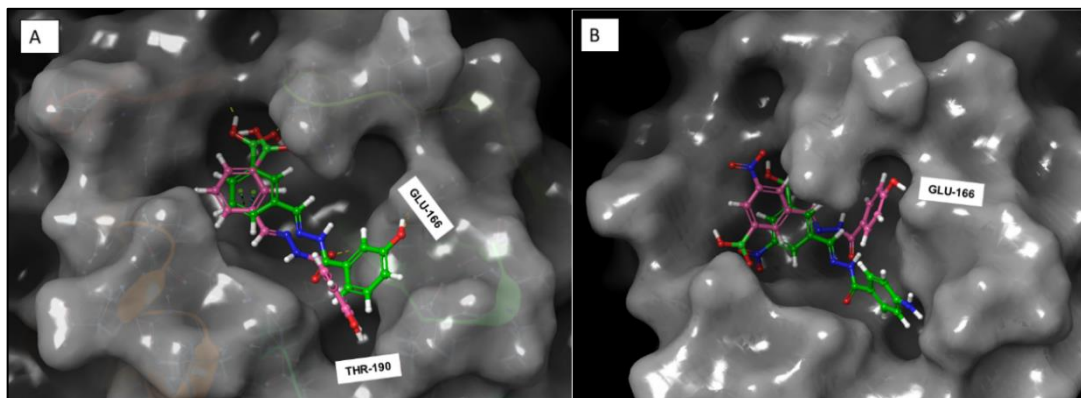
Figura 20. Sobreposição entre os derivados de amidas e 3CL^{pro} no sítio de SARS-CoV-2. A molécula em verde possui o grupo hidroxila substituído na posição *meta* do anel benzênico com uma distância de 2,64 Å (em roxo) do resíduo de Glu-166 e DS = -5,83. A molécula em rosa possui o grupo hidroxila substituído na posição *para* do anel benzênico com uma distância de 2,84 Å (em roxo) do resíduo de Glu-166 e DS = -5,14.



Quanto aos derivados de *N*-acil-hidrazona, foram selecionados os compostos com e sem grupo nitro em sua estrutura. As moléculas com grupo nitro substituído no anel benzênico A, apresentaram uma melhor pose e valor DS quando os grupos OH e NH₂ foram substituídos em *para* no anel benzênico B (Figura 21 – B). Quando esses grupos foram substituídos na posição *meta*, adquiriram poses muito diferentes do protótipo FL-166 e sugere-se que nesse caso, substituir os grupos nessa posição pode não ser tão efetivo quanto substituir os grupos OH e NH₂ na posição *para* do anel.

Nos derivados de *N*-acil-hidrazona que não possuíam o grupo nitro em sua estrutura, a substituição do grupo OH levou a obtenção poses muito variáveis dependendo do seu padrão de substituição. Na posição *meta*, o grupo OH foi mais efetivo em realizar interações com o resíduo de Glu-166, do que quando substituído em *para* (Figura 21 – A). O grupo NH₂, tanto nas posições *meta* e *para*, apresentou uma tendência de não realizar uma interação com o resíduo de Glu-166, mas, acessar outra região da protease e realizar uma interação com o resíduo de Thr-190 (Figura 21 – A).

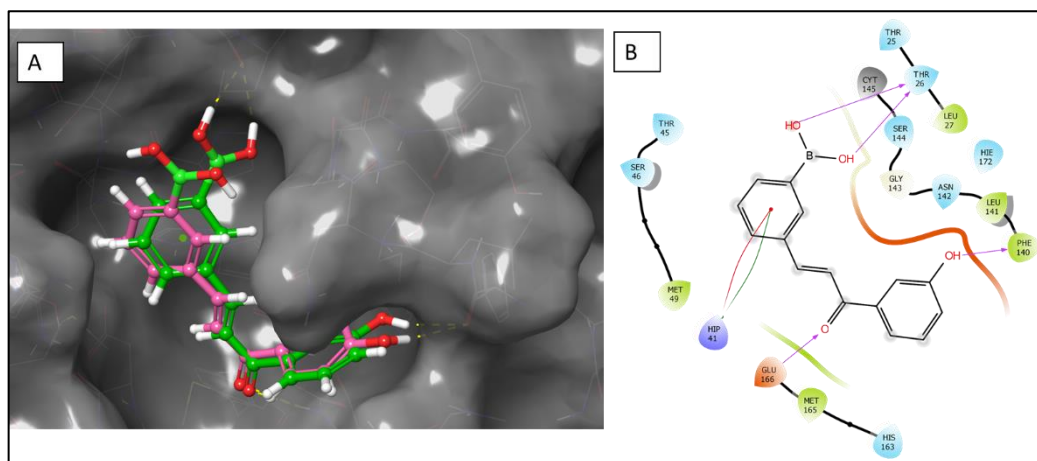
Figura 21 Sobreposição entre os derivados de N-acil-hidrazonas e 3CL^{pro} no sítio de SARS-CoV-2. A) A molécula em verde possui o grupo hidroxila na posição *meta* do anel benzênico e realiza uma interação de hidrogênio com o resíduo de Glu-166. A molécula em rosa possui o grupo amina na posição *para* do anel benzênico e realiza uma interação de hidrogênio com o resíduo de Thr-190. B) A molécula em verde possui o grupo amina na posição *para*, que não realiza interações efetivas com nenhum aminoácido da protease. A molécula em rosa possui o grupo hidroxila na posição *para* que realiza uma interação de hidrogênio com o resíduo de Glu-166.



Quanto aos derivados de chalconas foram selecionados os compostos com e sem grupo nitro em sua estrutura. De maneira geral, a presença do grupo nitro nessas estruturas teve um perfil muito semelhante ao das estruturas sem nitro, tanto em relação as poses adotadas quanto em relação ao valor de DS. Justamente por isso, sugere-se que para essa série de compostos seja mais vantajoso explorar uma maior quantidade de derivados sem a presença do grupo nitro, uma vez que as chalconas apresentam grande reatividade por serem aceptoras de Michael.

Quanto as posições *meta* e *para* do anel benzênico B, o grupo OH na posição *meta* levou a pose de melhor energia da série DS = -6,22, sendo que a interação com o resíduo de Glu-166 é feita pelo oxigênio da carbonila similar ao que o ocorre com a molécula do protótipo FL-166 (Figura 22). A hidroxila faz uma interação de hidrogênio com um resíduo de fenilalanina (Phe-140 (Figura 22)). Quando substituída na posição *para* do anel, suas poses se assemelham ao do outro derivado, porém, o ácido borônico não é capaz de realizar interações de hidrogênio com os resíduos de treonina da tríade (Thr-24, Thr-25 e Thr-26). As poses geradas para os derivados das chalconas, apesar dos valores de energia e boas interações com os aminoácidos do sítio, precisam ser olhadas com cuidado, uma vez que essa pose e orientação sugerida pode não ser adquirida pela molécula fora do modelo computacional. Os derivados substituídos com o grupo amina apresentaram poses muito distintas do protótipo e que, portanto, não puderam ser comparadas.

Figura 22. A) Sobreposição entre os derivados de cetonas alfa-beta insaturadas e 3CL^{pro} no sítio de SARS-CoV-2. A molécula em verde possui o grupo hidroxila na posição *meta* e a molécula rosa possui o grupo hidroxila na posição *para*. Em ambas as estruturas, os grupos hidroxila apresentaram uma tendência de realizar uma interação de hidrogênio com o resíduo de Phe-140 e o oxigênio das carbonilas uma interação de hidrogênio com o resíduo de ácido glutâmico (Glu-166). B) Figura 2D mostrando as interações entre o derivado de cetona alfa-beta insaturada com hidroxila na posição *meta* do anel benzênico (DS = 6,22).



Avaliação das estruturas planejadas frente a 3CL^{pro} de SARS-CoV-2

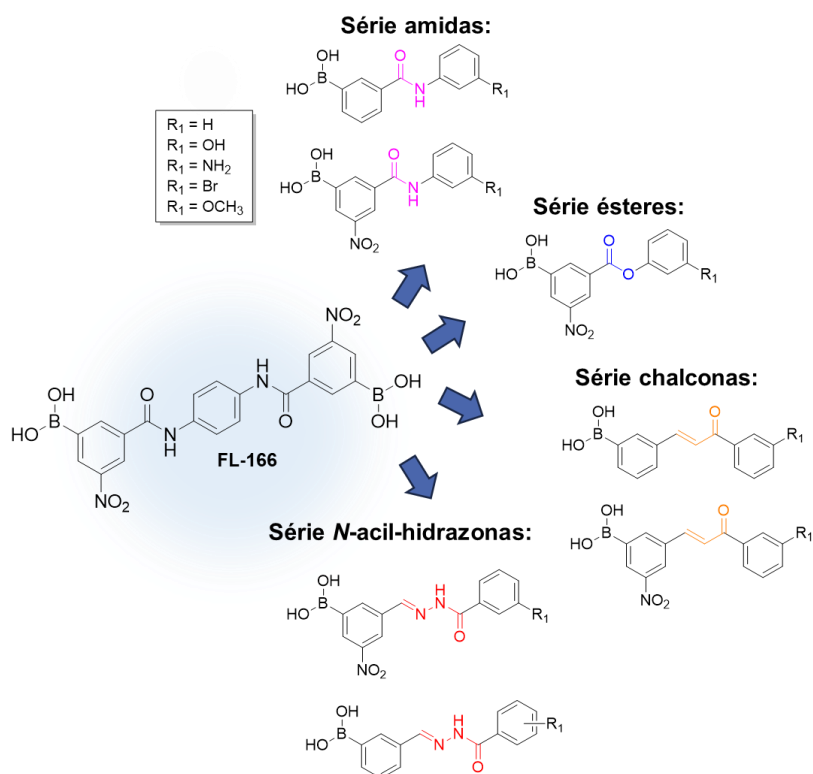
A realização do estudo *in silico* foi fundamental para seleção dos compostos a serem sintetizados. Com base nos resultados do estudo computacional, foram planejados derivados de amida com e sem grupo nitro substituído no anel A. Para os derivados de ésteres, selecionou-se apenas derivados com o grupo nitro substituído. Quanto o anel benzênico B, o estudo computacional demonstrou que a substituição de grupos como hidroxilas e aminas foram eficientes em realizar uma interação de hidrogênio com resíduo de Glu-166 tanto na posição *meta* quanto na posição *para*. Com o objetivo de reduzir o número de compostos a serem sintetizados, selecionou-se a síntese dos derivados na posição *meta* como ponto de partida. Esses compostos seriam primeiramente ensaiados nos estudos enzimáticos e posteriormente avaliaria-se a necessidade da síntese dos derivados substituídos na posição *para*.

Quanto as chalconas, optou-se por explorar uma pequena série de derivados contendo o grupo nitro no anel benzênico. Essa escolha foi motivada pela preocupação com a toxicidade que os compostos finais poderiam apresentar considerando combinação da reatividade do grupo aceptor de Michael das chalconas e do grupo nitro do anel aromático.

Para as *N*-acil-hidrazonas, o estudo computacional demonstrou que a presença do grupo nitro não resultou em nenhum fator diferencial ou contribuição efetiva de melhores poses e valores de DS. Com isso, preferiu-se explorar majoritariamente derivados sem o grupo nitro. Quanto a substituição de grupos no anel benzênico B, com base nos estudos computacionais priorizou-se a síntese de derivados na posição *meta* do anel B nas chalconas e as posições tanto em *meta* quanto em *para* nos derivados de *N*-acil-hidrazonas.

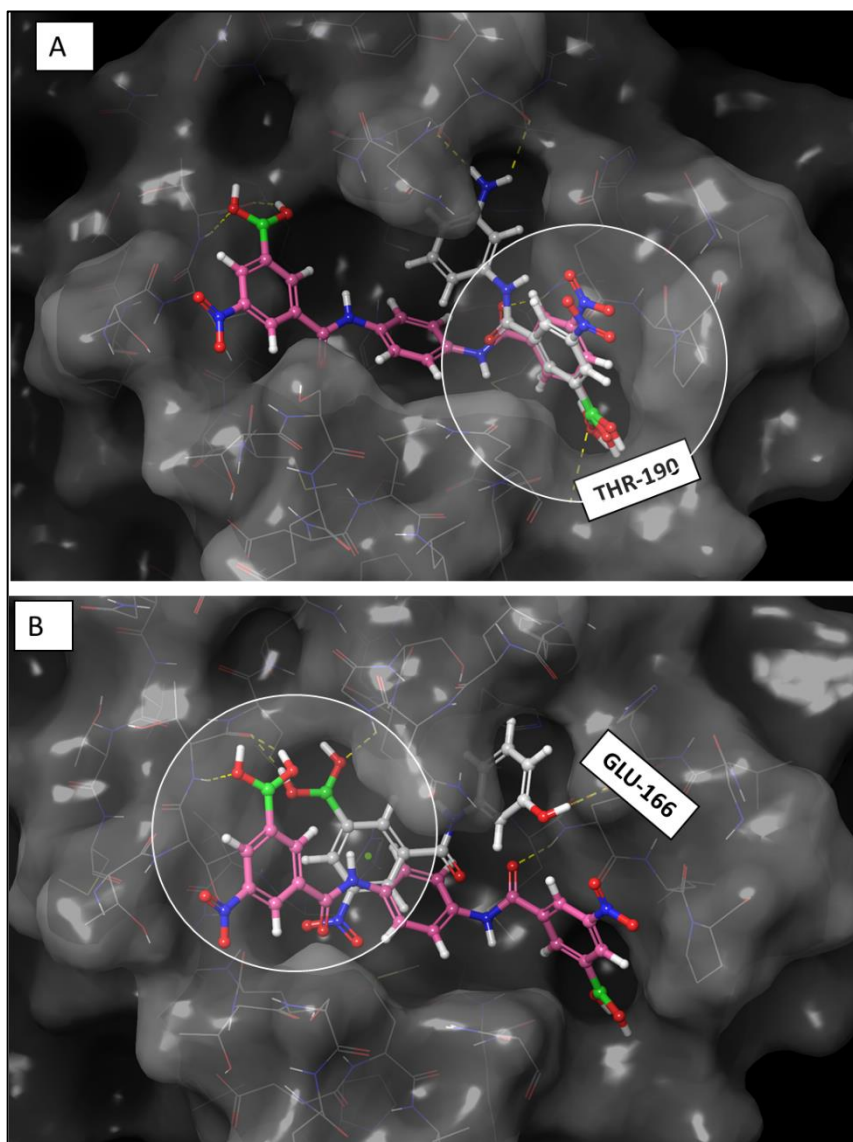
Por fim, explorou-se substituições bioisostéricas dos grupos hidroxila e amina por halogênios e metoxila. Com isso, chegou-se ao total de 40 estruturas planejadas (Figura 23), que seriam posteriormente sintetizadas.

Figura 23. Moléculas iniciais planejadas para síntese.



Os compostos planejados que apresentaram melhor relação entre pose e *DS* foram os derivados do grupo amida que por serem moléculas pequenas ocupam a região da protease próxima a cisteína catalítica (Cys-145) e conseguem na maior parte das poses fazer uma ou duas interações de hidrogênio com as treoninas da tríade (Thr-24, Thr-25 e Thr-26). Dependendo do substituinte, como por exemplo, na presença do grupo amino substituído na posição *meta* do anel benzênico B, a molécula adota uma pose em que o ácido borônico realiza duas interações de hidrogênio com a Thr-190 (Figura 24). Apesar de serem moléculas pequenas e simples estruturalmente, o estudo *in silico* demonstrou grande similaridade entre elas e o protótipo FL-166, o que pode vir a ser uma série interessante para posterior otimização.

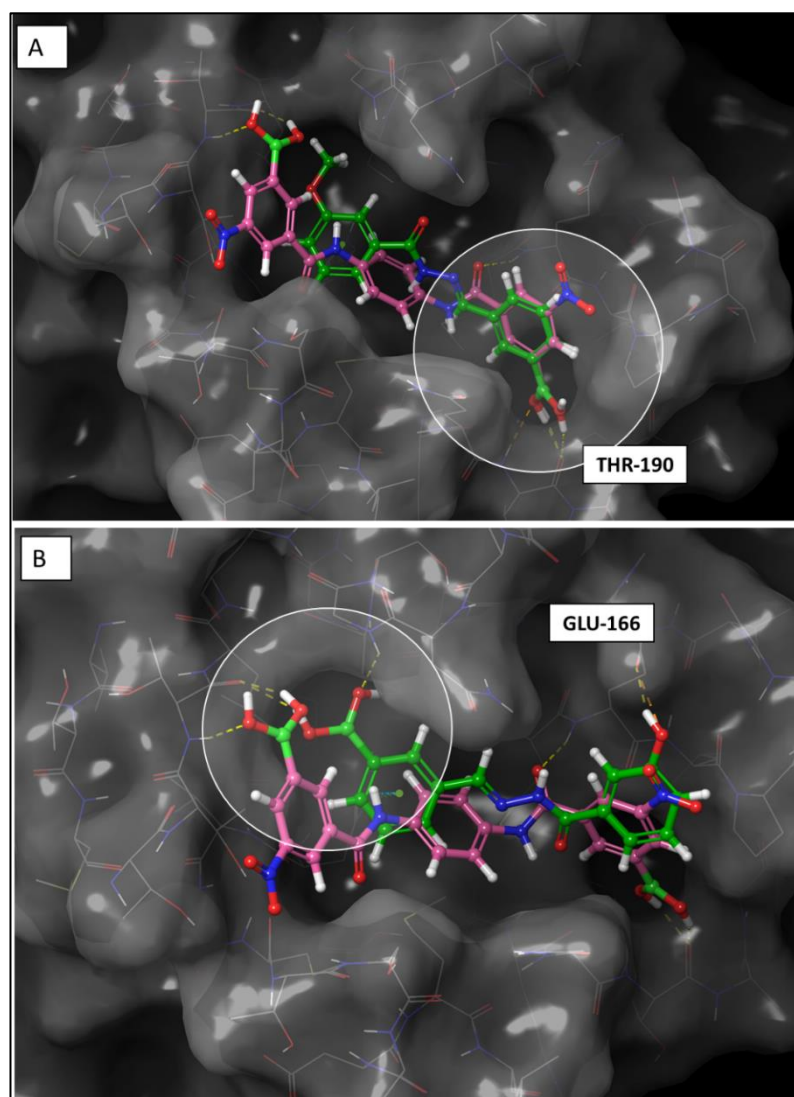
Figura 24. Figura 3D do docking molecular de derivados da série das amidas sobrepostos com o protótipo FL-166. A) A substituição do anel B com o grupo amina faz com que o derivado de amida adote como pose preferencial a interação de hidrogênio entre o ácido borônico e o resíduo de treonina (THR-190). B) A substituição do anel B com um grupo hidroxila faz com que o derivado de amida realize uma interação de hidrogênio entre a hidroxila com um resíduo de ácido glutâmico (Glu-166) e uma interação de hidrogênio entre o ácido borônico a treonina da tríade (Thr-24, Thr-25 e Thr-26).



Em termos espaciais, os derivados da série das *N*-acil-hidrazonas são as moléculas de maior tamanho, contendo quatro átomos separando os anéis A e B; seguido das chalconas com três átomos separando os anéis A e B e por fim, as amidas e ésteres com tamanhos similares. A rigidez pela presença das ligações duplas no caso das chalconas e *N*-acil-hidrazonas fizeram as moléculas adquirirem poses pouco favoráveis dentro do sítio ativo. Apesar disso, alguns derivados apresentaram uma boa complementariedade com a região catalítica da protease, principalmente os derivados de *N*-acil-hidrazonas. Em grande parte das poses observadas, os ácidos borônicos presentes nessas estruturas conseguiram realizar pelo menos uma interação de hidrogênio com os resíduos de treoninas da tríade (Thr-24, Thr-25 e Thr-26). Também foi possível observar poses em que o ácido borônico realizava preferencialmente interações de hidrogênio com a Thr-190 (Figura 25).

Por fim, a série dos derivados de *N*-acil-hidrazona apresentou resultados interessantes no estudo computacional, com poses semelhantes ao do protótipo FL-166. Essa série foi selecionada para síntese com uma maior variação dos substituintes com o objetivo de explorar esses derivados no estudo de avaliação enzimática em sua totalidade.

Figura 25. Figura 3D do docking molecular de derivados da série das *N*-acil-hidrazonas sobrepostos com o protótipo FL-166. A) A substituição do anel B com o grupo metoxila faz com que o derivado de *N*-acil-hidrazona adote como pose preferencial a interação de hidrogênio entre o ácido borônico e o resíduo de treonina (Thr-190). B) A substituição do anel B com um grupo hidroxila faz com que o derivado de *N*-acil-hidrazona realize uma interação de hidrogênio entre a hidroxila com um resíduo de ácido glutâmico (Glu-166) e uma interação de hidrogênio entre o ácido borônico a treonina da tríade (Thr-24, Thr-25 e Thr-26).



Os experimentos de modelagem computacional auxiliaram na escolha das moléculas a serem sintetizadas e foram essenciais para compreender como essas moléculas poderiam se comportar dentro do sítio ativo, se seriam capazes de adotar poses semelhantes ao do protótipo FL-166 e quais séries poderiam ser melhor exploradas no estudo de inibição enzimático. Após o resultado da atividade inibitória dessa série de compostos, as moléculas mais promissoras seriam novamente avaliadas em estudos *in silico* com o objetivo de propor otimizações estruturais e definir novos compostos a serem sintetizados.

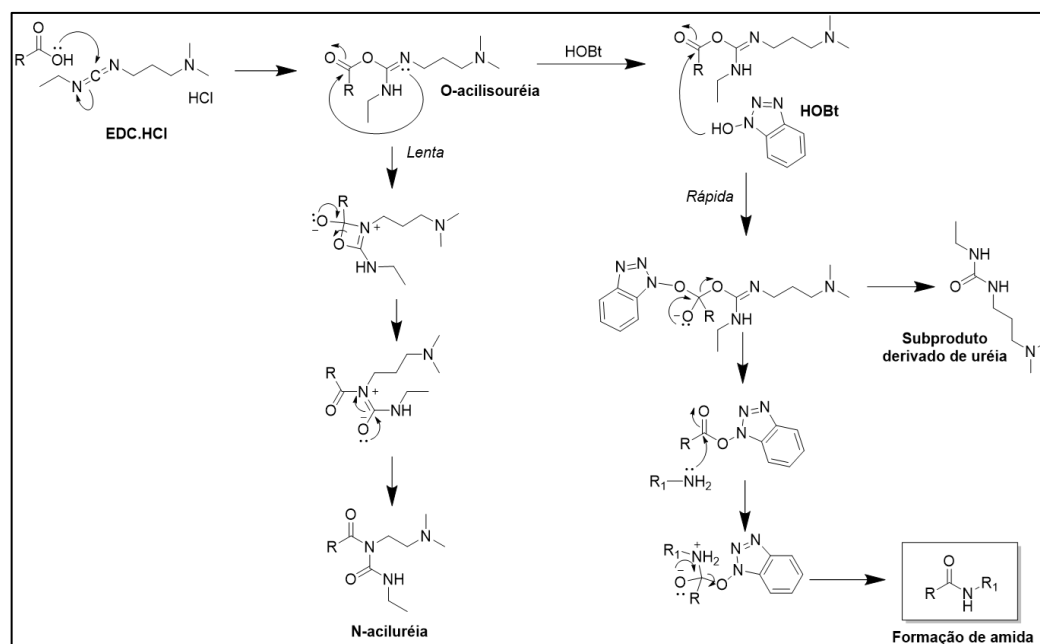
4.3 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS FINAIS

Todos os espectros de RMN de ^1H , DEPT-Q, bidimensionais (HSQC e HMBC) dos compostos sintetizados foram inseridos na seção Apêndice deste trabalho.

4.2.1 Síntese e caracterização dos compostos finais derivados de amida e ésteres

Os compostos (**6 - 11**) apresentaram etapas sintéticas semelhantes para formação da função amida em suas estruturas. Essas moléculas foram sintetizadas com o uso de EDC como agente acoplante, HOBt, DIPEA como base e em meio de DMF anidro. Além da efetividade em formar a ligação amida, esse agente acoplante forma um subproduto derivado de uréia solúvel em água, que é facilmente eliminado na etapa de extração líquido/líquido (Montalbetti, Falque; 2005). A adição de HOBt atua como um catalisador da reação através de seu comportamento como nucleófilo frente ao intermediário O-acilisouréia (etapa rápida), contribuindo por prevenir reações paralelas como o rearranjo intramolecular (etapa lenta) que leva a formação de um intermediário não reativo (N-aciluréia) (Figura 26). Além disso, leva a formação de um intermediário de éster, ligação clivada na última etapa para formação da ligação N-C.

Figura 26. Mecanismo de formação de amida com uso de agente acoplante (EDC).



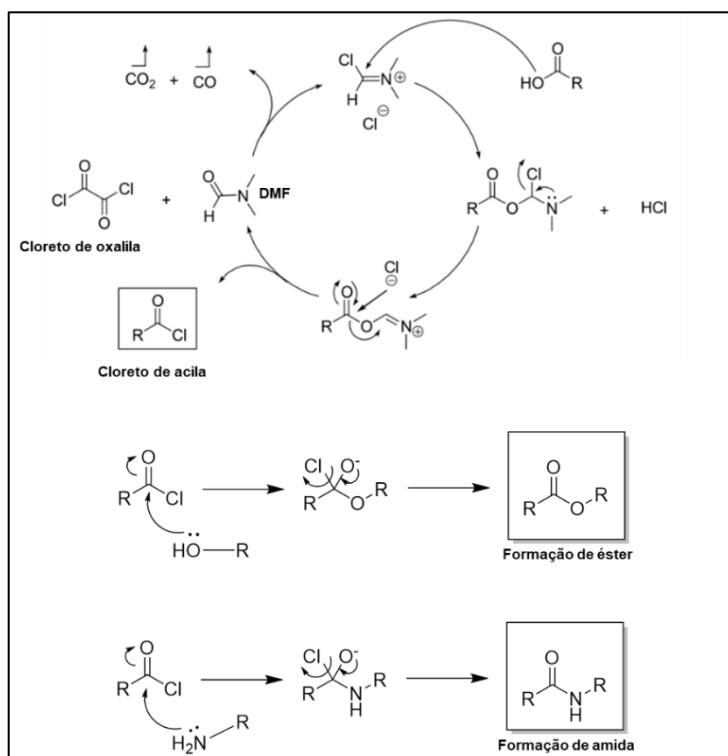
Fonte: Adaptado de Montalbetti, Falque; 2005.

O composto (**13**), a estrutura química do protótipo desse trabalho FL-166, foi sintetizado com objetivo de avaliar sua atividade inibitória frente a protease principal de SARS-CoV-2, uma vez que esse composto havia sido testado apenas frente a 3CL^{pro} de SARS-CoV. Sua síntese, diferente dos outros derivados de amida, se deu por meio do uso de cloreto de oxalila. Essa metodologia foi baseada na relatada por Bacha e colaboradores (2004). O uso de cloreto de oxalila para obtenção desse composto é mais adequado, uma vez que o objetivo foi a formação de dois grupos amida simultaneamente. O reagente *p*-fenilenodiamino (**12**) foi adicionado como limitante e o reagente

ácido 3-nitro-5-borônico benzóico (**2**), juntamente com o cloreto de oxalila, adicionado em excesso. Com isso, em uma única etapa, foi possível a obtenção do produto desejado (**13**). Os outros compostos derivados de amida nesse trabalho, que foram sintetizados com o uso de agente acoplante, podem também ser sintetizados por meio do uso de cloreto de oxalila. Mas, devido a toxicidade desse reagente, optou-se por dar continuidade as sínteses sem o seu uso. Os compostos (**17**), (**18**) e (**19**), derivados de ésteres, seguiram a mesma metodologia descrita para a obtenção do composto (**13**). A escolha dessa metodologia foi baseada na relatada por Bacha e colaboradores (2004).

O cloreto de oxalila na primeira etapa dessa reação (Figura 27) é ativado com o uso de DMF, que atua como catalisador nessa reação. O intermediário formado entre o cloreto de oxalila e DMF é posteriormente atacado pelo par de elétrons do oxigênio da hidroxila do ácido, o que leva a liberação do ânion cloreto e a formação de ácido clorídrico no meio (Figura 27). O ânion cloreto realiza um ataque nucleofílico ao carbono carbonílico do intermediário de éster, levando a formação do cloreto de acila (Figura 27). Por fim, o cloreto de acila é atacado por um grupo nucleofílico, podendo ser os derivados de álcoois ou fenóis por meio dos pares de elétrons livres da hidroxila ou os derivados de aminas por meio dos pares de elétrons livres do nitrogênio (Figura 27).

Figura 27. Mecanismo de formação dos derivados de ésteres e amida (FL-166).



Fonte: Adaptado de Montalbetti, Falque; 2005.

Após sintetizados, os compostos (**6 – 11**), (**13**), (**17**), (**18**) e (**19**) foram purificados e caracterizados. As moléculas derivadas de amidas foram purificadas por cromatografia em coluna, com uso de acetato de etila:hexano como fase móvel. A proporção da fase móvel foi definida para

cada molécula, mas de maneira geral, a tendência foi o uso de fases mais polares, normalmente (6:4) acetato:hexano ou (7:3) acetato hexano. As moléculas derivadas de ésteres foram purificadas com o uso do Biotage® Isolera™, utilizando a coluna Biotage® SNAP ULTRA 10g (HP-Sphere 25 µm), por um método isocrático, usando como fase móvel acetato de etila e hexano, com exceção do composto **(19)** que teve como fase móvel 100% CH₂Cl₂. Os rendimentos dessas moléculas foram em torno de 10-15%. Ao fazer o acompanhamento da reação por CCD, observou-se a formação de subprodutos e ainda a presença do reagente limitante, mesmo após 24 h de reação. Com isso, justifica-se que apesar das metodologias utilizadas serem eficientes para obtenção dos produtos desejados, estas poderiam ser otimizadas para obter melhores rendimentos. Como esses derivados foram obtidos em uma única etapa sintética, o baixo rendimento das reações não prejudicou a obtenção, caracterização e avaliação dos compostos.

A elucidação estrutural dos compostos foi realizada por meio de RMN de ¹H, DEPT-Q e bidimensionais (HSQC e HMBC). As análises foram organizadas em forma de tabela (Tabela 1, 2, 3 e 4). Como a série dos derivados de amida e ésteres apresenta grande semelhança quanto a seus sinais característicos de hidrogênio e carbono, os sinais não serão discutidos para cada molécula, mas sim, de maneira geral destacando apenas as maiores diferenças observadas entre as estruturas.

Para os derivados dos grupos amida (Tabela 1 e 2), o hidrogênio do grupo amida na posição 10 apresentou um deslocamento químico entre 9-10 ppm, sendo um simpleto com integração para 1H. Os hidrogênios do ácido borônico na posição 3 e 4, apresentam um deslocamento químico normalmente em 8 ppm, com variações dependendo das substituições das moléculas. Esse sinal aparece como um simpleto integrando para 2H. No caso do composto **(8)** não foi possível detectar o sinal das hidroxilas do ácido borônico no espectro, o que pode ser justificado pela troca entre deutério e hidrogênios das hidroxilas. Os hidrogênios dos grupos hidroxila e amina nas posições 15, apresentaram um deslocamento químico de 10 e 4-5 ppm respectivamente, sendo um simpleto em ambos os casos com integração de 1H e 2H, respectivamente. Para os derivados de amida sem o grupo nitro substituído, o hidrogênio na posição 1 do sistema aromático apresentou um deslocamento químico na ordem de 8,20 ppm, sendo um simpleto com integração para 1H. Os hidrogênios aromáticos na posição 5, 6, e 7 apresentaram deslocamentos químicos bastante similares, a exemplo do composto **(6)** em que o hidrogênio da posição 5 apresentou deslocamento em 7,92 ppm, sendo um duplete com constante de acoplamento $J = 7,6$ Hz, indicando acoplamento *orto* e integração para 1H. O hidrogênio da posição 6 apresentou deslocamento em 7,48 ppm, sendo um tripleto, com $J = 7,6$ Hz, indicando acoplamento *orto* e integração para 1H. O hidrogênio da posição 7 apresentou deslocamento em 7,67 ppm, sendo um duplete, com $J = 7,7$ Hz e integração para 2H. Nesse caso, o sinal foi equivalente ao do hidrogênio na posição 11 do outro sistema aromático. Por fim, o sistema aromático em que há a substituição do grupo hidroxila ou amina varia muito em relação aos deslocamentos químicos e multiplicidade em cada molécula. Quanto a substituição do grupo nitro no anel aromático, os compostos **(9)**, **(10)** e **(11)** também apresentaram similaridade quanto aos sinais característicos. Os hidrogênios da posição 5 e 7 apresentaram deslocamentos entre 8,80-8,70 ppm, com multiplicidade variando entre multipletos e

simpleto. A presença do grupo nitro tornou o hidrogênio da posição 1 mais desblindado em relação aos derivados que não possuem o nitro, apresentando deslocamento na ordem de 8,70 ppm. O composto **(11)** apresentou como sinal do hidrogênio aromático na posição 16, um deslocamento de 5,22 ppm, sendo um simpleto com integração para 1H. Apesar desse deslocamento não ser comum para esse tipo de grupo químico, o experimento de HMBC demonstrou que os hidrogênios do grupo amina (H15) são capazes de acoplar com carbono aromático (C16) em J_2 . O H16 também foi capaz de acoplar com o carbono da posição 14 (C14) em J_3 . Com isso, sugere-se que esse sinal de deslocamento 5,22 ppm seja proveniente do hidrogênio da posição 16.

Tabela 1. Caracterização estrutural de (6), (7) e (8) por RMN de ¹H, DEPT-Q, HSQC e HMBC em DMSO-d₆.

Posição	(6)		(7)		(8)	
	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
1	8,25 (s, 1H)	133,88	8,24 (s, 1H)	133,66	8,23 (s, 1H)	133,71
2	-	134,80	-	135,86	-	135,03
3	8,39 (s, 2H)	-	8,34 (s, 2H)	-	-	-
4	8,39 (s, 2H)	-	8,34 (s, 2H)	-	-	-
5	7,92 (d, J = 7.6 Hz, 1H)	137,88	7,92 (d, J = 7.6 Hz, 1H)	137,56	7,91 (d, J = 7.6 Hz, 1H)	137,61
6	7,48 (t, J = 7.6 Hz, 1H)	128,49	7,47 (t, J = 7.6 Hz, 1H)	128,10	7,47 (t, J = 7.6 Hz, 1H)	128,27
7	7,67 (d, J = 7.7 Hz, 2H)	129,98	7,88 (d, J = 7.7 Hz, 1H)	129,69	7,87 (d, J = 7.7 Hz, 1H)	129,80
8	-	138,00	-	140,60	-	137,89
9	-	167,46	-	167,15	-	167,15
10	10,23 (s, 1H)	-	9,64 (s, 1H)	-	9,94 (s, 1H)	-
11	7,67 (d, J = 7.7 Hz, 2H)	121,30	6,51 (m, 1H)	111,49	6,84 (d, J = 8.0 Hz, 1H)	109,50
12	7,34 (m, J = 7.9 Hz, 2H)	129,46	7,09 (m, 2H)	129,98	6,98 (m, J = 7.9 Hz, 1H)	129,74
13	7,11 (m, 1H)	124,82	7,09 (m, 2H)	111,72	6,36 (d, J = 7.9 Hz, 1H)	110,93
14	7,34 (m, J = 7.9 Hz, 2H)	129,46	-	157,89	-	149,26
15	7,90 (dd, J = 7.9, 1.4 Hz, 1H)	121,30	10,10 (s, 1H)	-	4,95 (s, 2H)	-
16	-	139,43	7,27 (s, 1H)	108,00	7,02 (s, 1H)	107,02
17	-	-	-	140,60	-	140,11

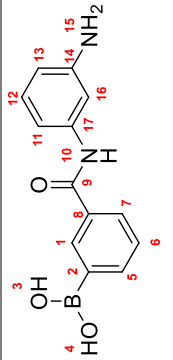
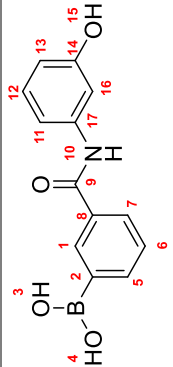
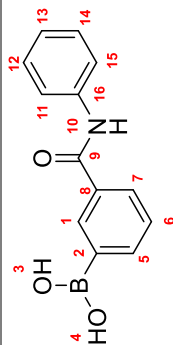
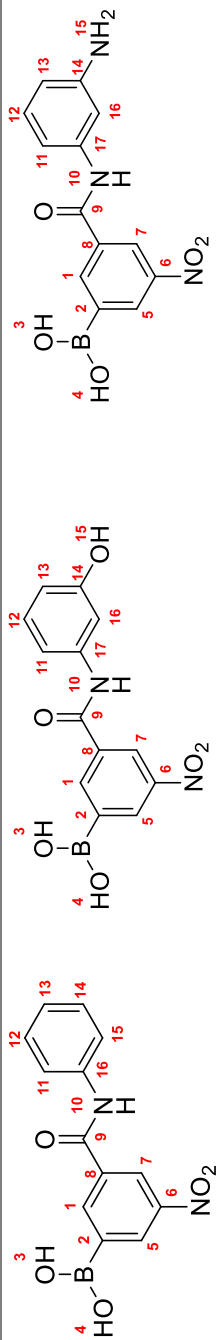


Tabela 2. Caracterização estrutural de (9), (10) e (11) por RMN de ¹H, DEPT-Q, HSQC e HMBC em DMSO-d₆.

Posição	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
1	8,75 (s, 1H)	124,29	8,72 (s, 1H)	124,01	8,74 (m, 1H)	123,86
2	-	136,20	-	136,28	-	136,55
3 e 4	8,71 (s, 2H)	-	8,70 (s, 2H)	-	8,69 (s, 2H)	-
5	8,80 (m, 2H)	131,35	8,77 (m, 2H)	130,98	8,77 (m, 1H)	130,69
6	-	147,90	-	147,86	-	147,83
7	8,80 (m, 2H)	140,08	8,77 (m, 2H)	139,69	8,70 (m, 1H)	139,67
8	-	139,24	-	140,09	-	139,26
9	-	164,33	-	164,48	-	167,07
10	10,62 (s, 1H)	-	9,47 (s, 1H)	-	10,34 (s, 1H)	-
11	7,78 (d, J = 7,6 Hz, 2H)	121,00	7,35 (d, J = 1,9 Hz, 1H)	107,90	7,08 (d, J = 2,0 Hz, 1H)	104,28
12	7,39 (m, 2H)	129,18	6,53 (m, 1H)	111,56	6,92 (d, J = 8,2 Hz, 1H)	123,38
13	7,14 (m, 1H)	124,55	7,15 (d, J = 2,0 Hz, 1H)	129,69	6,78 (dd, J = 8,2; 2,0 Hz, 1H)	107,97
14	7,39 (m, 2H)	129,18	-	157,87	-	144,55



(9)

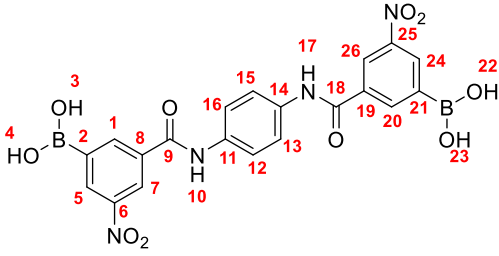
(10)

(11)

15	7,78 (d, J = 7,6 Hz, 2H)	121,00	10,48 (s, 1H)	-	5,95 (s, 2H)	-
16	-	-	7,13 (s, 1H)	111,62	5,23 (s, 1H)	127,50
17	-	-	-	-	-	-

O composto **(13)**, FL-166, apresentou sinais similares aos outros derivados de amida, mas com exceção de que essa estrutura química é simétrica e por conta disso o espectro de hidrogênio e carbono apresentam uma quantidade menor de sinais, com valores de integração dobrados uma vez que os hidrogênios e carbonos são equivalentes. Os hidrogênios característicos dos ácidos borônicos apresentaram deslocamento químico em 8,69 ppm, sendo um simpleto integrando para 4H. Os hidrogênios característicos do grupo amida apresentaram deslocamento químico em 10,64 ppm, sendo um simpleto com integração para 2H. Os hidrogênios dos sistemas aromáticos apresentaram deslocamentos químicos em 8,82, 8,80, 8,77 e 7,80 ppm, com integrações para 2H, 2H, 2H e 4H, respectivamente. Os sinais obtidos para esse composto são coerentes com o da literatura. Além disso, a faixa de fusão obtida para esse composto foi coincidente com o da literatura (254 – 256 °C) (Bacha *et al.*, 2004) o que sugere a obtenção do composto desejado.

Tabela 3. Caracterização estrutural de **(13)** por RMN de ^1H , DEPT-Q, HSQC e HMBC em DMSO-d_6 .



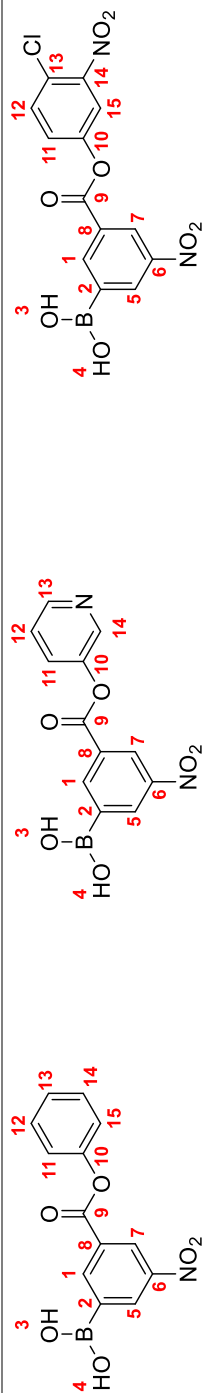
Posição	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1 e 20	8,77 (s, 2H)	140,07
2 e 21	-	136,21
3, 4 e 22 e 23	8,69 (s, 4H)	-
5 e 24	8,80 (<i>dd</i> , $J = 2.2, 0.9$ Hz, 2H)	130,68
6 e 25	-	147,93
7 e 26	8,82 (<i>m</i> , 2H)	124,27
8 e 19	-	139,86
9 e 18	-	164,14
10 e 17	10,64 (s, 2H)	
11 e 14	-	135,38
12 e 13	7,80 (s, 4H)	120,64

Quanto aos derivados de ésteres, os compostos **(17)**, **(18)** e **(19)** apresentaram sinais característicos semelhantes (Tabela 4), com os hidrogênios aromáticos nas posições 1, 5 e 7 tendo deslocamentos químicos na faixa de 8,79-8,81; 8,59-8,61 e 8,54-8,55 ppm, respectivamente. O hidrogênio na posição 1 no composto **(17)** foi caracterizado como um multiplete e nos compostos **(5)** e **(7)** como um tripleto, com $J = 2.0$ Hz em ambos os casos, indicando acoplamento *meta*. Os hidrogênios da posição 5 e 7 (H5 e H7) foram caracterizados como multipletos, esses sinais

apresentaram grande similaridade nos três espectros e nos experimentos de acoplamento a longa distância foram capazes de acoplar em J_3 com o carbono da posição 1 e vice-versa. Além disso, o H5 foi capaz de acoplar em J_2 com o carbono da posição 2 e o H7 foi capaz de acoplar em J_3 com o carbono da posição 9. Para as três moléculas não foi possível detectar o sinal característico dos ácidos borônicos. Quanto aos hidrogênios do anel aromático B, seus sinais apresentaram variações de acordo com a substituição. A exemplo do composto **(19)**, o H11 apresentou deslocamento químico em 7,81 ppm, sendo um duplo duplete com $J = 8.8$ e 2.7 Hz, indicando acoplamento em *orto* e *meta*. O H12 apresentou deslocamento químico em 7,95 ppm sendo um duplete com $J = 8.8$ Hz, indicando acoplamento em *orto*. O H15 apresentou deslocamento químico em 8,28 ppm com $J = 2.7$ Hz indicando acoplamento em *meta*. O efeito da substituição do átomo de cloro na posição *para* em relação ao grupo éster faz com que o C10 seja mais desblindado em relação aos outros carbonos dessa posição, nas outras moléculas.

Tabela 4. Caracterização estrutural de (17), (18) e (19) por RMN de ¹H, DEPT-Q, HMQC e HMBC em DMSO-d₆.

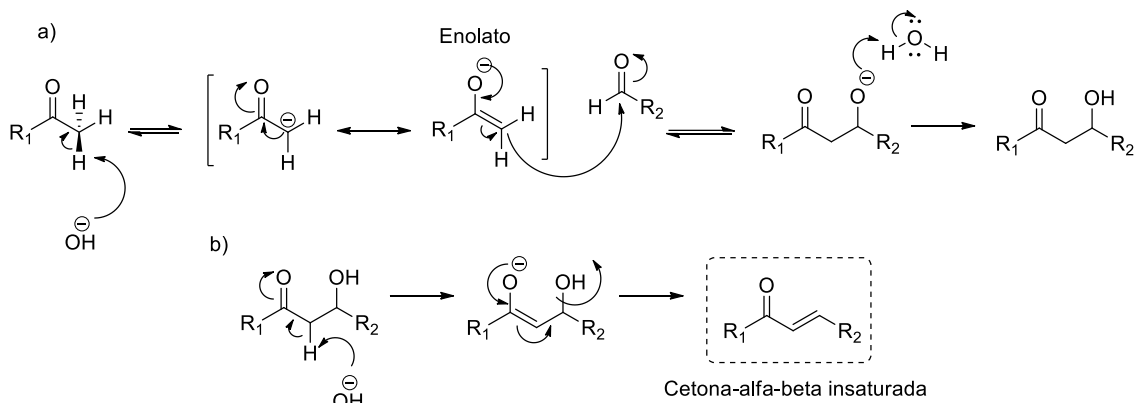
Posição	(17)		(18)		(19)	
	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
1	8,79 (m, 1H)	124,14	8,81 (t, J = 2.0 Hz, 1H)	123,68	8,81 (t, J = 2.0 Hz, 1H)	124,08
2	-	-	-	-	-	-
3 e 4	-	-	-	-	-	-
5	8,59 (m, 1H)	128,37	8,61 (m, 1H)	128,60	8,61 (m, 1H)	128,45
6	-	148,06	-	148,01	-	148,04
7	8,54 (m, 1H)	135,85	8,57 (m, 1H)	135,98	8,55 (m, 1H)	135,78
8	-	130,71	-	130,22	-	130,07
9	-	163,06	-	162,84	-	162,84
10	-	150,40	-	147,22	-	157,05
11	7,50 (m, 2H)	129,70	7,88 (ddd, J = 8.0, 2.7, 1.3 Hz, 1H)	129,86	7,81 (dd, J = 8.8, 2.7 Hz, 1H)	127,76
12	7,92 (m, 1H)	130,91	7,94 (t, J = 8.0 Hz, 1H)	130,53	7,95 (d, J = 8.8 Hz, 1H)	131,61
13	7,35 (m, 2H)	121,74	7,57 (dd, J = 8.0, 4.7 Hz, 1H)	124,15	-	122,62
14	7,35 (m, 2H)	126,25	8,65 (s, 1H)	143,45	-	149,20
15	7,50 (m, 2H)	129,70	-	-	8,29 (d, J = 2.7 Hz, 1H)	119,58



4.2.2 Síntese e caracterização dos compostos finais derivados de chalconas

As chalconas foram sintetizadas nesse trabalho por meio da condensação de Claisen-Schmidt, com o uso de derivados de acetofenona e de benzaldeído, em meio etanólico básico. Apesar de diferentes metodologias serem possíveis para a síntese do núcleo das chalconas, como os acoplamentos de Heck e Suzuki-Miyaura, Sonogashira, entre outras (Rammohan *et al.*, 2020), a escolha da metodologia clássica da condensação de Claisen-Schmidt nesse trabalho é mais adequada uma vez que os compostos são funcionalizados com ácidos borônicos e as reações de acoplamento cruzado poderiam levar a reações paralelas e produtos bi-funcionalizados. Além disso, é uma metodologia simples, que não faz uso de catalisadores, não necessita de altas temperaturas e utiliza um solvente limpo. O mecanismo de condensação de Claisen-Schmidt catalisada por base, a primeira etapa (Figura 28 – a) consiste na remoção do hidrogênio ácido do derivado de cetona (α -carbonila) pela base, resultando na formação do ânion enolato. O ânion enolato realiza um ataque nucleofílico ao carbono carbonílico (sp^2) do aldeído, levando a formação de um ânion alcóxido, que abstrai um próton da água do meio e se mantém na forma protonada (enol). A última etapa (Figura 28 – b), se trata de uma reação de eliminação do tipo E1cb por meio do ânion hidroxila, que abstrai o hidrogênio alfa-carbonila levando a formação do carbânion; que em seguida, leva a formação de uma ligação π , que por fim, favorece a saída do grupo hidroxila como grupo abandonador e a formação da cetona-alfa-beta insaturada (Álvarez, et al. 2019).

Figura 28. Mecanismo de formação das chalconas por meio da condensação de Claisen-Schmidt catalisada por meio básico.

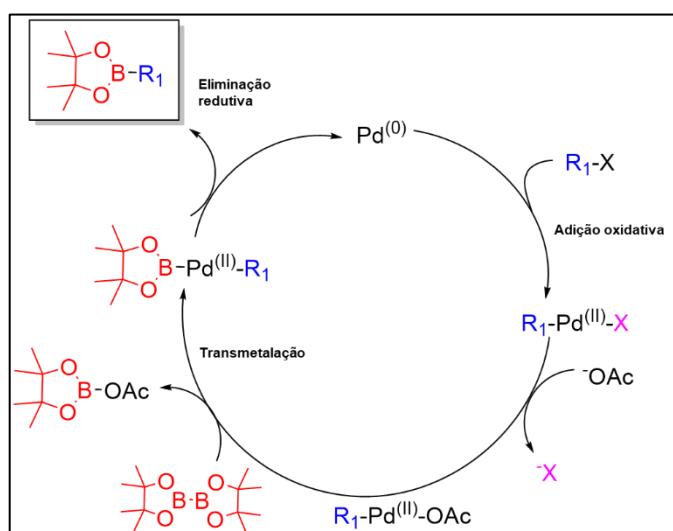


Fonte: Adaptado de Álvarez (2019).

Para a síntese das chalconas contendo grupo nitro substituído no anel benzênico A, a reação de borilação de Miyaura (Ishiyama; Murata; Miyaura, 1995) foi realizada para obtenção dos derivados de aldeído contendo ácido borônico em sua estrutura. Para essa reação, utilizou-se o reagente de bromobenzaldeído, excesso do reagente bis(pinacolato)diboro, um éster de pinacol de ácido diborônico; um catalisador de paládio $Pd(dppf)Cl_2$ e acetato de potássio (KOAc) como base. Um dos principais pontos para conseguir uma melhor seletividade na reação de borilação de Miyaura e evitar a formação de produtos bi-arílicos derivados da reação de Suzuki, é a escolha da base. Para uma maior seletividade nessa reação, as bases de Lewis duras como o KOAc ou fenóxido de potássio (KOPh) são as mais adequadas para promover uma melhor seletividade (Lennox, Lloyd-Jones, 2014).

A primeira etapa do mecanismo da borilação de Miyaura é a adição oxidativa do complexo de paládio (Pd^0 ou II) entre a ligação sigma C-X ($\text{X} = \text{Br}, \text{I}$ ou Cl) do haleto de arila (Figura 29). Após a adição oxidativa, a formação de um complexo de (acetato)paládio (II) influencia na etapa de transmetalção, sendo esse intermediário mais reativo frente ao reagente de boro do que o complexo de paládio-halogênio (Figura 29). Com isso, é proposto que a etapa de transmetalção ocorre unicamente por conta da formação desse intermediário de alcoxo-paládio (Lennox, Lloyd-Jones, 2014). Na etapa de transmetalção ocorre a substituição entre um dos átomos de boro do éster de pinacol de ácido diborônico pelo halogênio (Figura 29). Na etapa de eliminação redutiva, ocorre a formação da ligação entre o átomo de boro e o carbono da estrutura geral R_1 (Figura 29).

Figura 29. Mecanismo da reação de borilação de Miyaura. As etapas para obtenção do composto final consistem em i) adição oxidativa, ii) transmetalção e iii) eliminação redutiva



Fonte: Adaptado de Lennox, Lloyd-Jones; 2014.

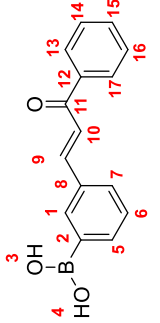
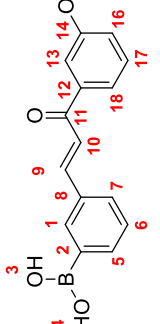
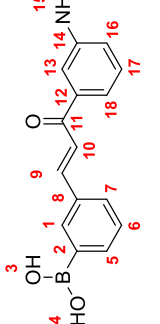
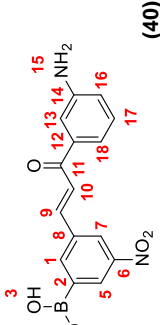
Após a reação de borilação de Miyaura, o intermediário contendo o grupo éster borônico foi utilizado na etapa seguinte para síntese da chalcona (**40**). O meio fortemente básico da reação de Condensação de Claisen-Schmidt favoreceu a hidrólise do éster borônico, levando a obtenção do produto em sua forma de ácido borônico.

O meio reacional, após finalizar o tempo da reação, teve seu pH acidificado com uso de HCl diluído e adição de gelo para precipitação das chalconas. Após a obtenção do sólido proveniente da precipitação, o mesmo foi lavado com água gelada e levado para secar em dessecador. A precipitação não levou a obtenção dos compostos finais puros e todos os derivados de chalconas precisaram passar por purificação por meio de coluna de bancada. Os rendimentos após a purificação foram variados, sendo que as chalconas com os menores rendimentos foram as que não possuíam nenhum grupo substituído no anel benzênico B e as substituídas com um átomo de bromo no anel benzênico B. Para esses casos, os rendimentos foram em média de 15-20%. Uma hipótese para justificar os melhores rendimentos (40-45%) das chalconas substituídas com OCH_3 , NH_2 e OH é que grupos doadores de densidade eletrônica poderiam favorecer a estabilização do ânion enolato, levando a formação de menos subprodutos.

A elucidação estrutural dos compostos foi realizada por meio de RMN de ^1H , DEPT-Q e bidimensionais (HSQC e HMBC). As análises foram organizadas em forma de tabela (Tabela 5, 6, 7, 8 e). Como a série dos derivados de chalconas apresenta grande semelhança quanto a seus sinais característicos de hidrogênio e carbono, selecionou-se os compostos **(40)** (Tabela 5), **(34)** (Tabela 6) e **(36)** (Tabela 7) para discutir com mais detalhes sobre cada uma.

A molécula **(76)** (Tabela 5) é a única dos derivados de chalcona que apresenta o grupo nitro em sua estrutura. Os sinais característicos que comprovam a obtenção do derivado de cetona-alfa beta insaturada são os hidrogênios nas posições 9 e 10, com sinais característicos de 7,79 e 9,75 ppm, dois dupletos com $J = 15.7$ Hz integrando *para* 1H cada. Esses sinais sugerem a obtenção dos hidrogênios olefínicos vicinais acoplando entre si e o valor de J sugere a configuração trans dessa ligação dupla. O experimento de DEPT-Q levou a identificação de um carbono quaternário, em 189,50 ppm, característico da carbonila do grupo cetona-alfa beta insaturada (C11). A identificação das posições dos hidrogênios olefínicos foi definida por meio do experimento de HMBC, indicando a tendência do H13 em acoplar com o C10 em J_4 e do H1 em acoplar com o C9 em J_3 . O sinal em 8,64 ppm, um simpleto integrando para 2H, indica as hidroxilas do ácido borônico. A obtenção desse sinal sugere que de fato, o meio básico durante a reação da formação da chalcona favoreceu a hidrólise do éster borônico. O éster borônico apresenta como sinal característico um simpleto intenso na região de 1,35 ppm, integrando para 12H. No espectro de RMN de ^1H da molécula **(76)** é possível observar que nessa região não há a presença de nenhum sinal similar ao que caracteriza o éster borônico. O carbono quaternário C2 normalmente não aparece no experimento de DEPT-Q, mas pode ser identificado por meio do experimento de HMBC em que os hidrogênios H3-4 acoplam com um único sinal na região de 137 ppm. Os hidrogênios do grupo amina (H15), foram identificados na região de 5,39 ppm, sendo um simpleto integrando para 2H. Quanto aos hidrogênios aromáticos, o H1 teve como sinal característico um simpleto na região de 8,72 ppm, integrando para 1H. Os hidrogênios na posição 5 e 7 apresentaram como sinais característicos um duplete em 8,61 ppm com $J = 2.2$ Hz, integrando *para* 1H, indicando acoplamento *meta*; e um simpleto em 8,59 ppm integrando para 1H. O H13 apresentou como sinal característico um multiplete em 7,27 ppm, integrando para 1H. Os hidrogênios nas posições 16, 17 e 18 apresentaram como sinais característicos valores na região de 6,87 ppm, um duplo duplete com $J = 7.9$ e 2.3 Hz, indicando acoplamento em orto e *meta*; 7,23 ppm, um tripleto com $J = 7.9$ Hz, indicando acoplamento em orto com dois hidrogênios; e em 7,36 um multiplete integrando para 1H. Por fim, os carbonos quaternários, C8 e C12, foram identificados com auxílio do experimento de HMBC em que os acoplamentos a longa distância permitiram a identificação dos sinais para o C6, C8, C12 e C14. Os hidrogênios H9 e H10 acoplam em J_2 e J_3 com o carbono C8; o hidrogênio H17 acopla em J_3 com o carbono C12 e com o C14; os hidrogênios H1 e H5 acoplam com o carbono C6 em J_4 e J_2 .

Tabela 5. Caracterização estrutural de (31), (32), (33) e (40) por RMN de ¹H, DEPT-Q, HSQC e HMBC em DMSO-d₆.

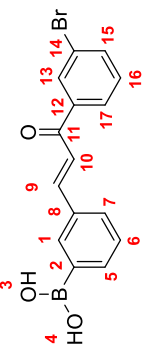
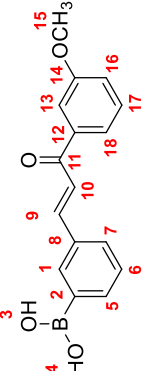
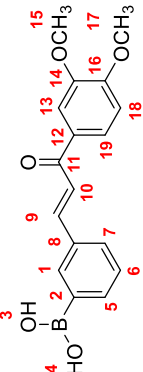
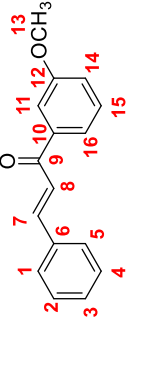
					
	(31)	(32)	(33)	(40)	
	δ_H (ppm)	δ_H (ppm)	δ_H (ppm)	δ_H (ppm)	
	δ_C (ppm)	δ_C (ppm)	δ_C (ppm)	δ_C (ppm)	
1	8,23 (s, 1H)	8,22 (s, 1H)	133,74	8,72 (s, 1H)	124,26
2	-	-	134,75	-	137,15
3 e 4	8,22 (s, 2H)	8,21 (s, 2H)	-	8,20 (s, 2H)	-
5	7,85 (dt, J = 7.5, 1.1 Hz, 1H)	7,85 (m, 2H)	136,27	7,85 (m, 1H)	136,29
6	7,44 (t, J = 7.5 Hz, 1H)	7,44 (t, J = 7.5 Hz, 1H)	127,84	7,44 (m, 2H)	128,06
7	7,91 (m, 1H)	7,85 (m, 2H)	130,31	7,89 (d, J = 7.7 Hz, 1H)	130,50
8	-	-	134,03	-	133,62
9	7,74 (d, J = 15.6 Hz, 1H)	7,68 (d, J = 15.6 Hz, 1H)	143,50	7,71 (d, J = 15.6 Hz, 1H)	144,17
10	7,89 (d, J = 15.6 Hz, 1H)	7,75 (d, J = 15.6 Hz, 1H)	121,79	7,81 (d, J = 15.6 Hz, 1H)	121,75
11	-	-	189,60	-	189,11
12	-	-	137,68	-	139,07
13	8,13 (dd, J = 8.4, 1.3 Hz, 1H)	7,25 (m, 1H)	112,61	7,44 (m, 2H)	114,36
14	7,59 (m, 2H)	-	149,18	-	157,75
				7,27 (m, 1H)	112,68
				-	149,27

15	7,68 (m, 1H)	133,23	5,38 (s, 2H)	-	9,82 (s, 1H)	-	5,39 (s, 2H)	-
16	7,59 (m, 2H)	128,93	6,85 (ddd, J = 7.9, 2.4, 1.0 Hz, 1H)	118,26	7,07 (ddd, J = 8.1, 2.6, 0.9 Hz, 1H)	120,12	6,87 (dd, J = 7.9, 2.3 Hz, 1H)	118,65
17	8,13 (dd, J = 8.4, 1.3 Hz, 1H)	128,23	7,22 (t, J = 7.9 Hz, 1H)	128,91	7,38 (t, J = 8.1 Hz, 1H)	129,83	7,23 (t, J = 7.9 Hz, 1H)	129,02
18	-	-	7,29 (dt, J = 7.9, 1.0 Hz, 1H)	115,86	7,59 (m, 1H)	119,30	7,36 (m, 1H)	116,41

A molécula **(34)** (Tabela 6) apresentou sinais característicos bastante similares aos já discutidos para o composto **(40)**. Algumas diferenças se dão no anel A, em que a posição 6 é substituída por um hidrogênio ao invés do grupo nitro. Com isso, o H6 apresentou como sinal característico um deslocamento químico de 7,44 ppm, um tripleto com $J = 7.7$ Hz, indicando acoplamento *orto* com dois hidrogênios. Os hidrogênios H5 e H7 apresentaram deslocamentos químicos em 7,85 ppm, um multipletto integrando para 1H e 7,94 ppm, um dupletto com $J = 7.7$ Hz, indicando acoplamento em *orto* e integração para 1H. O H9 apresentou um deslocamento químico em 7,94, sendo um dupletto com $J = 15.7$ Hz, novamente indicando a obtenção da chalcona na isomeria *trans*. O H10, o outro hidrogênio da ligação dupla *trans*, coalesceu com um sinal da região dos hidrogênios aromáticos e se apresentou como um multipletto em 7,74 ppm, com integração *para* 2H. O experimento de DEPT-Q levou a identificação de um carbono quaternário, em 188,97 ppm, característico da carbonila do grupo cetona-alfa beta insaturada (C11). Os hidrogênios aromáticos do anel B apresentaram um perfil muito similar quanto aos deslocamentos químicos e multiplicidade do composto **(40)** (Tabela 5), já discutido anteriormente. Os hidrogênios do grupo metoxila (H15) foram caracterizados como um simpleto em 3,86 ppm, integrando para 3H. Por fim, os carbonos quaternários foram caracterizados com auxílio do experimento de HMBC.

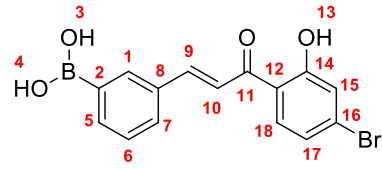
Os compostos **(35)** e **(42)** (Tabela 6) apresentaram algumas diferenças nos sinais obtidos, uma vez que o composto **(35)** é substituído com um halogênio e o composto **(42)** não apresenta o ácido borônico em sua estrutura. Para o composto **(35)** os hidrogênios da ligação dupla não puderam ser caracterizados, se encontrando como multipletos em ambos os casos. O experimento de DEPT-Q levou a identificação de um carbono quaternário, em 197,59 ppm, característico da carbonila do grupo cetona-alfa beta insaturada (C11), o que sugere a formação dessa chalcona. Observa-se que o C11 apresentou o maior deslocamento químico da série influenciado pelo átomo de bromo substituído no anel B, um grupo eletronegativo que atua como um fraco desativante do sistema aromático. Outro sinal quaternário diferente dos outros compostos foi em $\delta_c = 122,17$. O experimento de HMBC auxiliou na elucidação desse sinal, indicando se tratar do C14, uma vez que os hidrogênios H13, H15 e H16 acoplam com esse carbono em J_2 , J_3 e J_4 , respectivamente. O valor obtido para o C14 é inferior ao que normalmente era observado para os outros derivados de chalconas, o que pode ser justificado pelo fato do bromo apresentar menor eletronegatividade do que quando comparado aos elementos oxigênio e nitrogênio. Além disso, sua grande nuvem eletrônica polarizável pode gerar um efeito de proteção ao carbono quaternário em que está substituído, tornando-o mais blindado.

Tabela 6. Caracterização estrutural de (34), (35), (36) e (42) por RMN de ¹H, DEPT-Q, HSQC e HMBC em DMSO-d₆.

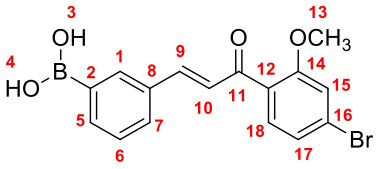
		(35)		(34)		(36)		(42)	
		δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
									
									
									
									
1		7,75 (s, 1H)	133,27	8,23 (s, 1H)	134,26	8,21 (s, 1H)	134,57	7,46 (m, 3H)	128,91
2		-	133,97	-	134,58	-	135,45	7,46 (m, 3H)	128,91
3		7,98 (s, 2H)	-	8,20 (s, 2H)	-	8,19 (s, 2H)	-	7,80 (m, 1H)	128,30
4		7,98 (s, 2H)	-	8,20 (s, 2H)	-	8,19 (s, 2H)	-	7,46 (m, 3H)	128,91
5		7,36 (dt, J = 7.5, 1.5 Hz, 1H)	129,37	7,85 (m, 1H)	136,15	7,85 (d, J = 7.5 Hz, 1H)	136,21	7,90 (m, 2H)	121,80
6		7,20 (t, J = 7.5 Hz, 1H)	127,19	7,44 (t, J = 7.7 Hz, 1H)	127,81	7,44 (t, J = 7.5 Hz, 1H)	128,08	-	134,65
7		7,56 (dt, J = 7.5 Hz, 1.5 Hz, 1H)	131,96	7,94 (d, J = 7.7 Hz, 1H)	130,24	7,94 (m, 1H)	130,29	7,75 (d, J = 15.7 Hz, 1H)	143,86
8		-	142,83	-	133,60	-	133,78	7,93 (d, J = 15.7 Hz, 1H)	121,87
9		7,81 (m, 2H)	135,66	7,87 (d, J = 15.7 Hz, 1H)	144,27	7,91 (d, J = 15.5 Hz, 1H)	143,51	-	188,95
10		7,92 (ddd, J = 7.9, 2.0, 1.0 Hz, 2H)	126,82	7,74 (m, 2H)	120,78	7,71 (d, J = 15.5 Hz, 1H)	121,60	-	139,02
11		-	197,59	-	188,97	-	187,38	7,62 (dd, J = 2.7, 1.6 Hz, 1H)	112,74
12		-	138,73	-	139,09	-	130,55	-	159,58

13	8,06 (t, J = 2.0 Hz, 1H)	130,39	7,59 (dd, J = 2.4, 1.7 Hz, 1H)	112,67	7,60 (d, J = 2.0 Hz, 1H)	110,71	3,85 (s, 1H)	-
14	-	122,17	-	159,59	-	148,87	7,24 (dd, J = 7.9, 2.7, 0.9 Hz, 1H)	119,00
15	7,81 (ddd, J = 8.0, 2.0, 1.0, 2H)	135,66	3,86 (s, 3H)	55,07	3,86 (s, 3H)	55,81	7,49 (t, J = 7.9 Hz, 1H)	129,47
16	7,47 (t, J = 7.9 Hz, 2H)	130,79	7,25 (ddd, J = 7.9, 2.4 Hz, 1H)	118,82	-	153,25	7,90 (m, 2H)	128,77
17	7,92 (ddd, J = 7.9, 2.0, 1.0 Hz, 2H)	126,82	7,51 (t, J = 7.9 Hz, 1H)	129,69	3,88 (s, 3H)	55,61	-	-
18	-	-	7,74 (m, 2H)	120,98	7,12 (d, J = 8.5 Hz, 1H)	110,90	-	-
-	-	-	-	-	7,88 (d, J = 2.0 Hz, 1H)	123,30	-	-

Tabela 7. Caracterização estrutural de (37) e (38) por RMN de ^1H , DEPT-Q, HSQC e HMBC em DMSO-d_6 .



(37)



(38)

Posição	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	8,22 (s, 1H)	134,75	8,10 (s, 1H)	134,08
2	-	-	-	134,41
3 e 4	8,21 (s, 2H)	-	8,18 (s, 2H)	-
5	7,87 (dt, $J = 7.5, 1.2$ Hz, 1H)	136,83	7,83 (dt, $J = 7.4, 1.0$ Hz, 1H)	136,17
6	7,45 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H)	128,11	7,42 (m, 3H)	128,19
7	7,92 (m, 2H)	130,76	7,77 (m, 1H)	130,05
8	-	133,38	-	133,42
9	7,81 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H)	145,32	7,48 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H)	143,65
10	7,92 (m, 2H)	121,97	7,34 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H)	126,12
11	-	192,69	-	191,60
12	-	120,92	-	125,83
13	12,44 (s, 1H)	-	3,89 (s, 3H)	56,13
14	-	161,65	-	158,25
15	7,26 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H)	119,80	7,42 (m, 3H)	130,81
16	-	128,91	-	128,01
17	7,20 (dd, $J = 8.5, 1.9$ Hz, 1H)	121,82	7,28 (dd, $J = 8.1, 1.8$ Hz, 1H)	123,27
18	8,07 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H)	132,25	7,42 (m, 3H)	115,63

Quanto as chalconas com o grupo ácido borônico substituído na posição *para* do anel A, seus sinais característicos também apresentaram grande similaridade quanto aos deslocamentos químicos e multiplicidade (Tabela 8 e 9). Comparando as chalconas substituídas com ácido borônico em *meta* e em *para* no anel A, também é possível observar que a maior parte dos sinais foi semelhante e muitas vezes idênticos, principalmente ao comparar aqueles compostos que apresentavam o mesmo grupo químico substituído no anel B.

O composto (**31'**) (Tabela 7) apresentou na região dos hidrogênios aromáticos os sinais $\delta_H = 7,07$ e $6,58$, dois dupletos com $J = 8.5$ Hz, integrando pra 2H. Esses sinais indicam que os hidrogênios estão acoplado entre si (em *orto*) e que são equivalentes, o que justifica um único sinal com integração para 2H. Com isso, sugere-se que esses hidrogênios estão dispostos em um sistema aromático com substituição em *para*, sendo caracterizados nos pares H1 e H7; H2 e H6. As hidroxilas do ácido borônico apresentaram deslocamento químico em $7,94$ ppm, sendo um simpleto com integração para 2H. Os hidrogênios característicos da ligação dupla em *trans* novamente não foram identificados, assim como nos compostos anteriores já discutidos. A presença do sinal $\delta_C = 199,87$, característico da carbonila alfa-beta insaturada sugere a formação da chalcona. O H13 apresentou um deslocamento químico de $7,91$ ppm, sendo um duplete com $J = 1.6$ Hz, indicando acoplamento em *meta*. Os H14, H15 e H16 foram caracterizados como um multiplete com integração para 4H, com constante de acoplamento em $7,50$ ppm e o H17 foi caracterizado como um multiplete com integração para 2H. Esses hidrogênios aromáticos e os sinais característicos das duplas em *trans* da chalcona coalesceram e não puderam ser identificados de maneira separada.

Tabela 8. Caracterização estrutural de (31)', (32)' e (33)' por RMN de ¹H, DEPT-Q, HSQC e HMBC em DMSO-d₆.

Posição	(31)'		(32)'		(33)'	
	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
1 e 7	7,07 (d, J = 8.5 Hz, 2H)	128,92	7,86 (d, J = 8.0 Hz, 2H)	135,04	7,86 (m, 5H)	134,64
2 e 6	6,58 (d, J = 8.5 Hz, 2H)	115,37	7,79 (m, 3H)	128,13	7,86 (m, 5H)	127,85
3	-	134,70	-	137,16	-	137,01
4 e 5	7,94 (s, 2H)	-	8,19 (s, 2H)	-	8,19 (s, 2H)	-
8	-	155,88	-	136,48	-	136,09
9	7,50 (m, 4H)	144,33	7,67 (d, J = 15.6 Hz, 1H)	143,89	7,70 (d, J = 15.7 Hz, 1H)	143,90
10	7,61 (m, 2H)	133,79	7,79 (m, 3H)	123,14	7,86 (m, 5H)	122,61
11	-	199,87	-	190,46	-	189,25
12	-	137,15	-	138,75	-	139,05
13	7,91 (d, J = 1.6 Hz, 1H)	128,33	7,27 (m, 1H)	113,50	7,46 (m, 1H)	144,67
14	7,50 (m, 4H)	129,24	-	149,31	-	157,79
15	7,50 (m, 4H)	129,24	5,38 (s, 2H)	-	9,82 (s, 1H)	-
16	7,50 (m, 4H)	129,24	6,84 (m, 1H)	119,23	7,06 (dd, J = 7.9, 2.1 Hz, 1H)	120,43
17	7,61 (m, 2H)	133,79	7,21 (t, J = 7.8 Hz, 1H)	129,61	7,38 (t, J = 7.9 Hz, 1H)	129,97
18	-	-	7,33 (d, J = 7.8 Hz, 1H)	117,25	7,64 (d, J = 7.9 Hz, 1H)	119,70

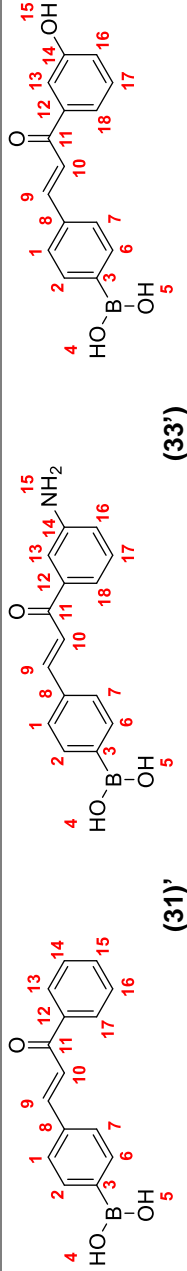


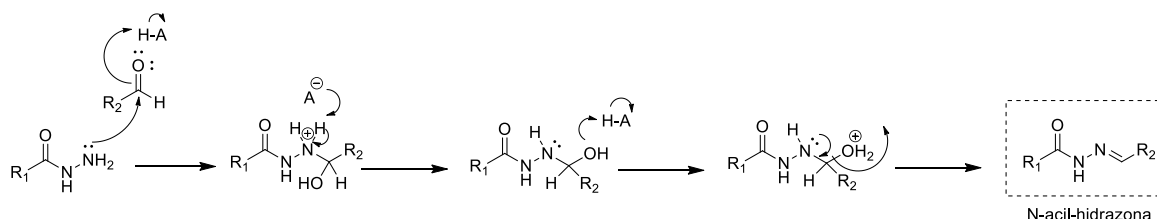
Tabela 9. Caracterização estrutural de (35), (34) e (36) por RMN de ¹H, DEPT-Q, HSQC e HMBC em DMSO-d₆.

Posição	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
1 e 7	7,28 (d, J = 8.1 Hz, 2H)	126,78	7,99 (d, J = 8.0 Hz, 2H)	122,16	7,86 (m, 4H)	134,40
2 e 6	7,65 (d, J = 8.1 Hz, 2H)	133,85	7,87 (m, 4H)	127,80	7,86 (m, 4H)	127,60
3	-	132,09	-	-	-	136,72
4 e 5	7,94 (s, 2H)	-	7,87 (m, 4H)	-	8,17 (s, 2H)	-
8	-	145,90	7,87 (m, 4H)	127,80	-	136,19
9	7,83 (ddd, J = 8.0, 2.0, 1.0 Hz, 2H)	135,60	7,99 (d, J = 8.0 Hz, 2H)	134,32	7,71 (d, J = 15.5 Hz, 1H)	142,96
10	7,93 (m, 2H)	126,69	-	144,14	7,99 (d, J = 15.6 Hz, 1H)	122,18
11	-	198,02	7,75 (d, J = 15.6 Hz, 1H)	143,88	-	187,35
12	-	138,12	7,95 (d, J = 15.6 Hz, 1H)	122,16	-	130,48
13	8,07 (t, J = 2.0 Hz, 1H)	130,34	-	188,95	7,62 (d, J = 2.0 Hz, 1H)	110,58
14	-	122,19	-	139,01	-	148,82
15	7,83 (ddd, J = 8.0, 2.0, 1.0 Hz, 2H)	135,60	7,62 (s, 1H)	112,76	3,88 (s, 3H)	55,60
16	7,48 (t, J = 7.9 Hz, 1H)	130,34	-	159,59	-	153,28
17	7,93 (m, 2H)	126,69	3,86 (s, 3H)	55,16	3,87 (s, 3H)	55,80
18	-	-	7,23 (m, 1H)	119,04	7,11 (d, J = 8.5 Hz, 1H)	110,75
19	-	-	7,48 (t, J = 7.9 Hz, 1H)	129,74	7,93 (dd, J = 8.5, 2.0 Hz, 1H)	123,32

4.2.3 Síntese e caracterização dos compostos finais derivados de derivados de *N*-acil-hidrazonas

Os derivados de *N*-acil-hidrazona foram sintetizados por meio de uma reação de condensação entre um aldeído e derivados e as hidrazidas, em meio de etanol com adição de pequenas quantidades de um ácido fraco, com objetivo de catalisar a reação. O mecanismo dessa reação foi esquematizado na Figura 30.

Figura 30. Mecanismo geral para formação das *N*-acil-hidrazonas, via catalise ácida.



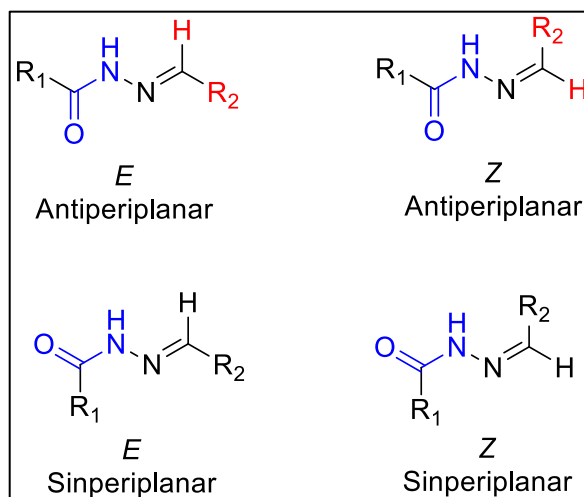
Fonte: Adaptado de Guimarães, *et al.* 2017

O mecanismo da reação se inicia com o ataque nucleofílico dos derivados da hidrazida à carbonila do aldeído, que se torna ativada em meio ácido (Figura 30). Com a ligação C-N formada, o nitrogênio com carga positiva tem seu próton abstraído pela base conjugada. Em seguida, o grupo OH abstrai um próton do meio ácido levando a formação de um bom grupo abandonador (H_2O^+). Os pares de elétrons do nitrogênio formam uma ligação π ($\text{C}=\text{N}$), favorecendo a saída do grupo H_2O e levando a formação do derivado de *N*-acil-hidrazona (Figura 30).

A síntese da série de derivados de *N*-acil-hidrazonas apresentou bons rendimentos (em média 60%) e todos os compostos finais foram obtidos após adição de gelo no meio reacional, levando a obtenção dos precipitados. Após a precipitação dos compostos, estes foram avaliados por meio de CCD utilizando diferentes fases móveis, indicando a formação de uma única mancha em todos os casos. A obtenção de uma única mancha na CCD sugere, alinhado com os dados de caracterização estrutural, a obtenção de apenas um isômero estrutural. As *N*-acil-hidrazonas podem apresentar isomeria *E* e *Z* causada pela ligação π ($\text{C}=\text{N}$) e dois isômeros conformacionais (*syn* ou *anti*) devido a ligação sigma ($\text{N}-\text{N}$) (Figura 31). Quanto as isomerias, normalmente se observa uma maior prevalência da isomeria *E* em função da *Z* para *N*-acil-hidrazonas provenientes de aldeídos aromáticos, uma vez que essa é termodinamicamente mais favorável (Palla, *et al.* 1986; Munir, *et al.* 2021). Porém, *N*-acil-hidrazonas com maior prevalência da isomeria *Z* são relatados, mas normalmente apresentam um grupo químico específico em sua estrutura com objetivo de favorecer a isomeria *Z*, como por exemplo, grupos que levem a formação de uma interação de hidrogênio intramolecular com o hidrogênio do nitrogênio ligado a carbonila (Palla, *et al.* 1986; Socea, *et al.* 2022). Além disso, a detecção desses isômeros depende do solvente utilizado, sendo que solventes mais apolares como clorofórmio estabilizam de maneira mais eficiente o isômero *Z* (Palla *et al.*, 1986; Munir *et al.*, 2021). Quanto as conformações, considerando a isomeria *E* são possíveis dois confôrmeros: *E* ($\text{C}=\text{N}$)($\text{N}-\text{N}$), *sinperiplanar* e *antiperiplanar* (Figura 31). Esses confôrmeros normalmente podem ser detectados por RMN, mas sua conformação preferencial depende da polaridade do solvente, que pode contribuir por estabilizar melhor ou não determinada conformação.

Normalmente, o uso de solventes polares como dimetilsulfóxido (DMSO) favorece a prevalência do confôrmero E (C=N)(N-N), sinperiplanar devido a formação de interações de hidrogênio (Palla *et al.*, 1986; Munir *et al.*, 2021; Socea *et al.*, 2022).

Figura 31. N-acil-hidrazonas e suas isomerias e confôrmeros possíveis.



A elucidação estrutural dos compostos foi realizada por meio de RMN de ¹H, DEPT-Q e bidimensionais (HSQC e HMBC). As análises foram organizadas em forma de tabela (Tabela 10, 11 e 12). Como a série dos derivados de N-acil-hidrazonas apresenta grande semelhança quanto a seus sinais característicos de hidrogênio e carbono, selecionou-se os compostos **(60)** (Tabela 10), **(66)** (Tabela 11) e **(71)** (Tabela 12) para discutir com mais detalhes sobre cada uma.

O composto **(60)** (Tabela 10) apresentou como sinais característicos do núcleo da hidrazona, o hidrogênio na posição 10 (H10), com deslocamento químico de 11,61 ppm, um simpleto integrando para 1H; o hidrogênio da posição 9 (H9), com deslocamento químico de 8,42 ppm, um simpleto integrando para 1H e o carbono da posição 11 (C11), com deslocamento químico de 162,80. O H10 é relatado na literatura por apresentar valores de deslocamento químicos diferentes de acordo com a isomeria da hidrazona. Com uso de CDCl₃-d₆ (clorofórmio deuterado), valores em torno de δ_H = 14,0 ppm foram relatados para as hidrazonas que apresentam isomeria Z, enquanto que valores em torno de δ_H = 10,4 ppm foram relatados para hidrazonas que apresentam isomeria E. Com o uso de DMSO-d₆ apenas o isômero E foi detectado, com H10 apresentando valores em torno de δ_H = 11,4 – 11,6. Os hidrogênios característicos do ácido borônico, H3 e H4, foram caracterizados como um simpleto em 8,19 ppm, com integração para 2H. O carbono quaternário C2, ligado diretamente ao grupo ácido borônico, não é detectado no experimento de DEPT-Q. Com auxílio do experimento de HMBC, foi possível identificar que o único acoplamento a longa distância que as hidroxilas do ácido borônico fazem é em J₂ com um sinal em δ_C = 134,58. Com isso, justifica-se que esse é o provável sinal do C2. O hidrogênio da hidroxila (H17) apresentou como sinal característico um simpleto em 9,76 ppm, com integração para 1H. Quanto aos hidrogênios aromáticos, as posições H1, H5, H6 e H7 foram caracterizados como: um simpleto em 8,12 ppm, integrando para 1H; um duplete em 7,75 ppm, com J = 7,5 Hz e integração para 1H; um triplete em 7,43 ppm, com J = 7,5 Hz e integração para 1H e um

duplete em 7,84 ppm, com $J = 7.5$ Hz e integração *para* 1H, respectivamente. A constante de acoplamento obtida *para* esse sistema aromático justificam que os hidrogênios acoplam entre si, em *orto*. Os hidrogênios do outro sistema aromático (anel B), H13, H14 e H18 foram caracterizados como um multiplete em 7,32 ppm, com integração *para* 3H. O H15 foi caracterizado como um duplete em 6,98 ppm, com integração *para* 1H. Para comprovação das posições, bem como a identificação dos carbonos quaternários, o experimento de HMBC foi utilizado. O H17 acopla em J_2 com o carbono em $\delta_c = 157,31$, sugerindo se tratar do C16. Os hidrogenios H13, H14 e H18 acoplam em J_2 e J_3 com o carbono em $\delta_c = 134,88$, sugerindo se tratar do C12. O hidrogênio H6 acopla em J_3 com o carbono em $\delta_c = 133,39$, sugerindo se tratar do C8.

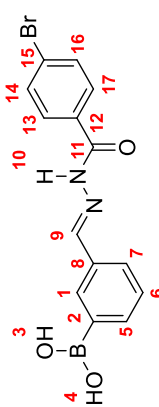
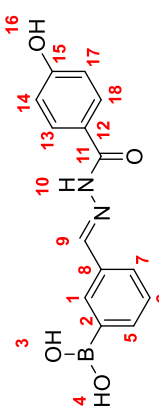
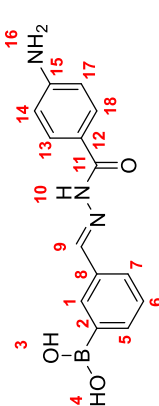
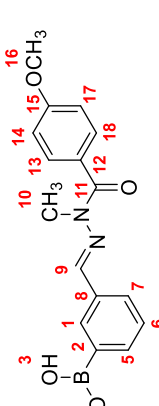
O composto **(66)** (Tabela 11) apresenta sua estrutura química muito similar ao do composto **(60)**, diferenciando-se apenas pela posição da substituição da hidroxila no anel B. Os sinais do anel aromático A apresentaram valores de deslocamento químico e constantes de acoplamento praticamente idênticos ao composto **(60)** e não serão discutidos novamente. Os hidrogênios característicos do núcleo das hidrazonas, H9 e H10, apresentaram deslocamentos químicos em $\delta_H = 8,42$ e 11,61 dois simpletos com integração *para* 1H, respectivamente. Os hidrogênios aromáticos do anel B foram caracterizados em: H13 e H18, um duplete com $J = 8.8$ Hz e integração *para* 2H; H14 e H16 um duplete com $J = 8.8$ Hz e integração *para* 2H. Esses sinais indicam que os hidrogênios estão acoplando entre si (em *orto*) e que são equivalentes, o que justifica um único sinal com integração *para* 2H. Esse tipo de sinal é característico dos anéis aromáticos com substituição em *para*. Ao comparar os compostos **(66)** e **(60)**, observa-se que o carbono quaternário C12 sofre uma influência quanto a posição do grupo substituído no anel aromático. Nos compostos que apresentam substituição em *para*, o C12 apresentou deslocamentos químicos menores do que nos compostos substituídos em *meta*. Como se tratam de grupos doadores de densidade eletrônica por ressonância e um retirante de densidade fraco, mas com uma nuvem eletrônica grande e polarizável, o C12 sofre um maior efeito de blindagem na presença desses grupos quando substituídos em *para* do que em *meta*.

O composto **(71)** (Tabela 12) foi o único dessa série de derivados que apresenta o ácido borônico substituído no anel na posição *para*. Os hidrogênios aromáticos H2 e H6; H1 e H7, foram caracterizados em: dois dupletos, com deslocamentos químicos em 7,86 e 7,70 e $J = 7.8$ Hz, ambos integrando *para* 2H. Esse sinal é característico dos hidrogênios aromáticos com substituinte em *para* e indicam que estão acoplando entre si (em *orto*). Os carbonos quaternários nas posições 8 e 12 apresentaram valores de deslocamento químicos muito similares $\delta_c = 135,76$ e 133,45 respectivamente, o que demonstra que a falta de substituintes no anel B influencia no efeito de blindagem no C12, tornando-o menos protegido nesses casos. O experimento de HMBC foi realizado para comprovação das posições dos carbonos quaternários, sendo que os hidrogênios H14 e H16 acoplaram em J_3 com o sinal $\delta_c = 133,45$ e os hidrogênios H1 e H7 acoplaram em J_2 com o sinal $\delta_c = 135,76$.

Tabela 10. Caracterização estrutural de (60), (61), (65) e (69) por RMN de ¹H, DEPT-Q, HSQC e HMBC em DMSO-d₆.

Posição	(65)				(60)				(69)				(61)			
	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
1	8,13 (s, 1H)	133,10	8,12 (s, 1H)	132,93	7,97 (t, J = 1.5 Hz, 1H)	133,67	8,11 (s, 1H)	132,84								
2	-	-	-	134,58		134,59		134,92								
3 e 4	8,22 (s, 2H)	-	8,19 (s, 2H)	-	8,08 (s, 2H)	-	8,19 (s, 2H)	-								
5	7,77 (d, J = 7.5 Hz, 1H)	128,62	7,75 (d, J = 7.5 Hz, 1H)	128,46	7,53 (dt, J = 7.5, 1.5 Hz, 1H)	127,27	7,74 (m, 1H)	128,29								
6	7,44 (t, J = 7.5 Hz, 1H)	127,87	7,43 (t, J = 7.5 Hz, 1H)	127,77	7,34 (t, J = 7.5 Hz, 1H)	127,49	7,42 (t, J = 7.5 Hz, 1H)	127,66								
7	7,85 (d, J = 7.5 Hz, 1H)	135,88	7,84 (d, J = 7.5 Hz, 1H)	135,64	7,77 (dt, J = 7.5, 1.5 Hz, 1H)	134,92	7,83 (d, J = 7.5 Hz, 1H)	135,52								
8	-	-	-	133,39		133,79		133,50								
9	8,44 (s, 1H)	148,77	8,45 (s, 1H)	147,90	8,03 (s, 1H)	140,82	8,42 (s, 1H)	147,45								
10	11,91 (s, 1H)	-	11,74 (s, 1H)	-	3,79 (s, 3H)	54,82	11,64 (s, 1H)	-								
11	-	162,05	-	163,13		158,79		163,93								
12	-	-	-	134,88		136,79		134,36								
13	7,92 (d, J = 7.9 Hz, 1H)	126,70	7,32 (m, 3H)	129,43	7,07 (m, 1H)	115,73	7,02 (d, J = 7.9 Hz, 1H)	114,22								

Tabela 11. Caracterização estrutural de (66), (67), (68) e (70) por RMN de ¹H, DEPT-Q, HSQC e HMBC em DMSO-d₆.

								
	(68)	(66)	(67)	(70)				
	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)				
	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)				
1	8,13 (s, 1H)	132,91	8,11 (s, 1H)	133,06	8,08 (s, 1H)	132,81	8,00 (s, 1H)	133,57
2	-	134,76	-	134,76	-	134,70	-	134,89
3 e 4	8,21 (s, 2H)	-	8,20 (s, 2H)	-	8,19 (s, 2H)	-	8,09 (s, 2H)	-
5	7,77 (m, 1H)	128,40	7,74 (d, J = 7.5 Hz, 1H)	128,58	7,73 (d, J = 7.5 Hz, 1H)	128,33	7,78 (dt, J = 7.5, 1.3 Hz, 1H)	134,89
6	7,44 (t, J = 7.5 Hz, 1H)	127,66	7,42 (t, J = 7.5 Hz, 1H)	127,96	7,41 (t, J = 7.5 Hz, 1H)	127,74	7,36 (t, J = 7.5 Hz, 1H)	127,62
7	7,85 (d, J = 7.5 Hz, 1H)	135,68	7,83 (m, 1H)	135,64	7,81 (dt, J = 7.5, 1.2 Hz, 1H)	135,32	7,59 (dt, J = 7.5, 1.3 Hz, 1H)	127,52
8	-	133,27	-	133,57	-	133,76	-	133,95
9	8,45 (s, 1H)	148,30	8,42 (s, 1H)	147,27	8,39 (s, 1H)	146,30	8,01 (s, 1H)	140,47
10	11,90 (s, 1H)	-	11,61 (s, 1H)	-	11,41 (s, 1H)	-	3,83	54,95
11	-	162,64	-	162,80	-	164,00	-	160,79
12	-	132,55	-	123,95	-	119,56	-	127,03
13	7,87 (d, J = 8.5 Hz, 2H)	129,45	7,81 (d, J = 8.8 Hz, 1H)	129,72	7,67 (d, J = 8.7 Hz, 2H)	129,28	7,72 (m, 2H)	131,80

14	7,76 (d, J = 8.4 Hz, 2H)	131,23	6,86 (d, J = 8.7 Hz, 2H)	115,09	6,59 (d, J = 8.7 Hz, 2H)	112,50	7,01 (d, J = 8.9 Hz, 1H)	112,50
15	-	125,98	-	160,70	-	152,31	-	169,05
16	7,76 (d, J = 8.4 Hz, 2-H)	131,23	10,14 (s, 1H)	-	5,77 (s, 2H)	-	3,49	28,46
17	7,87 (d, J = 8.5 Hz, 2H)	129,45	6,86 (d, J = 8.7 Hz, 2H)	115,09	6,59 (d, J = 8.7 Hz, 2H)	112,50	7,01 (d, J = 8.9 Hz, 1H)	112,50
18	-	-	7,81 (d, J = 8.8 Hz, 1H)	129,72	7,67 (d, J = 8.7 Hz, 2H)	129,28	7,72 (m, 2H)	131,80

Tabela 12. Caracterização estrutural de (62), (63), (64) e (71) por RMN de ¹H, DEPT-Q, HSQC e HMBC em DMSO-d₆.

Posição	(64)		(71)		(62)		(63)	
	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
1	8,13 (s, 1H)	133,13	7,86 (d, J = 7,8 Hz, 2H)	134,32	8,12 (s, 1H)	133,24	8,12 (s, 1H)	133,08
2	-	134,77	7,70 (d, J = 7,8 Hz, 2H)	125,90	-	134,70	-	134,27
3 e 4	8,21 (s, 2H)	-	-	136,37	8,23 (s, 2H)	-	8,20 (s, 2H)	-
5	7,85 (d, J = 7,5 Hz, 1H)	135,85	8,17 (s, 2H)	-	7,77 (d, J = 7,5 Hz, 1H)	128,09	7,76 (d, J = 7,5 Hz, 1H)	128,68
6	7,44 (t, J = 7,4 Hz, 1H)	127,63	7,70 (d, J = 7,8 Hz, 2H)	125,90	7,45 (m, 3H)	128,09	7,43 (t, J = 7,5 Hz, 1H)	127,97
7	7,77 (d, J = 7,5 Hz, 1H)	128,00	7,86 (d, J = J = 7,8 Hz, 2H)	134,32	7,84 (d, J = 7,5 Hz, 1H)	135,99	7,84 (d, J = 7,5 Hz, 1H)	135,76
8	-	133,50	-	135,76	-	133,43	-	125,51
9	8,46 (s, 1H)	148,25	8,46 (s, 1H)	147,71	8,45 (s, 1H)	148,47	8,44 (s, 1H)	147,90
10	11,83 (s, 1H)	-	11,88 (s, 1(H))	-	11,80 (s, 1H)	-	11,71 (s, 1H)	-
11	-	163,20	-	163,30	-	163,08	-	162,62
12	-	133,39	-	133,45	-	134,92	-	133,39
13	7,92 (d, J = 7,4 Hz, 2H)	127,69	7,92 (d, J = 7,4 Hz, 2H)	127,43	7,49 (d, J = 7,7 Hz, 1H)	119,94	7,92 (d, J = 8,9 Hz, 2H)	129,60

14	7,53 (t, J = 7.4 Hz, 2H)	127,96	7,53 (t, J = 7.4 Hz, 2H)	128,28	7,45 (m, 3H)	129,85	7,06 (d, J = 8.9 Hz, 2H)	113,79
15	7,60 (t, J = 7.5 Hz, 1H)	131,78	7,60 (t, J = 7.5 Hz, 1H)	131,65	7,16 (m, 1H)	117,64	-	162,07
16	7,53 (t, J = 7.4 Hz, 2H)	127,96	7,53 (t, J = 7.4 Hz, 2H)	128,28	-	159,34	3,83 (s, 3H)	55,49
17	7,92 (d, J = 7.4 Hz, 2H)	127,69	7,92 (d, J = 7.4 Hz, 2H)	127,43	3,83 (s, 3H)	55,47	7,06 (d, J = 8.9 Hz, 2H)	113,79
18	-	-	-	-	7,45 (m, 3H)	112,95	7,92 (d, J = 8.9 Hz, 2H)	129,60

4.3 AVALIAÇÃO ENZIMÁTICA DOS COMPOSTOS FRENTE AS PROTEASES DE SARS-COV-2

Os compostos **(6) - (11), (17), (18), (19), (29), (31), (31'), (33), (33'), (34), (34')** e o composto FL-166 foram avaliados frente as proteases 3CL^{pro} e PL^{pro} de SARS-CoV-2 em uma concentração única de 40 μ M. A porcentagem de inibição dos compostos foi determinada e nenhum apresentou inibição superior a 50% frente a nenhuma das proteases e por conta disso, os ensaios para determinação do valor de IC₅₀ não foram realizados.

O composto FL-166 não se mostrou efetivo frente a protease de SARS-CoV-2. Os autores (Bacha *et al.*, 2004) apesar de relatarem um potente valor de Ki para essa molécula frente a 3CL^{pro} de SARS-CoV, não determinaram valores de porcentagem de inibição frente a protease, nem valores de IC₅₀ tanto para a protease quanto para o vírus. Até o presente momento, nenhum estudo de avaliação enzimática frente a SARS-CoV-2 referente ao composto FL-166 ou derivados de borônicos com estruturas similares foi publicado.

Diferentes hipóteses são possíveis para justificar as diferenças observadas para o composto FL-166 quanto seu potente valor de Ki para 3CL^{pro} de SARS-CoV e o valor não expressivo de inibição da 3CL^{pro} de SARS-CoV-2. Uma hipótese é que o FL-166 e derivados desses compostos não sejam efetivos para a protease de SARS-CoV-2, mas, apresentem atividade frente a protease de SARS-CoV. Porém, é importante ressaltar que as proteases apresentam 96% de similaridade e a região do sítio ativo é conservada. A única maneira de verificar essa hipótese seria por meio da comprovação da região exata e das interações com a qual o FL-166 realiza na protease de SARS-CoV por meio de cristalografia. Além disso, os compostos também poderiam ser avaliados frente a protease principal de SARS-CoV, com objetivo de determinação dos valores de porcentagem de inibição, bem como de IC₅₀ do protótipo FL-166 e dos derivados sintetizado nesse trabalho.

5. CONCLUSÕES

O planejamento estrutural com o uso da estratégia de modelagem molecular levou ao planejamento de diferentes compostos derivados de ácidos borônicos, baseados na estrutura do protótipo FL-166, inibidor da protease principal de SARS-CoV. Foram sintetizados 38 compostos, que foram purificados e caracterizados. Os rendimentos variaram de acordo com cada classe de compostos, sendo a classe de derivados de *N*-acil-hidrazonas os que apresentaram maior rendimento médio de 60%. A caracterização estrutural realizada por meio de RMN uni e bidimensional sugere a obtenção das moléculas, bem como a isomeria *E* para as chalconas e *N*-acil-hidrazonas.

Dos compostos sintetizados, 16 foram enviados para avaliação enzimática frente as proteases PL^{pro} e 3CL^{pro} de SARS-CoV-2, incluindo o protótipo FL-166. Os resultados demonstraram que os compostos não foram efetivos em promover uma inibição superior a 50% do alvo, quando avaliados em uma concentração pontual de 40 μ M.

6. REFERÊNCIAS

- ALTMAN, J. D. et al. Factors Affecting Vaccine Attitudes Influenced by the COVID-19 Pandemic. **Vaccines**. v. 11, n. 516, 2023
- ALAAELDIN, R. et al. In vitro inhibition and molecular docking of a new ciprofloxacin-chalcone against SARS-CoV-2 main protease. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 36, p. 160-170, 2022.
- ÁLVAREZ, M. G.; CRIIOVI, D. G.; MEDINA, F.; TICHIT, D. Synthesis of Chalcone Using LDH/Graphene Nanocatalysts of Different Compositions. **ChemEngineering**. v. 3, n. 1, p. 29, 2019.
- BANERJEE, R.; PERERA, L.; TILLEKERATNE, L.M.V. Potential SARS-CoV-2 main protease inhibitors. **Drug Discovery Today**. v 26, n. 3, p. 804-816, 2021.
- BERLIN, D. A. et al. Severe Covid-19. **The New England Journal of Medicine**. v. 383, n. 25, 2020.
- CESCO de, S.; et al. Covalent inhibitors design and discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**. n. 138, p. 96-114. 2017.
- CHEN, G. et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 130, n. 5, 2020.
- CLEMENTINO, L. C. et al. Design, synthesis and biological evaluation of *N*-oxide derivatives with potent *in vivo* antileishmanial activity. **PLOS One**. v. 16, n. 11, p. 1-22, 2021.
- De OLIVEIRA, A. S. et al. Novel trypanocidal thiophen-chalcone cruzain inhibitors: structure- and ligand-based studies. **Future Medicinal Chemistry**, n. 14, p. 11, 2022.
- DUVEAU, D. Y.; THOMAS, C. J. The Remarkable Selectivity of Nirmatrelvir. **ACS Pharmacology & Translational Science**., v. 5, p. 445-447, 2022.
- FASSI, E.M.A. et al. Computational Design, Synthesis, and Biophysical Evaluation of β -Amido Boronic Acids as SARS-CoV-2 Mpro Inhibitor. **Molecules**., v. 28, n. 5, p. 2356, 2023.
- FDA NEWS RELEASE, 2022. Disponível em: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-roundup-april-5-2022>. Acesso em: 12 jan. 2024.
- FERNANDES, G. F. S.; DENNY, W. A.; DOS SANTOS, J. L. Boron in drug design: Recent advances in the development of new therapeutic agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 179, p. 791-804, 2019.
- GHOSH, A.K. et al. Indole Chloropyridinyl Ester-Derived SARS-CoV-2 3CLpro Inhibitors: Enzyme Inhibition, Antiviral Efficacy, Structure-Activity Relationship, and X-ray Structural Studies. **Journal of Medicinal Chemistry**., v. 64, n. 19, p. 14702-14714, 2021.
- GOSH, A.K. et al. Design, synthesis and antiviral efficacy of a series of potent chloropyridyl ester-derived SARS-CoV 3CLpro inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. , v. 18, n. 20, p. 5684-5688, 2008.
- GUIMARÃES, D. G.; ROLIM, L. A.; GONSALVES, A. A.; ARAÚJO, C.R.M. Investigação do Potencial Biológico de Hidrazonas Obtidas Sinteticamente na Última Década (2006-2016): Uma Revisão Sistemática. **Revista Virtual de Química**., v. 9, n. 6, p. 2551-2592, 2017.
- HE, J. et al. Potential of coronavirus 3C-like protease inhibitors for the development of new anti-SARS-CoV-2 drugs: Insights from structures of protease and inhibitors. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 56, n. 2, p. 106055, 2020.
- Helmy, Y. A. et al. The covid-19 Pandemic: A Comprehensive Review of Taxonomy, Genetics, Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Control. **Journal of Clinical Medicine**., v. 9, n. 4, p. 1225, 2020

Hu, Q. et al. The SARS-CoV-2 Main Protease (mpro): Structure, Function, and Emerging Therapies for Covid-19. **MedComm**. v. 3, n. 3, p. 151, 2022.

HU, B.; HUANG, S.; YIN, I. The cytokine storm and covid-19. **Journal of Medical Virology**. v. 93, n. 1, p. 250-256, 2021.

HAUNG, C. et al. Clinical Features of Patients Infected with 2019 Novel Coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet**. v. 395, n. 10223, p. 497-506, 2020.

ISHIYAMA, T.; MURATA, M.; MIYAURA, N. Palladium(0)-catalyzed Cross-coupling Reaction of Alkoxydiboron with Haloarenes: a Direct Procedure for Arylboronic Esters. **The Journal of Organic Chemistry**. v. 60, n. 23, p. 7508-7510, 1995.

KÜHL, N. et al. Discovery of Potent Benzoxaborole Inhibitors Against SARS-CoV-2 Main and Dengue Virus Proteases. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 240, p. 114585, 2022.

LENNOX, A. J.J.; LLOYD-JONES, G.C. Selection of Boron Reagents for Suzuki–Miyaura Coupling. **Chemical Society Reviews**. v. 43, p. 412-443, 2014.

LI, G.; HILGENFELD, R.; WHITLEY, R.; E. CLERCQ de. Therapeutic Strategies for Covid-19: Progress and Lessons Learned. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 22, n. 6, p. 449-475, 2023.

LIU, Y.; et al. The Development of Coronavirus 3C-like Protease (3clpro) Inhibitors From 2010 to 2020. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 206, p. 112711, 2020

MAHAPATRA, D.K. et al. Chalcone Scaffolds as Anti-infective Agents: Structural and Molecular Target Perspectives. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 101, p. 496-524, 2015.

MONTANI, D. et al. Post-acute COVID-19 syndrome. **European Respiratory Review**. v. 31, n. 163, p. 210185, 2022.

MONTALBETTI, C.A.G.N. ; FALQUE, V. Amide bond formation and peptide coupling. **Tetrahedron**. v. 61, p. 10827-10852, 2005.

MUNIR, R. et al. Synthesis of Novel N-Acylhydrazones and Their C-N/N-N Bond Conformational Characterization by NMR Spectroscopy. **Molecules**. v. 26, n. 16, p. 4908, 2021.

Our World in Data, Coronavirus (COVID-19) vaccinations. Disponível em: <https://ourworldindata.org/covid-vaccinations>. Acesso em: 12 de jan. 2024.

PALLA, G. et al. Conformational behaviour and E/Z isomerization of N-acyl and N-arylylhydrazones. **Tetrahedron**. v. 42, n. 13, p. 3649-3654, 1986.

PARK, J. et al. Chalcones isolated from *Angelica keiskei* inhibit cysteine proteases of SARS-CoV. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**. v. 31, n. 1, p. 23-30, 2016.

PEREIRA, R. et al. *Bis*-chalcones: A review of synthetic methodologies and anti-inflammatory effects. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 252, p. 115280, 2023.

PLESCIA, J.; MOITESSIER, N. Design and discovery of boronic acid drugs. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 195, p. 112270, 2020.

PRATES, J.L.B.; PAVAN, A.R.; DOS SANTOS, J.L. Boron in Medicinal and Organic Chemistry. **Current Organic Chemistry**. v. 25, n. 16 p. 1853-1867, 2021.

QIN, H. et al. Chalcone hybrids as privileged scaffolds in antimalarial drug discovery: A key review. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 193, p. 112215, 2020.

RAZAI, M. S. et al. Covid-19 vaccination hesitancy. **The BMJ**. v. 373, n. 1138, 2021.

RAMMOHAN, A. et al. Chalcone synthesis, properties and medicinal applications: a review. **Environmental Chemistry Letters**. v. 18, p. 433-458, 2020.

RUBIN, R. From Positive to Negative to Positive Again—The Mystery of Why COVID-19 Rebounds in Some Patients Who Take Paxlovid. **JAMA**, 327, 24, p. 2380-2382, 2022.

SARAVOLATZ, L. D.; DEPCINSKI, S.; SHARMA, M. Molnupiravir and Nirmatrelvir-Ritonavir: Oral Coronavirus Disease 2019 Antiviral Drugs. **Clinical Infectious Diseases**. v. 76, n. 1, p. 165-171, 2023.

SOCEA, L. et al. Acylhydrazones and Their Biological Activity: A Review. **Molecules**, v. 27, n. 24, p. 8719, 2022.

SMOUM, R. et al. Boron Containing Compounds as Protease Inhibitors. **Chemical Reviews**. v. 112, n. 7, p. 4156-4220, 2012.

TAKASHITA, E. et al. Efficacy of Antiviral Agents against the SARS-CoV-2 Omicron Subvariant BA.2. **The New England Journal of Medicine**. v. 386, n. 15, p. 1-3, 2022.

VALIPOUR, M. Recruitment of chalcone's potential in drug discovery of anti-SARS-CoV-2 agents. **Phytotherapy Research**. v. 36, n. 12, p. 4477-4490, 2022.

WANG, Y. et al. Rapid COVID-19 rebound in a severe COVID-19 patient during 20-day course of Paxlovid. **Journal of Infection**. v. 85, n. 5, p. 134-136, 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). A clinical case definition of post COVID-19 condition by a Delphi consensus. 2021. Disponível em: https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-Post_COVID-19_condition-Clinical_case_definition-2021. Acesso em: 12 de jan. 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Coronavirus Disease (COVID-19). Disponível em: https://www.who.int/health-topics/coronavirus#tab=tab_3. Acesso em: 12 de jan. 2024.

XU, E.; XIE, Y.; AL-ALY, Z. Long-term neurologic outcomes of COVID-19. **Nature Medicine**. v. 28, p. 2406-2415, 2022.

YONG, S. J. Long Covid or post-COVID-19 syndrome: putative pathophysiology, risk factors, and treatments. **Infectious Diseases**. v. 53, n. 10, p. 737-754, 2021.

ZHENG, C. et al. Real-world effectiveness of COVID-19 vaccines: a literature review and meta-analysis. **International Journal of Infectious Diseases**. v. 114, p. 252-260, 2022.

PARTE B

Síntese, caracterização e avaliação da atividade anticancer *in vitro* de derivados de chalconas e xantonas contendo ácido borônico

1. INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA

O câncer de cabeça e pescoço (CCP) ou do inglês “*head and neck cancer*” (HCN), é o sétimo câncer mais comum do mundo, sendo responsável por mais de 870.000 novos casos e 440.000 mortes em 2020 (Sung *et al.*, 2021). A incidência dos casos desse tipo de câncer está em ascensão e estimativas preveem um aumento de 1,08 milhões de novos casos por ano, até 2030 (Sung *et al.*, 2021).

No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer, são registrados cerca de 41 mil novos casos por ano. Apenas em 2019 foram computados 13.189 obtidos no Brasil decorrentes de CCP, sendo em sua maioria (34%) provenientes de câncer na laringe (C32) (Observatório de Oncologia, 2021). Entre 2014 e 2018, os dados dos estabelecimentos de saúde que fazem parte dos Registros Hospitalares de Câncer do INCA mostraram que 48% dos pacientes com CCP apresentaram diagnóstico tardio (estágios III e IV) (Observatório de Oncologia, 2021). Dentre as localizações, o câncer de hipofaringe (C12-13) foi o que apresentou maior percentual (71,2%) de pacientes diagnosticados já em estágios avançados (III e IV) (Observatório de Oncologia, 2021). O diagnóstico tardio nesses tipos de cânceres está associado na demora da percepção de sintomas nesses locais (Observatório de Oncologia, 2021).

Aproximadamente 90% dos CCPs são carcinomas de células escamosas, que se originam do epitélio da cavidade oral, faringe e laringe (SUNG, et al. 2021). Devido a divergências na incidência e no perfil de risco para pessoas com CCP nos três locais anatômicos (cavidade oral, faringe e laringe), estes são considerados como entidades separadas (Gormley *et al.*, 2022; Thomas *et al.*, 2018). Os diferentes tipos de CCPs foram categorizados com base em sua localização anatômica usando a Classificação Internacional de Doenças (CID-10) da OMS (Quadro 1).

Quadro 1. Classificação dos tipos de CCPs de acordo com sua localização anatômica e os respectivos códigos CID-10.

Classificação	ICD-10 code
Neoplasia maligna do lábio	C00
Neoplasia maligna da base da língua	C01
Neoplasia maligna de outra parte não específica da língua	C02
Neoplasia maligna da gengiva	C03
Neoplasia maligna do assoalho da boca	C04
Neoplasia maligna do palato	C05
Neoplasia maligna de outras regiões não específicas da boca	C06
Neoplasia maligna da glândula parótida	C07
Neoplasia maligna de outras glândulas salivares não específicas	C08
Neoplasia maligna da amígdala	C09
Neoplasia maligna da orofaringe	C10
Neoplasia maligna da nasofaringe	C11

Neoplasia maligna do seio piriforme	C12
Neoplasia maligna da hipofaringe	C13
Neoplasia maligna de outras localizações e de localizações mal definidas do lábio, cavidade oral e faringe	C14
Neoplasia maligna da cavidade nasal e ouvido médio	C30
Neoplasia maligna dos seios da face	C31
Neoplasia maligna da laringe	C32
Neoplasia maligna de outras localizações e de localizações mal definidas	C76

Fonte: Adaptado de Gormley (2022).

1.2 FISIOPATOLOGIA E TRATAMENTO ATUAL

O CCP se origina da mucosa epitelial das células de cavidade oral, faringe, laringe e trato nasossinusal (Johnson *et al.*, 2020). Histologicamente, o CCP se inicia através de uma hiperplasia da célula epitelial, seguido de uma displasia (que pode ser classificada em leve, moderada ou forte), formação do carcinoma *in situ* e por fim, o carcinoma invasivo (Johnson *et al.*, 2020). Como o CCP é um câncer heterogêneo, a célula de origem vai depender da localização anatômica e do agente etiológico (Johnson *et al.*, 2020).

Pode-se classificar os eventos que levam a iniciação desse tipo de câncer em: CCP HPV-negativo ou CCP HPV-positivo (Johnson *et al.*, 2020). Os CPPs HPV-positivo e negativo apresentam diferenças quanto a expressão gênica e em seus perfis mutacionais e imunológicos (The Cancer Genome Atlas Network, 2015). Os dois principais fatores de risco para o desenvolvimento do CCP HPV-negativo são o uso de tabaco e o excesso no consumo de álcool (Leemans *et al.*, 2011; Johnson *et al.*, 2020). Os derivados carcinogênicos do tabaco como PHAs e nitrosaminas, passam por metabolismo levando a formação de metabólitos reativos. Esses metabólitos podem levar a formação de adutos covalentes de DNA, responsáveis por causar mutações e desordens genéticas (Johnson *et al.*, 2020). Além disso, o uso do tabaco é associado a um aumento da inflamação local nos tecidos expostos. Desta forma, a produção de citocinas inflamatórias, quimiocinas e desregulação de fatores de transcrição contribuem com a proliferação, angiogênese e carcinogênese nesses tecidos (Johnson *et al.*, 2020). A indução desse microambiente inflamatório por sua vez, favorece a progressão do tumor. Nakano e colaboradores (1999) identificaram elevadas concentrações das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 em tecidos tumorais de pacientes com câncer de cavidade oral (Nakano *et al.*, 1999). As citocinas podem estimular a progressão das células tumorais por diferentes mecanismos, desempenhando um papel patogênico no desenvolvimento do câncer. Outros estudos posteriores identificaram uma maior concentração das interleucinas IL-6 e IL-8 em pacientes com câncer de cavidade oral (Maie *et al.*, 2004; SahebJamee *et al.*, 2008). Scheff e colaboradores (2017) avaliaram que a citocina pró-inflamatória TNF- α estava presente em grandes concentrações em dois modelos celulares de câncer de cavidade oral (HSC3 e SCC9) e que essa citocina seria responsável por mediar a indução de nocicepção e inflamação nesse tipo de câncer (Scheff *et al.*, 2017). Por fim, a citocina pró-inflamatória TNF- α também seria responsável por

promover significativamente a progressão do câncer, promovendo a invasão celular (Goertzen *et al.*, 2018). Desta forma, é importante ressaltar a importância e a influência do microambiente tumoral na manutenção e progressão desse tipo de câncer.

A infecção pelo vírus HPV é um fator de risco para o desencadeamento do CCP (CCP HPV-positivo) (Johnson *et al.*, 2020). O HPV está associado com os cânceres na região orofaríngeo (> 70%) (Stein *et al.*, 2015). A oncogênese associada ao vírus HPV tem como mecanismo principal suas oncoproteínas E6 e E7 (The Cancer Genome Atlas Network, 2015; Johnson *et al.*, 2020). A proteína E6 interage com a proteína de ubiquitinação (E6-AP) levando a formação do complexo E6-E6-AP que interage especificamente com a proteína p53, levando a sua ubiquitinação e degradação (Scheffener *et al.*, 1993). Além disso, a proteína viral E7 está associada a mecanismos que levam a desregulação do ciclo celular (Leemans *et al.*, 2011). A proteína p53 é denominada como “supressora de tumor”, é uma das respostas imediatas na tentativa de conter os processos de proliferação do câncer. Em células normais a proteína p53 existe em concentrações muito baixas, porém, sob condição de estresse, esta proteína se acumula nas células e uma vez ativada, induz a expressão de genes-alvos que desencadeiam mecanismos supressores de tumores, como a parada do ciclo celular (ex. p21), morte celular programada (ex. Bax), senescência (p21) e inibição da angiogênese (ex. TSP1) (Herrero *et al.*, 2016). Desta forma, mecanismos que levem sua inibição ou degradação, como na presença da proteína viral E6, favorecem a proliferação das células tumorais.

Leemans e colaboradores (2011) classificaram as principais diferenças clínicas e características biológicas de pacientes com CCP HPV-positivo e negativo, o Quadro 2 sumariza essas informações:

Quadro 2. Características clínicas e biológicas de pacientes com CCP HPV-positivo e negativo

	CCP HPV-negativo	CCP HPV-positivo
Etiologia	Fumar, consumo excessivo de álcool	Sexo oral
Idade	Acima de 60 anos	Abaixo de 60 anos
Local de predileção	Não possui	Orofaringe
Prognóstico	Ruim	Favorável

Fonte: Adaptado de Leemans *et al.*, 2011.

O tratamento para o CCP é realizado de acordo com a individualidade de cada paciente, tendo influência da região anatômica do carcinoma, o estágio em que se encontra a doença, características da doença, entre outros (Johnson *et al.*, 2020). As principais formas de tratamento são a cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Pacientes com câncer de cavidade oral são mais propensos a passarem por cirurgia enquanto que pacientes com câncer na região da faringe e laringe usualmente recebem tratamento por radioterapia (Johnson *et al.*, 2020). Pacientes em estágios iniciais da doença possuem taxas altas de sobrevivência, entre 70 até 90%, após intervenção cirúrgica ou radioterapia (Laura; Chow, 2020).

Mais de 60% dos pacientes com CCP apresentam estágios III ou IV da doença, desenvolvendo normalmente tumores com invasão local acentuada, metástase para linfonodos ou

ambos (Laura; Chow, 2020). Nesses casos, ou, em casos em que a cirurgia não apresente vantagens a longo prazo, a quimiorradioterapia é o tratamento padrão *para* o CCP. Uma alta dose de cisplatina (100mg/m²) combinado com a radioterapia é o regime usual de tratamento. Devido a efeitos de toxicidade associados a cisplatina, seu uso é normalmente recomendado para pacientes não idosos, que não possuam comorbidades (Laura; Chow, 2020).

O CCP recorrente ou metastático ocorre em mais de 65% dos pacientes e nesse caso, o tratamento de primeira linha consiste no uso do anticorpo monoclonal pembrolizumab, ou a combinação entre pembrolizumab, cisplatina e 5-fluoracil (De Sousa; Ferrarotto, 2021). Pacientes que não são elegíveis *para* o tratamento com pembrolizumab, podem ainda receber cetuximab em combinação com cisplatina (ou carboplatina) e 5-fluoracil (Vermorken *et al.*, 2008). O anticorpo monoclonal pembrolizumab foi o mais recente agente aprovado pela FDA (em 2014) para o tratamento de CCP. Até então, apenas seis fármacos tinham sua aprovação, sendo estes: metotrexato (aprovado em 1956), 5-fluoracil (aprovado em 1957), bleomicina (aprovado em 1973, porém, raramente utilizado atualmente), cisplatina (aprovada em 1978) e docetaxel e cetuximabe (ambos aprovados em 2006) (Li *et al.*, 2014).

Atualmente novas terapias visando o tratamento mais efetivo do CCP estão sendo desenvolvidas. De maneira geral, existem duas abordagens principais no desenvolvimento de terapias direcionada ao câncer: biomacromoléculas e moléculas pequenas (Lee *et al.*, 2018; Zhong *et al.*, 2021). As biomacromoléculas englobam os anticorpos monoclonais, polipeptídios, conjugados e ácidos nucleicos (Zhong *et al.*, 2021). Os anticorpos monoclonais por exemplo, possuem grande aplicação no tratamento de diversos tipos de cânceres, mas assim como outros fármacos da classe das biomacromoléculas, apresenta como desvantagens sua forma de administração por via intravenosa ou subcutânea e seu elevado custo (Zhong *et al.*, 2021; Bedard *et al.*, 2020). As moléculas pequenas por sua vez, apresentam algumas vantagens como suas propriedades farmacocinéticas, menores custos, maior adesão do paciente e em fatores como o armazenamento e transporte desses medicamentos (Zhong *et al.*, 2021; Bedard *et al.*, 2020). Os alvos moleculares desses compostos são diversos, podendo atuar em enzimas epigenéticas, quinases, proteasomas e enzimas reguladoras de dano ao DNA (Zhong *et al.*, 2021).

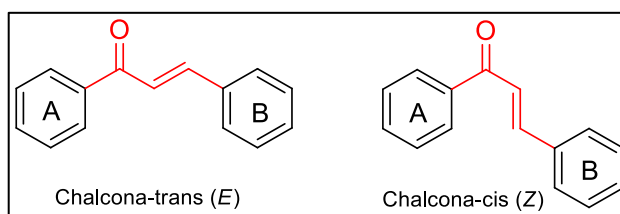
Apesar de serem amplamente estudadas, as moléculas pequenas apresentam desafios na terapêutica como o desenvolvimento de resistência a esses fármacos após um período de tempo de uso e baixa eficiência de resposta, uma vez que durante terapias prolongadas um número limitado de pacientes responde ao tratamento (Zhong *et al.*, 2021). Devido a essas limitações, a busca por novas moléculas e o estudo de seus alvos de atuação no tratamento do câncer são essenciais para o desenvolvimento de novos fármacos mais seletivos e eficientes.

1.3 CHALCONAS COMO SCAFFOLD NO DESENVOLVIMENTO DE COMPOSTOS ANTICÂNCER

As chalconas, caracterizadas pelo núcleo 1,3-difenil-2-propeno-1-ona (*E*) ou (*Z*) e são precursoras da classe dos flavonóides (Ouyang *et al.*, 2021; Rudrapal *et al.*, 2021). O termo “chalcona” foi introduzido por Kostanecki e Tomar em 1899 (Kostanecki *et al.*, 1899). Quimicamente,

as chalconas são cetonas alfa-beta insaturadas tendo uma ligação dupla conjugada com seu sistema de elétrons π delocalizado entre os anéis benzênicos. Usualmente são moléculas de baixa massa molecular (300 – 600 g/mol) que apresentam uma acentuada lipofilicidade ($\text{Log } P \geq 5$) (Rudrapal *et al.*, 2021). Podem apresentar isomeria *cis* (*Z*) ou *trans* (*E*), sendo a forma *trans* termodinamicamente mais estável que a forma *cis* (Rudrapal *et al.*, 2021) (Figura 32). As chalconas, sendo estas isoladas de plantas ou sintéticas, são relatadas na literatura por apresentar diferentes atividades biológicas como: propriedade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, antifúngica, anticâncer, entre outras (Jasim *et al.*, 2021). Mas, apesar de serem amplamente estudadas por conta de sua potencial aplicação no tratamento de diferentes doenças, as chalconas podem apresentar problemas de baixa biodisponibilidade (Rudrapal *et al.*, 2021). Desta forma, considera-se importante a observação além da atividade *in vitro* desses derivados, propondo modificações a fim de otimizar suas propriedades ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade).

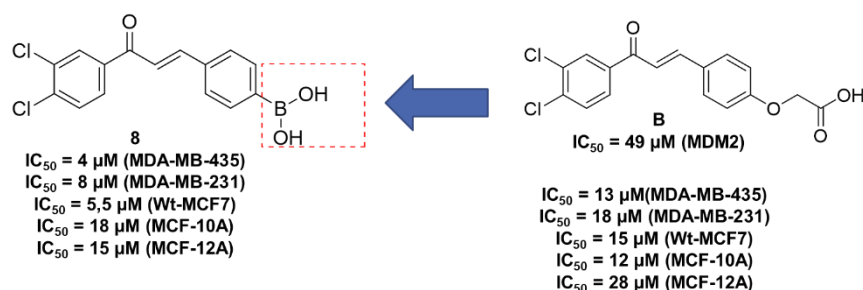
Figura 32. Chalconas avaliadas como inibidoras da interação MDM2-p53 e seus valores de IC_{50} frente a diferentes modelos celulares de câncer de mama e células normais



Diferentes chalconas são relatadas na literatura por sua atividade anticâncer, tendo como mecanismo de ação a inibição de diferentes alvos moleculares envolvidos na carcinogênese como enzimas epigenéticas (histonas deacetilases e sirtuinas), proteasoma, NF- κ B, quinases, catepsina-k, tubulina, entre outros (Mahapatra *et al.*, 2015). Quanto às chalconas contendo ácidos borônicos, destacam-se os estudos de Stoll e colaboradores (2001), Kumar e colaboradores (2003), Achanta e colaboradores (2006) e Kong e colaboradores (2010). Em 2001, Stoll e colaboradores buscaram identificar o mecanismo pelo qual diferentes chalconas apresentavam atividade frente a inibição de modelos celulares de câncer de mama. Neste estudo, os autores demonstraram que essas moléculas foram capazes de interferir no complexo MDM2-p53 (Stoll *et al.*, 2001). Essas duas proteínas fazem parte de um sistema de auto-regulação, sendo a proteína MDM2 transcricionalmente ativada por p53, levando a inibição da atividade de p53 por diferentes mecanismos (Levine *et al.*, 1992). MDM2 se liga ao domínio transcricional de p53 através de seu domínio N-terminal e bloqueia sua transativação; após se ligar a p53, a proteína MDM2 também é capaz de exportar p53 para fora do núcleo, impedindo seu acesso ao DNA e com isso, perdendo sua função como fator de transcrição e por fim, sendo uma proteína de ubiquitinação, MDM2 pode ubiquitinar a proteína p53 levando a sua degradação pelo proteasoma (Chène, 2003). Como o MDM2 desempenha um papel principal na inibição da atividade de p53, antagonizando sua ação por meio de uma interação direta, o bloqueio da interação proteína-proteína MDM2-p53 é uma estratégia explorada com o objetivo liberar p53 dessa interação e restaurar sua função (Zhao *et al.*, 2014). No estudo de Stoll e colaboradores (2001), destaca-se o composto (**B** - Figura 33). Esses derivado de chalcona apresentou valor de IC_{50}

para MDM2 de 49 μM . Em 2003, Kumar e colaboradores (2003) avaliaram a troca isostérica entre o ácido carboxílico presentes nas estruturas de Stoll e colaboradores (2001) por um ácido borônico. O composto (**8**) (Figura 33), contendo ácido borônico em sua estrutura, se mostrou mais potente frente aos modelos celulares de câncer de mama (MDA-MB-435, MDA-MB-231 e Wt-MCF7) do que seu derivado contendo ácido carboxílico (composto **B** – Figura 33), mantendo um perfil não citotóxico frente aos modelos de célula normal (MCF-10 e MCF-12A) (Kumar *et al.*, 2003). Nesse trabalho, os autores não avaliaram o real mecanismo pelo qual essas chalconas contendo ácido borônico atuam, porém, justificaram com base no estudo de Stoll e colaboradores (2001) que o mecanismo provavelmente seria através da interação com MDM2 por se tratar de estruturas químicas muito similares.

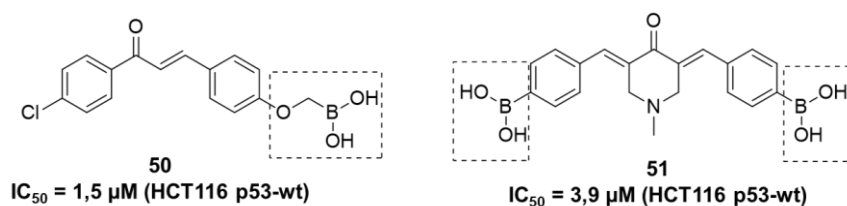
Figura 33. Chalconas avaliadas como inibidoras da interação MDM2-p53 e seus valores de IC_{50} frente a diferentes modelos celulares de câncer de mama e células normais



Fonte: Adaptado de Stoll *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 2003.

Já no estudo de Achanta e colaboradores (2006), a avaliação de oito chalconas derivatizadas com ácido borônico levou a identificação de dois compostos (**50** e **51** – Figura 34) que apresentaram os melhores valores de IC_{50} quando avaliados em um modelo celular de câncer de cólon (HCT116 wt-p53), sendo 1,5 e 3,9 μM respectivamente (Achanta *et al.*, 2006). Por meio da avaliação do mecanismo de ação, identificou-se que esses compostos atuam por meio da inibição do proteassoma 20S, levando ao acúmulo de p53. Curiosamente, essas chalconas apresentaram um mecanismo similar ao do fármaco Bortezomib, sendo este capaz de inibir o proteassoma 26S por meio da interação covalente reversível que o ácido borônico realiza com a treonina catalítica desse proteassoma. Desta forma, a inibição do proteassoma leva a prevenção da degradação de fatores pró-apoptóticos, como a proteína p53.

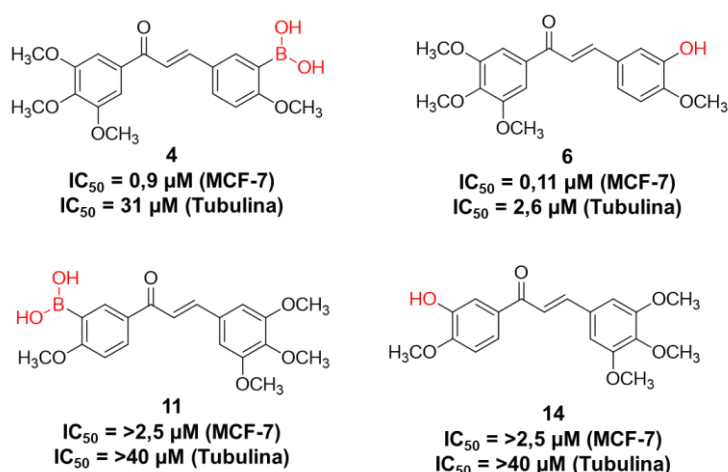
Figura 34. Chalconas avaliadas frente ao modelo celular de câncer de cólon, inibidoras do proteassoma 20S



Fonte: Adaptado de Achanta *et al.*, 2006

Kong e colaboradores (2010) sintetizaram dois análogos de chalconas derivatizadas com ácido borônico, baseado na estrutura química da combrestatina A-4 (**4** e **11** – Figura 35). Ambos os compostos, **4** e **11**, foram avaliados frente ao modelo celular de câncer de mama (MCF-7) apresentando valores de $IC_{50} = 0,9$ e $>2,5$ μM respectivamente (Kong *et al.*, 2010). Os derivados que não continham ácido borônico em sua estrutura química (**6** e **14** – Figura 35) foram avaliados no mesmo modelo celular apresentando $IC_{50} = 0,11$ e >40 μM (Kong *et al.*, 2010). Os autores sugerem que o mecanismo de ação dessas chalconas seja por meio da inibição da polimerização da tubulina, apesar de apresentarem valores de IC_{50} não tão expressivos ($IC_{50} = 31$ e >40 μM) frente a esse alvo quanto comparado a atividade frente as células cancerígenas ($IC_{50} = 0,9$ e $>2,5$ μM). Interessante notar que a posição em que o ácido borônico foi substituído nos anéis da chalcona teve grande influência no valor da atividade anticâncer, sendo sua substituição no anel B, na posição meta, mais promissora do que quando substituído no anel A.

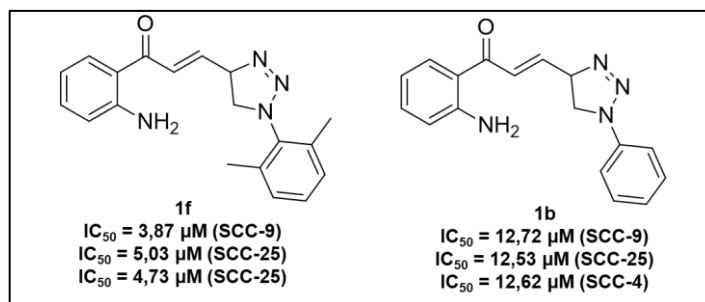
Figura 35. Chalconas derivatizadas com ácidos borônicos frente ao modelo celular de câncer de mama, avaliadas como inibidoras da polimerização da tubulina.



Fonte: Adaptado de Kong *et al.*, 2010

Wermelinger e colaboradores (2023) descreveram uma série de chalconas avaliadas frente ao câncer de cavidade oral, objeto de estudo deste trabalho. As seis chalconas foram primeiramente avaliadas frente ao modelo celular SCC-9 (câncer de cavidade oral) e posteriormente, as duas moléculas mais ativas (1b e 1f – Figura 36) foram avaliadas também frente aos modelos SCC-25 e SCC-4, sendo também modelos celulares de câncer de cavidade oral. Experimentos *in silico* de docking e dinâmica molecular indicam que essas chalconas estejam atuando por meio da inibição da interação MDM2-p53. Como padrão dos estudos, os autores utilizaram a Nutlin-3a, inibidor seletivo de MDM2. Quando avaliada no estudo *in vitro* (frente ao modelo SCC-9) esse composto demonstrou $IC_{50} = 17,99 \mu\text{M}$.

Figura 36. Chalconas avaliadas frente ao modelo celular de câncer de cavidade oral, inibidoras da interação MDM2-p53.



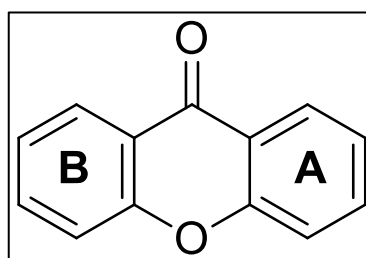
Fonte: Adaptado de Wermelinger *et al.*, 2023

Considerando os trabalhos da literatura, justifica-se que as chalconas podem ser um interessante “*scaffold*” a ser explorado no desenvolvimento de novos derivados sintéticos visando sua atividade anticâncer. Tendo em vista a potencialidade desses compostos frente a inibição de diferentes modelos celulares de câncer, justifica-se o estudo de derivados de chalconas frente a outros modelos não tão bem explorados, como o câncer de cabeça e pescoço, mais especificamente, o câncer de cavidade oral. A identificação de um composto promissor, bem como o estudo de seu possível mecanismo de ação, pode auxiliar no desenvolvimento de moléculas mais ativas e seletivas para o tratamento dessa doença.

1.4 XANTONAS COMO SCAFFOLD NO DESENVOLVIMENTO DE COMPOSTOS ANTICÂNCER

As xantonas são compostos heterocíclicos aromáticos que contêm o oxigênio como heteroátomo, tendo como nomenclatura “9H-xanteno-9-ona” (Figura 37) (Pinto *et al.*, 2021). Historicamente, a primeira xantona isolada de uma planta (*Gentiana lutea*) foi em 1821, sendo essa denominada gentisin (1,7-dihidroxi-3-metoxixantona) e em 1860 a primeira xantona sintética foi descrita por Kolbe e Lautermann, por meio da reação entre fenol e ácido salicílico utilizando oxicloreto de fósforo (Pinto *et al.*, 2021).

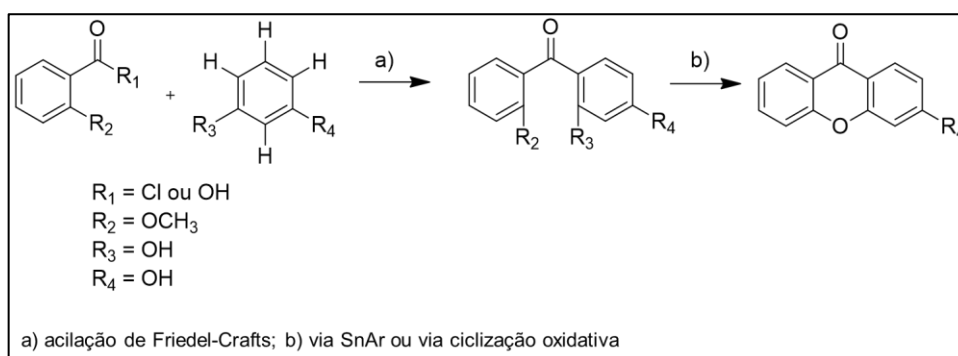
Figura 37. Estrutura geral do núcleo das xantonas



Atualmente, diferentes metodologias sintéticas podem ser empregadas para a síntese das xantonas, com destaque para o método clássico de Grover, Shah e Shah (Grover, Shah, Shah; 1955) que consiste na reação entre derivados de ácido salicílico e fenóis, aquecidos com cloreto de zinco (ZnCl₂) e cloreto de fosforila (POCl₃) (Resende *et al.*, 2020). Nesse caso, normalmente uma etapa adicional de ciclização é requerida para a obtenção da xantona. Outra metodologia considerada

clássica e que usualmente apresenta melhores resultados, é o uso de pentóxido de fósforo e ácido metanossulfônico (reagente de Eaton) (Resende *et al.*, 2020). Por fim, uma das metodologias mais exploradas é a através da síntese das benzofenonas por meio da acilação de Friedel-Crafts, utilizando cloreto de alumínio (AlCl₃) como ácido de Lewis (Figura 38) (Resende *et al.*, 2020). Normalmente, após a obtenção da benzofenona, segue-se a próxima etapa com o objetivo de realizar a ciclização da xantona (Figura 38). A ciclização por sua vez, pode ser obtida usualmente por meio de uma substituição nucleofílica aromática (SnAr) em meio básico ou por meio de uma ciclização oxidativa (Figura 38) (Resende *et al.*, 2020).

Figura 38. Representação de uma possível rota sintética para síntese de uma xantona.



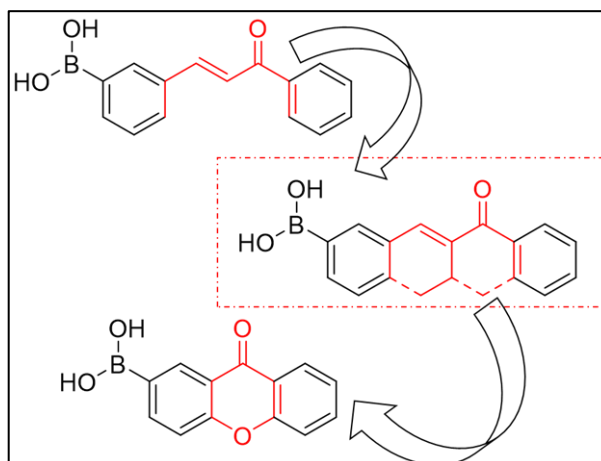
Adaptado de Resende *et al.*, 2020.

As xantonas, sejam sintéticas ou como produto natural isoladas de plantas/vida marinha, são relatadas por apresentarem diferentes atividades biológicas como: antioxidante, antidiabética e antiplasmodial (Wairata *et al.*, 2021). Porém, as xantonas são amplamente estudadas por sua atividade anticâncer e antitumoral, tendo sido exploradas em diferentes modelos celulares de cânceres como câncer de mama, câncer de próstata, câncer de ovário, câncer de pulmão, leucemia, glioblastoma, entre outros (Kurniawan *et al.*, 2021). Um possível alvo de atuação dessas xantonas frente ao câncer é a através da inibição da interação MDM2-p53, sendo possível destacar diferentes trabalhos em que a atividade anticâncer das xantonas pôde ser correlacionada com sua capacidade de liberar p53 por meio da inibição da interação com MDM2 (Zang *et al.*, 2017); (Leão *et al.*, 2013); (Lemos *et al.*, 2019); (Gomes *et al.*, 2019).

Estruturalmente, as xantonas apresentam semelhança com as chalconas, sendo seu núcleo rígido, de caráter lipofílico e baixa solubilidade em água. Desta forma, da mesma maneira, esse *scaffold* precisa ser avaliado com cuidado quanto a seu perfil farmacocinético. A maior diferença entre as duas estruturas está na ligação dupla conjugada, sendo que a xantona apresenta um sistema de anel tricíclico e a separação entre os anéis aromáticos A e B se dá pela carbonila e o heteroátomo (oxigênio, nesse caso). Nas chalconas, os anéis aromáticos A e B são separados por uma carbonila alfa-beta insaturada. Essa diferença estrutural pode auxiliar na compreensão sobre o perfil de reatividade ao comparar os dois *scaffolds*. As chalconas por seremceptoras de Michael podem apresentar um perfil de citotoxicidade mais pronunciado (Heller *et al.*, 2015). Considera-se por exemplo, que o núcleo alfa beta insaturado das chalconas pode, por ser um aceptor de Michael,

interagir com diferentes resíduos nucleofílicos como as cisteínas (Liang *et al.*, 2022). Desta forma, é preciso compreender se substituir o aceptor de Michael por um núcleo não tão reativo poderia influenciar na perda da atividade biológica dos compostos ou se acarretaria em uma vantagem frente a obtenção de compostos mais seletivos e não citotóxicos frente as células normais.

Figura 39. Semelhança estrutural entre os núcleos das chalconas e xantonas.



Com isto, pretende-se explorar o núcleo das xantonas e sua funcionalização com ácido borônico neste trabalho, com objetivo de avaliar a potencialidade desse *scaffold* frente a inibição do câncer de cavidade oral, especificamente frente ao modelo SCC-25, não havendo estudos na literatura sobre a capacidade das xantonas em inibir esse tipo de câncer.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliação de uma série de derivados de chalconas e xantonas contendo ácido borônico como inibidoras de câncer de cabeça de pescoço.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliação *in vitro* de uma série de chalconas contendo ácido borônico frente ao câncer de cavidade oral;
- Seleção do composto mais promissor para avaliação *in vitro* frente ao modelo celular de câncer de cabeça e pescoço metastático;
- Avaliação da atividade anti-inflamatória dos compostos mais promissores;
- Determinação do coeficiente de partição (Log P);
- Síntese e caracterização de uma série de xantonas contendo ácido borônico;
- Avaliação *in vitro* de uma série de xantonas contendo ácido borônico frente ao câncer de cavidade oral.

3. METODOLOGIA

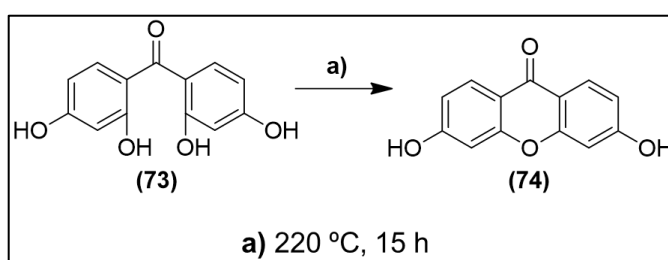
A descrição da metodologia sintética, de isolamento e de caracterização dos derivados de chalconas contendo ácido borônico foi anteriormente relatada na sessão A.

3.1 METODOLOGIA SINTÉTICA

3.1.1 Síntese do composto 2,7-dihidroxi-9H-xanten-9-ona

A síntese do composto 2,7-dihidroxi-9H-xanten-9-ona (**74**) foi realizada de acordo com o esquema reacional da Figura 40. A metodologia foi adaptada de Pinto e colaboradores (2011).

Figura 40. Metodologia sintética para obtenção do composto 2,7-dihidroxi-9H-xanten-9-ona (**74**)



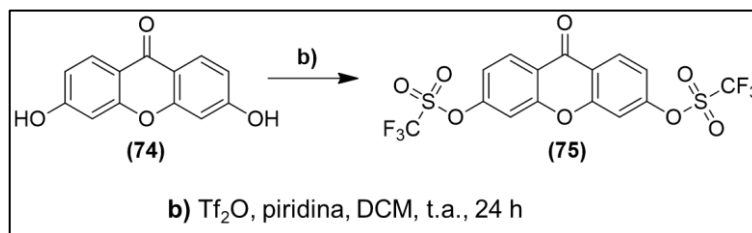
Procedimento experimental:

Em um cadinho de porcelana, adicionou-se 1,5g (4,06 mmol) do reagente 2,2'-4,4'-tetrahidroxiacetofenona (**73**). Em seguida o cadinho foi deixado sob aquecimento em um forno na temperatura de 220 °C durante overnight (aproximadamente 15 h). Após esse período, observou-se a mudança de cor do reagente inicial (cor branca) para uma cor marrom. O acompanhamento reacional por meio cromatografia em camada delgada (CCD) indicou o consumo total do reagente e formação do produto desejado (**74**) com rendimento de 80%.

3.1.2 Síntese do composto 9-oxo-9H-xanteno-3,6-diil bis(trifluorometanossulfonato)

A síntese do composto 9-oxo-9H-xanteno-3,6-diil bis(trifluorometanossulfonato) (**75**) foi realizada de acordo com o esquema reacional da Figura 41. A metodologia foi adaptada de Miller e colaboradores (2005).

Figura 41. Metodologia sintética para obtenção do composto 9-oxo-9H-xanteno-3,6-diil bis(trifluorometanossulfonato) (**75**)

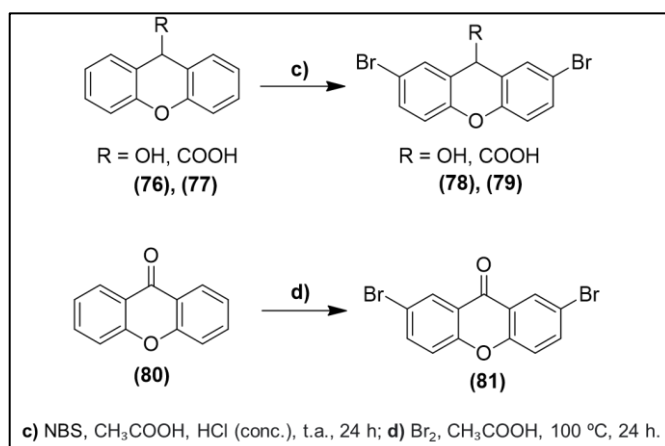


Em um balão de fundo redondo de 10 mL adicionou-se 500 mg (2,19 mmol) do composto **(74)** em 6 mL de diclorometano (DCM) anidro. Em seguida, o balão foi colocado em banho de gelo e adicionou-se 10 eq.mol⁻¹ de piridina, gota à gota ao meio reacional. Após a adição da piridina, adicionou-se a seguir 3 eq.mol⁻¹ do reagente anidrido trifluorometanossulfônico (Tf₂O). O banho de gelo foi removido e a reação seguiu por 24 h sob temperatura ambiente, sob atmosfera inerte de N₂. O acompanhamento reacional foi feito por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando hexano:acetato de etila (9:1) como fase móvel e revelação sob luz ultravioleta (254 nm) até que o consumo dos reagentes indicasse o término da reação. Ao fim da reação, a CCD foi revelada com solução de cloreto de ferro (10% MeOH). Esse revelador indica a presença de grupos fenóis, levando a obtenção de uma coloração preta na CCD. A falta da coloração levou a conclusão de que a mancha resultante na CCD indicava ser o produto com as duas hidroxilas protegidas pelo grupo Tf₂O. Adicionou-se então, no meio reacional, 50 mL de água destilada e HCl 1 M até total neutralização do excesso de piridina. A fase orgânica foi lavada três vezes com 80 mL de água destilada. Posteriormente a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e a solução filtrada. Em seguida o solvente foi evaporado a pressão reduzida levando a obtenção de um sólido branco. A última etapa consistiu na purificação do produto de interesse por meio de coluna de bancada, utilizando como fase móvel 9:1 hexano/acetato. A purificação levou a obtenção do composto 9-oxo-9H-xanteno-3,6-diil bis(trifluorometanossulfonato) **(76)** puro, com 80% de rendimento.

3.1.3 Síntese da série de xantonas bromadas

A síntese dos compostos 2,7-dibromo-9H-xanten-9-ol **(78)** e ácido 2,7-dibromo-9H-xanteno-9-carboxílico **(79)** foi realizada por meio de uma reação de bromação, utilizando N-bromosuccinimida (NBS). Para obtenção do composto 2,7-dibromo-9H-xanteno-9-ona **(81)**, a reação de bromação foi realizada com uso de bromo (Br₂). A metodologia foi adaptada de de Sivakamasundari e Genesan (1980). O esquema reacional foi representado na Figura 42.

Figura 42. Metodologia sintética para obtenção dos compostos 2,7-dibromo-9H-xanten-9-ol **(78)**, ácido 2,7-dibromo-9H-xanteno-9-carboxílico **(79)** e 2,7-dibromo-9H-xanteno-9-ona **(81)**.



Procedimento experimental:

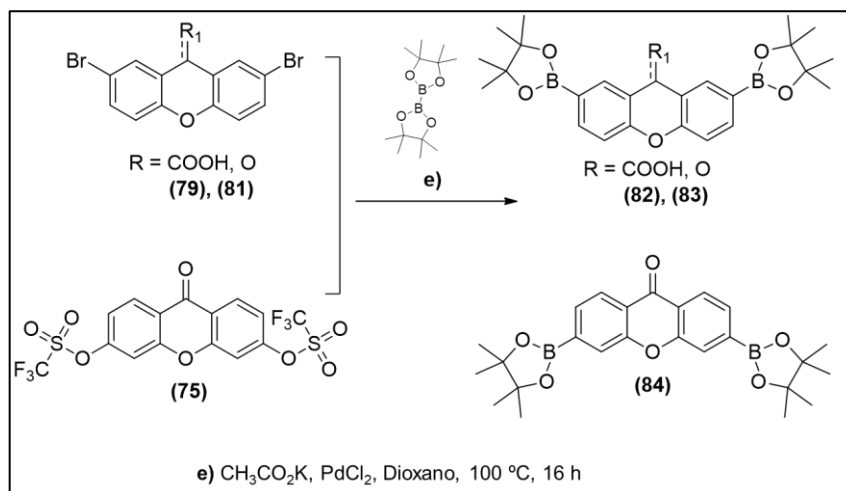
Em um balão de fundo redondo de 10 mL, adicionou-se 800 mg (1 eq.mol⁻¹) do reagente 9H-xanteno-9-ol (**76**) ou ácido 9H-xanteno-9-carboxílico (**77**), NBS (2,5 eq.mol⁻¹), 12 mL de ácido acético (CH₃COOH) e 8 gotas de HCl concentrado. A reação foi mantida sob agitação, atmosfera inerte de N₂ e temperatura ambiente por 24 h. O acompanhamento reacional foi feito por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando 100% tolueno como fase móvel e revelação sob luz ultravioleta (254 nm) até que o consumo dos reagentes indicasse o término da reação. Após esse tempo, adicionou-se 50 mL de água destilada ao meio reacional levando a precipitação do produto de interesse. O precipitado foi filtrado em funil de Büchner e lavado de 3 à 4 vezes com 80 mL de água destilada. O composto (**79**) foi precipitado puro, não havendo necessidade de uma etapa adicional de purificação, sendo este um sólido “*off-white*” com rendimento de 70%. Para o composto (**78**) realizou-se uma purificação por meio de coluna de bancada, utilizando como fase móvel 100% tolueno. Após a purificação o produto desejado foi obtido como um sólido branco, com rendimento de 34%. Este produto após etapa de caracterização estrutural por RMN de ¹H indicou se tratar do derivado de xantona di-bromado, estrutura idêntica ao composto (**81**).

Para obtenção do composto (**81**), em um balão de fundo redondo de 10 mL, adicionou-se 800 mg (4,07 mmol) do reagente 9H-xanteno-9-ona e 12 mL de ácido acético (CH₃COOH). Em seguida, adicionou-se gota à gota ao meio reacional 2 mL de Br₂. A reação foi mantida sob agitação, em temperatura de 100 °C durante 22 h. O acompanhamento reacional foi feito por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando 100% tolueno como fase móvel e revelação sob luz ultravioleta (254 nm) até que o consumo dos reagentes indicasse o término da reação. Após esse tempo, adicionou-se 50 mL de água destilada ao meio reacional levando a precipitação do produto de interesse. O precipitado foi filtrado em funil de Büchner e lavado de 3 à 4 vezes com 80 mL de água destilada. Após a obtenção do precipitado, realizou-se uma etapa de purificação por meio de coluna de bancada utilizando como fase móvel 100% tolueno. Após a purificação o produto desejado foi obtido como um sólido branco, com rendimento de 60%. Além do produto de interesse, foi também isolado um segundo produto dessa reação que após a caracterização por RMN de ¹H indicou se tratar do derivado de xantona substituído com apenas um átomo de bromo, sendo obtido com 12% de rendimento.

3.1.4 Síntese das xantonas derivadas de éster borônico

A síntese dos derivados de éster borônico, os compostos ácido 2,7-bis(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-9H-xanteno-9-carboxílico (**82**), 2,7-bis(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-9H-xanten-9-ona (**83**) e 3,6-bis(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-9H-xanten-9-ona (**84**) foi realizada por meio de um reação de Borilação de Miyaura. O esquema reacional foi representado na Figura 43:

Figura 43. Metodologia sintética para obtenção dos derivados ácido 2,7-bis(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-9H-xanteno-9-carboxílico (**82**), 2,7-bis(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-9H-xanten-9-ona (**83**) e 3,6-bis(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-9H-xanten-9-ona (**84**)



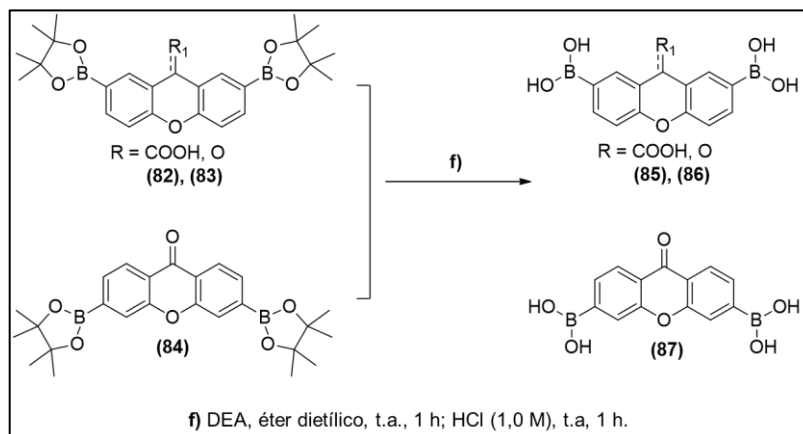
Procedimento experimental:

A metodologia sintética para realização da reação de Borilação de Miyaura já foi previamente discutida na seção A deste trabalho. O mesmo procedimento experimental foi adotado para a síntese dos intermediários (**82**), (**83**) e (**84**). O acompanhamento reacional foi realizado por meio de CCD e revelador de curcumina “curcumin dip”, sendo este capaz de revelar compostos que contêm ésteres borônicos e ácidos borônicos em sua estrutura, adquirindo após a secagem da placa cromatográfica uma coloração laranja em torno das manchas (“spots”) reveladas. Quanto a etapa de purificação, os compostos (**82**) e (**83**) foram purificados por meio de coluna de bancada tendo como eluentes os solventes hexano e acetato nas proporções 7:3. Os respectivos produtos foram obtidos como sólidos brancos, com rendimentos de 45% e 42%. Quanto ao composto (**84**), sua purificação por coluna de bancada não se mostrou efetiva, uma vez que o reagente não foi totalmente consumido e o R_f do reagente (composto (**75**)) e do produto de interesse eram muito próximos em diferentes fases móveis testadas. Com isso, sua purificação se deu por meio de uma recristalização em metanol, sendo o produto obtido como um sólido branco com rendimento de 36%.

3.1.5 Síntese das xantonas derivadas de ácido borônico

A síntese dos compostos finais derivados de ácido borônico ácido 2,7-diborono-9H-xanteno-9-carboxílico (**85**) ácido (9-oxo-9H-xanteno-2,7-diil)diborônico (**86**) e ácido (9-oxo-9H-xanteno-3,6-diil)diborônico (**87**) foi realizada por meio da reação entre os respectivos intermediários de éster borônico com dietilanoamina (DEA) e HCl (0,1 M) para hidrólise do éster e obtenção do grupo ácido. A metodologia foi adaptada de Sun, Perfetti e Santos (2011). O esquema reacional foi representado na Figura 44.

Figura 44. Metodologia sintética para obtenção dos compostos ácido 2,7-diborono-9H-xanteno-9-carboxílico (**85**) ácido (9-oxo-9H-xanteno-2,7-diil)diborônico (**86**) e ácido (9-oxo-9H-xanteno-3,6-diil)diborônico (**87**)



Procedimento experimental:

Em um balão de fundo redondo de 10 mL, adicionou-se 50 mg do respectivo reagente de éster borônico (compostos **(82)**, **(83)** ou **(84)**), 3 mL de éter etílico e duas a três gotas de DEA. A reação foi mantida sob agitação em temperatura ambiente por 1 h. Após esse tempo, foi possível observar no caso do reagente **(84)**, a formação de um precipitado no meio reacional. O precipitado foi filtrado e lavado 4x com éter etílico. Em seguida, o precipitado foi adicionado a um novo balão de fundo redondo de 10 mL, com 3 mL de éter etílico e 3 mL de uma solução de HCl (0,1 M), a reação foi novamente mantida sob agitação e temperatura ambiente por 1 h. Para os reagentes **(83)** e **(84)** não foi possível observar a formação de um precipitado sólido, mas sim, de um precipitado gelatinoso que não pôde ser separado por filtração. Com isso, ao término da primeira etapa, o meio reacional foi descartado e o sólido gelatinoso lavado 4x com éter etílico. Nesse mesmo balão de fundo redondo, adicionou-se 3 mL de éter etílico e 3 mL de uma solução de HCl (0,1 M), a reação foi novamente mantida sob agitação e temperatura ambiente por 1 h. Ao término da reação, realizou-se uma extração líquido/líquido com uso de éter etílico e água. Foi possível observar uma tendência do composto em ficar concentrado na fase aquosa, desta forma, extraiu-se a fase aquosa com éter etílico de 3 a 4 vezes. Após a extração, os produtos foram obtidos como um sólido de cor branca para os compostos **(86)** e **(87)** e lilás para o composto **(85)** com rendimentos próximos de 50%.

3.2 PROTOCOLO DE TESTE DE MTT

Os ensaios para determinação dos valores de IC₅₀ das moléculas foram realizados em parceria com a Dra. Paula Aboud Barbugli, da Faculdade de Odontologia da UNESP de Araraquara. As células de linhagens SCC-25, NOK-si e Detroit 562 foram inicialmente descongeladas e cultivadas em um frasco de cultivo celular de 12,5 cm². O acompanhamento do crescimento celular foi realizado com o uso de um microscópio e o meio de cultura trocado periodicamente. Após o crescimento completo das células, a dissociação celular foi realizada por meio da adição de 5 mL de tripsina e as garrafas foram mantidas na estufa de CO₂ por 10 minutos. Após esse processo, as células são transferidas para tubos falcon de 25 mL e centrifugadas em 2000 rpm, por 10 minutos, para formação dos pellets. A contagem de células foi realizada por meio de um contador automático de células

(Countess II FL). Ao determinar a quantidade de células, realizou-se a diluição das mesmas em meio de cultura para realizar o plaqueamento da suspensão celular nas placas de ELISA de 96 poços. Determinou-se um valor constante de 30 mil células por poço. As placas de ELISA foram deixadas por 24 h em estufa de CO₂. Após esse tempo, os compostos a serem avaliados foram encubados por 24 h em 10 diferentes concentrações: 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56, 0,78, 0,39, 0,19 e 0,097 µg/mL. Após o tempo indicado, adicionou-se o reagente de MTT (3 mg/mL) dissolvido em RPMI 1640 sem fenol por 4 h. Os cristais de MTT formados foram solubilizados com 2-propanol P.A sob agitação. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placas ELISA (EZ Read 400 Microplate reader, BioChrom e Software Adap 2,0 Biocrom) em 562 nm. Os valores de IC₅₀ e os gráficos foram calculados pela Dra. Paula Aboud Barbugli, com o uso dos softwares Excel e Prism. Os resultados das análises de MTT foram avaliados pelo teste de normalidade (Shapiro-Wilk), seguindo-se de Análises de variâncias (ANOVA-one way) com pós teste de Tukey, com o nível de significância do 5%.

3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

Os ensaios para determinação da atividade anti-inflamatória das moléculas foram realizados em parceria com a Dra. Paula Aboud Barbugli, da Faculdade de Odontologia da UNESP de Araraquara. Os compostos foram encubados em placas de 24 poços contendo cultura de células THP-1 previamente estimuladas com LPS. Avaliou-se duas concentrações diferentes para cada molécula, sendo estas 2 e 4 µg/mL, concentrações não citotóxicas avaliadas por meio de um ensaio de viabilidade celular. Após um período de 24 h, o sobrenadante foi removido e utilizado no ensaio de quantificação de citocinas. Para esse ensaio, utilizou-se um kit de citocinas inflamatórias (BD® Cytometric Bead Array CBA Human Inflammatory Cytokine Cytometric Bead Array), contendo as respectivas citocinas humanas: IL-8, IL-1β, IL-6 e TNFα. As citocinas padrão foram preparadas em 9 concentrações diferentes sendo estas: 1:256, 1:128, 1:64, 1:32, 1:16, 1:8, 1:4, 1:2 e 1:1 ("top standard"). A leitura das análises foi realizada por meio de um citometro de fluxo BD FACSAria® Fusion Flow Cytomer, lotado na Faculdade de Odontologia da UNESP de Araraquara. Os dados foram analisados por meio do software Prisma, sendo estes calculados pela Dra. Paula Aboud Barbugli.

3.4 DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO (LOG P)

O método utilizado para determinação do coeficiente de partição utilizado foi o estabelecido pelo OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Test No. 117: Partition Coefficient (n-octanol/water), HPLC Method (OECD Guidelines, 2022). Para este ensaio, foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência da Shimadzu® com um detector UV-VIS. Foi utilizado um modo isocrático de fase móvel [metanol:água (70:30)] em um fluxo de 1,0 mL/min. O volume de injeção foi de 20 µL e o comprimento de onda utilizado foi de 210 nm. A coluna empregada foi uma C18 de 18 cm. As substâncias anilina (LogP 0,9), acetanilida (LogP 1,0), clorobenzeno (LogP 2,8), naftaleno (LogP 3,6), bifenil (LogP 4), trefenilamina (LogP 5,7) e DDT (LogP 6,5) foram utilizadas como padrão para a

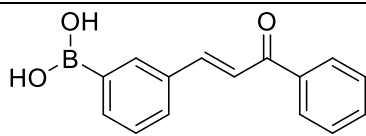
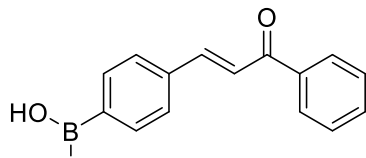
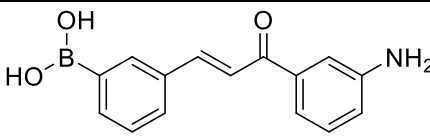
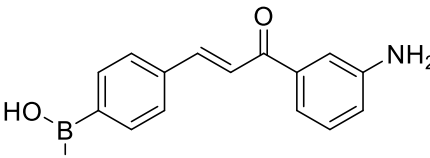
construção da curva $\log K \times \log P$, sendo K o fator de retenção dado pela expressão: $(Tr-T0)/T0$, onde, Tr representa o tempo de retenção da substância analisada, e $T0$ é o tempo morto, sendo esse o tempo médio que a fase móvel leva para percorrer a coluna cromatográfica. A análise foi realizada em triplicata.

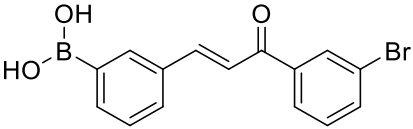
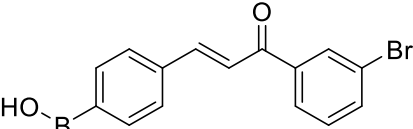
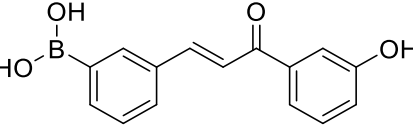
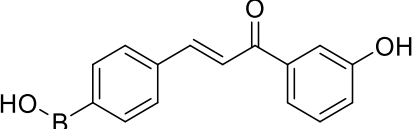
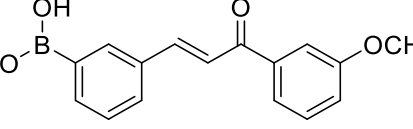
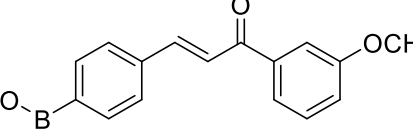
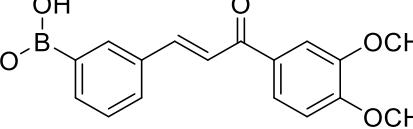
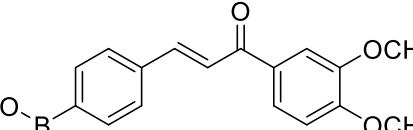
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

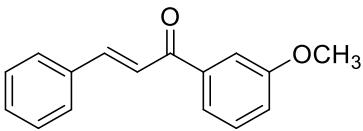
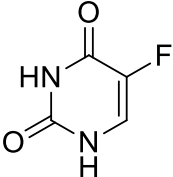
4.1 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS COMPOSTOS FRENTE AOS MODELOS CELULARES DE CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO

Os compostos derivados de chalconas foram avaliados em três modelos celulares: NOK-si (células normais de cavidade oral), SCC-25 (célula de câncer de cavidade oral - língua) e Detroit 562 (derivada do líquido pleural de um paciente com carcinoma primário da faringe). Os 13 compostos foram avaliados inicialmente nos modelos de NOK-si e SSC-25, com o objetivo de selecionar as moléculas mais promissoras que seriam posteriormente avaliadas no modelo Detroit 562 (metastático). Os valores de IC_{50} e índice de seletividade (SI) foram determinados (Quadro 3).

Quadro 3. Moléculas avaliadas frente aos modelos celulares de SCC-25, NOK-si e Detroit 562.

Molécula	IC_{50} SSC-25 (μM)	IC_{50} NOK-si (μM)	IC_{50} Detroit 562 (μM)	SI (NOK-si/SCC-25)
 (31)	139	145	-	1,04
 (31')	129,9	127,1	-	0,97
 (33)	98	105	-	1,07
 	131,5	130,7	-	0,99

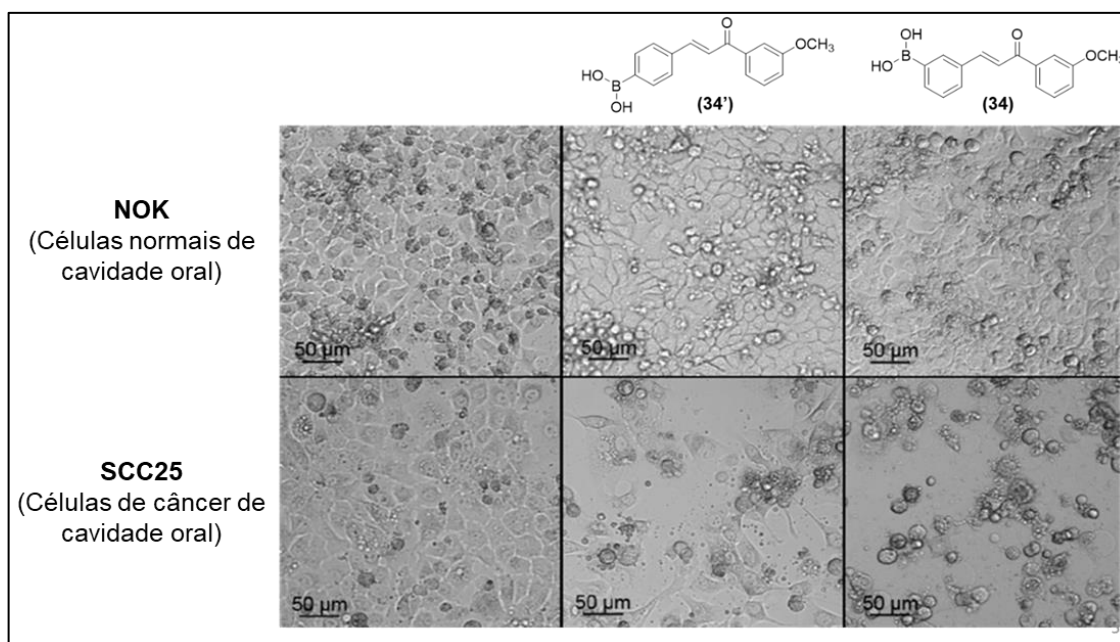
(33')				
 <p style="text-align: center;">(35)</p>	123	130,9	-	0,84
 <p style="text-align: center;">(35')</p>	80,4	109,4	-	1,36
 <p style="text-align: center;">(32)</p>	53,28	88,44	-	1,65
 <p style="text-align: center;">(32')</p>	105,2	70,50	-	0,66
 <p style="text-align: center;">(34)</p>	18,4	41,4	99,7	2,25
 <p style="text-align: center;">(34')</p>	33,8	51,3	-	1,51
 <p style="text-align: center;">(36)</p>	27,58	22,1	-	0,80
 <p style="text-align: center;">(36')</p>	98,3	77	-	0,78

 <p style="text-align: center;">(42)</p>	76	-	-	-
 <p style="text-align: center;">5-Fluoracil</p>	1,8 (mM)	-	-	<1

O fármaco utilizado como comparativo dos resultados foi o 5-fluoracil, usualmente utilizado para o tratamento de CCP. Esse composto foi avaliado nos mesmos modelos celulares que os derivados de chalconas e apresentou um $IC_{50} = 1,8$ mM para o modelo celular de SCC-25. Ao comparar o 5-fluoracil com o melhor composto da série **(34)**, $IC_{50} = 18,4$ μ M para o modelo celular de SCC-25, evidencia-se que o composto se mostrou superior ao fármaco. Além disso, o fármaco 5-fluoracil não apresentou seletividade para o modelo celular de câncer, sendo as células normais estatisticamente mais sensíveis, enquanto que o composto **(34)** apresentou $SI = 2,2$.

Dentre as chalconas avaliadas, as que apresentaram substituição no anel B com um único grupo metoxila (**34** e **34'**) foram as mais promissoras quanto sua capacidade em inibir as células de câncer com um perfil mais seletivo (Quadro 3). Na imagem de microscopia (Figura 37) é possível observar que após a incubação dos compostos, as células de câncer de cavidade oral (SCC-25) apresentaram o maior efeito de inibição, com uma clara alteração em sua morfologia, com indicativo de um processo de apoptose.

Figura 45. Imagem de microscopia dos compostos **(34)** e **(34')** frente aos modelos celulares NOK-si e SCC-25, nas concentrações de 6,25 µg/mL and 3,12 µg/mL, respectivamente, após 24 horas de incubação.



Fonte: Elaborado por Dra. Paula Aboud Barbugli

O composto **(42)** foi testado frente a linhagem de SCC-25, com o objetivo de avaliar a importância da presença do grupo ácido borônico na atividade inibitória dos compostos. Com isso, o composto **(42)** foi sintetizado tendo seu anel B substituído por uma metoxila, similar ao do composto mais promissor da série **(34)**, e sem a presença do ácido borônico no anel A da chalcona. Seu valor de $IC_{50} = 76,0 \mu M$ frente ao modelo celular de SCC-25, demonstra que a falta do ácido borônico em sua estrutura química fez seu valor de IC_{50} ser 4x maior do que o IC_{50} obtido para o composto **(34)**.

Os outros compostos avaliados apresentaram valores de IC_{50} muito superiores ao do composto **(34)**, além de SI inferiores, indicando uma baixa seletividade para as células cancerígenas. Com isso, o composto **(34)** foi o único selecionado da série para ser avaliado frente ao modelo celular de Detroit 562. Apesar de apresentar uma potencialidade quanto a inibição do modelo de câncer de cavidade oral, no modelo células metastáticas o composto **(34)** não foi efetivo, uma vez que seu valor de IC_{50} para a linhagem Detroit 562 foi superior a linhagem de células normais (Quadro 3). As células metastáticas normalmente apresentam um desafio para as moléculas no geral, principalmente na questão da seletividade (Ganesh, Massagué, 2021). Para que seja possível otimizar os compostos visando uma maior potencialidade frente a linhagem metastática e poder avaliar outros modelos celulares de CCP, é necessário a elucidação do real mecanismo pelo qual essas chalconas estão atuando. Assim, uma vez identificado o alvo, novas modificações estruturais podem ser planejadas podendo levar a síntese de compostos mais potentes e seletivos.

4.2 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DOS COMPOSTOS

De acordo com os resultados obtidos na avaliação *in vitro* das chalconas frente aos modelos celulares de câncer de cabeça e pescoço, selecionou-se quatro moléculas sendo estas: **(32)**, **(34)**, **(34')** e **(42)** para o respectivo estudo da atividade anti-inflamatória. A escolha das moléculas foi motivada por sua atividade frente ao modelo celular de câncer (SCC-25), sendo os compostos **(34)** e **(34')** os mais potentes e seletivos da série. O composto **(32)** demonstrou uma das melhores reações de índice de seletividade (SI) e por tanto, também foi escolhido. Por último, o composto **(42)** foi selecionado com o objetivo de avaliar se a remoção do ácido borônico da estrutura química influenciaria de alguma forma na sua atividade anti-inflamatória. As moléculas foram ensaiadas nas concentrações de 2 e 4 µg/mL, sendo estas não citotóxicas frente a linhagem THP-1. Para esse ensaio, os monócitos foram estimulados com lipossacarídeo (LPS), sendo esta substância uma ativadora de genes relacionados à resposta inflamatória aguda e responsável por induzir a expressão de citocinas inflamatórias como TNF, IL-1, IL-6, IL-8, entre outras (Guha, Mackman; 2001). Os gráficos referentes a cada citocina/molécula foram representados nas Figuras 46, 47, 48 e 49.

Figura 46. Avaliação da capacidade de inibição dos compostos (32), (34), (34') e (42) frente a citocina inflamatória TNF α , avaliados nas concentrações de 2 e 4 $\mu\text{g/mL}$. Controle (CT) = macrófagos não estimulados com LPS

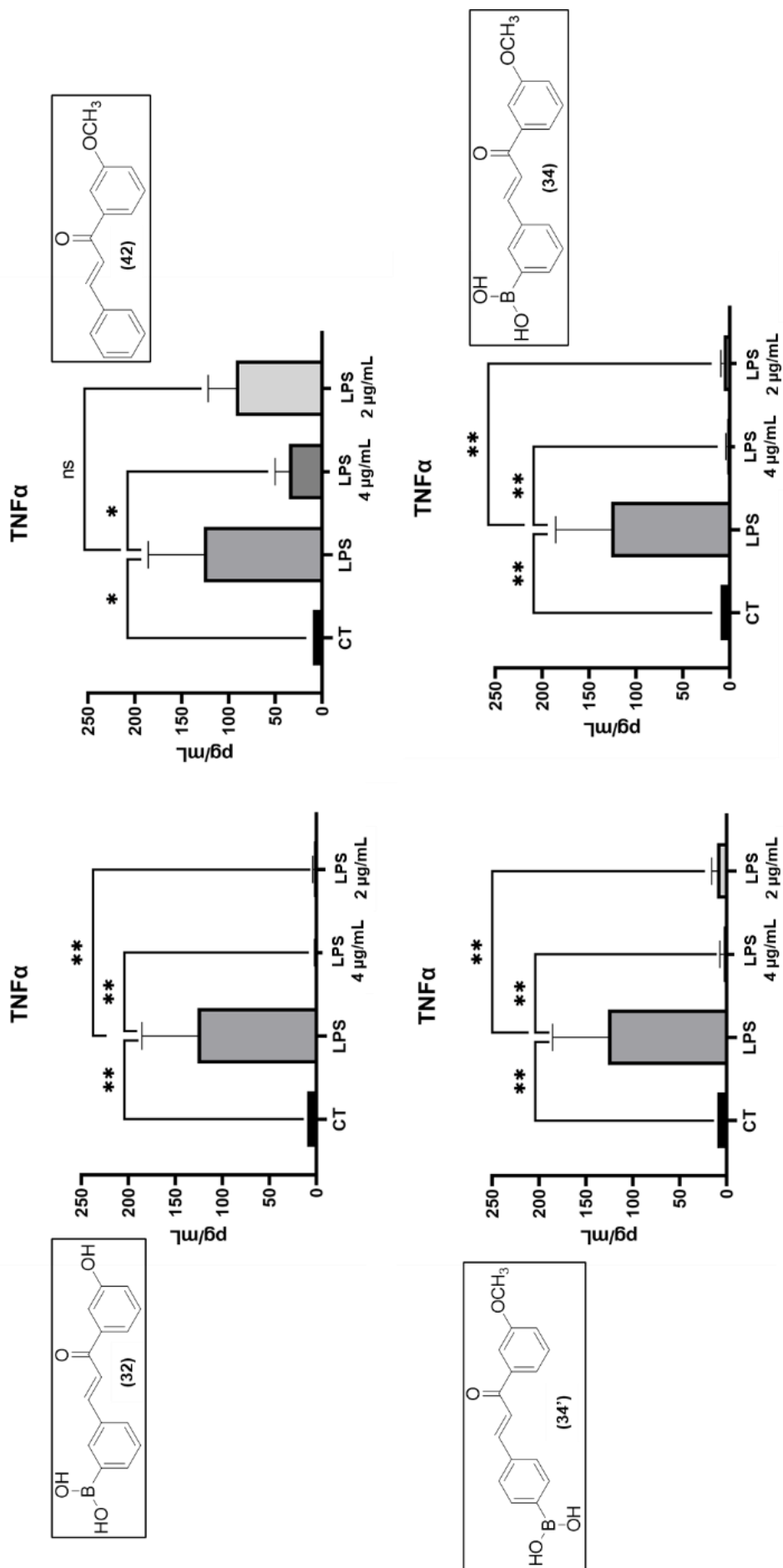


Figura 47. Avaliação da capacidade de inibição dos compostos (32), (34), (34') e (42) frente a citocina inflamatória IL-6, avaliados nas concentrações de 2 e 4 µg/mL. Controle (CT) = macrófagos não estimulados com LPS.

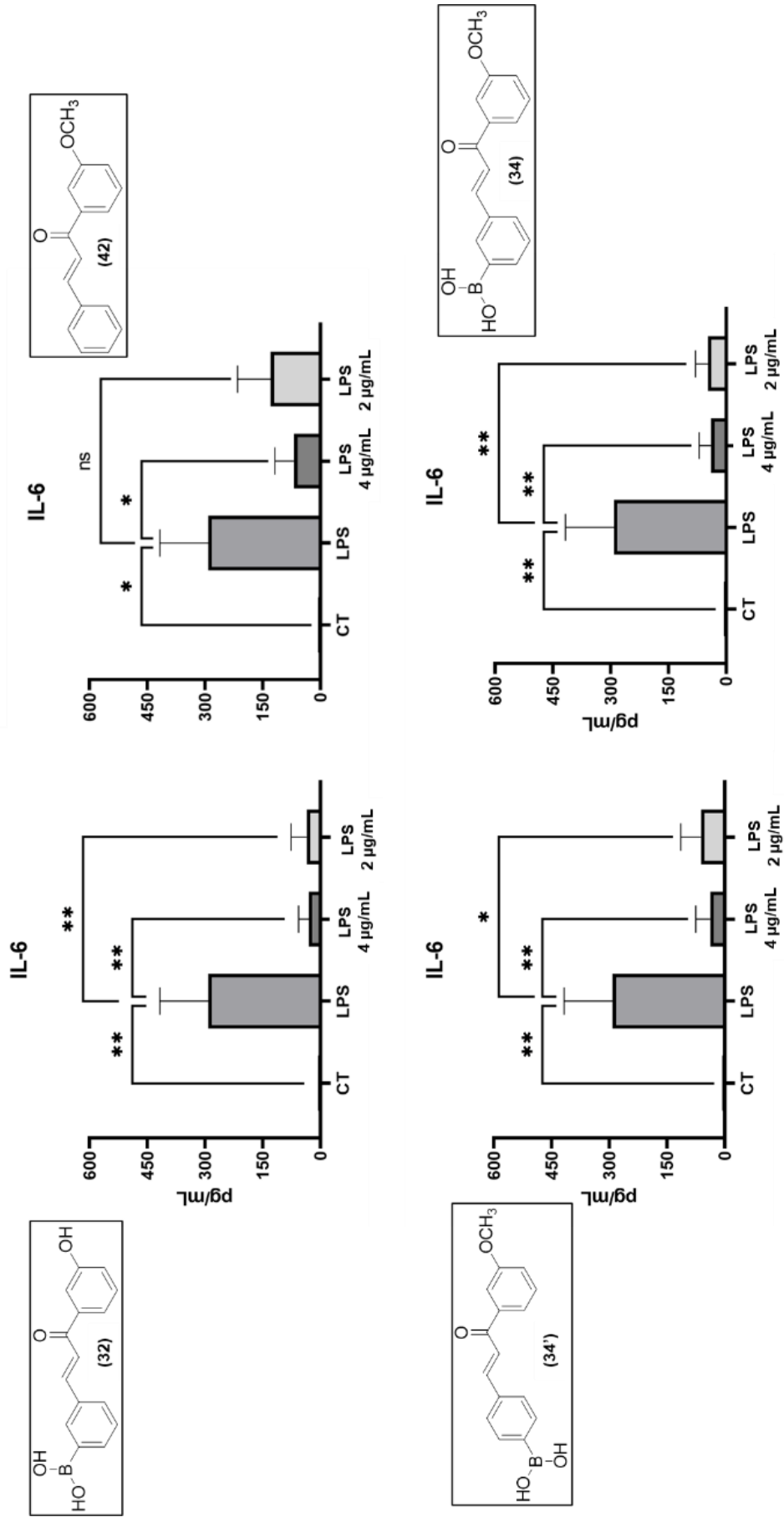


Figura 48. Avaliação da capacidade de inibição dos compostos (32), (34), (34') e (42) frente a citocina inflamatória IL-1 β , avaliados nas concentrações de 2 e 4 $\mu\text{g/mL}$. Controle (CT) = macrófagos não estimulados com LPS.

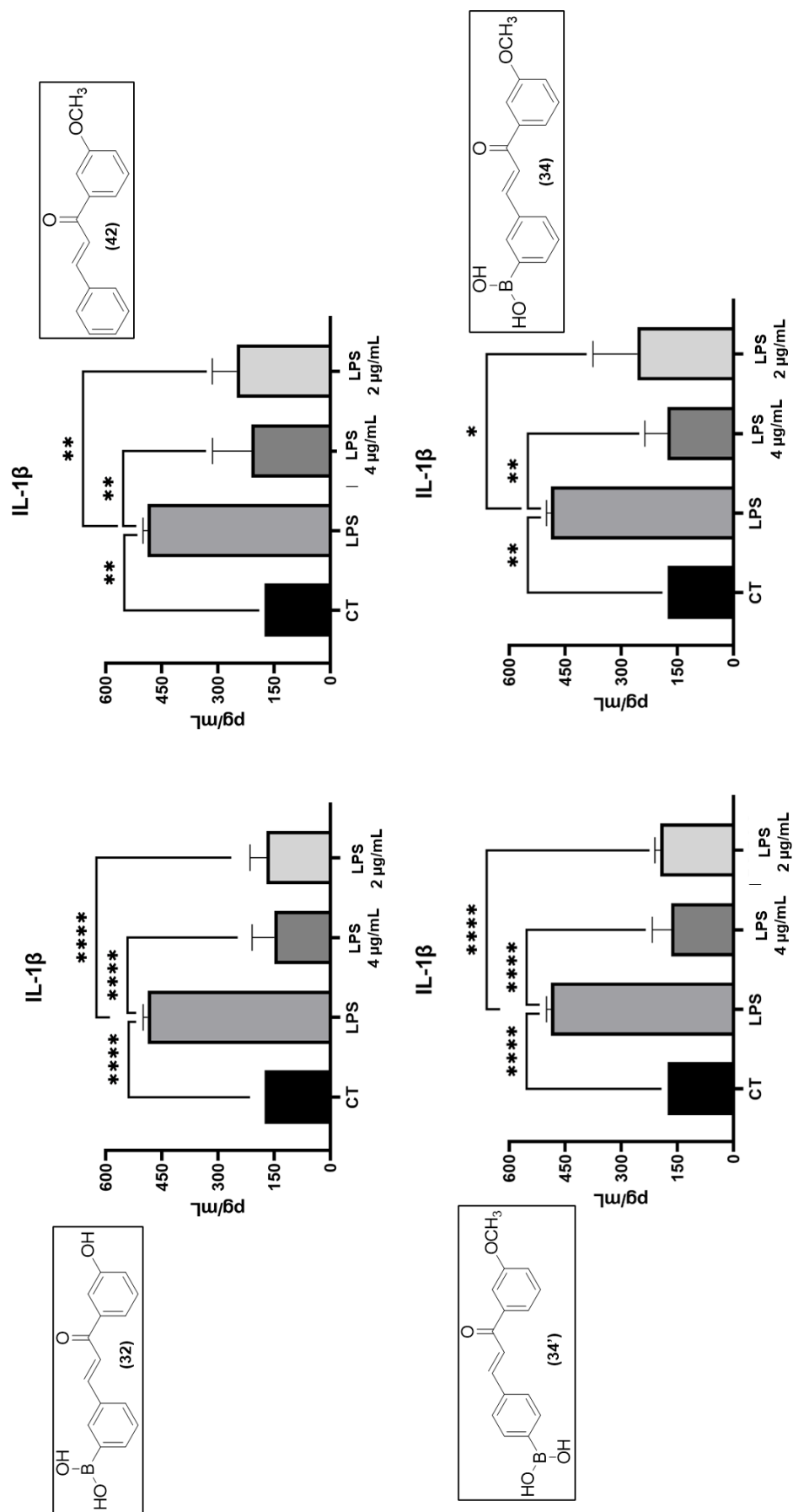
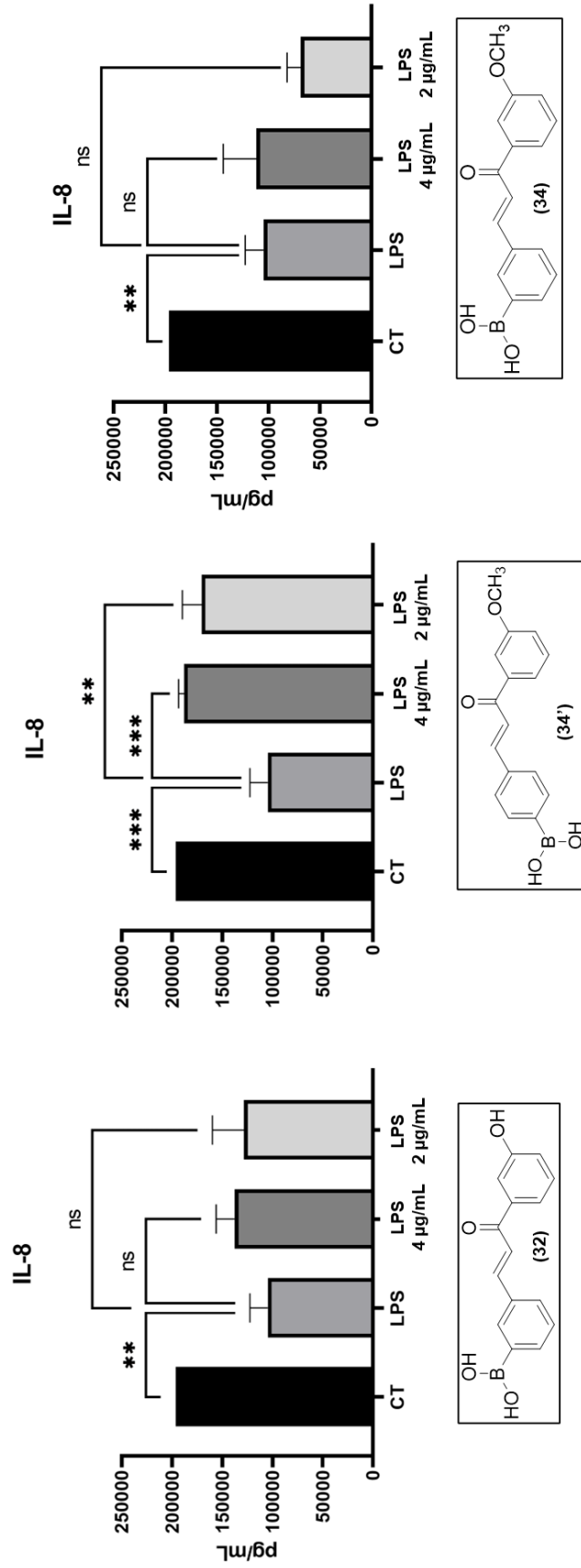


Figura 49. Avaliação da capacidade de inibição dos compostos (32), (34), (34') e (42) frente a citocina inflamatória IL-8, avaliados nas concentrações de 2 e 4 µg/mL. Controle (CT) = macrófagos não estimulados com LPS



Os resultados demonstraram que de maneira geral, os compostos foram capazes de reduzir os níveis das citocinas TNF, IL-6 e IL-1 β nas concentrações de 2 e 4 $\mu\text{g/mL}$, sendo que destas, a redução mais expressiva foi frente a TNF. Os compostos **(32)**, **(34)** e **(34')** reduziram os níveis de TNF para valores menores que o controle. Curiosamente, o composto **(42)**, apesar de demonstrar uma redução expressiva da citocina quando comparado as células estimuladas com LPS, teve uma resposta inferior que as moléculas **(32)**, **(34)** e **(34')**. Estruturalmente, os compostos **(34)** e **(42)** diferem-se apenas pela presença do ácido borônico na estrutura química, sendo um indicativo de que esse grupo foi essencial para que as moléculas apresentassem essa potente redução de TNF- α . Esse mesmo padrão se repetiu para a citocina IL-6, sendo que novamente os compostos **(32)**, **(34)** e **(34')** apresentaram uma melhor resposta da atividade anti-inflamatória que **(42)**. Quanto a citocina IL-1 β , a diferença entre as quatro moléculas não foi tão expressiva, sendo que todas apresentaram capacidade de reduzir a citocina de maneira similar quando comparado as células estimuladas com LPS. Por fim, quanto a IL-8, os compostos **(32)** e **(34)** foram efetivos em reduzir os níveis dessa citocina quando comparados ao controle. O composto **(42)** não demonstrou nenhum efeito frente a essa citocina e o composto **(34')** foi capaz de aumentar a expressão de IL-8 nas células estimuladas com LPS.

4.3 DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO (LOG P)

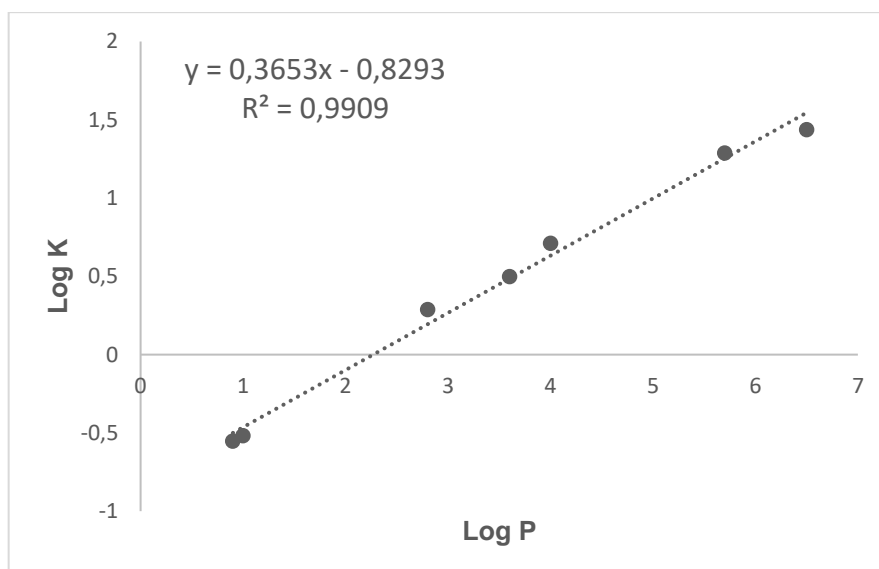
A lipofilicidade de uma molécula é uma propriedade físico-química que está relacionado com sua afinidade por ambientes lipídicos. Essa propriedade é de grande importância dentro do contexto de “*drug design*” pois influencia na determinação das propriedades de Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade (ADMET) de um determinado fármaco/candidato à fármaco (Waring, 2010). A determinação da lipofilicidade de uma molécula, principalmente de fármacos, se dá por meio do “coeficiente de partição” (P ou Log P). Para essa determinação é possível adotar diferentes metodologias, sendo as mais comumente empregadas o método “Shake-flask”, cálculos computacionais e por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A lipofilicidade foi definida por Lipinski na “Regra dos 5” ou “Regra de Lipinski” que compostos que apresentem valor de Log P < 5 seriam favoráveis a administração oral e valores entre 0 e 3 ideais para absorção (Lipinski *et al.*, 1997; Waring, 2010).

A determinação do valor de Log P dos compostos foi realizada para todas as chalconas sintetizadas neste trabalho, totalizando 15 moléculas. Para realização desse estudo, inicialmente realizou-se a construção de uma curva analítica por meio de 7 compostos padrões com Log P definidos na literatura (OECD Guidelines, 2022). Os tempos de retenção dos padrões foram determinados por meio de CLAE. No Quadro 1 estão representados os valores de Log P determinados experimentalmente para os padrões e seus valores definidos na literatura, por meio do guia OECD (OECD Guidelines, 2022) e na Figura 42 está representado a curva analítica construída.

Quadro 4. Valores de Log P para os compostos padrões.

Padrão	Log P (OECD Guidelines)	Log P (determinado experimentalmente)
Acetanilida	1	1
Anilina	0,9	0,9
Clorobenzeno	2,8	2,8
Naftaleno	3,6	3,6
Bifenil	4	4
Trifenilamina	5,7	5,7
DDT	6,5	6,5

Figura 50. Curva analítica dos padrões obtida experimentalmente.

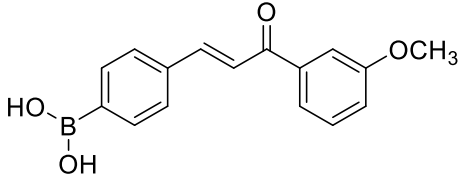
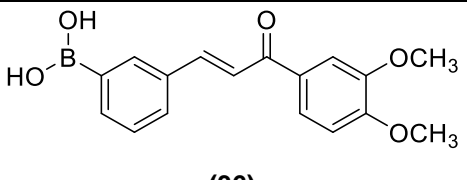
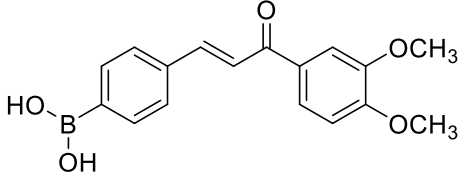
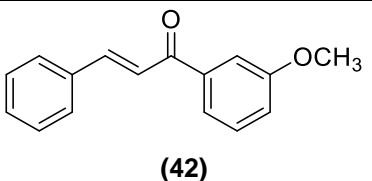
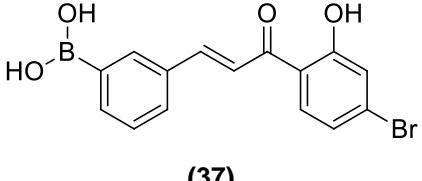
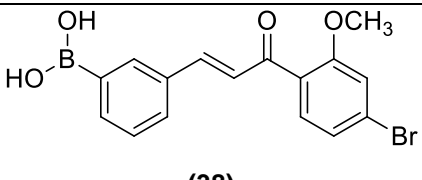


Por fim, com os tempos de retenção obtidos para cada molécula, o valor de Log P pode ser determinado por meio da equação da reta obtida. Os valores de Log P foram representados no Quadro 5.

Quadro 5. Valores de Log P determinados experimentalmente

Molécula	Log P (experimental)
	2,68

(31)	
 <chem>O=C(c1ccccc1)/C=C/c2ccc(cc2)B(O)O</chem>	2,69
(31')	
 <chem>Nc1ccccc1C(=O)/C=C/c2ccc(cc2)B(O)O</chem>	1,49
(33)	
 <chem>Nc1ccc(cc1)C(=O)/C=C/c2ccc(cc2)B(O)O</chem>	1,18
(33')	
 <chem>Brc1cccc(c1)C(=O)/C=C/c2ccc(cc2)B(O)O</chem>	4,86
(35)	
 <chem>Brc1ccc(cc1)C(=O)/C=C/c2ccc(cc2)B(O)O</chem>	4,83
(35')	
 <chem>Oc1cccc(c1)C(=O)/C=C/c2ccc(cc2)B(O)O</chem>	1,81
(32)	
 <chem>Oc1ccc(cc1)C(=O)/C=C/c2ccc(cc2)B(O)O</chem>	1,64
(32')	
 <chem>COc1cccc(c1)C(=O)/C=C/c2ccc(cc2)B(O)O</chem>	2,92
(34)	

 <p style="text-align: center;">(34')</p>	2,81
 <p style="text-align: center;">(36)</p>	2,30
 <p style="text-align: center;">(36')</p>	2,16
 <p style="text-align: center;">(42)</p>	3,73
 <p style="text-align: center;">(37)</p>	3,46
 <p style="text-align: center;">(38)</p>	4,68

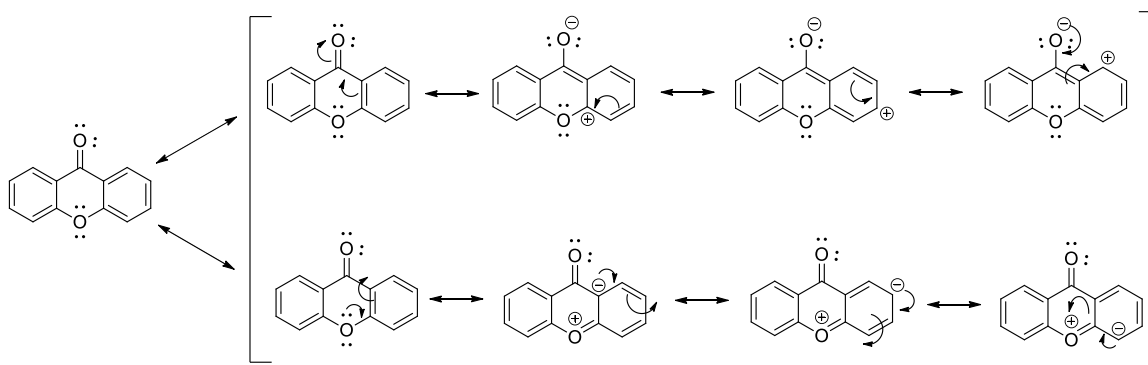
De maneira geral, pode-se observar que todos os compostos apresentam valores de Log P < 5, com uma faixa ampla indo de 1,18 até 4,86. Os dois compostos mais promissores frente a atividade anticâncer *in vitro*, **(34)** e **(34')** apresentaram valores de Log P = 2,92 e 2,81 respectivamente. Interessante notar a influência dos grupos químicos na lipofilicidade, como na molécula **(42)** que sem a presença do ácido borônico leva-se a um aumento do Log P, em 3,73. Com isso entende-se que o derivado contendo esse grupamento **(34)**, não só apresentou melhor IC₅₀ frente a linhagem SCC-25, maior seletividade para as células cancerígenas e maior capacidade inibição de citocinas inflamatórias como também um melhor perfil de lipofilicidade quando comparado ao composto **(42)**. Por fim, a influência do grupo bromo também é notória nos valores de Log P, uma vez que os compostos **(35)**, **(35')**, **(37)** e **(38)** apresentaram os maiores valores, indo de 3,46 até 4,86.

4.4 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO OS DERIVADOS XANTÔNICOS

Para obtenção das xantonas substituídas com ácidos borônicos, realizou-se duas diferentes rotas sintéticas. Uma, constituiu-se do uso de reagentes contendo o núcleo xantônico e seus derivados com o objetivo de realizar uma reação de bromação e levar a obtenção dos derivados bromados, que posteriormente foram utilizados para formação do éster borônico por meio de uma reação de Borilação de Miyaura e, por fim, a hidrólise do éster borônico, com o objetivo de obter os compostos finais com ácido borônico. Dentro desta rota sintética, partiu-se inicialmente de três diferentes reagentes sendo estes: 9H-xanteno-9-ol (xantidrol) (**76**), ácido 9H-xanteno-9-carboxílico (ácido xanteno-9-carboxílico) (**77**) e 9-xantenona (xantona) (**80**). Para realização da reação de bromação foram utilizadas duas diferentes metodologias sendo estas: uma com o uso do reagente N-bromosuccinimida (NBS) e outra com o uso do bromo (Br_2). Essas reações são caracterizadas como uma “substituição eletrofílica aromática” (SEAr). No caso da metodologia com uso de NBS, a liberação do Br_2 se dá de maneira mais controlada e lenta, uma vez que o NBS precisa primeiro reagir com o ácido bromídrico (HBr) para levar a formação de Br_2 no meio racional. Apesar de ser a metodologia preferencial nesse caso, principalmente por se tratar de um reagente de fácil manuseio e de toxicidade/periculosidade inferior do que o bromo, seu uso não resultou na formação do produto 2,7-dibromo-9H-xanteno-9-ona (**81**). Por se tratar de uma molécula de baixa reatividade, o reagente 9-xantenona (**80**) só foi capaz de levar a formação do produto desejado com o uso de Br_2 em meio de ácido acético e altas temperaturas (110 °C). Durante essa síntese, também foi possível observar a formação do produto 2-bromo-9H-xanteno-9-ona (**81-b**), ou seja, o derivado com apenas um átomo de bromo substituído (monosubstituído). Apesar de não ser o produto majoritário da reação, o mesmo pôde ser isolado e caracterizado (Tabela 13).

O produto ácido 2,7-dibromo-9H-xanteno-9-carboxílico (**79**) foi obtido por meio da metodologia com uso de NBS, ácido acético e temperatura ambiente. Além disso, observou-se o total consumo do reagente e que não houve a formação do produto monosubstituído. Uma justificativa é que a diferença entre os compostos se dá na posição 9, sendo uma carbonila ou um carbono sp^3 substituído com um grupo ácido carboxílico. O núcleo da xantona caracterizado pela presença da carbonila na posição 9 pode ser considerado bastante estável por ser estabilizado por ressonância. O efeito de ressonância já não acontece quando na posição 9 existe o carbono sp^3 substituído com o ácido carboxílico, o que leva a formação de um núcleo de baixa reatividade. Quanto ao padrão de substituição do anel aromático, as posições 2 e 7 são favorecidas durante as reações de bromação, uma vez que o núcleo das xantonas apresenta uma densidade eletrônica maior nessas posições, podendo ser evidenciado por meio de suas estruturas de ressonância (Figura 51). A carbonila atua como um grupo desativante por meio de ressonância, sendo, portanto, um grupamento meta-dirigente. O oxigênio por sua vez, atua como um grupo ativante por meio de ressonância, sendo, portanto, um grupo orto e para-dirigente (Figura 51).

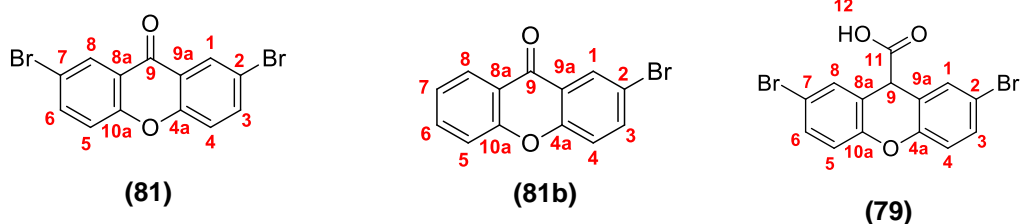
Figura 51. Estruturas de ressonância das xantonas



Fonte: Adaptado de Pinto e colaboradores (2021)

Por fim, o último reagente em que foi realizada a reação de bromação se tratou do 9H-xanteno-9-ol (xantidrol) (**76**), por meio da metodologia com NBS. Ao término da reação, esta avaliada em dois períodos de tempo diferentes: 24 h e 12 h, demonstrou consumo total do reagente de partida, mas, também, a decomposição do núcleo do xantidrol levando a formação do núcleo da xantona, tendo ocorrido, portanto, uma oxidação do álcool secundário para uma cetona. Este produto foi isolado e caracterizado por RMN, indicando que de fato a decomposição do núcleo xantidrol ocorreu. A decomposição do núcleo xantidrol já havia sido relatada na literatura (Karaman *et al.*, 1989) com reagentes muito distintos do utilizado neste trabalho, sendo estes álcoois terciários substituídos com grupos volumosos como benzil e benzidril, além de condições básicas. Os autores reportaram a conversão do núcleo xantidrol em xantona, assim como foi observado neste trabalho (Karaman *et al.*, 1989). Sugere-se que as condições reacionais, principalmente o meio fortemente ácido, possa ter auxiliado na decomposição do núcleo xantidrol e que, portanto, para obtenção do produto bromado seja necessário reavaliar a metodologia escolhida por uma com uso de um solvente mais compatível com o reagente e sem a presença de ácidos ou bases fortes.

Os compostos bromados: (**79**), (**81**) e (**81b**) foram caracterizados por meio de RMN de ^1H e ^{13}C (Tabela 13). De maneira geral, os compostos apresentam valores de deslocamentos químicos bastante similares, principalmente os derivados (**79**) e (**81**) por se tratarem de moléculas simétricas. Para o composto (**81**), os hidrogênios 1 e 8 apresentam deslocamento químico de 8,43 ppm, sendo um duplete com $J = 2.4$ Hz, indicando um acoplamento em *meta*; os hidrogênios 6 e 3 apresentaram deslocamento químico de 7,81 ppm, sendo um duplo duplete com $J = 8.9$ e 2.5 Hz, indicando acoplamento em *orto* e *meta* e por fim, os hidrogênios 4 e 5 apresentaram deslocamento químico de 7,40 ppm sendo um duplete com $J = 8.8$ Hz, indicando um acoplamento em *meta* (Tabela 13). O composto (**81b**) que foi substituído com apenas um átomo de bromo apresenta a maior diferença quanto a caracterização por RMN, uma vez que a simetria foi desfeita.

Tabela 13. Caracterização estrutural de (79), (81) e (81b) por RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC e HMBC em DMSO-d_6 e CDCl_3 .

Posição	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	8,43 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2.4 Hz, 2H)	129,24	8,39 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 2.5, 0.4 Hz, 1H)	128,39	7,58 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2.4 Hz, 2H)	132,28
2	-	117,65	-	116,90	-	115,45
3	7,81 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8.9, 2.5 Hz, 2H)	137,98	7,73 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8.9, 2.5 Hz, 1H)	136,90	7,51 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8.7, 2.5 Hz, 2H)	132,47
4	7,40 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H)	119,99	7,34 (<i>m</i> , 2H)	119,17	7,15 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8.7 Hz, 2H)	119,14
4a	-	122,94	-	121,40	-	121,92
5	7,40 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H)	119,99	7,34 (<i>m</i> , 2H)	123,54	7,15 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8.7 Hz, 2H)	119,14
6	7,81 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8.9, 2.5 Hz, 2H)	137,98	7,68 (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 8.7, 7.1, 1.7 Hz, 1H)	134,44	7,51 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8.7, 2.5 Hz, 2H)	132,47
7	-	117,65	8,26 (<i>m</i> , 1H)	126,08	-	115,45
8	8,43 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2.4 Hz, 2H)	129,24	7,43 (<i>m</i> , 1H)	117,24	7,58 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2.4 Hz, 2H)	132,28
8a	-	154,96	-	155,90	-	150,41
9	-	174,93	-	175,83	5,10 (<i>s</i> , 1H)	44,20
9a	-	154,96	-	154,80	-	150,41
10a	-	122,94	-	122,99	-	121,92
11	-	-	-	-	-	172,30
12	-	-	-	-	-	-

A segunda rota sintética para obtenção da xantona substituída com ácido borônico tratou-se do uso do reagente 2,2',4,4'-tetrahidrobenzofenona (**73**) sendo este aquecido à 220 °C em uma mufla durante um período de overnight (ou tempo necessário para consumo total do reagente), levando a obtenção da xantona 3,6-dihidroxixantona (**74**) pura, sem necessidade de uma etapa posterior de purificação. A segunda etapa, tratou-se da reação entre a 3,6-dihidroxixantona (**74**) e anidrido

trifluorometanossulfônico, em meio contendo diclorometano e piridina. Nessa reação, caracterizada como uma substituição nucleofílica acílica, a hidroxila do fenol é responsável por atacar um dos enxofres do anidrido trifluorometanossulfônico, sendo esta etapa catalisada pela presença da base, levando a formação de um grupo triflato. A reação ao ser acompanhada por CCD, indicou a formação de um novo produto com R_f diferente do reagente, sendo este mais polar e com perceptível diferença em diferentes fases orgânicas testadas. Após a purificação por coluna de bancada, a caracterização por RMN de ¹H e ¹³C indicaram a obtenção da xantona di-substituída com o grupo triflato. No espectro de ¹H do composto 3,6-ditrifilxantona (**75**), foi possível observar o desaparecimento das hidroxilas presentes na 3,6-dihidroxixantona (**74**) caracterizadas como um simpleto com deslocamento químico em 10,82 ppm, além dos sinais dos hidrogênios aromáticos que sofreram um deslocamento, sendo perceptível a diferença ao comparar os dois espectros (Figura 52 e Figura 53). Este deslocamento é causado pelo fato do triflato ser um grupo mais eletronegativo que a hidroxila, causando um efeito de desblindagem na densidade eletrônica dos hidrogênios aromáticos.

Figura 52. Espectro de RMN de ¹H do composto 3,6-dihidroxixantona (**74**) em DMSO-d₆.

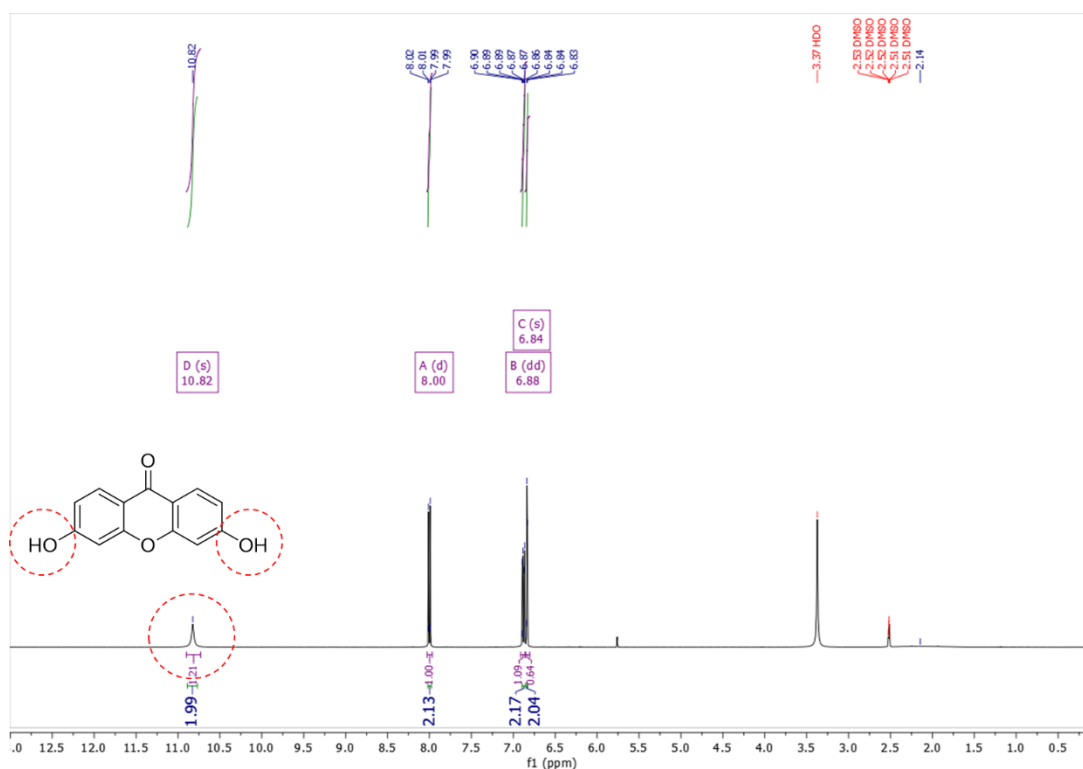
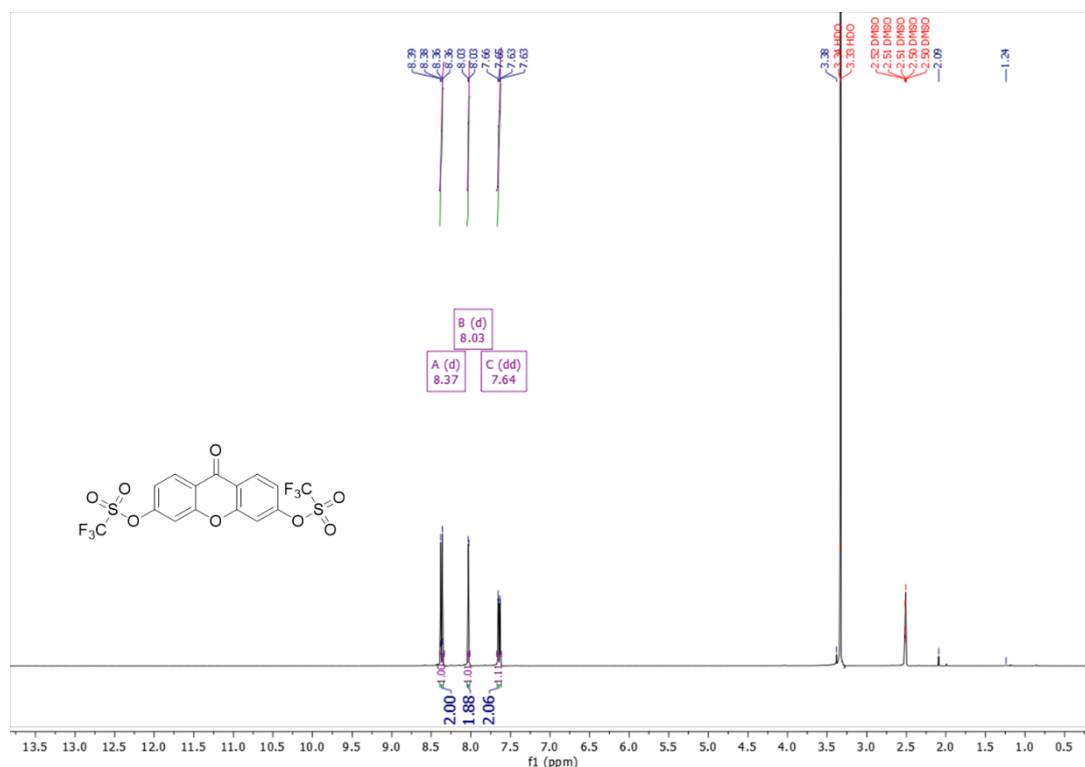


Figura 53. Espectro de RMN de ^1H do composto 3,6-ditrifilixantona (**75**) em DMSO- d_6 .

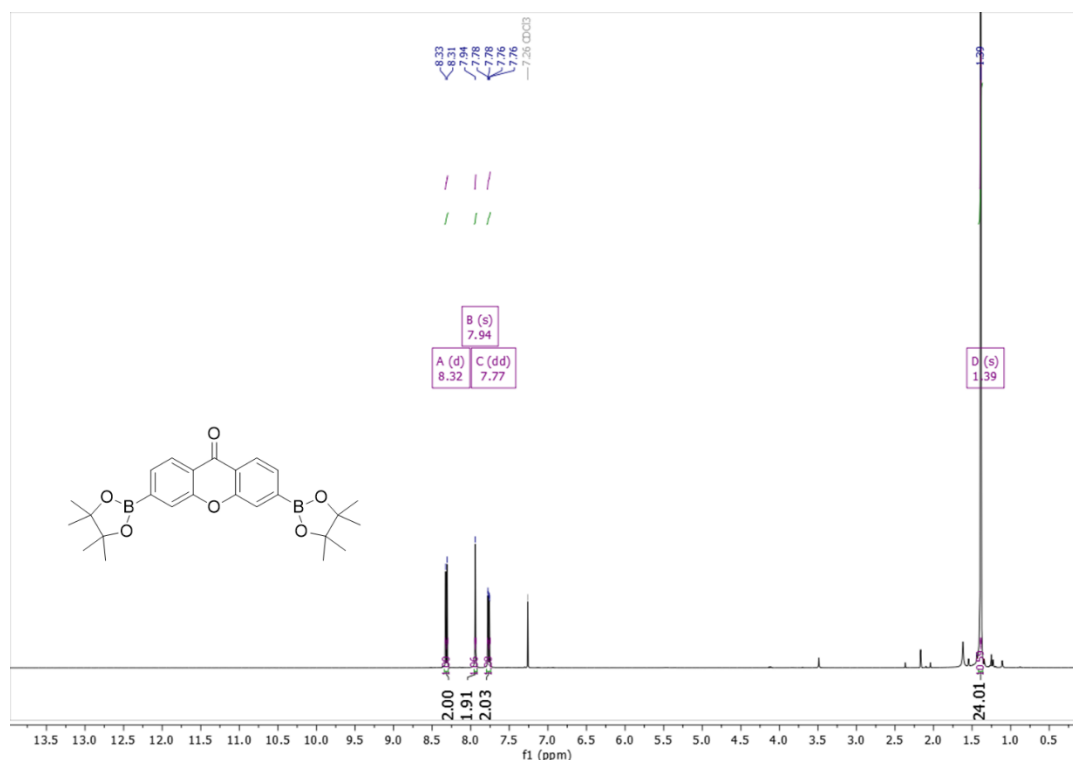


Após a obtenção dos intermediários xantônicos substituídos com bromo e triflato, realizou-se a posterior etapa de síntese de Borilação de Miyaura, obtendo no total, quatro derivados de ésteres borônicos: (**82**), (**83**) e (**84**) e um, proveniente da reação do composto (**81b**). O uso do composto (**81b**), sendo este monosubstituído com bromo, foi efetivo na obtenção do respectivo derivado de éster borônico, sendo obtido puro após uma etapa de recristalização em metanol. Sua caracterização se deu por meio de RMN de ^1H e ^{13}C (espectros na seção de anexos). Mas, apesar disso, como o composto (**81b**) se tratou de um produto secundário de reação (obtido durante a reação de bromação) havia pouca massa disponível para dar continuidade as etapas subsequentes. Por tanto, apesar de efetiva a reação de borilação, levando a formação do produto de xantona com éster borônico monosubstituído, a pouca massa obtida (16 mg) foi utilizada para análises por RMN e ensaios biológicos. O produto final com ácido borônico não pôde ser obtido.

A purificação dos derivados de éster borônicos se deu por cromatografia em coluna tendo como eluentes acetato de etila e hexano, ou por meio de uma recristalização com uso de metanol. Porém, apesar da recristalização ter sido efetiva, este não é o melhor método de purificação para esses compostos uma vez que os cristais demoram de um até dois dias para formar e nem todo produto acaba por precipitar. A caracterização estrutural foi realizada por meio de RMN de ^1H e ^{13}C . Os sinais característicos do grupo éster borônico foram identificados de maneira similar em todos os espectros dos respectivos compostos e com isso, selecionou-se um único composto para discussão. O composto (**84**) apresentou na região dos hidrogênios aromáticos três sinais em $\delta_{\text{H}} = 8,32$ (d, $J = 7.9$ Hz, 2H); 7,94 (s, 2H) e 7,77 (d, $J = 7.9, 0.9$, 2H), sendo estes provenientes dos hidrogênios do núcleo da xantona e um sinal em $\delta_{\text{H}} = 1,39$ (s, 24 H) proveniente dos hidrogênios do éster borônico (Figura 54). Além disso, no espectro de ^{13}C , também foi possível observar os sinais em $\delta_{\text{C}} = 84,3$ e 24,9,

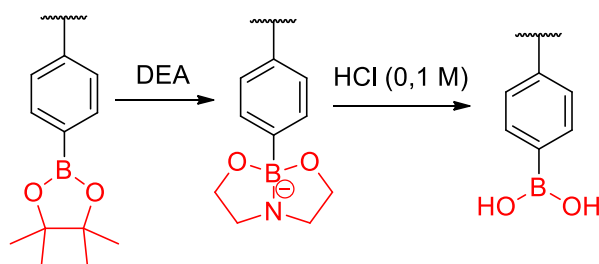
sendo estes característicos do carbono quaternário e dos carbonos das metilas presentes no grupamento éster borônico.

Figura 54. Espectro de RMN de ^1H do composto 3,6-bis(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-9H-xanten-9-ona (**84**) em CDCl_3 .



Por fim, para obtenção dos compostos finais derivados de ácidos borônicos, os respectivos ésteres (**85**), (**86**) e (**87**) reagiram com dietanolamina (DEA) em meio de éter e posteriormente, ácido clorídrico (0,1 M) para hidrólise (Sun, Perfetti, Santos; 2011). Durante a primeira etapa, o éster borônico reage com a DEA levando a formação de um intermediário de boro-DEA (éster borônico de dietanolamina), em que o boro adquire uma hibridização sp^3 (Figura 55) (Sun, Perfetti, Santos; 2011). O acompanhamento reacional feito por CCD indicou o consumo do reagente e a precipitação do intermediário boro-DEA. A segunda etapa da reação consistiu na adição de HCl (0,1 M) levando a hidrólise do intermediário boro-DEA e obtenção do composto final na forma de ácido borônico.

Figura 55. Transesterificação do éster borônico na presença de DEA, levando a formação do intermediário boro-DEA. A adição de HCl leva a obtenção do ácido borônico por meio da hidrólise.



Ao fim da reação e após a realização da extração líquido-líquido utilizando água e éter, os produtos **(85)** e **(87)** foram obtidos, sem uma etapa posterior de purificação. O composto **(86)** apesar da caracterização por RMN de ^1H e IV indicar a obtenção do produto desejado, não foi obtido puro e, portanto, sua caracterização completa não foi realizada. Tentou-se uma etapa de purificação por meio de cromatografia preparativa com eluentes: acetato de etila e hexano nas proporções 5:5 (ou 1:1). Apesar do isolamento da mancha de interesse ter sido efetiva ao utilizar a placa preparativa, houve grande dificuldade em solubilizar o composto nos solventes orgânicos para sua separação da sílica, o que resultou em uma quantidade muito pequena de produto. A caracterização estrutural dos compostos **(85)** e **(87)** foi realizada por meio de RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC e HMBC e infravermelho (IV). Como os compostos apresentam uma grande similaridade quanto aos sinais, apenas o **(87)** será discutido. Os sinais característicos do núcleo da xantona na região dos hidrogênios aromáticos foram caracterizados em $\delta_{\text{H}} = 8,15$ (*d*, $J = 7.9$ Hz, 2H); 7,82 (*dd*, $J = 7.9, 1.0$ Hz, 2H) e 8,04 (*d*, $J = 1.0$ Hz, 2H) sendo os hidrogênios 1 e 8, 2 e 7, 4 e 5, simétricos. Os hidrogênios nas posições 1 e 8 acoplam apenas em *orto* ($J = 7.9$ Hz), os hidrogênios 2 e 7 acoplam em *orto* e *meta* ($J = 7.9, 1.0$ Hz) e os hidrogênios 4 e 5 acoplam em *meta* ($J = 1.0$ Hz). Os quatro hidrogênios dos dois ácidos borônicos da molécula foram caracterizados como um simpleto em 8,52 ppm com integração para 4H (Tabela 14). Quanto ao IV, na região em 3400 cm^{-1} é possível observar uma banda larga e intensa característica das hidroxilas do ácido borônico (espectro na seção de Anexos).

Tabela 14. Caracterização estrutural de **(85)** e **(87)** por RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC e HMBC em DMSO-d_6 .

	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	7,80 (<i>d</i> , $J = 1.6$ Hz, 2H)	135,65	8,15 (<i>d</i> , $J = 7.9$ Hz, 2H)	124,43
2	-	128,92	7,82 (<i>dd</i> , $J = 7.9, 1.0$ Hz, 2H)	128,99
3	7,75 (<i>dd</i> , $J = 8.2, 1.6$ Hz, 2H)	134,90	-	143,01
4	7,12 (<i>d</i> , $J = 8.2$ Hz, 2H)	115,49	8,04 (<i>d</i> , $J = 1.0$ Hz, 2H)	123,31
4a	-	152,17	-	155,12
5	7,12 (<i>d</i> , $J = 8.1$ Hz, 2H)	115,49	8,04 (<i>d</i> , $J = 1.0$ Hz, 2H)	123,31
6	7,75 (<i>dd</i> , $J = 8.1, 1.5$ Hz, 2H)	134,90	-	143,01

7	-	128,92	7,82 (dd, J = 7.9, 1.0 Hz, 2H)	128,99
8	7,80 (d, J = 1.6 Hz, 2H)	135,65	8,15 (d, J = 7.9 Hz, 2H)	124,43
8a	-	118,45	-	122,10
9	4,97 (s, 1H)	44,57	-	176,39
9a	-	118,45	-	122,10
10a	-	152,17	-	155,12
11	-	173,18	8,52 (s, 4H)	-
12	-	-	8,52 (s, 4H)	-
13	8,03 (s, 4H)		8,52 (s, 4H)	-
14	8,03 (s, 4H)		8,52 (s, 4H)	-
15	8,03 (s, 4H)		-	-
16	8,03 (s, 4H)		-	-

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho, 13 chalconas derivatizadas com ácido borônico foram avaliadas *in vitro* para determinação de sua atividade anti-câncer. Das 13 chalconas avaliadas, destaca-se o composto (**34**) sendo esse o mais ativo da série com $IC_{50} = 18,4 \mu\text{M}$ frente ao modelo de câncer de cavidade oral (SCC-25) e $SI > 2,0$. Essa mesma molécula foi avaliada em outro modelo celular, Detroit-562, sendo esse modelo metastático, com $IC_{50} = 99,7 \mu\text{M}$. Das 13 chalconas avaliadas frente a atividade anti-câncer, 4 foram selecionadas para avaliação da atividade anti-inflamatória. De maneira geral, todas apresentaram capacidade de redução das citocinas TNF- α , IL-6 e IL1- β , sendo que a molécula menos efetiva foi a (**42**), evidenciando que a ausência do ácido borônico em sua estrutura reduziu seu efeito anti-inflamatório quando comparado as outras chalconas avaliadas. Por fim, o valor de Log P experimental foi determinado para os compostos com uma faixa de 1,18 até 4,86, sendo, portanto, todos abaixo de 5. O composto mais ativo da série (**34**) apresentou um valor de Log P = 2,92 sendo esse um valor satisfatório, que pode indicar uma boa capacidade da molécula em atravessar as camadas bilipídicas das células por meio de difusão passiva. Por fim, conclui-se que as chalconas da série são protótipos interessantes para modificação estrutural, com destaque ao composto (**42**). A elucidação do mecanismo de ação frente a atividade anti-câncer é um ponto decisivo para propor novas modificações que visem a obtenção de um composto mais potente e seletivo frente a esse modelo celular.

Quanto a série das xantonas, foram sintetizados e caracterizados dois compostos finais sendo estas xantonas derivadas de ácidos borônicos, com rendimentos médios de 55-60%. Os compostos finais bem como os intermediários sintéticos serão avaliados *in vitro* com objetivo de determinar a propriedade anti-câncer dessas moléculas.

6. REFERÊNCIAS

- JOHNSON, D. E. et al. Head and Neck squamous cell carcinoma. **Nature Reviews Disease Primer**. v. 6, n. 92, 2020.
- LEEMANS, C. R.; BRAAKHUIS, B. J. M.; BRAKENHOFF, R. H. The molecular biology of head and neck cancer. **Nature Reviews Cancer**. v. 11, p. 9-22, 2011.
- GORMLEY, M. et al. Reviewing the epidemiology of head and neck cancer: definitions, trends and risk factors. **British Dental Journal**. v. 233, n. 9, p. 780-786, 2022.
- THOMAS, S. J. et al. The changing aetiology of head and neck squamous cell cancer: A tale of three cancers?. **Clinical Otolaryngology**. v. 43, n. 4, p. 999-1003, 2018.
- THE CANCER GENOME ATLAS NETWORK. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. **Nature**. v. 517, n. 7536, p. 576-582, 2015.
- HERRERO, A. B. et al. Molecular Mechanisms of p53 Deregulation in Cancer: An Overview in Multiple Myeloma. **Internacional Journal of Molecular Sciences**. v. 17, n. 12, 2003.
- SCHEFFENER, M. et al. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. **Cell**. v. 75, n. 3, p. 495-505, 1993.
- OBSERVATÓRIO DE ONCOLOGIA. Disponível em: <<https://tjcc.com.br/acontece-tjcc/observatorio-de-oncologia-faz-levantamento-sobre-o-cancer-de-cabeca-e-pescoco/>>. Acesso em: 4 jan. 2024.
- SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**. v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021.
- LAURA, Q. M.; CHOW, M. D. Head and Neck Cancer. **The New England Journal of Medicine**. v. 382, n. 1, p. 60-72, 2020.
- DE SOUSA, L. G.; FERRAROTTO, R. Pembrolizumab in the first-line treatment of advanced head and neck cancer. **Expert Review of Anticancer Therapy**. v. 21, n. 12, p. 1321-1331, 2021.
- VERMOKEN, J. B. et al. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. **The New England Journal of Medicine**. v. 359, n. 11, p. 1116-1127, 2008.
- ZHONG, L.; LI, Y.; XIONG, L. et al. Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives. **Signal Transduction and Targeted Therapy**. v. 6, n. 201, p. 1-48, 2021.
- BEDARD, P. L. et al. Small molecules, big impact: 20 years of targeted therapy in oncology. **The Lancet**. v. 395, p. 10229, p. 1078-1088, 2020.
- LEE, Y. T.; TAN, Y. J.; OON, C. E. Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. **European Journal of Pharmacology**. v. 834, p. 188-196, 2018.
- Li, H.; et al. Genomic Analysis of Head and Neck squamous Cell Carcinoma Cell Lines and Human Tumors: A Rational Approach to Preclinical Model Selection. **Molecular Cancer Research**. v. 12, n. 4, p. 571-582, 2014.
- H. ZU, et al. Targeting p53–MDM2 interaction by small-molecule inhibitors: learning from MDM2 inhibitors in clinical trials. **Journal of Hematology & Oncology**. v. 15, n. 1, 2022.
- BOUZID, A. et al. Identification of p53-target genes in human papillomavirus-associated head and neck cancer by integrative bioinformatics analysis. **Frontiers in Oncology**. v. 13, p. 1128753, 2023.

- DENARO, N. et al. The Role of p53 and MDM2 in Head and Neck Cancer. **IRSN Otolaryngology**. v. 2011, p. 931813, 2011.
- CHÈNE, P. Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**. v. 3, n. 2, p. 102-109, 2003.
- ZHAO, Y. et al. Small-Molecule Inhibitors of the MDM2–p53 Protein–Protein Interaction (MDM2 Inhibitors) in Clinical Trials for Cancer Treatment. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 58, n. 3, p. 1038-1052, 2015.
- 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.
- MOREIRA, J. et al. Chalcones as Promising Antitumor Agents by Targeting the p53 Pathway: An Overview and New Insights in Drug-Likeness. **Molecules**. v. 26, n. 12 3737, p. 1-24, 2021.
- STOLL R. et al. Chalcone Derivatives Antagonize Interactions between the Human Oncoprotein MDM2 and p53. **Biochemistry**. v. 40, n. 2, p. 336-344, 2001.
- LEÃO, M. et al. Enhanced Cytotoxicity of Prenylated Chalcone Against Tumor cells via Disruption of the p53–MDM2 Interaction. **Life Sciences**. v. 142, p. 60-65, 2015.
- BRANDÃO, P. et al. Targeting the MDM2-p53 protein-protein interaction with prenylchalcones: Synthesis of a small library and evaluation of potential antitumor activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 156, p. 711-721, 2018.
- OUYANG, Y. et al. Chalcone Derivatives: Role in Anticancer Therapy. **Biomolecules**. v. 11, n. 6, p. 894, 2021.
- WARING, M. J. Lipophilicity in drug Discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**. v. 5, n. 3, p. 235-248, 2010.
- GUHA, H.; MACKMAN, N. LPS induction of gene expression in human monocytes. **Cellular Signaling**. v. 13, n. 2, p. 85-94, 2001.
- LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 46, n. 1-3, p. 3-26, 2001.
- JASIM, H. A. et al. Chalcones: Synthetic Chemistry Follows Where Nature Leads. **Biomolecules**. v. 11, n. 8, p. 1203, 2021.
- RUDRAPAL, M. et al. Chalcone Scaffolds, Bioprecursors of Flavonoids: Chemistry, Bioactivities, and Pharmacokinetics. **Molecules**. v. 26, n. 23, p. 7177, 2021.
- ACHANTA, G. et al. A Boronic-Chalcone Derivative Exhibits Potent Anticancer Activity through Inhibition of the Proteasome. **Molecular Pharmacology**. v. 70, n. 1, p. 426- 433, 2006.
- DENG, N. et al. Anticancer effects of licochalcones: A review of the mechanisms. **Frontiers in Pharmacology**. v. 14, p. 1-10, 2023.
- ZENG, G. et al. Licochalcone A as a potente antitumor agent suppresses growth of human oral cancer SCC-25 cells in vitro via caspase-3 dependent pathways. **Tumor Biology**. v. 35, n. 7, p. 6549-6555, 2014.
- MCILWAN, D. R.; BERGER, T.; MAK, T. W. Caspase Functions in Cell Death and Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**. v. 5, n. 4, p. 1-28, 2013.
- SCHEFF, N. N. et al. Tumor necrosis factor alpha secreted from oral squamous cell carcinoma contributes to cancer pain and associated inflammation. **Pain**. v. 158, n. 12, p. 2396-2409, 2017.

- NAKANO, Y. et al. Expression of Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-6 in Oral Squamous Cell Carcinoma. **Japanese Journal of Cancer Research**. v. 90, n. 8, p. 858-866, 1999.
- GOERTZEN, C. et al. Oral inflammation promotes oral squamous cell carcinoma invasion. **Oncotarget**. v. 9, n. 49, p. 29047-29063, 2018.
- ST JOHN, M. A. R. et al. Interleukin 6 and interleukin 8 as potential biomarkers for oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Archives of otolaryngology - head & neck surgery**. v. 130, n. 8, p. 929-935, 2004.
- SAHEBJAMEE, M. et al. Salivary concentration of TNF α , IL1 α , IL6, and IL8 in oral squamous cell carcinoma. **Medicina oral, patologia oral y cirugia buccal**. v. 13, n. 5, p. 292-295, 2008
- KONG, Y. et al. A boronic acid chalcone analog of combretastatin A-4 as a potent anti-proliferation agente. **Bioorganic Medicinal Chemistry**. v. 18, n. 2, p. 971, 2010.
- 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.
- SUN, J.; PERFETTI, M. T.; SANTOS, W. L. A method for the deprotection of alkylpinacolyl boronate esters. **The Journal of Organic Chemistry**. v. 76, p. 3571-3575, 2011.
- KARAMAN, R.; BADEJO, I. T.; FRY, J. L. Facile decomposition of 9-substituted 9-xanthydrols in basic media. Dependence of reaction behavior on structure and metal ion. **Journal of American Chemical Society**. V. 111, n. 16, p. 6450-6451, 1989.
- LIANG, S. et al. Michael acceptor molecules in natural products and their mechanism of action. **Frontiers in Pharmacology**. v. 13, p. 1-17, 2022.
- HELLER, L. et al. Incorporation of a Michael acceptor enhances the antitumor activity of triterpenoic acids. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 101, p. 391-399, 2015.
- LEMOS, A. et al. Synthesis, Biological Evaluation, and In Silico Studies of Novel Aminated Xanthonas as Potential p53-Activating Agents. **Molecules**. v. 24, n. 10, p. 197, 2019.
- LEÃO, M. et al. Discovery of a new small-molecule inhibitor of p53–MDM2 interaction using a yeast-based approach. **Biochemical Pharmacology**. v. 85, n. 9, p. 1234-1245, 2013.
- LIU, J. et al. Synthesis of xanthone derivatives and studies on the inhibition against cancer cells growth and synergistic combinations of them. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 133, p. 50-61, 2017.
- PINTO, M. M. M. et al. From Natural Products to New Synthetic Small Molecules: A Journey through the World of Xanthonas. **Molecules**. v. 26, n. 2, p. 431, 2021.
- FENG, Z. et al. Xanthonas, A Promising Anti-Inflammatory Scaffold: Structure, Activity, and Drug Likeness Analysis. **Molecules**. v. 25, n. 3, p. 598, 2020.
- WAIRATA, J. et al. Evaluation of the Antioxidant, Antidiabetic, and Antiplasmodial Activities of Xanthonas Isolated from *Garcinia forbesii* and Their *In Silico* Studies. **Biomedicines**. v. 9, n. 10, p. 1380, 2021.
- KURNIAWAN, Y. S. et al. An Update on the Anticancer Activity of Xanthone Derivatives: A Review. **Pharmaceuticals**. v. 14, n. 11, p. 1144, 2021.
- RESENDE, D. I. S. P. Recent advances in the synthesis of xanthonas and azaxanthonas. **Organic Chemistry Frontiers**. v. 7, p. 3027-3066, 2020.

SIVAKAMASUNDARI, S.; GANESAN, R. Kinetics and Mechanism of the Bromination of Aromatic Compounds by N-Bromosuccinimide in Solution. **International Journal of Chemical Kinetics**. v. 12, p. 837-850, 1980.

ANDERSH, B.; MURPHY, D. L.; OLSON, J. Hydrochloric Acid Catalysis of N-Bromosuccinimide (NBS) Mediated Nuclear Aromatic Brominations in Acetone. **Synthetic Communications: An International Journal for Rapid Communication of Synthetic Organic Chemistry**. v. 30, n. 12, p. 2091-2098, 2000.

MILLER, E. W.; ALBERS, A. E.; CHANG, C. J. Boronate-Based Fluorescent Probes for Imaging Cellular Hydrogen Peroxide. **Journal of the American Chemical Society**. v. 127, n. 47, p. 16652-16659, 2005.

PINTO, E. et al. Antifungal activity of xanthenes: evaluation of their effect on ergosterol biosynthesis by high-performance liquid chromatography. **Chemical Biology & Drug Design**. v. 77, n. 3, p. 212-222, 2011.