

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA

CAMILA MARCOVICZ

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO, ANÁLISE CONFORMACIONAL E ATIVIDADE  
BIOLÓGICA DE 2', 3' E 4' - BROMOCHALCONAS

PONTA GROSSA  
2018

CAMILA MARCOVICZ

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO, ANÁLISE CONFORMACIONAL E ATIVIDADE  
BIOLÓGICA DE 2', 3' E 4' – BROMOCHALCONAS

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Química Aplicada no Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada – Mestrado – da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora:  
Profa Dra Barbara Celânia Fiorin

PONTA GROSSA  
2018

M321 Marcovicz, Camila  
Síntese e análise conformacional de chalconas bromadas aliada à avaliação de atividades antioxidante e antimicrobiana/ Camila Marcovicz. Ponta Grossa, 2018. 111f.

Dissertação (Mestrado em Química Aplicada - Área de Concentração Química), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Barbara Celânia Fiorin.

1. Chalconas. 2. Análise conformacional. 3. Cálculos teóricos. 4. Espectroscopia MRN. 5. Atividade antioxidante. 6. Atividade antimicrobiana. I. Fiorin, Barbara Celânea II. Universidade Estadual de Ponta Grossa - Mestrado em Química Aplicada. III. T.

CDD: 541

## TERMO DE APROVAÇÃO

CAMILA MARCOVICZ

**“SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO, ANÁLISE CONFORMACIONAL E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE 2', 3' E 4' - BROMOCHALCONAS”.**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.

Orientadora :

  
Prof.ª Dr.ª Barbara Celânia Fiorin  
UEPG/PR

  
Prof.ª Dr.ª Jacqueline Aparecida Marques  
UEPG/PR

  
Prof. Dr. Luciano Fernandes  
UTFPR/PR

Ponta Grossa, 10 de agosto de 2018.

Dedico este trabalho à minha mãe,  
que com muito carinho e apoio sempre acreditou em mim,  
e sem medir esforços, muitas vezes abdicou de sua vida  
em prol das minhas realizações e da minha felicidade.

Foi à pessoa fundamental, foi mãe e pai,  
e fez com que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Te amo!!!

## **Agradecimentos**

A Deus, por ter permitido realizar tantos sonhos, por me permitir errar, aprender e crescer, com sua eterna compreensão e tolerância. Sua voz não me deixou desistir.

A minha mãe, Emilia Marcovicz pelo imenso amor e sacrifício durante toda minha existência, sem este sacrifício eu não conseguiria todas minhas conquistas e realizações, por todo o orgulho que sempre demonstrou em relação aos caminhos que decidi seguir. Enfim, tudo o que sou, ou o que ainda serei, devo a minha querida mãe.

A minha querida tia Lidia, por toda ajuda carinho e compreensão, e por todas as xicaras de chá quentinho durante meus incansáveis períodos de estudo.

Ao meu esposo e melhor amigo, Thiago Sibeneichler agradeço de forma especial, com muito amor, por nunca me deixar desanimar, por estar ao meu lado mesmo quando eu não conseguia lhe dar atenção, por aguentar todas as minhas “crises”, por toda ajuda direta e indiretamente sempre que precisei. Por todos os cafés da manhã, almoços e jantas, durante todos os períodos em que minha única preocupação era realizar alguma etapa deste trabalho. Eu amo você.

Agradeço a todos meus amigos, que são pessoas que admiro muito e desejo muito sucesso, e sem eles a vida não seria mais leve e tão feliz. Gostaria de agradecer especialmente a duas amigas que estão fazendo parte desta jornada, desde a minha graduação. Obrigada Emily Suchodolak, por me acolher na sua vida, na sua casa e na sua família, por me fazer parte disso tudo e por toda parceria em me deixar dividir o peso deste trabalho com você, durante as minhas “crises”. Sou muito grata por todas as vezes que tive uma cama quentinha para dormir e o delicioso feijão da sua mãe para me alimentar. Obrigada Rita Oliveira, por me passar a confiança de que eu conseguiria, enquanto por diversas vezes eu mesma duvidava disso, por todos os conselhos e incentivos, por estar sempre pronta para me ajudar. Sou muito grata por todos os “mates” e tardes de conversa e desabafo. Gostaria de agradecer a uma amiga que mesmo não fazendo parte desta minha caminhada desde o inicio, tem sido essencial, seja por sua presença física ou espiritual, pois desde que nossas almas irmãs se reconheceram, percebemos que nossas vidas serão muito melhores se permanecermos uma ao lado da outra. Obrigada Jessica Calixto por ser você, em minha vida.

A querida “Profe” Dra. Barbara Fiorin, por acreditar que eu era capaz, por ser simplesmente brilhante, pela orientação, competência, profissionalismo e dedicação tão importantes.

Ao Dr. Thiago Rozada por pacientemente me orientar, com a química computacional.  
A Dra. Patrícia pelo auxílio com as análises biológicas.

Aos membros da banca examinadora, Profa. Dra. Jacqueline Aparecida Marques e Prof. Dr. Luciano Fernandes, pelos quais eu tenho imensa admiração, e que tão gentilmente aceitaram participar e colaborar com esta dissertação.

A CAPES pelo apoio financeiro.

Ao C-LABMU/PROPESP pelas análises realizadas.

*“Eu não sei o que quero ser, mas sei muito bem o que não quero me tornar.”*

Friedrich Nietzsche



## Resumo

As chalconas estão associadas a várias atividades biológicas, dentre as quais, podemos citar: antioxidante, antialérgica, anti-inflamatória, anticarcinogênica, antiulcerogênica, vasodilatadora, antiespasmódica, antiplaquetária, antimicrobiana e antiviral. A modificação molecular de estruturas químicas é uma das ferramentas mais utilizadas pela indústria farmacêutica para obtenção de novos fármacos, dentro deste contexto houve o interesse de sintetizar quatro chalconas, uma destas sem substituinte nos anéis aromáticos, comparando-a com chalconas que apresentam o átomo de bromo em sua estrutura. Avaliando também o posicionamento deste substituinte no anel como caráter comparativo. Desta maneira, neste trabalho demonstramos a síntese e caracterização por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  das seguintes chalconas: 1-Fenil-2-propen-3-fenil-1-ona (CHAL), 1-(2-Bromofenil)-2-propen-3-fenil-1-ona (*o*-CHALBr), 1-(3-Bromofenil)-2-propen-3-fenil-1-ona (*m*-CHALBr) e 1-(4-Bromofenil)-2-propen-3-fenil-1-ona (*p*-CHALBr). Todas foram obtidas com rendimento e pureza satisfatórios através da condensação de Claisen-Schmidt, utilizando benzaldeído e derivados da acetofenona. Além disto, estas chalconas foram avaliadas com respeito a sua atividade antimicrobiana e antioxidante. Nos ensaios para a avaliação da atividade antimicrobiana, a chalcona sem substituinte apresentou atividade contra espécies Gram positivas, essa atividade foi ligeiramente aumentada pela presença do bromo na posição *orto*, enquanto a presença deste halogênio na posição *meta* manteve a atividade apenas contra espécies *S. aureus*. O bromo na posição *para*, aparentemente prejudicou a atividade antimicrobiana. Já a avaliação da atividade antioxidante apresentou resultados positivos para as quatro chalconas. A chalcona sem substituinte apresentou atividade antioxidante, que pode ser superada, em determinadas concentrações, substituindo o bromo na posição *orto*. Porém a substituição do bromo nas posições *meta* e *para* aparentemente diminuem a atividade antioxidante. Para complementar, foi realizado um estudo conformacional dos compostos com o emprego de cálculos teóricos, que foram desenvolvidos com o nível de teoria HF/6-31G para os cálculos de *scan*, M06-2X/6311++G(2d, 2p) para as otimizações e frequências, determinando as energias e geometrias, e ainda M06-2X/6-311++G(2d, 2p) para os cálculos de NBO, determinando os efeitos hiperconjugativos dos compostos. O pacote de programas utilizado foi o GAUSSIAN 09. Sendo os programas PyMOL e GaussView 5 utilizados para a visualização de estruturas e superfícies. Ao final destes cálculos, foi possível confirmar que a conformação de maior estabilidade para todos os compostos estudados apresentou a carbonila e a dupla ligação vinílica arranjadas de maneira *s-cis*. Sendo que o efeito hiperconjugativo foi o responsável pela maior população da *s-cis* frente a *s-trans*.

**Palavras chave:** chalconas; análise conformacional; cálculos teóricos; espectroscopia RMN; atividade antioxidante; atividade antimicrobiana.

## Abstract

The chalcones are associated to several biological activities, among which we can mention: antioxidant, antiallergic, anti-inflammatory, anticarcinogenic, antiulcerogenic, vasodilator, antispasmodic, antiplatelet, antimicrobial and antiviral. The molecular modification of chemical structures is one of the tools most used by the pharmaceutical industry to obtain new drugs, within this context it was interesting to synthesize four chalcones, one of them without substituent in the aromatic rings, comparing it with chalcones that present the atom of bromine in structure. Evaluating also the positioning of this substituent in the ring as a comparative character. Thus, in this work we demonstrate the synthesis and characterization by NMR of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  of the following chalcones: 1-Phenyl-2-propen-3-phenyl-1-one (CHAL), 1- (2-Bromophenyl) -2-propene -3-phenyl-1-one (m-CHALBr) and 1- (4-Bromophenyl) -2-propenecarboxylate (o-CHALBr), 1- (3-Bromophenyl) -2-propen- -3-phenyl-1-one (p-CHALBr). All were obtained in satisfactory yield and purity by condensation of Claisen-Schmidt, using benzaldehyde and acetophenone derivatives. In addition, these chalcones were evaluated with respect to their antimicrobial and antioxidant activity. In the tests performed for the evaluation of antimicrobial activity, the chalcone without substituent showed activity against *Gram positive* species, this activity was slightly increased by the presence of bromine in the *ortho* position, while the presence of this halogen at the *meta* position maintained the activity only against *S. aureus* species. The bromo in the *para* position, apparently impaired the antimicrobial activity. The evaluation of the antioxidant activity presented positive results for the four chalcones. The chalcone without substituent presented antioxidant activity, which can be overcome, in certain concentrations, replacing bromine in the *ortho* position. However, the substitution of bromo in the *meta* positions and for apparently decreases the antioxidant activity. To complement, a conformational study of the compounds was carried out using theoretical calculations, which were developed with the theory level HF / 6-31G for the *scan* calculations, M06-2X / 6311 ++ G (2d, 2p) for the optimizations and frequencies, determining the energies and geometries, and also M06-2X / 6-311 ++ G (2d, 2p) for the NBO calculations, determining the hyperconjugative effects of the compounds. The program package used was GAUSSIAN 09. The programs PyMOL and GaussView 5 are used for the visualization of structures and surfaces. At the end of these calculations, it was possible to confirm that the conformation of greater stability for all the studied compounds presented the carbonyl and the vinyl double bond arranged in *s-cis* manner. As the hyperconjugative effect was responsible for the largest population of *s-cis* versus *s-trans*.

**Keywords:** chalcone; conformational analysis; theoretical calculations; NMR spectroscopy; antibacterial activity; antimicrobial activity

## Lista de Figuras

|                                                                                                                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 – Principais rotas de biossíntese dos metabólitos secundários e suas inter-relações com o metabolismo primário .....                                                                                             | 21 |
| Figura 2 – Apresentação das duas rotas básicas na síntese dos compostos fenólicos .....                                                                                                                                   | 22 |
| Figura 3 – Esquema da biossíntese de compostos fenólicos a partir da fenilalanina .....                                                                                                                                   | 24 |
| Figura 4 – Estrutura básica dos flavonoides .....                                                                                                                                                                         | 25 |
| Figura 5 – Classificação dos flavonoides .....                                                                                                                                                                            | 26 |
| Figura 6 – Estrutura molecular de uma chalcona não substituída .....                                                                                                                                                      | 27 |
| Figura 7 – Equilíbrio conformacional s-cis e s-trans de chalconas .....                                                                                                                                                   | 28 |
| Figura 8 – Reação geral de uma condensação de Claisen-Schmidt, para formação de uma chalcona (1,3-difenil-2-propeno-1ona) .....                                                                                           | 29 |
| Figura 9 – Mecanismo antioxidante para chalconas fenólicas dissustituídas (orto e para). orto-substituído (a), orto-semiquinona (b), orto-quinona (c), para substituído (d), para-semiquinona (e), para-quinona (f) ..... | 33 |
| Figura 10 – Radical <i>DPPH</i> • e <i>DPPH</i> -H .....                                                                                                                                                                  | 34 |
| Figura 11 – Estrutura das Retrochalconas isoladas. 1. Licochalcona A, 2. Licochalcona B, 3 licochalcona C, 4. Licochalcona D .....                                                                                        | 36 |
| Figura 12 – Regiões características de deslocamento químico .....                                                                                                                                                         | 42 |
| Figura 13 – Estruturas dos compostos: CHAL (a), <i>o</i> -CHALBr (b), <i>m</i> -CHALBr (c) e <i>p</i> -CHALBr (d) .....                                                                                                   | 44 |
| Figura 14 – Ângulos diedros girados das Chalconas .....                                                                                                                                                                   | 48 |
| Figura 15 – Reação de Claisen-Schmidt, mecanismo geral para obtenção das chalconas: CHAL, <i>o</i> -CHALBr, <i>m</i> -CHALBr e <i>p</i> -CHALBr .....                                                                     | 52 |
| Figura 16 – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da CHAL .....                                                                                                                                                               | 54 |
| Figura 17 – Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup> H da CHAL, deslocamentos químicos e constantes de acoplamentos dos hidrogênios vinílicos .....                                                                    | 54 |
| Figura 18 – Expansão do espectro de RMN de <sup>13</sup> C da CHAL .....                                                                                                                                                  | 55 |
| Figura 19 – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da <i>o</i> -CHALBr .....                                                                                                                                                   | 56 |
| Figura 20 – Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup> H da <i>o</i> -CHALBr, deslocamento químico e constantes de acoplamentos dos hidrogênios vinílicos .....                                                          | 57 |

|                                                                                                                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 21 – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da <i>o</i> -CHALBr .....                                                                                                                                                 | 58 |
| Figura 22 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da <i>m</i> -CHALBr .....                                                                                                                                                    | 59 |
| Figura 23 – Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da <i>m</i> -CHALBr, deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos hidrogênios vinílicos .....                                                          | 59 |
| Figura 24 – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da <i>m</i> -CHALBr .....                                                                                                                                                 | 60 |
| Figura 25 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da <i>p</i> -CHALBr .....                                                                                                                                                    | 61 |
| Figura 26 – Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da <i>p</i> -CHALBr, deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos hidrogênios vinílicos .....                                                          | 62 |
| Figura 27 – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da <i>p</i> -CHALBr .....                                                                                                                                                 | 62 |
| Figura 28 – Exemplo Superfície de energia potencial de um cálculo de scan aplicado para o ângulo diedros ( $\omega$ ). O gráfico foi gerado pelo programa Gaussian 09, utilizando o nível de teoria HF/6-31G .....       | 64 |
| Figura 29 – Confôrmeros de menor energia obtidos para a CHAL, usando o nível de teoria M06-2X/6-311++G (2d, 2p). Os ângulos diedros estão destacados em verde. Imagens obtidas através do programa PyMOL .....           | 66 |
| Figura 30 – Confôrmeros de menor energia obtidos para <i>o</i> -CHALBr, usando o nível de teoria M06-2X/6-311++G (2d, 2p). Os ângulos diedros estão destacados em verde. Imagens obtidas através do programa PyMOL ..... | 69 |
| Figura 31 – Confôrmero <i>o</i> -CHALBr3. A distância entre os átomos de Oxigênio e Bromo (3,12 Å) está destacada em verde. Imagem obtidas através do programa PyMOL .....                                               | 71 |
| Figura 32 – Estrutura base de uma chalcona, mostrando suas três partes planas .....                                                                                                                                      | 71 |
| Figura 33 – Mapa de potencial eletrostático da <i>o</i> -CHALBr 3, gerado a partir da estrutura otimizada com o nível de teoria M06-2X/6-311++G (2d, 2p). Imagem obtida através do programa PYMOL .....                  | 74 |
| Figura 34 – Superfícies de interação não covalente dos confôrmeros da <i>o</i> -CHALBr substituídos, nível de teoria M06-2X/6-311++G (2d, 2p). Imagens obtidas através do programa PyMOL .....                           | 75 |
| Figura 35 – Confôrmeros de menor energia obtidos para <i>m</i> -CHALBr, usando o nível de teoria M06-2X/6-311++G (2d, 2p). Os ângulos diedros estão destacados em verde. Imagens obtidas através do programa PyMOL ..... | 76 |
| Figura 36 – Confôrmeros de menor energia obtidos para <i>p</i> -CHALBr, usando o nível de teoria M06-2X/6-311++G(2d, 2p). Os ângulos diedros estão destacados em verde. Imagens obtidas através do programa PyMOL .....  | 79 |

|                                                                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 37 – Atividade antioxidante utilizando concentração de 100 mmol.L <sup>-1</sup> das amostras .....                                                                                                    | 81 |
| Figura 38 – Atividade antioxidante utilizando concentração de 50 mmol.L <sup>-1</sup> das amostras .....                                                                                                     | 82 |
| Figura 39 – Atividade antioxidante utilizando concentração de 30 mmol.L <sup>-1</sup> das amostras .....                                                                                                     | 82 |
| Figura 40 – Atividade antioxidante utilizando concentração de 20 mmol.L <sup>-1</sup> .....                                                                                                                  | 83 |
| Figura 41 – Efeitos dos compostos sobre o crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> .....                                                                                                                  | 84 |
| Figura 42 – Efeitos dos compostos listados sobre o crescimento de <i>Bacillus subtilis</i> .....                                                                                                             | 85 |
| Figura 43 – Efeitos dos compostos listados sobre o crescimento de <i>Escherichia coli</i> .....                                                                                                              | 85 |
| Figura 44 – Placas de microtitulação contendo inóculos bacterianos incubados na presença de controles positivos e negativos para os inóculos de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> ..... | 87 |
| Figura 45 – Placas de microtitulação contendo inóculos bacterianos de <i>S. aureus</i> incubados na presença dos compostos DMSO, DMSO:PEG, Canamicina e CHAL .....                                           | 88 |

## Lista de Quadros

|                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Quadro 1 – Espécies reativas de oxigênio que podem ser eliminadas ou ter a formação inibida por flavonoides ..... | 31 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## Lista de Tabelas

|                                                                                                                                                                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 – Relação de reagentes utilizados .....                                                                                                                                                                                                            | 46 |
| Tabela 2 – Relação de reagentes utilizados nas sínteses, bem como a característica final dos produtos obtidos .....                                                                                                                                         | 46 |
| Tabela 3 – Rendimento das sínteses da CHAL, <i>o</i> -CHALBr, <i>m</i> -CHALBr e <i>p</i> -CHALBr .....                                                                                                                                                     | 53 |
| Tabela 4 – Resumo dos sinais $^{13}\text{C}$ RMN (100 Mz, $\text{CDCl}_3$ ) .....                                                                                                                                                                           | 63 |
| Tabela 5 – Confômeros de maior estabilidade para cada uma das chalconas, suas respectivas energias totais usando o nível de teoria M06-2X/6-311++G(2d, 2p) .....                                                                                            | 65 |
| Tabela 6 – Parâmetros de energia dos confômeros preferenciais da CHAL, calculados em fase isolada, usando o nível de teoria M06-2X/6-311++G(2d, 2p). São apresentadas também as populações calculadas para cada confômero no equilíbrio .....               | 66 |
| Tabela 7 – Ângulos diedros em graus dos confômeros preferenciais da CHAL, calculados em fase isolada, usando o nível de teoria M06-2X/6-311++G (2d, 2p) .....                                                                                               | 67 |
| Tabela 8 – Principais interações orbitais, efeito estérico e variação de energia por deleção. Cálculo de NBO, usando o nível de teoria M06-2X/6-311++G(2d,2p), para os confômeros preferenciais da CHAL .....                                               | 68 |
| Tabela 9 – Parâmetros de energia dos confômeros preferenciais da <i>o</i> -CHALBr, calculados em fase isolada, usando o nível de teoria M06-2X/6-311++G (2d, 2p). São apresentadas também as populações calculadas para cada confômero no equilíbrio .....  | 70 |
| Tabela 10 – Ângulos diedros em graus dos confômeros preferenciais da <i>o</i> -CHAL, calculados em fase isolada, usando o nível de teoria M06-2X/6-311++G (2d, 2p) .....                                                                                    | 70 |
| Tabela 11 – Principais interações orbitais, efeito estérico e variação de energia por deleção. Cálculo de NBO, usando o nível de teoria M06-2X/6-311++G (2d, 2p), para os confômeros preferenciais da <i>o</i> -CHAL .....                                  | 73 |
| Tabela 12 – Parâmetros de energia dos confômeros preferenciais da <i>m</i> -CHALBr, calculados em fase isolada, usando o nível de teoria M06-2X/6-311++G (2d, 2p). São apresentadas também as populações calculadas para cada confômero no equilíbrio ..... | 76 |
| Tabela 13 – Ângulos diedros em graus dos confômeros preferenciais da <i>m</i> -CHALBr, calculados em fase isolada, usando o nível de teoria M06-2X/6-311++G (2d, 2p) .....                                                                                  | 77 |

|                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 14 – Principais interações orbitais, efeito estérico e variação de energia por deleção. Cálculo de NBO, usando o nível de teoria M06-2X/6-311++G (2d 2p), para os conformeros preferenciais da m-CHALBr .....                                 | 77 |
| Tabela 15 – Parâmetros de energia dos conformeros preferenciais da p-CHALBr, calculados em fase isolada, usando o nível de teoria M06-2X/6-311++G(2d, 2p). São apresentadas também as populações calculadas para cada conformero no equilíbrio ..... | 79 |
| Tabela 16 – Ângulos diedros em graus dos conformeros preferenciais da p-CHALBr, calculados em fase isolada, usando o nível de teoria M06-2X/6-311++G(2d, 2p) .....                                                                                   | 79 |
| Tabela 17 – Principais interações orbitais, efeito estérico e variação de energia por deleção. Cálculo de NBO, usando o nível de teoria M06-2X/6-311++G(2d, 2p), para os conformeros preferenciais da p-CHALBr .....                                 | 80 |



## Lista de Abreviaturas e siglas

|                  |                                                                                                                         |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CHAL             | 1-Fenil-2-propen-3-fenil-1ona                                                                                           |
| <i>o</i> -CHALBr | 1-(2-Bromofenil)-2-propen-3-fenil-1-ona                                                                                 |
| <i>m</i> -CHALBr | 1-(3-Bromofenil)-2-propen-3-fenil-1-ona                                                                                 |
| <i>p</i> -CHALBr | 1-(4-Bromofenil)-2-propen-3-fenil-1-ona                                                                                 |
| IV               | Infravermelho                                                                                                           |
| RMN              | Ressonância magnética nuclear                                                                                           |
| DEPT             | Aumento sem distorção por transferência de polarização, do inglês “distortionless enhancement by polarization transfer” |
| $CDCl_3$         | Clorofórmio deuterado                                                                                                   |
| DPPH             | 2,2-difenil-1-picrilhidrazila, do inglês “2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl”                                                |
| DMSO             | Dimetilsulfóxido                                                                                                        |
| pH               | Potencial hidrogeniônico                                                                                                |
| C-LABMU          | Complexo de Laboratórios Multiusuários                                                                                  |
| UEPG             | Universidade Estadual de Ponta Grossa                                                                                   |

## Lista de Símbolos

|                 |                          |
|-----------------|--------------------------|
| $\alpha$        | Alfa                     |
| $\beta$         | Beta                     |
| $\gamma$        | Gama                     |
| $\pi$           | Pi                       |
| $\pi^*$         | Pi antiligante           |
| $\theta$        | Teta                     |
| $\tau$          | Tau                      |
| $\omega$        | Ômega                    |
| $\sigma$        | Sigma                    |
| $\delta$        | Deslocamento químico     |
| $J$             | Constante de acoplamento |
| $\Delta$        | Delta                    |
| $\text{\AA}$    | Angstrom                 |
| $^1\text{H}$    | Hidrogênio 1             |
| $^{13}\text{C}$ | Carbono 13               |
| $^{19}\text{F}$ | Flúor 1                  |
| $^{31}\text{P}$ | Fósforo                  |
| D               | Dupleto                  |
| M               | Multiplete               |
| S               | Simpleto                 |

## Sumário

|           |                                                                                                                              |           |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1.</b> | <b>INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                                      | <b>19</b> |
| <b>2.</b> | <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>                                                                                           | <b>21</b> |
| 2.1.      | METABÓLICOS SECUNDÁRIOS DO REINO VEGETAL.....                                                                                | 21        |
| 2.2.      | CLASSE DOS FLAVONOIDES.....                                                                                                  | 24        |
| 2.3.      | CHALCONAS .....                                                                                                              | 26        |
| 2.4.      | SÍNTESE DE CHALCONAS.....                                                                                                    | 28        |
| 2.5.      | ATIVIDADE BIOLÓGICA .....                                                                                                    | 29        |
| 2.5.1.    | Atividade antioxidante .....                                                                                                 | 30        |
| 2.5.2.    | Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método do DPPH.....                                                              | 33        |
| 2.5.3.    | Determinação da Atividade Antimicrobiana .....                                                                               | 34        |
| 2.5.4.    | Determinação da Atividade Antimicrobiana pelo Método <i>Kirby-Bauer</i> .....                                                | 38        |
| 2.6.      | ANÁLISE CONFORMACIONAL.....                                                                                                  | 39        |
| 2.6.1.    | Análise Conformacional através de Cálculos teóricos .....                                                                    | 40        |
| 2.7.      | RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....                                                                                           | 42        |
| <b>3.</b> | <b>OBJETIVOS.....</b>                                                                                                        | <b>45</b> |
| 3.1.      | OBJETIVOS GERAIS.....                                                                                                        | 45        |
| 3.2.      | OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                                                                                                  | 45        |
| <b>4.</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                                                                                              | <b>47</b> |
| 4.1.      | SÍNTESE DOS COMPOSTOS .....                                                                                                  | 47        |
| 4.2.      | CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS POR ESPECTROSCOPIA DE<br>RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....                                     | 48        |
| 4.3.      | CÁLCULOS TEÓRICOS.....                                                                                                       | 48        |
| 4.4.      | ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO DPPH .....                                                                             | 49        |
| 4.5.      | ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM<br>DISCO .....                                                            | 50        |
| <b>5.</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                                                                           | <b>52</b> |
| 5.1.      | SÍNTESES DAS CHALCONAS: CHAL, <i>o</i> -CHALBr, <i>m</i> -CHALBr E<br><i>p</i> -CHALBr .....                                 | 52        |
| 5.2.      | PURIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS.....                                                                                               | 53        |
| 5.3.      | CARACTERIZAÇÃO DAS CHALCONAS POR ESPECTROSCOPIA DE<br>RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE <sup>1</sup> H E <sup>13</sup> C..... | 54        |
| 5.3.1.    | CHAL.....                                                                                                                    | 54        |
| 5.3.2.    | <i>o</i> -CHALBr .....                                                                                                       | 57        |
| 5.3.3.    | <i>m</i> -CHALBr .....                                                                                                       | 59        |
| 5.3.4.    | <i>p</i> -CHALBr .....                                                                                                       | 62        |
| 5.4.      | EQUILÍBRIO CONFORMACIONAL POR CÁLCULOS TEÓRICOS .....                                                                        | 65        |
| 5.4.1.    | CHAL.....                                                                                                                    | 67        |
| 5.4.2.    | <i>o</i> -CHALBr .....                                                                                                       | 70        |
| 5.4.2.1.  | Análise de superfície de NCI <i>o</i> -CHALBr .....                                                                          | 76        |
| 5.4.3.    | <i>m</i> -CHALBr .....                                                                                                       | 77        |
| 5.4.3.1.  | <i>p</i> -CHALBr .....                                                                                                       | 80        |
| 5.5.      | ANÁLISE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE MÉTODO DPPH.....                                                                              | 82        |
| 5.6.      | ANÁLISE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA MÉTODO <i>KIRBY-BAUER</i> .....                                                             | 85        |
| 5.6.1.    | Método <i>Kirby-Bauer</i> : disco-difusão .....                                                                              | 85        |

|                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.6.2. Análise inibitória contra a bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> ..... | 85 |
| 5.6.3. Análise inibitória contra a bactéria <i>Bacillus subtilis</i> .....     | 86 |
| 5.6.4. Análise inibitória contra a bactéria <i>Escherichia coli</i> .....      | 87 |
| 5.7. ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA .....                           | 88 |

|                           |           |
|---------------------------|-----------|
| <b>6. CONCLUSÕES.....</b> | <b>89</b> |
|---------------------------|-----------|

|                         |           |
|-------------------------|-----------|
| <b>REFERÊNCIAS.....</b> | <b>90</b> |
|-------------------------|-----------|

|                       |           |
|-----------------------|-----------|
| <b>APÊNDICE .....</b> | <b>96</b> |
|-----------------------|-----------|

|                                                                                                                               |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| APÊNDICE A – ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ A 400MHZ DA CHAL EM $\text{CDCl}_3$ .....                                        | 96  |
| APÊNDICE B – ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ 100MHZ DA CHAL EM $\text{CDCl}_3$ .....                                       | 98  |
| APÊNDICE C – ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ A 400MHZ DA <i>o</i> -CHALBr EM $\text{CDCl}_3$                                  | 99  |
| APÊNDICE D – ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ A 100MHZ DA <i>o</i> -CHALBr EM<br>$\text{CDCl}_3$ .....                      | 101 |
| APÊNDICE E – ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ , DEPT-90, DEPT-135 A 100MHZ DA <i>o</i> -<br>CHALBr EM $\text{CDCl}_3$ ..... | 103 |
| APÊNDICE F – ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ A 400MHZ DA <i>m</i> -CHALBr EM<br>$\text{CDCl}_3$ .....                         | 104 |
| APÊNDICE G – ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ A 100MHZ DA <i>m</i> -CHALBr EM<br>$\text{CDCl}_3$ .....                      | 106 |
| APÊNDICE H – ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ , DEPT-90, DEPT-135 A 100MHZ DA <i>m</i> -<br>CHALBr EM $\text{CDCl}_3$ ..... | 107 |
| APÊNDICE I – ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ A 400MHZ DA <i>p</i> -CHALBr EM<br>$\text{CDCl}_3$ .....                         | 108 |
| APÊNDICE J – ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ A 100MHZ DA <i>p</i> -CHALBr EM<br>$\text{CDCl}_3$ .....                      | 110 |
| APÊNDICE K – ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ , DEPT-90, DEPT-135 A 100MHZ DA <i>p</i> -<br>CHALBr EM $\text{CDCl}_3$ ..... | 111 |

## 1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais obtidos a partir de plantas são grandes aliados no desenvolvimento de novos fármacos, o seu estudo sempre foi de grande valia, pois quando os fármacos não são produzidos a partir destes produtos obtidos através de plantas, estes servem de inspiração para produção de substâncias sintéticas (BARREIRO, 2009).

Na química dos compostos naturais, existem diversos produtos de origem vegetal sendo estudados constantemente, dentre estes produtos há uma grande classe que é formada por diversos compostos, os quais são produzidos por vegetais e que não atuam diretamente em seu crescimento, conhecidos como metabólitos secundários. Esses metabólitos, mesmo não participando diretamente do crescimento e desenvolvimento dos vegetais, atuam na proteção contra agentes externos, impedindo assim que prejudiquem seu crescimento (TAIZ, ZEIGER, 2013).

As chalconas, produzidas em vegetais, pertencem a esta classe de metabólitos secundários, mais precisamente ao grupo dos flavonoides e são conhecidas como flavonoides de cadeia aberta, devido a sua estrutura. Possuem uma grande variabilidade de compostos, devido à possibilidade de modificação estrutural, com a inserção de substituintes em seus anéis aromáticos. Esta modificação estrutural interfere diretamente nas suas propriedades farmacológicas (CESARIN, FERREIRA, DRAZ, 2011; JURCSAK, ZAMINI, 1999).

Dentre as propriedades farmacológicas das chalconas, podemos citar: antioxidante, antialérgica, anti-inflamatória, anticarcinogênica, antiulcerogênica, vasodilatadora, antiespasmódica, antiplaquetária, antimicrobiana e antiviral (CHLUPACOVA, OPLRTALOVA 2004). As chalconas têm sido objeto de estudo como potenciais fármacos desde 1940 (AMBEKAR *et al.*, 1961).

São encontradas na natureza, mas também são obtidas por síntese orgânica. Buscando fundamentalmente obter compostos com potencial atividade biológica, houve o interesse em sintetizar as chalconas: 1-fenil-2-propen-3-fenil-1ona (CHAL); 1-(2-bromofenil)-2-propen-3-fenil-1-ona (*o*-CHALBr); 1-(3-bromofenil)-2-propen-3-fenil-1-ona (*m*-CHALBr); e 1-(4-bromofenil)-2-propen-3-fenil-1-ona (*p*-CHALBr). O presente trabalho dá continuidade a um estudo sobre a atividade antioxidante da *o*-CHALBr, realizado na dissertação: Síntese, caracterização, análise conformacional e atividade antioxidante de análogos de chalconas bromadas e hidroxiladas (SENS, 2014). Bem como tem o objetivo de analisar o efeito da

mudança de posição do bromo nas diferentes posições do anel, fazendo-se assim um estudo das chalconas *m*-CHALBr e *p*-CHALBr e compara-las a chalcona sem substituinte, (CHAL). Esse trabalho também inclui um estudo conformacional e avaliação da atividade antimicrobiana dessas quatro chalconas.

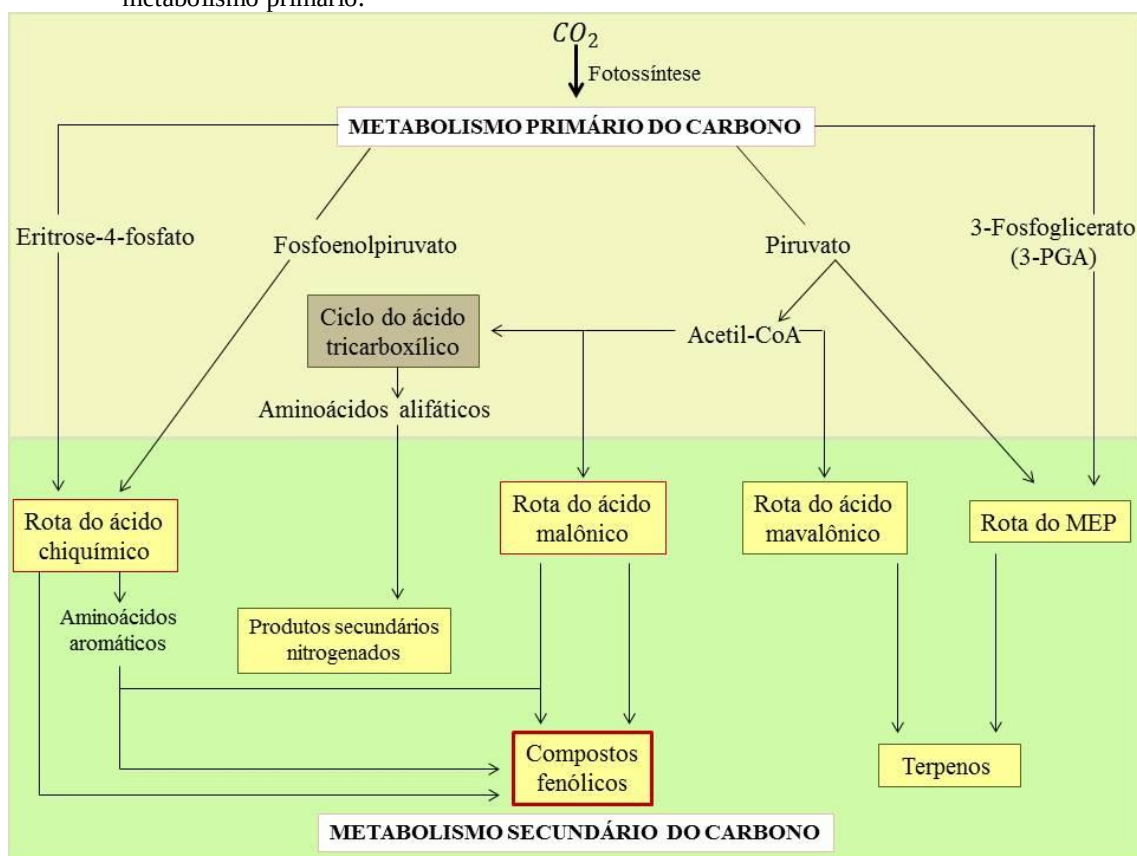
## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DO REINO VEGETAL

Os metabólitos secundários são uma grande classe de compostos orgânicos, os quais são produzidos nos vegetais e não apresentam função direta em seu crescimento e desenvolvimento, por isso são chamados de compostos secundários ou metabólitos secundários (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Estes metabólitos são divididos em três grandes grupos: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (TAIZ; ZEIGER, 2013) (Figura 1).

Figura 1 – Principais rotas de biossíntese dos metabólitos secundários e suas inter-relações com o metabolismo primário.



Fonte:

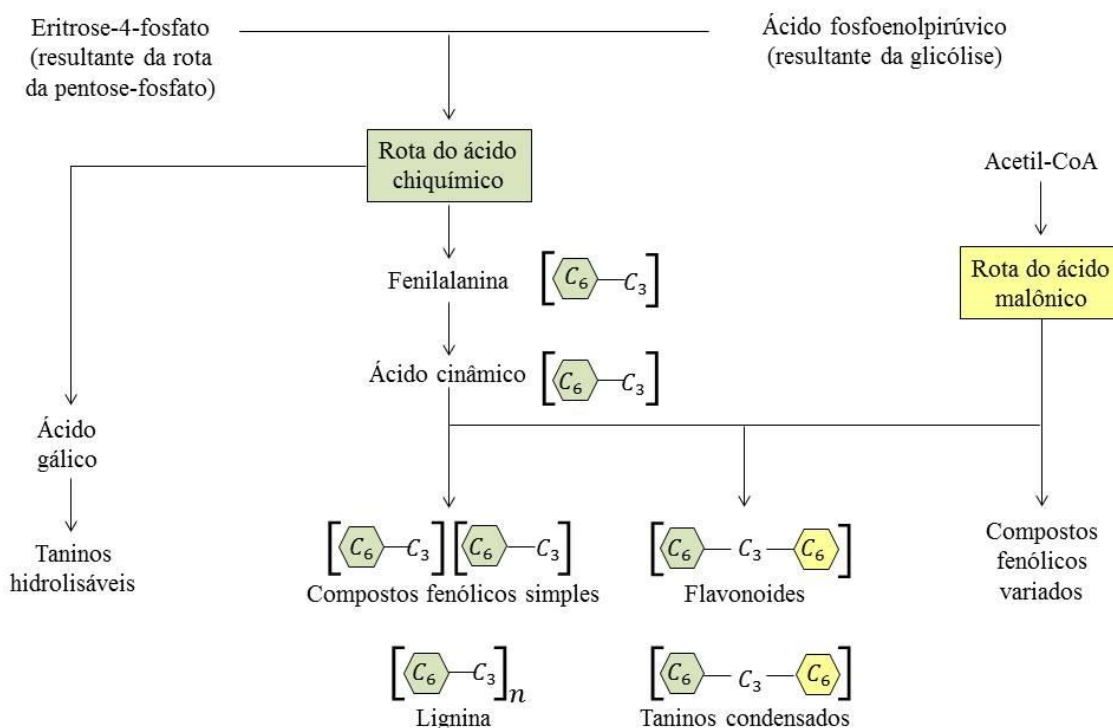
Adaptada de TAIZ; ZEIGER, 2013.

Os terpenos são sintetizados a partir da acetil-CoA, através da rota do ácido mevalônico ou do metileritritol fosfato (MEP); os compostos fenólicos a partir do ácido chiquímico e do ácido malônico; e os compostos nitrogenados a partir de aminoácidos (TAIZ; ZEIGER, 2013) (Figura 1).

Dentre os metabólitos secundários produzidos a partir de plantas, neste trabalho relata-se um estudo de algumas substâncias que fazem parte do grupo dos compostos fenólicos. Trata-

se de um grupo heterogêneo, pois as plantas produzem aproximadamente dez mil compostos secundários que contêm um grupo fenólico. Esses compostos são sintetizados por diferentes rotas e por isso constituem um grupo quimicamente tão heterogêneo (Figura 2) (TAIZ; ZEIGER, 2013; STANTON, 2008).

Figura 2 – Apresentação das duas rotas básicas na síntese dos compostos fenólicos.



Fonte:

Adaptada de TAIZ; ZEIGER, 2013.

Das duas principais rotas de síntese, a que produz um maior número de compostos é a rota do ácido chiquímico. Sendo assim, os compostos fenólicos mais abundantes em plantas derivam de um aminoácido conhecido como fenilalanina, que é um dos intermediários nessa biossíntese (Figura 3). A biossíntese ocorre pela eliminação de uma molécula de amônia da fenilalanina, formando o ácido cinâmico, essa reação é catalisada pela enzima fenilalanina amônia liase (FAL), à atividade enzimática da FAL é diretamente proporcional à síntese dos compostos fenólicos, pois a atividade enzimática aumenta quando ocorrem variações em fatores ambientais, como por exemplo: sazonalidade, índice pluviométrico, nível de radiação ultravioleta, aumento de poluentes atmosféricos, invasão por fungos ou um baixo nível de nutrientes, faz com que a produção de compostos fenólicos aumente (TAIZ; ZEIGER, 2013). Estudos realizados por Harborne (1980) mostram que a atividade da enzima FAL, também está ligada com a idade da planta, sendo mais ativa em folhas velhas ou totalmente expandidas, já que a maioria das folhas adultas tem maiores teores de compostos fenólicos necessários para fotoproteção, e também proteção contra patógenos e herbívoros. Através da correlação entre

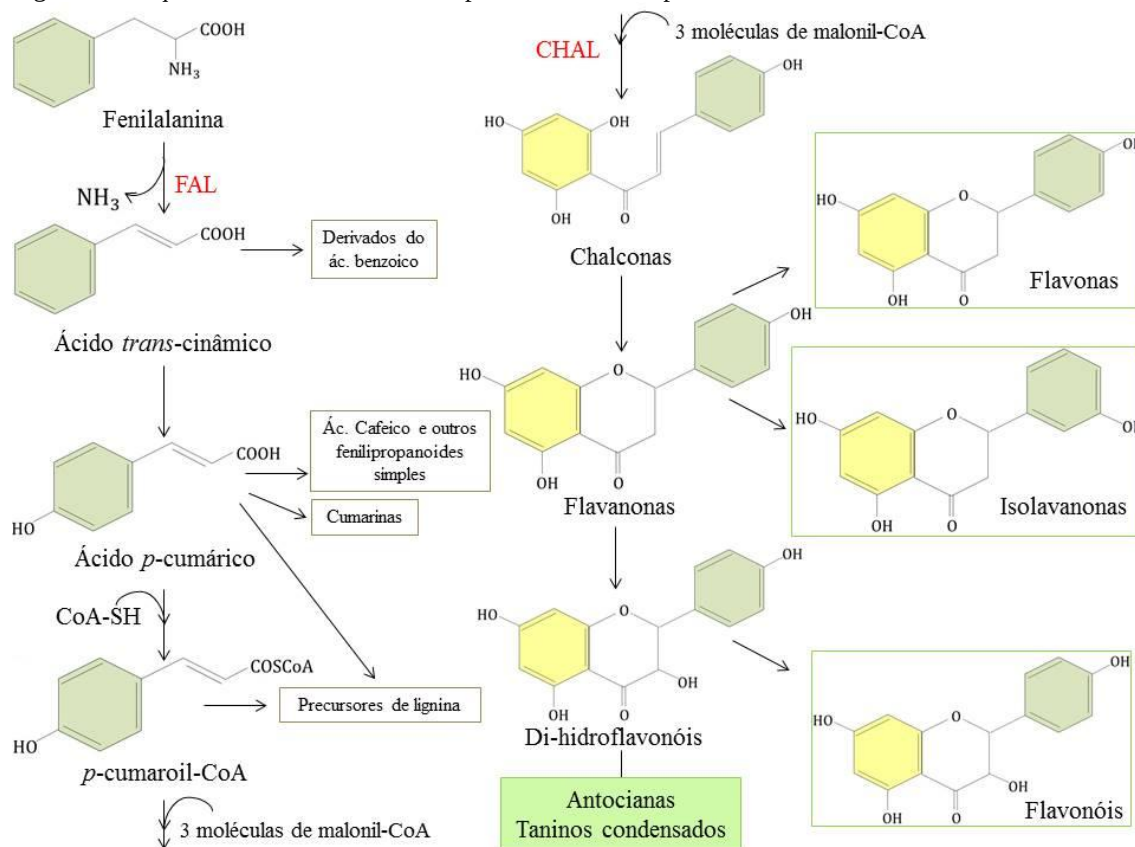


fatores ambientais e a produção dos metabólitos secundários nesta biossíntese, pode-se perceber a importância desses metabólitos que mesmo não possuindo função direta com o crescimento das plantas, possuem funções de suma importância, sem as quais não seria possível seu desenvolvimento. Dentre essas funções podemos citar, a proteção contra a incidência de raios ultravioletas e visível, proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias. Atuando também como antioxidantes, no controle hormonal das plantas e na atração de animais com a finalidade da polinização (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Após a desaminação da fenilalanina e a formação do ácido *trans*-cinâmico, as vias subsequentes envolvem reações de hidroxilação, que quando ocorrem na posição *para* fornecem o ácido *p*-cumárico, dependendo da série de hidroxilações e metilações nessa etapa ocorre à a formação de ácido cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico e outros fenilpropanoides simples.

O ácido *p*-cumárico é o precursor de derivados hidroxilados, como a umbeliferona, mas neste estudo sua rota biosintética de interesse ocorre através da sua esterificação, formando seu tioéster (4-cumaroil), que juntamente com a coenzima A (CoA) formam *p*-cumaroil-CoA, que além de precursores de lignina, são responsáveis pela biossíntese das chalconas, através da condensação com três moléculas de malonil-CoA. Esta reação de formação das chalconas ocorre a partir da enzima chalcona sintase (CHS) tão importante quanto a FAL, pois é necessária para que ocorra a formação de importantes flavonoides, como isoflavonóides, flavonóis, antocianinas e taninos condensados. As chalconas então sofrem isomerização para formação das flavanonas, que através da hidroxilação produzem os flavonóis (Figura 3). Sendo assim, pode-se concluir que as chalconas pertencem à classe dos flavonoides, sendo consideradas flavonoides de cadeia aberta devido a sua estrutura, e são intermediárias na biossíntese de todos os outros compostos que pertencem a classe de flavonoides (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Figura 3 – Esquema da biossíntese de compostos fenólicos a partir da fenilalanina



Fonte: Adaptada de TAIZ; ZEIGER, 2013.

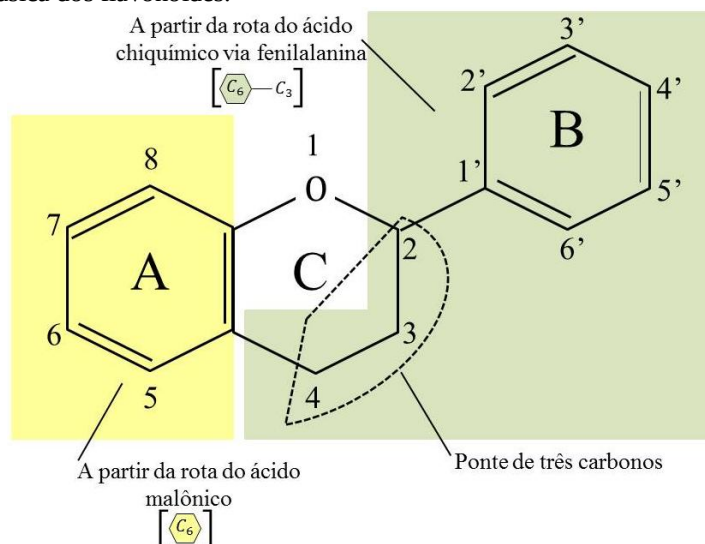
## 2.2 CLASSE DOS FLAVONOIDES

Dentre as diversas classes de compostos fenólicos, os flavonoides são a mais expressiva, por consistir na maior das classes, com compostos que possuem diversidade estrutural. O nome deriva do latim, onde “*flavus*” quer dizer amarelo, sendo esse o seu principal pigmento, mesmo a flavona apresentando-se incolor e alguns flavonoides possuindo uma leve variação de cor (LOPES et al., 2000).

Estes numerosos compostos fenólicos estão largamente distribuídos na natureza, mais especificamente no reino vegetal, e têm sido objeto de inúmeros estudos devido à variabilidade e importância de suas propriedades farmacológicas que os fazem atuar sobre os sistemas biológicos (SOARES, 2002; TAIZ; ZEIGER, 2013).

São sintetizados a partir de produtos das rotas do ácido chiquímico e do ácido malônico. Contem quinze carbonos (C6-C3-C6), organizados em dois anéis aromáticos, conectados por um anel heterocíclico. Os carbonos são numerados como descrito na Figura 4, que mostra a estrutura de um flavonoide resultante de duas rotas biossintéticas (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Figura 4 – Estrutura básica dos flavonoides.

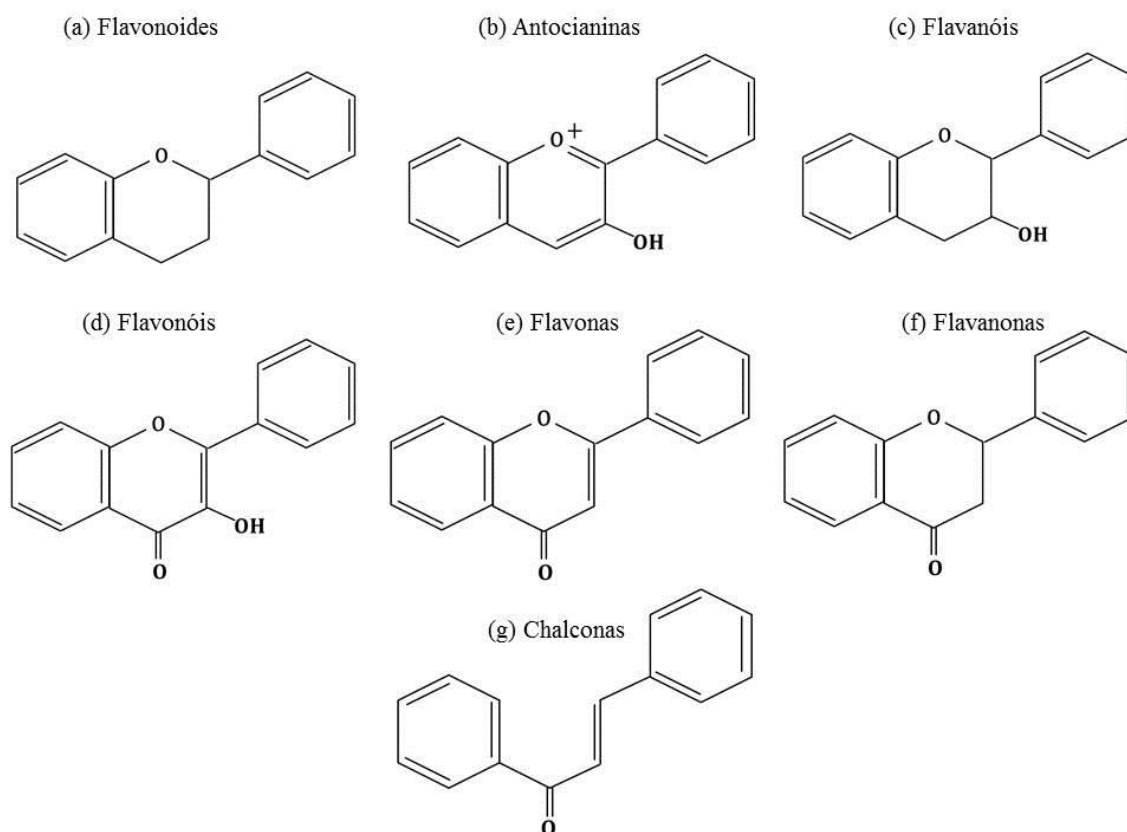


Fonte: Adaptada de TAIZ, ZEIGER, 2013.

Dentre as propriedades farmacológicas dos flavonoides, é importante citar os efeitos antioxidantes que se trata da área em que se concentra a maior quantidade de estudos, antialérgica, anti-flamatoria, anticarcinogênica, antiulcerogênica, vasodilatadora, antiespasmódica, antiplaquetária e também as ações antimicrobiana, e antiviral. Tendo em vista todas essas propriedades farmacológicas e levando em consideração que a síntese desses compostos não ocorre na espécie humana, cabe ao homem ingeri-los através de uma dieta balanceada, rica em frutas, verduras, sementes, azeite, chás, mel, vinho tinto, dentre outros (LOPES et al., 2000; FLÓREZ et al., 2002; CLIMENT et al., 2004; REBELLO, 2005; VOLP; RENHE; STRINGUETA, 2008.).

Os flavonoides, devido a se tratar de uma classe de compostos com diversidade estrutural e grande número de componentes, se subdivide em sete classes (Figura 5). Dentre as quais, uma das subdivisões é a classe das chalconas, objeto de estudo do presente trabalho.

Figura 5 – Classificação dos flavonoides.



Fonte: Adaptada de MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000.

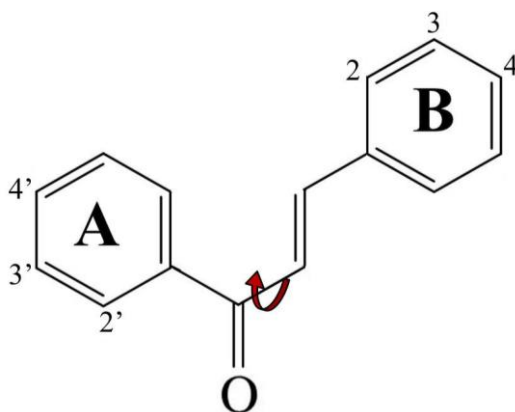
### 2.3 CHALCONAS

Normalmente as chalconas são bem abundantes em plantas, e na grande maioria das vezes em que estão presentes nos vegetais, é comum também a presença de flavanonas, isso se deve ao fato das chalconas serem convertidas em flavanonas em uma reação estereoespecífica catalisada pela enzima chalcona isomerase (Figura 3), por existir esta estreita relação estrutural e biogenética entre elas, não se costuma encontrar somente um desses compostos isolados (SHAIK; VIDYA; AFZAL, 2015).

As chalconas, biologicamente classificadas como uma classe de compostos pertencentes à família das fitoalexinas, que são compostos químicos de baixo peso molecular com propriedades antimicrobianas produzidas pelas plantas, (OSÓRIO *et al.*, 2012) quimicamente, são classificadas como flavonoides de cadeia aberta, por não possuírem o anel pirânico C (Figura 4). Dessa forma são definidas como cetonas aromáticas  $\alpha,\beta$ -insaturadas, constituídas por dois anéis aromáticos conectados por três carbonos com um sistema  $\alpha,\beta$ -insaturado (Figura 6) (ÁVILA *et al.*, 2008).

São compostos que além de produzidos por plantas, também são obtidos em laboratório, através de síntese orgânica, tema que é muito relatado na literatura, os registros mostram que primeiro as chalconas foram sintetizadas em laboratório, aproximadamente no final dos anos 1800, para que só muito tempo depois pudesse ser feito o isolamento a partir dos compostos naturais em 1910 (SHIMOKORIYAMA, 1962).

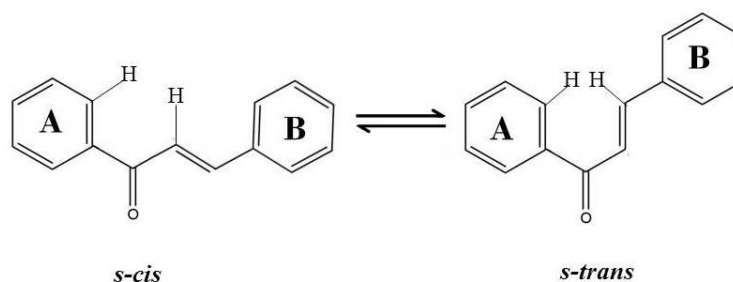
Figura 6 – Estrutura molecular de uma chalcona não substituída.



Fonte: A autora.

Ao observar a estrutura molecular da chalcona, dois confôrmeros devem ser considerados, no que se diz respeito a rotação da ligação sigma, que se localiza entre o carbono carbonílico e a insaturação que liga os dois anéis aromáticos (Figura 6), a rotação desta ligação, permite a conformação: *s-cis* e *s-trans* (Figura 7). Os compostos que possuem a ligação  $\alpha, \beta$ -insaturada tem o confôrmero *s-trans* considerado como de maior estabilidade, nas chalconas o produto majoritário isolado é o confôrmero *s-trans*, que em diversos estudos foi considerado mais estável termodinamicamente, porém ao analisarmos esta conformação verificamos que pode existir um impedimento estérico entre os átomos de hidrogênio, fazendo com que o confôrmero não seja totalmente plano. Estudos investigaram a maior estabilidade da conformação *s-trans* em relação a *s-cis*, devido aos efeitos estéricos, entre a carbonila e o anel aromático adjacente (anel A, Figura 7) que fazem com que a configuração *s-cis* perca estabilidade (BUTTERWORTH; 1996). Em contrapartida a conformação *s-cis* apresentar um impedimento estérico entre a carbonila e o anel aromático B (Figura 7). Devido a estas considerações, faz-se necessário um estudo detalhado de uma análise conformacional quando ocorre à inserção de substituintes nos anéis aromáticos (HIJOVA, 2006; KOZLOWSKI, et al., 2007)

Figura 7 – Equilíbrio conformacional *s-cis* e *s-trans* de chalconas.



Fonte: Adaptada de KOZLOWSKI, et al., 2007.

As chalconas de origem vegetal são sempre substituídas, e possuem um fator de diversificação, quanto a natureza e posição dos substituintes, que podem estar presentes em ambos anéis aromáticos, das mais variadas formas. Os substituintes mais comuns encontrados nas chalconas de origem vegetal são hidroxilas, metoxilas, O-glicosilas, C-glicosilas e C-alquilas, distribuídos nas posições *orto*, *meta* e *para* (respectivamente nas posições 2, 3, ou 4) (KOZLOWSKI et al., 2007).

A natureza dos substituintes, como por exemplo a eletronegatividade, bem como sua posição, faz com que possa-se classificar as interações estruturais, os efeitos estéricos, os efeitos eletrônicos e identificar diferentes interações como efeitos estéricos e efeitos eletrônicos (ROZADA, 2015). Tanto a mudança do posicionamento quanto o tipo dos substituintes implica em alteração direta nas propriedades farmacológicas apresentadas pelas chalconas (KOZLOWSKI et al., 2007). Isto faz com que a modificação molecular de estruturas químicas, seja uma das ferramentas mais utilizadas pela indústria farmacêutica, para o estudo de compostos bioativos (CARVALHO et al., 2003).

A modificação molecular da estrutura química, aliada a avaliação das propriedades farmacológicas das chalconas, já foram objeto de estudo de muitas pesquisas, dentre estas propriedades podemos citar as antioxidante, antialérgica, anti-flamatoria, anticarcinogênica, antibacteriana, antimicrobiana e antiviral (DEVIA; PAPPANO; DEBATISTA 1998; HASSAN, 2011).

## 2.4 SÍNTESE DE CHALCONAS

As chalconas de origem natural têm um fato muito interessante de diversificação quanto à natureza das posições dos substituintes, que podem estar presentes em qualquer um dos dois anéis aromáticos. Vários substituintes podem ser observados, podendo ocupar as posições *orto*, *meta* ou *para* dos anéis. Através da síntese orgânica é possível produzir as chalconas com os

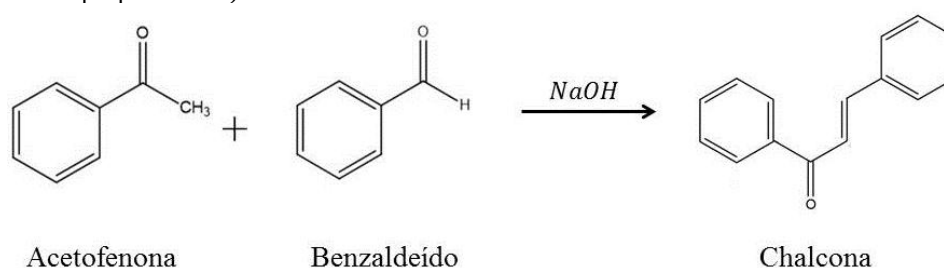
substituintes específicos de interesse de estudo, de forma simples e relativamente rápida. Podendo-se trabalhar com uma enorme variedade de substituintes.

A literatura descreve alguns métodos para a síntese das chalconas, como a reação de Suzuki, ou a utilização de irradiação ultra sônica, porém as reações de condensação de Claisen-Schmidt mostram-se a estratégia sintética mais utilizada, portanto será o método adotado nesse trabalho. O convencional para esse tipo de reação aldólica cruzada é a utilização de uma base catalítica, um período de reação que varia de 2 a 24 horas que irá depender dos substituintes nos anéis aromáticos, fornecendo um bom rendimento do produto (CLIMENT et al., 2004).

As condensações aldólica cruzadas são possíveis quando um componente não tem hidrogênio  $\alpha$  e, conseqüentemente é incapaz de formar um íon enolato e sofrer autocondensação (SOLOMONS; FRYHLE, 2012).

A reação realizada neste trabalho faz a utilização de uma cetona, (para cada síntese foram utilizados derivados de acetofenona), combinada com o benzaldeído, sob catálise básica utilizando hidróxido de sódio. Essa condensação aldólica cruzada, leva a formação da ligação  $C = C$ , da chalcona (cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada). A Figura 8 está representando a reação geral de formação de uma chalcona, neste caso, sem substituintes nos anéis A e B.

Figura 8 – Reação geral de uma condensação de Claisen-Schmidt, para formação de uma chalcona (1,3 difenil-2-propeno-1ona).



Fonte: A autora.

## 2.5 ATIVIDADE BIOLÓGICA

As chalconas, sejam sintetizadas ou isoladas da natureza, são constituídas por dois anéis aromáticos, como já citado anteriormente. Apresentam um sistema extenso de deslocalização eletrônica, pois estes anéis são conectados por de três carbonos com um sistema  $\alpha,\beta$ -insaturado. A deslocalização eletrônica confere ao sistema baixo potencial redox, tornando os compostos mais susceptíveis a reações de transferência de elétrons (PATIL; MAHAJAN; KATTI, 2009). Pode-se também substituir um ou mais átomos de hidrogênio presentes nos anéis aromáticos por qualquer outro grupo ou simplesmente, pode-se utilizar o mesmo substituinte em diferentes

posições nos anéis. Estas características fazem com que as chalconas exibam uma diversificada gama de atividades biológicas (NOWAKOWSKA, 2007). Devido a esses fatores, se tornam substâncias atraentes para a química medicinal.

As chalconas são alvo de vários estudos de isolamento, identificação e investigação de propriedades biológicas e farmacológicas. Como a análise de substâncias com propriedades farmacológicas é bastante demorada e na maioria das vezes difícil, uma vez obtido um composto biologicamente ativo, pode-se otimizar sua atividade fazendo uma modificação molecular (WERMUTH, 1996). As alterações estruturais dessas chalconas, aliadas aos estudos conformacionais e atividades biológicas podem aumentar o desenvolvimento de compostos com propriedades farmacológicas que atuam em sistemas biológicos de maneira eficiente e sem danos colaterais, que vão desde tonturas, indisposição e dores de cabeça, até danos cardiovasculares e acidentes vasculares cerebrais (DIMMOCK et al., 1998; DIMMOCK et al., 1999; DIMMOCK et al., 2002; DIMMOCK et al., 2003).

#### 2.5.1 Atividade antioxidante

Átomos ou moléculas que possuem elétrons emparelhados são estáveis, ou seja, como cada orbital pode ter no máximo dois elétrons com spins em direções opostas, é necessária a presença de elétrons emparelhados em sua órbita externa para que a molécula seja estabilizada. Os radicais livres se formam devido a possuírem um ou mais elétrons não emparelhados em seus últimos orbitais atômicos, portanto instáveis, de maneira geral isto ocorre pela perda ou ganho de elétrons (oxirredução). O metabolismo do oxigênio, durante a respiração e produção de energia mitocondrial, gera espécies reativas de oxigênio (EROS), o termo EROS corresponde a um diverso grupo de intermediários reativos formados no processo de redução incompleta do  $O_2$  nas mitocôndrias para formar a água, gerando espécies que apresentam alta reatividade para outras biomoléculas, principalmente lipídios, proteínas das membranas celulares, e o DNA, comprometendo suas funções, sendo associados a diversas doenças, que vão desde lesão inflamatória ao infarto do miocárdio e ao câncer, devido a estes comprometimentos, existe uma importante atenção aos estudos relacionados a compostos que possuem atividade antioxidante, com a finalidade de minimizar os danos causados aos organismos vivos (DROGE, 2002). O grande interesse sobre a atividade antioxidante é, devido à habilidade em sequestrar e reduzir a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RAMALHO; JORGE 2006).



Nem todos os compostos estudados, que possuem esse tipo de atividade biológica podem ser usados para o consumo humano, pois devem atender a alguns critérios tais como: eficácia em baixas concentrações; ausência de efeitos indesejáveis na cor, no odor, no sabor e em outras características; fácil aplicação; estabilidade nas condições de processo e armazenamento; além disso, o subproduto formado não pode ser tóxico e seus efeitos colaterais devem ser mínimos e menos prejudiciais possíveis (RAMALHO; JORGE, 2006).

A defesa fornecida pelos sistemas antioxidantes é crucial para a sobrevivência dos organismos, que mesmo em pequenas concentrações impedem a oxidação, porém existem compostos que possuem uma atividade extremamente baixa, devendo assim estar presente em grandes concentrações, desta forma irão contribuir significativamente para a atividade antioxidante total de um sistema (DROGE, 2002).

O  $\beta$ -caroteno e as vitaminas A, C e E, devido ao alto poder redutor, são compostos conhecidos e foram muito estudados quanto a avaliação da atividade antioxidante, pois proporcionam proteção contra a oxidação no meio aquoso celular (JAYAPRAKASHA; PATIL, 2007; KLIMCKAC et al., 2007; KRINSKY, 1998) e quanto à possível prevenção de câncer e doenças cardiovasculares (KRINSKY; PEACOCKE; RUSSELL, 1996; KRINSKY, 1998). Polifenóis em geral tem grande poder de neutralizar as moléculas de radicais livres, devido ao poder redutor do grupo hidroxila aromático que reduz radicais livres reativos, captando radicais de alcóxila ( $RO\bullet$ ), alquilperóxila ( $ROO\bullet$ ), superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroxila ( $HO\bullet$ ), óxido nítrico ( $NO\bullet$ ) e o oxidante peroxinitrito ( $ONOO^-$  /  $ONOOH$ ). (JAYAPRAKASHA; PATIL, 2007; KLIMCKAC et al., 2007).

Middleton e Kandaswami (1994) estudaram a atividade antioxidante dos flavonoides presentes nos vegetais. Os EROs que podem ser eliminados, ou a formação pode ser inibida pelos flavonoides são mostrados no quadro a seguir.

Quadro 1 – Espécies reativas de oxigênio que podem ser eliminadas, ou ter a formação inibida por flavonoides.

|          |                                                                                                                                                                                                                                          |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| $O_2^-$  | Produto da redução da molécula de $O_2$ , por um único elétron, sua geração ocorre principalmente na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial Produzido por fagócitos, formados em reações de auto oxidação e gerados por oxidases. |
| $HO_2^-$ | Forma protonada de $O_2^-$ .                                                                                                                                                                                                             |
| $H_2O_2$ | Produto de redução de dois elétrons de $O_2$ formado a partir de $O_2^-$ ( $HO_2^-$ ). Por dismutação ou diretamente de $O_2^-$ . Reatividade de $O_2^-$ e $H_2O_2$ é amplificado na presença de proteínas heme.                         |

(continua)

(continuação)

|                           |                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|---------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b><i>OH</i></b>          | Produto de redução de três elétrons de $O_2$ gerado pela reação de Fenton, reação de Haber-Weiss catalítica de metal de transição (ferro, cobre); também formado pela decomposição de peroxinitrito produzido pela reação de $O_2^-$ com $NO_2$ (radical de óxido nítrico) |
| <b><i>RO^\circ</i></b>    | Exemplo: radical lipídico ( $LO^\circ$ ).                                                                                                                                                                                                                                  |
| <b><i>ROO^\circ</i></b>   | Exemplo: radical peróxido lipídico ( $LOO^\circ$ ) produzido a partir de hidroperóxido orgânico (por exemplo, hidroperóxido lipídico, $LOOH$ ), $ROOH$ por abstração de hidrogênio.                                                                                        |
| <b><math>^1O_2</math></b> | Singlete de oxigênio.                                                                                                                                                                                                                                                      |

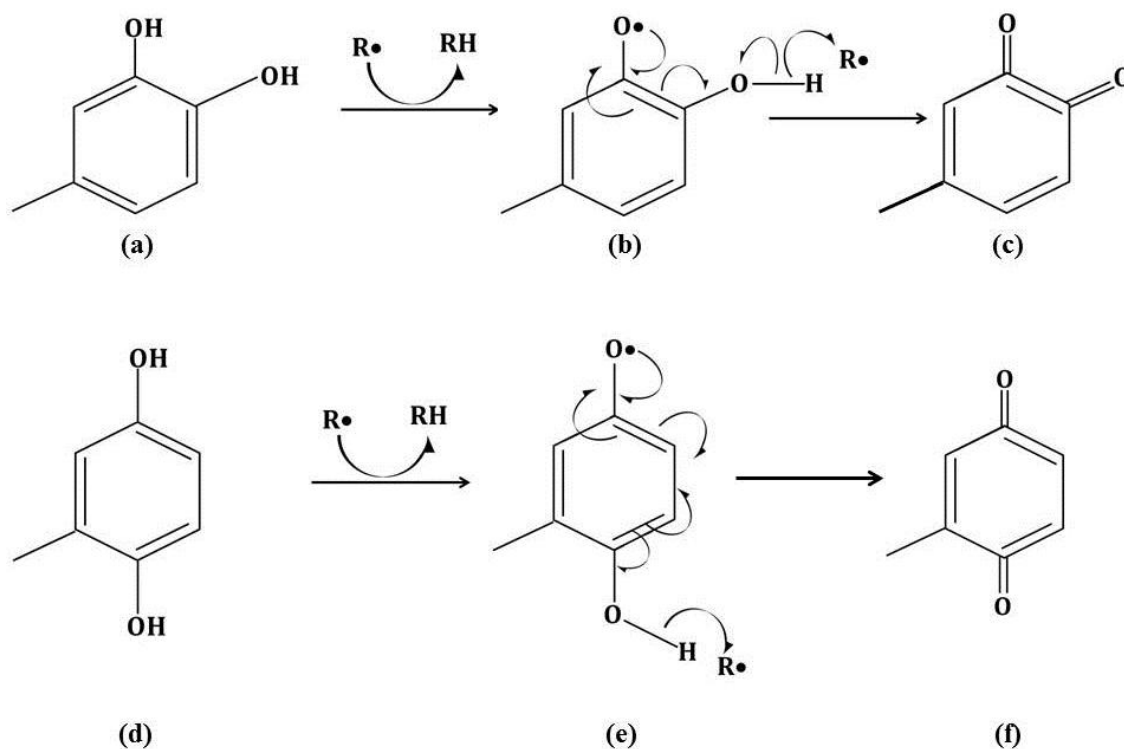
Fonte: Adaptada de Kandaswami, Middleton 1994.

O mecanismo de reação dos flavonoides como agentes antioxidantes consiste em deixar que o radical livre, capture um de seus átomos de hidrogênio ativo, estabilizando assim o novo composto formado. Este tipo de mecanismo é caracterizado como primário, dentro da subdivisão de agentes antioxidantes. Por sua vez o radical antioxidante formado a partir da perda de um hidrogênio, possui baixa reatividade, e é estabilizado por ressonância, e não inicia outras reações de propagação de radicais livres (KANDASWAMI; MIDDLETON, 1994).

A capacidade das chalconas atuarem como aceptores de EROs é objeto de estudo de diversos trabalhos, mas na grande maioria das vezes relacionam este efeito apenas a presença de grupamentos hidroxila em um ou nos dois anéis aromáticos. O efeito também é atribuindo a sua estrutura, que apresenta uma característica de suma importância quando se trata de agentes antioxidantes, ser capaz de doar elétrons sem perder a estabilidade, suportando a deslocalização em torno do sistema aromático, devido ao seu sistema conjugado estendido (CERQUEIRA, MEDEIROS, OHARA, 2007).

Patil e MAhajan (2009) descrevem o mecanismo antioxidante de chalconas fenólicas dissustituídas, onde o átomo de hidrogênio é removido por radicais livres e posteriormente são formadas espécies inativas (Figura 9).

Figura 9 – Mecanismo antioxidante para chalconas fenólicas dissustituídas (*orto* e *para*). *Orto* substituído (a), *orto*-semiquinona (b), *orto*-quinona (c), *para*-substituído (d), *para*-semiquinona (e), *para*-quinona (f).



Fonte: Adaptada de Pati, Mahajan, 2009.

Bons resultados relacionados a atividade antioxidante, foram relatados no trabalho de Sivakumar, Prabhakar e Doble (2011) que avaliaram algumas chalconas quanto a capacidade aceptora de radicais, para isto foi realizada a inserção de um grupo hidroxila (*OH*).

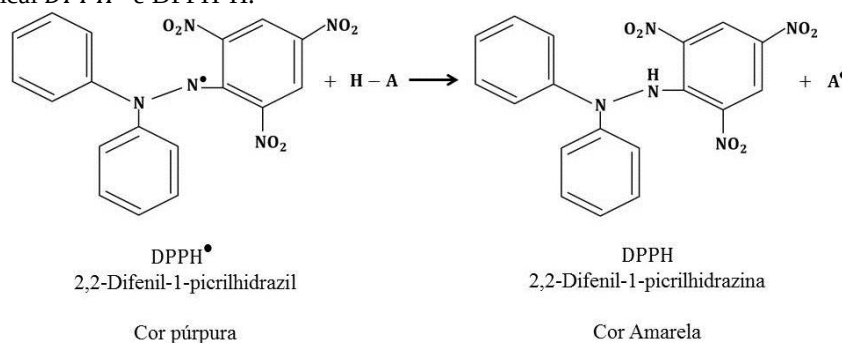
### 2.5.2 Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método do DPPH

Existem muitos métodos para determinar a atividade antioxidante de substancias, e alguns critérios devem ser analisados para que ocorra o melhor aproveitamento de metodologia para com o objeto de estudo, é importante realizar uma boa revisão bibliográfica, a fim de analisar moléculas que possuam uma relevância biológica, procurar um método de determinação relativamente simples e de baixo custo, principalmente em investigações preliminares e que possua mecanismos químicos bem definidos. A avaliação da atividade antioxidante pelo método de DPPH é a uma das mais utilizadas, foi desenvolvida por Blois (1958).

Neste trabalho, a avaliação da atividade antioxidante foi realizada pelo método de DPPH que se baseia na transferência de elétrons, na capacidade do DPPH em reagir com doadores de hidrogênio por ação de um antioxidante, ou uma espécie radicalar, como nos processos de

oxirredução. O radical DPPH• (2,2-Difenil-1-picrilhidrazil) que apresenta a coloração púrpura, ao ser misturado a solução com uma substância que pode doar um átomo de hidrogênio dá origem a forma reduzida 2,2-Difenil-1-picrilhidrazina qual apresenta a coloração amarela, o que pode ser facilmente detectado por espectroscopia pelo decréscimo da absorbância, devido a sua intensa absorção na região visível, com a posterior perda de coloração. (BONDET; BRAND-WILLIAMS; BERSET, 1997) O radical DPPH•, bem como a sua forma estável, estão representados na figura a seguir.

Figura 10 – Radical DPPH• e DPPH-H.



Fonte: A autora

### 2.5.3 Determinação da Atividade Antimicrobiana

A utilização de plantas como recurso terapêutico é uma realidade desde os primórdios. A indústria farmacêutica se inspira em alguns produtos naturais para desenvolver novos medicamentos, uma grande exigência hoje é formular produtos seguros, menos nocivos e com características próximas a de produtos naturais. O estudo de novos ativos busca oferecer um produto que possua efeito farmacológico, sem possuir efeitos colaterais severos, como efeitos cardiocirculatórios ou que prejudiquem diretamente o sistema nervoso (HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2008; PACKER e LUZ, 2007). Existe uma enorme quantidade de substâncias catalogadas que possuem atividade antimicrobiana, e os estudos com novas substâncias vem crescendo, desta forma constantemente compostos que apresentem esta atividade em potencial são descobertos, porém apenas uma pequena parte destas substâncias são efetivamente utilizadas (HALL, 2004).

Um número aproximado de 8000 substâncias que possuem atividade antimicrobiana são estudadas a cada ano, o motivo da pequena utilização, se deve ao fato do processo de desenvolvimento de novos fármacos, seguir um planejamento prévio e extremamente rigoroso de várias etapas, que conta com modificações moleculares (sínteses), estudos qualitativos e quantitativos das relações estruturais com a atividade, além dos estudos via modelagem

molecular das estruturas químicas. Após esses processos é feita a otimização, e este protótipo deverá ser avaliado quanto aos parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos, para então ser um candidato a novo fármaco. Na sequência, são realizadas as três fases de ensaios clínicos, e somente se ocorrer a aprovação em todas é feita uma solicitação de nova aplicação como fármaco. Assim, os candidatos a novos fármacos muitas vezes não atendem aos requisitos mínimos para o emprego terapêutico. Paralelo a isto, existe resistência bacteriana aos diferentes antibióticos, antigamente esta resistência ocorria somente em ambiente hospitalar, mas desde então pode estar associada a inúmeros ambientes, inclusive atingindo indivíduos saudáveis (HALL, 2004).

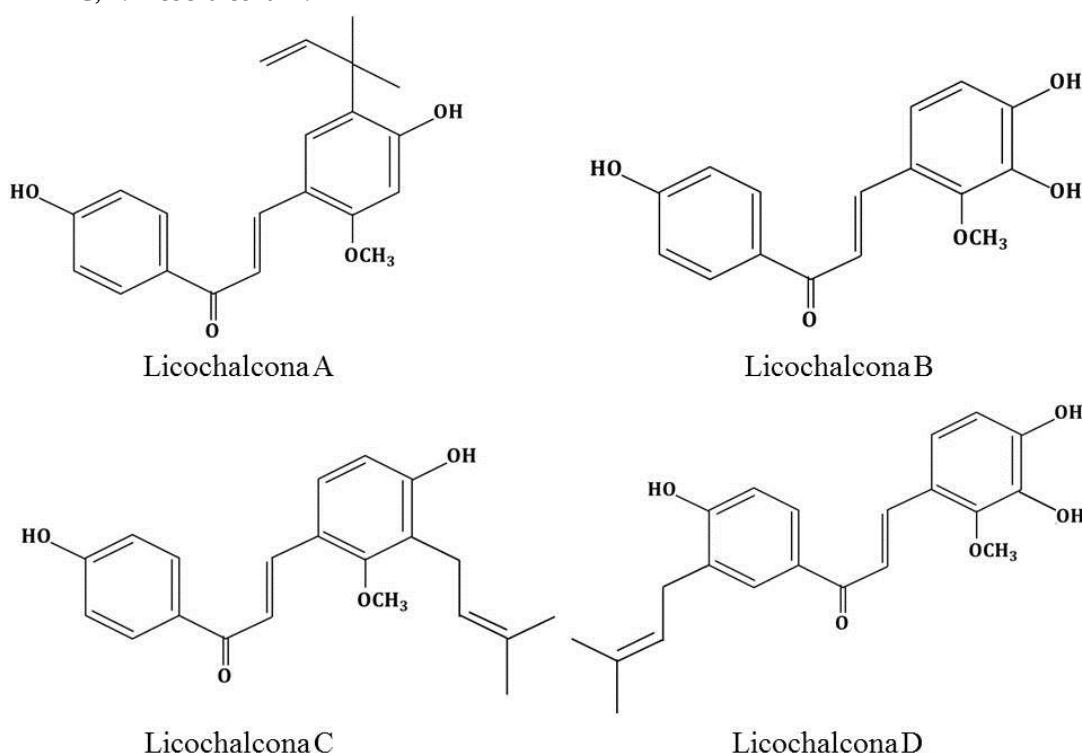
A cada 30.000 moléculas sintetizadas, 20.000 (66,7%) entram na fase de estudos pré-clínicos, 200 (0,67%) entram na fase I de estudos clínicos; 40 (0,13%) passam para a fase II, 12 (0,04%) entram na fase III e somente 9 (0,027%) são aprovados pelos órgãos regulatórios. Além destes dados, é importante mencionar que apenas 1 medicamento é aprovado (0,003%) e satisfaz o mercado, e em função disso, traz retorno para a indústria que o desenvolveu (CALIXTO; SIQUEIRA 2008).

Existem muitos relatos na literatura, referentes a atividade antimicrobiana das chalconas, dando ênfase que a atividade antibacteriana está associada à reatividade da função cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada (LÓPEZ et al., 2001; YAZDAN et al., 2015) ou também que interferem com a parede celular bacteriana (SIVAKUMAR; PRYA; DOBLE, 2009), por esta se ligar aos grupamentos tiol das proteínas, fazendo com que a biossíntese da parede celular do microrganismo seja inibida. Em sua maioria, as chalconas atuam inibindo microrganismos Gram-positivos, porém algumas chalconas apresentaram inibição de microrganismos Gram-negativos também (OPLETALOVA, 2000) Já foram relatadas inibições para bactérias: *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* (ALCARAZ et al., 2000), *Escherichia coli* (ALVAREZ et al., 2004), dentre outras.

As chalconas têm sido bastante estudadas em relação ao potencial antibacteriano, pesquisadores estão isolando, sintetizando ou modificando chalconas com esta atividade biológica (NIELSEN et al. 2004; NIELSEN et al. 2005). Retrochalconas, (Figura 11), foram isoladas e avaliadas quanto ao seu potencial efeito antibacteriano no estudo de Haraguchi et al., (1998), sendo que todas licochalconas inibiram o crescimento de bactérias Gram-positivas. A licochalcona A e C mostraram um pequeno efeito sobre o crescimento de fungos, mas a licochalcona A mostrou a atividade antibacteriana mais potente. Os efeitos da licochalconas A

e C sobre macromoléculas (DNA, RNA e proteína) foram testados, mostrando potente atividade inibidora antibacteriana e respiratória, na oxidação de NADH pela cadeia respiratória das frações de membrana preparadas a partir de várias células bacterianas, ambas foram inibidores eficazes de NADH oxidase bacteriana. Suas concentrações inibitórias foram de 50%.

Figura 11 – Estrutura das Retrochalconas isoladas. 1. Licochalcona A, 2. Licochalcona B, 3 licochalcona C, 4. Licochalcona D.



Fonte: Adaptada de HARAGUCHI et al., 1998.

Derivados da licochalcona foram sintetizados e estudados, na pesquisa de Nielsen et al. (2004), a hidroxila foi substituída pelo flúor no anel A (adjacente a Carbonila) e pelo ácido carboxílico no anel B. Esta nova mudança molecular não obteve sucesso quanto a atividade antimicrobiana, e foi concluído pelo Nielsen et al. (2004), que é essencial para atividade antibacteriana a hidroxila no anel A associado a substituintes lipofílicos no anel B. A substituição da hidroxila (anel A) pelo grupo 4-carboxi, forneceu um composto mais ativo, hidrossolúvel, menos tóxico, e bacteriostático. Outra modificação molecular que apresentou atividade antibacteriana, estudada por Nielsen et al. (2005), foi a inserção de grupamentos volumosos na posição 4' do anel A.

Estudos realizados por Schraufstatter e Bernt (1949) mostraram que ocorre um aumento na ação bacteriostática das cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas com a introdução dos substituintes hidroxila e halogênios. Testes para a atividade antifúngica com chalconas substituídas com halogênios

bromo e cloro demonstraram que o cloro contribuiu favoravelmente para o aumento da atividade (NIELSEN *et al.* 2004).

#### 2.5.4 Determinação da Atividade Antimicrobiana pelo Método *Kirby-Bauer*

Os agentes microbianos interferem no desenvolvimento de microrganismos. O agente deve inibir ou matar o microrganismo sem inibir ou matar o organismo hospedeiro (HALL, 2004).

Em 1928, Alexandre Fleming observou que o crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus* era inibido na área ao redor de colônias de fungos que haviam contaminado a placa de Petri. O fungo foi identificado como *Penicillium notatum*, e o componente ativo, isolado mais tarde, foi denominado penicilina. Reações inibitórias similares entre colônias em meio sólido são comumente observadas em microbiologia, e o mecanismo de inibição é conhecido como antibiose. A partir dessa palavra surgiu o termo antibiótico, uma substância produzida por microrganismos que em pequenas quantidades, inibe o crescimento de outro microrganismo. (TORTORA; FUNK; CASE, p. 559, 2005).

Substâncias produzidas por espécies de bactérias e fungos que em baixas concentrações, são capazes de impedir o crescimento ou eliminar seletivamente outros micro-organismos são chamadas de antibióticos. Já as substâncias sintéticas, compostos naturais juntamente com os seus derivados, são denominados de antimicrobianos.

Os agentes antimicrobianos possuem várias classificações, dentre as quais de acordo com sua origem, podendo ser sintéticos, semissintéticos ou naturais. O espectro de ação, onde podem ser divididos em amplo, intermediário e reduzido. Os efeitos também são classificatórios, podendo então ser bacteriostáticos ou bactericidas. De acordo com o modo de ação que é bastante complexo, mas que resumidamente pode-se citar como atuação de cinco formas: inibindo a síntese da parede celular, atuando na membrana citoplasmática, atuando como análogo estrutural de nutrientes, inibindo a síntese proteica ou inibindo a síntese de ácidos nucléicos (HALL, 2004; TORTORA; FUNK; CASE, 2005). E ainda podemos classificá-los em: antibacterianos, anti-helmínticos, antifúngicos, antivirais e antiprotzoários.

Por possuírem esta vasta área de classificação, estes agentes apresentam também diferentes intensidades de ação contra os microrganismos. Muitos são os testes que podem ser usados para indicar qual o agente mais adequado para determinado microrganismo, porém o método mais usado é o disco-difusão, também conhecido como *Kirby-Bauer*, por se tratar de um método de fácil manipulação e excelentes resultados. Consiste em inocular uniformemente

uma placa de Petri contendo um meio de ágar sólido, com quantidade padronizada do organismo teste. Após isto, discos de papel filtro que devem estar impregnados com concentrações conhecidas dos agentes são colocados sobre a superfície do ágar. Durante o período de incubação, que deve ser de 18 a 24 horas, os agentes difundem-se dos discos para o meio de cultura, então é feita a determinação dos halos de inibição do crescimento. O diâmetro da zona de inibição é comparado a valores de referência tabelados do diâmetro dos halos de inibição (TORTORA; FUNK; CASE, 2005). Este foi o método empregado neste trabalho para avaliação da atividade antimicrobiana.

## 2.6 ANÁLISE CONFORMACIONAL

A análise conformacional é a interpretação das propriedades dos compostos em termos de suas conformações (SOLOMONS; FRYHLE 2012). Ligações sigma ( $\sigma$ ) possuem uma barreira de rotação baixa, sendo assim quando grupos estão unidos por uma ligação deste tipo, estes podem sofrer rotação em torno desta ligação. O resultado desta rotação são arranjos tridimensionais moleculares temporários, os quais são chamados de conformação, todas as moléculas do mesmo composto que apresentem uma conformação diferente, são chamadas de confômeros. Através da Análise Conformacional se determina a estrutura molecular e energia relativa de cada confômero a fim de explicar a relativa estabilidade de uma conformação frente outra, pois a maioria das moléculas têm inúmeros confômeros, mas apenas alguns são favoráveis (ELIEL; WILEN; MANDER, 1994).

O que determina o equilíbrio de um determinado confômero são os ajustes de ângulos e comprimentos de ligação, que podem ser realizados através das rotações em torno das ligações sigma ( $\sigma$ ), até que a molécula se configure em sua forma de menor energia. Sendo assim, a energia total da molécula está diretamente relacionada com sua geometria.

Neste trabalho, foi realizada uma análise conformacional dos compostos sintetizados utilizando-se cálculos teóricos para que se possam prever as geometrias preferencias de cada molécula.

### 2.6.1 Análise Conformacional através de Cálculos teóricos

Através dos cálculos computacionais, os químicos podem investigar as propriedades segundo modelos teóricos. Informações sobre a geometria mais estável, comprimentos de ligação, ângulos diedros, barreiras de rotação de uma ligação simples, frequências vibracionais,



distribuição eletrônica, potenciais de ionização, afinidades eletrônicas, momentos de dipolo e constantes de acoplamento são dados que os cálculos computacionais podem fornecer (FORESMAN; FRISCH, 1996). Realizando assim cálculos com maior exatidão para modelos aceitos e induzindo o uso de computadores para o tratamento de sistemas moleculares complexos (HASE, 2003).

Dentro da química computacional existem duas grandes áreas de estudo: O método clássico, de mecânica molécula ou dinâmica molecular e o método quântico. Enquanto o método clássico é baseado nas leis da física clássica, se mostrando extremamente rápido e conseguindo diagnosticar propriedades estruturais simples, o método quântico se baseia em nas leis da mecânica quântica, então quando se está interessado em analisar quaisquer quantidades eletrônicas, obrigatoriamente deve-se utilizar um método quântico, que está subdividido em: *ab initio*, Semi-empírico e funcional de densidade, o que determina qual método quântico será utilizado, é o nível de precisão dessas quantidades eletrônicas que se deseja. De maneira geral semi- empíricos, levam a resultados menos precisos do que os métodos *ab initio*. Porém são menos sofisticados, e não ocasionam um custo computacional tão elevado (YOUNG, 2001; FORESMAN; FRISCH, 1996).

Algumas considerações devem ser feitas, através da análise dos principais fatores de sua pesquisa, para que a escolha correta do método de modelagem que melhor se encaixa em sua pesquisa seja feita:

- O que se deseja saber;
- Qual a precisão necessária;
- Quais aproximações foram feitas e quão significantes elas são;
- Quanto tempo levará a pesquisa;
- E a capacidade de cálculo disponível.

Os principais métodos quânticos, assim como os conjuntos de funções de base, necessários para se determinar um nível de teoria, serão descritos na sequência.

Os métodos Semi-empíricos foram desenvolvidos para gerar economia de tempo de máquina e também reduzir a quantidade de memória necessária (YOUNG, 2001), pois nos cálculos são negligenciadas informações de um grande número de integrais simplificando-os, no caso dos métodos *ab initio*, por exemplo essas integrais podem chegar a alguns milhões mesmo para moléculas pequenas. Introduziu-se então parâmetros empíricos ou previamente

calculados na resolução da equação de Schrödinger (Equação 1) que substituem algumas integrais que foram excluídas (FORESMAN; FRISCH, 1996).

Nos cálculos *ab initio*, que provém do latim “a partir do início” não existe nenhuma parametrização. Ao contrário, são baseados unicamente nas leis da mecânica quântica e nos valores de um pequeno número de constantes físicas como a velocidade da luz, massas e cargas dos elétrons e do núcleo, constante de Planck (YOUNG, 2001; FORESMAN; FRISCH, 1996). O principal método destes cálculos é o chamado Hartree-Fock (HF), no qual a equação de Schrödinger para muitos elétrons é dividida em muitas equações simples de um elétron. Cada função de onda  $\Psi$  (chamada orbital) corresponde a um estado de energia para um elétron. A energia (chamada energia orbital) associada com o estado do elétron pode ser calculado a partir da função de onda (YOUNG, 2001).

$$H\Psi = E\Psi \quad \text{(Equação 1)}$$

Nota:  $H$  é o operador Hamiltoniano, que opera sobre uma função matemática que no caso é a função de onda  $\Psi$ , e  $E$  representa a energia do sistema.

A Equação 1 é denominada auto equação, a função de onda é uma auto função e a representação de energia, o auto valor. Dessa forma o elétron é descrito como uma onda (YOUNG, 2001).

A partir da função de onda são retiradas todas as informações do elétron. Cada função de onda representa um estado de energia para um elétron, que é considerado imerso no campo médio dos outros elétrons, não permitindo que exista uma correlação eletrônica entre eles, em sistemas reais os movimentos eletrônicos são correlacionados de modo a minimizar a repulsão intereletrônica. Uma das limitações consiste justamente nesta falta de correlação entre elétrons. A repulsão entre os elétrons pode ser incluída através de métodos pós HF, com a teoria da perturbação de Møller Plesset (MP2) (HEAD; POPLÉ; FRISCH, 1988), onde a correção para a correlação eletrônica é introduzida através de uma perturbação sobre a função de onda. Porém este cálculo requer um tempo de máquina maior para serem realizados (FORESMAN; FRISCH, 1996; YOUNG, 2001; CRAMER, 2004).

Teoria do Funcional de Densidade (*do inglês, density function theory – DFT*). Nestes modelos, considera-se que a energia de um conjunto de elétrons sob influência de um campo externo é um funcional único da densidade eletrônica. Produz resultados mais exatos em determinados casos por levar em conta a correlação eletrônica. Possui um baixo custo no

processamento e no uso memória computacional. O método mais utilizado nos dias de hoje para cálculos moleculares é o funcional híbrido denominado B3LYP (BECKE 1993).

Conjuntos de funções de base é a representação matemática dos orbitais moleculares, onde apresentam os orbitais através de funções, que descrever sua forma. Escolher as funções de base adequadas, é essencial para se obter um resultado com precisão e otimizar o processamento (YOUNG, 2001). A junção do um método com o conjunto de funções de base utilizadas no cálculo se denomina como nível de teoria empregado.

## 2.7 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), está baseada na medida de absorção de radiação eletromagnética na região de radiofrequência aproximadamente entre 4 a 900 MHz. Muitos núcleos atômicos tem uma propriedade chamada *spin*: os núcleos comportam-se como se estivessem girando. Na verdade, qualquer núcleo atômico que tenha massa ímpar ou número atômico ímpar, tem um momento angular de *spin* e um momento magnético (HOLLER; SKOOG; CROUCH 2009; PAVIA et al., 2010).

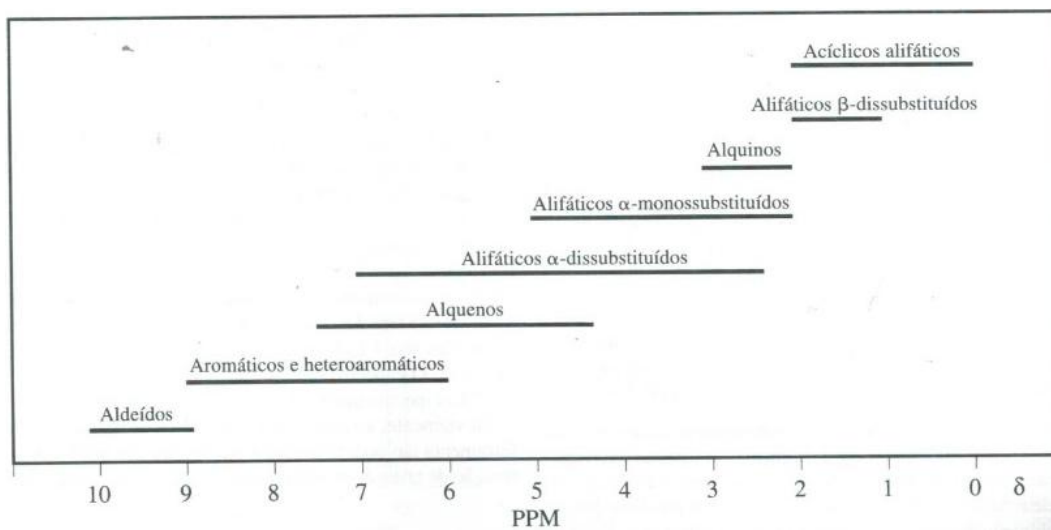
Os quatro núcleos de maior interesse dos químicos e bioquímicos são  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$  e  $^{31}\text{P}$ . O número quântico de spin desses núcleos é  $\frac{1}{2}$ . Assim, cada núcleo tem dois estados de spin  $I = +1/2$ , de maior energia e  $I = -1/2$ , de menor energia (HOLLER; SKOOG; CROUCH 2009).

O fenômeno de ressonância magnética nuclear ocorre quando núcleos alinhados, com um campo aplicado, são induzidos a absorver energia e a mudar a orientação de *spin* em relação ao campo aplicado (PAVIA et al., 2010). Nem todos os prótons da molécula possuem ressonância exatamente na mesma frequência, isso se deve ao fato de que os prótons de uma molécula, estão rodeados de elétrons e estão em ambientes químicos levemente diferentes em relação aos outros. Pode-se dizer que o fluxo de elétrons causa uma blindagem, que está diretamente relacionada à densidade eletrônica que o circula (HOLLER; SKOOG; CROUCH 2009).

Os diferentes tipos de prótons têm deslocamentos químicos diferentes e específicos (PAVIA et al., 2010). Este deslocamento químico é utilizado para identificar grupos funcionais e para ajudar a determinar os arranjos estruturais. Como apresentado na Figura 10, que mostra os deslocamentos químicos dos hidrogênios de compostos orgânicos em algumas regiões características, para cada grupamento.

Pode-se também fazer uma análise do fenômeno de acoplamento *spin-spin*, no espectro de hidrogênio, esse fenômeno trata-se do acoplamento indireto dos spins dos hidrogênios através dos elétrons da ligação, estes elétrons de ligação se emparelham com os spins antiparalelos (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE 2007). Esse fenômeno, pode ser explicado empiricamente pela regra conhecida como  $n + 1$ . Em geral este acoplamento não ocorre além de três ligações, salvo algumas exceções.

Figura 12 – Regiões características de deslocamento químico.



Fonte: (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE 2007).

O espectro de RMN de hidrogênio, além de distinguir os tipos diferentes de próton existentes na molécula, mostra também, quantos de cada tipo estão contidos na molécula. A área sob cada pico é proporcional ao número de hidrogênios (PAVIA et al, 2010).

Outro fator que afeta o deslocamento químico é a mudança na hibridização ( $sp^2$  versus  $sp^3$ ) e da desblindagem causada pela anisotropia diamagnética gerada pelos elétrons  $\pi$  da ligação dupla. A distância entre os picos em um multipeto é chamada de constante de acoplamento  $J$ , prótons de alquenos têm padrões de separação e constantes de acoplamento característicos (PAVIA et al., 2010). A espectroscopia de RMN está sendo utilizada como uma das ferramentas para analisar a estrutura conformacional de moléculas orgânicas desde 1963. Karplus deu origem aos estudos sobre a dependência angular das constantes de acoplamento como evidência estereoquímica para uma análise conformacional (HORE, 1995; KARPLUS, 1963).

Prótons substituídos *trans* em uma ligação dupla acoplam-se com mais intensidade, com valor típico de  $^3J$  de aproximadamente 16 Hz. Já a constante de acoplamento em prótons substituídos *cis* é de aproximadamente 10 Hz (PAVIA et al., 2010).

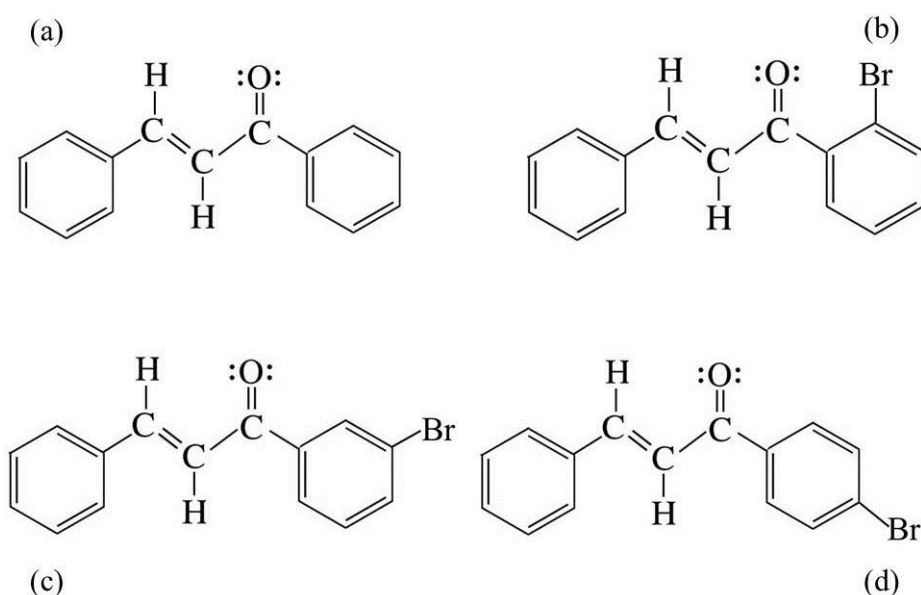
Neste trabalho a espectroscopia de RMN foi utilizada para caracterização de todos os produtos das sínteses, avaliação da pureza dos mesmos e confirmação da estereoquímica da formação da dupla ligação carbono-carbono.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVOS GERAIS

Dentro do contexto analisado anteriormente, devido à grande diversidade estrutural das chalconas aliada a sua potencial atividade biológica, houve o interesse em sintetizar os compostos (Figura 13): 1-Fenil-2-propen-3-fenil-1-ona (CHAL), 1-(2-Bromofenil)-2-propen-3-fenil-1-ona (*o*-CHALBr), 1-(3-Bromofenil)-2-propen-3-fenil-1-ona (*m*-CHALBr), 1-(4-Bromofenil)-2-propen-3-fenil-1-ona (*p*-CHALBr). Realizar uma análise conformacional utilizando cálculos teóricos e a espectroscopia de RMN, aliado à avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana de cada uma das chalconas.

Figura 13 – Estruturas dos compostos: CHAL (a), *o*-CHALBr (b), *m*-CHALBr (c) e *p*-CHALBr (d).



Fonte: A autora.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar as chalconas CHAL, *o*-CHALBr, *m*-CHALBr e *p*-CHALBr;
- Caracterizar os compostos sintetizados por espectroscopia de RMN;
- Realizar cálculos teóricos de análise conformacional (cálculos de scan e cálculos de otimização e frequência) e de teoria dos orbitais naturais de ligação (NBO), a fim de determinar as preferências conformacionais dos compostos (em fase isolada), obtendo-se a visualização tridimensional das estruturas preferenciais das chalconas, bem como os fatores estereoeletrônicos que estabilizam tais estruturas majoritárias;
- Realizar a avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana de cada uma das chalconas;

- Avaliar a influência do substituinte bromo, em diferentes posições no anel A, sobre o potencial de atividade biológica, bem como na preferência conformacional das chalconas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 SÍNTESES DOS COMPOSTOS

As chalconas CHAL, *o*-CHALBr, *m*-CHALBr e *p*-CHALBr, foram sintetizadas utilizando o método de reações de condensação aldólica cruzada de Claisen-Schmidt, combinando derivados de acetofenona com benzaldeído, utilizando como meio básico hidróxido de sódio e metanol como solvente. Os reagentes utilizados nas sínteses foram obtidos comercialmente e estão listados na Tabela 1.

Tabela 1 – Relação de reagentes utilizados.

| Reagente                   | Marca              | Grau de pureza (%) |
|----------------------------|--------------------|--------------------|
| <b>Aldeído benzoico</b>    | Vetec Química Fina | 95,0               |
| <b>Acetofenona</b>         | Vetec Química Fina | 99,0               |
| <b>2' Bromoacetofenofa</b> | Sigma Aldrich      | 99,0               |
| <b>3' Bromoacetofenofa</b> | Sigma Aldrich      | 99,0               |
| <b>4' Bromoacetofenofa</b> | Sigma Aldrich      | 98,0               |
| <b>Hidróxido de sódio</b>  | Vetec Química Fina | 99,0               |
| <b>Metanol</b>             | Merck              | 99,0               |

Fonte: A autora

A seguir está descrito o procedimento experimental geral utilizado nas sínteses. Sob agitação, e em banho de gelo foram misturados em um balão de fundo redondo de 50 mL, 10 mL de metanol e 20 mmol da acetofenona correspondente (Tabela 2). Em seguida, foram adicionados 5 mL da uma solução aquosa de hidróxido de sódio 50% (50g/100 mL) e 20mmol de benzaldeído. A mistura reacional foi mantida em agitação a temperatura ambiente por um período de 2 horas. Após esse período, houve a formação de um precipitado com coloração característica (amarelo), como apresentado na Tabela 2, os precipitados foram filtrados e caracterizados por espectroscopia de RMN como as chalconas correspondentes (Tabela 2).

Tabela 2 – Relação de reagentes utilizados nas sínteses, bem como a característica final dos produtos obtidos.

| Composto               | Aldeído     | Acetofenona         | Características    |
|------------------------|-------------|---------------------|--------------------|
| <b>CHAL</b>            | Benzaldeído | Acetofenona         | Sólido amarelo     |
| <b><i>o</i>-CHALBr</b> | Benzaldeído | 2'-Bromoacetofenona | Gelatinoso amarelo |
| <b><i>m</i>-CHALBr</b> | Benzaldeído | 3'-Bromoacetofenona | Sólido amarelo     |
| <b><i>p</i>-CHALBr</b> | Benzaldeído | 4'-Bromoacetofenona | Sólido amarelo     |

Fonte: A autora



## 4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS POR ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT-135 e 90 foram adquiridos em um espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear - Bruker, AVANCE III, operando a 400,131 MHz para o núcleo de hidrogênio e a 100,623 MHz para o núcleo de carbono. O equipamento está alocado no Complexo de Laboratórios Multiusuários (C-LABMU) na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG).

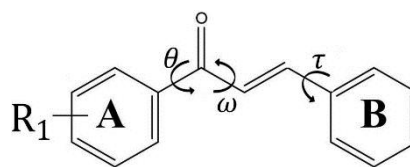
A aquisição dos espectros foi realizada utilizando-se soluções com aproximadamente 33 mg.mL<sup>-1</sup> do composto em 0,7 mL dos solventes:  $\text{CDCl}_3$ , com tetrametilsilano (TMS) com referência interna e temperatura da probe mantida acerca de 25° C. Para os espectros de hidrogênios foram empregados os seguintes parâmetros: Janela espectral 6393.862 Hz e 10000.000 Hz; número de scan 16 e 32, respectivamente para cada uma das frequências empregadas. No caso dos espectros de RMN de carbono foram utilizados: janela espectral 25510.203 Hz 29761.904 Hz; número de scans 2048 e 512, respectivamente para cada uma das frequências empregadas.

## 4.3 CÁLCULOS TEÓRICOS

Os cálculos teóricos foram realizados em estações de trabalho em ambiente Linux. Com o emprego do pacote de programas Gaussian 09 para os cálculos de estrutura eletrônica. O módulo NBO 5.9 para as análises envolvendo a teoria NBO (*Natural Bond Orbital*) (WEINHOLD; LANDIS; GLENDENING, 2016). Os programas PyMOL e GaussView 5 para a visualização de estruturas e superfícies.

Para encontrar o equilíbrio conformacional de cada uma das chalconas estudadas neste trabalho, foram realizados cálculos de superfície de energia potencial (*scan*) em função dos ângulos diedros, que estão representados na Figura 14 como  $\theta$ ,  $\tau$  e  $\omega$ . O cálculo consiste em rotacionar os ângulos diedros em determinados números de passos, e calcular a energia apresentada nas respectivas conformações. Os três ângulos diedros das chalconas foram submetidos a estes cálculos através do método *ab initio* HF (Hartree-Fock) e conjunto de funções de base 6-31G (KRISHNAN; BINKLEY; SEEGER; POPLE, 1980). Com estes cálculos foi possível construir um gráfico que expressa a energia total *versus* o ângulo do diedro, a superfície de energia potencial (SEP).

Figura 14 – Ângulos diedros girados das Chalconas.



Fonte: A autora

Através dos valores dos mínimos do primeiro *scan* (SEP), foram realizados os cálculos de superfície de energia girando desta vez o próximo e repetindo esse procedimento por mais uma vez, realizando o giro do terceiro diedro.

Ao final dos cálculos de *scan*, foram obtidas todas as geometrias mais estáveis para cada molécula e foram realizados cálculos de otimização e frequência, empregando nível de teoria M06-2X/6311++G(2d, 2p), em busca da confirmação das formas de menor energia (ALLINGER; BURKERT, 1982; FORESMAN; FRISCH; 1996PASCUTTI, 2002).

Ao final dos cálculos de otimização e frequência observou-se o número de confôrmeros preferenciais encontrados para cada uma das chalconas. Foram calculadas as populações de cada um deles, e realizados cálculos de NBO para verificar a importância dos efeitos eletrônicos.

#### 4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO DPPH

Em uma placa de Elisa foram adicionados 22  $\mu\text{L}$  das chalconas nas seguintes concentrações: 100, 50, 30 e 20  $\text{mmol.L}^{-1}$ , juntamente com 200  $\mu\text{L}$  da solução de DPPH $^{\bullet}$  (25  $\text{mg.L}^{-1}$ ). Para o branco das amostras foram misturados 22  $\mu\text{L}$  das chalconas em diferentes concentrações com 200  $\mu\text{L}$  do solvente DMSO, e para o branco do DPPH $^{\bullet}$ , 200  $\mu\text{L}$  do mesmo, com 22  $\mu\text{L}$  do solvente. A leitura, da triplicata de cada uma das amostras, foi realizada no Leitor de Elisa Synergy H1 – Biotek, com medidas de absorbância em 517 nm, nos tempos de 0, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 80, 120 e 180 minutos.

A porcentagem de inibição do radical DPPH foi calculada utilizando a seguinte equação:

Equação 2 – Inativação do radical DPPH

$$I(\%) = \frac{[(A_0) - (A_1 - A_2)]. 100}{A_0}$$

Nota:

$I$  inativação do radical DPPH $^{\bullet}$

$A_0$  absorvância do branco DPPH•  
 $A_1$  absorvância da amostra  
 $A_2$  absorvância do branco da amostra

A partir dos resultados obtidos foi determinada a porcentagem de atividade antioxidante das chalconas. O teste foi realizado simultaneamente com o ácido ascórbico, para que seja realizada uma comparação da porcentagem de atividade antioxidante das chalconas avaliadas com um composto antioxidante conhecido.

#### 4.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELO MÉTODO DIFUSÃO EM DISCO

Para o teste de atividade antibacteriana, utilizou-se inicialmente a técnica de difusão em disco. Foram utilizados discos de papel de filtro Whatman, 6 mm de diâmetro, estéreis e saturados com 5µL das soluções de compostos.

Duas espécies Gram positivas [(*Staphylococcus aureus* (ATT25923) e *Bacillus subtilis* (PY79)] e uma espécie Gram negativa [(*Escherichia coli* (ATT25922)] foram usadas para preparar os pré inóculos em meio líquido Luria Bertani. Os cultivos foram incubados a 37 °C durante 16 horas e, em seguida, foram transferidos para meio sólido ágar Mueller Hinton, espalhados com o auxílio de swabs estéreis. Após a adição de 5 µL das soluções testadas, os discos de papel filtro foram transferidos para as placas de Petri contendo meio sólido. Após incubação a 37 °C, durante 24 horas, as placas foram analisadas. Foram testadas as quatro chalconas sintetizadas.

Padronização do cultivo de bactérias Estirpes de *Escherichia coli* (ATCC25922) e de *Staphylococcus aureus* (ATCC25923) foram utilizadas para os testes de atividade de inibição de crescimento bacteriano. O cultivo bacteriano foi padronizado a partir de uma cultura crescida a 37 °C por 24 horas, em caldo Mueller Hinton (CMH), adicionando-se meio estéril até atingir turvação igual à suspensão do tubo 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente  $1,0 \times 10^8 \text{ UFC.mL}^{-1}$ ). Em seguida foi verificada a leitura espectrofotométrica a 620 nm para confirmação da densidade óptica entre 0,08 e 0,13. Posteriormente, foi realizada uma diluição 1: 150, em CMH, obtendo-se uma suspensão de  $5,0 \times 10^5 \text{ UFC.mL}^{-1}$ , a qual foi utilizada nos ensaios.

Para a determinação da concentração mínima inibitória (CMI), as soluções utilizadas foram: CHAL dissolvida em DMSO, CHAL em DMSO:PEG (1: 16), CHAL em DMSO:PEG (1: 8) e CHAL em DMSO:PEG (1: 1). As soluções estoque foram preparadas a  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$ . A técnica de diluição em microplacas (96 orifícios) foi utilizada para determinação da CIM de

acordo com a metodologia descrita na norma M7-A6 do “Manual Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2012) para as bactérias aeróbicas. Aos poços da linha A das microplacas contendo 120  $\mu\text{L}$  de CMH foram adicionados 30  $\mu\text{L}$  de soluções de chalcona sem substituintes dissolvidas em diferentes proporções de DMSO:PEG. Assim, nos poços da linha A, as concentrações finais de compostos foram de 1  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ . A seguir, 50  $\mu\text{L}$  dessa diluição foram usados para realizar uma diluição seriada dos compostos. Para a diluição, cada coluna recebeu 50  $\mu\text{L}$  de meio estéril e 50  $\mu\text{L}$  da solução contida no poço em posição anterior na coluna. Adicionalmente foram distribuídos 50  $\mu\text{L}$  das suspensões dos micro-organismos em cada poço das microplacas. No volume final as concentrações da diluição seriada foram de 1  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  (linha A) até 0,0052  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  (linha H). Canamicina 1  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  foi utilizada como controle positivo e 30  $\mu\text{L}$  de DMSO e 30  $\mu\text{L}$  de DMSO:PEG (1:8) como controles negativos. Além disso, o controle de crescimento bacteriano foi realizado na ausência de aditivos e o controle do meio de cultivo foi realizado na ausência de inóculo bacteriano. As microplacas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas. Após isso, as placas foram visualizadas para verificar a turvação do meio, o que indica crescimento bacteriano nos poços.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 SÍNTESES DAS CHALCONAS: CHAL, *o*-CHALBr, *m*-CHALBr E *p*-CHALBr

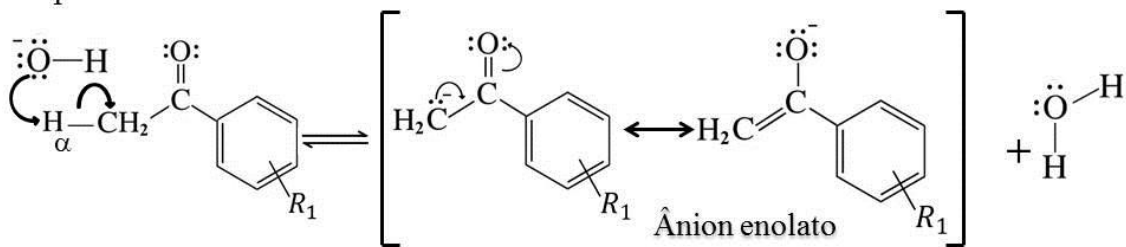
Uma reação aldólica que começa com dois compostos diferentes, mas ambos apresentam carbonila, é chamada de reação aldólica cruzada. Quando as cetonas são utilizadas como um dos reagentes, as reações aldólicas cruzadas são chamadas de reações de Claisen-Schmidt. Essas reações são práticas quando bases como o hidróxido de sódio são utilizadas, pois sob essas condições, as cetonas não sofrem autocondensação apreciável (SOLOMONS; FRYHLE, 2012).

O mecanismo da reação para a obtenção das quatro chalconas sintetizadas neste trabalho (CHAL, *o*-CHALBr, *m*-CHALBr, *p*-CHALBr), está apresentado em etapas e pode ser analisado na Figura 15.

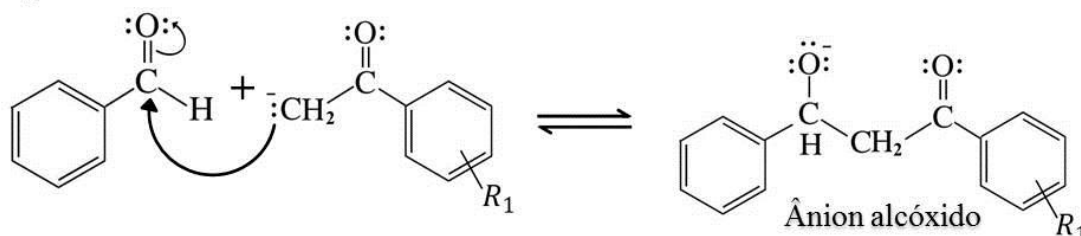
Na primeira etapa, um íon hidróxido remove um próton  $\alpha$  do derivado de acetofenona utilizado em cada uma das respectivas sínteses, gerando um ânion enolato que é o nucleófilo e estabilizado por ressonância. Na segunda etapa ocorre uma adição nucleofílica, com o ânion enolato atacando o carbono da carbonila do benzaldeído, gerando assim um ânion alcóxido. Na terceira etapa o ânion alcóxido remove um próton da molécula de água. A quarta etapa é da desidratação, onde ocorre uma eliminação do tipo E2, formando a ligação  $C = C$ , da chalcona, desta maneira formando além do produto desejado, água e um íon hidróxido. A desidratação que ocorreu na etapa final é característica das reações de Claisen-Schmidt, e é favorecida, pois forma a ligação dupla que se conjuga tanto com o grupo carbonila como com o anel aromático, formando assim um sistema conjugado estendido (SOLOMONS; FRYHLE, 2012).

Figura 15 – Reação de Claisen-Schmidt, mecanismo geral para obtenção das chalconas: CHAL, *o*-CHALBr, *m*-CHALBr e *p*-CHALBr.

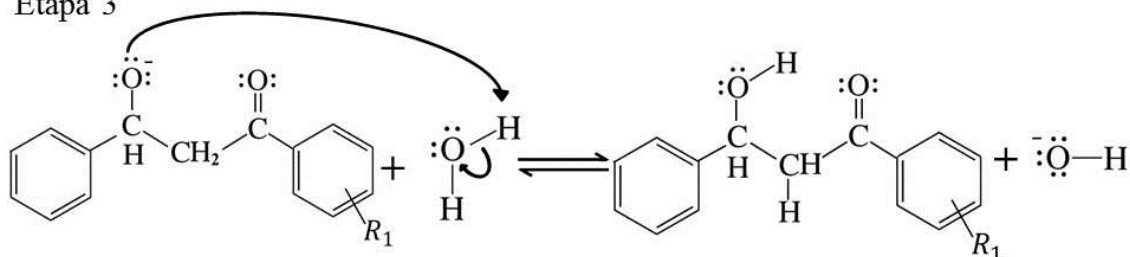
Etapa 1



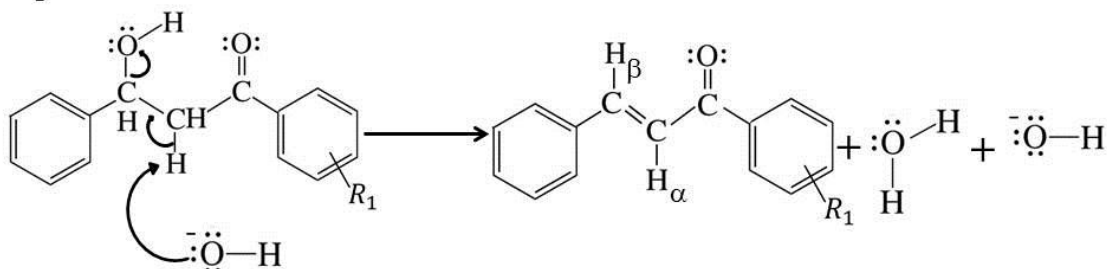
Etapa 2



Etapa 3



Etapa 4



Fonte: A autora.

Notas: Para síntese da CHAL:  $\text{R}_1 = \text{H}$

Para síntese *o*-CHALBr:  $\text{R}_1 = \text{Br}$  na posição *orto*

Para síntese *m*-CHALBr:  $\text{R}_1 = \text{Br}$  na posição *meta*

Para síntese *p*-CHALBr:  $\text{R}_1 = \text{Br}$  na posição *para*

## 5.2 PURIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS

Analizando os espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT-135 e 90 dos produtos obtidos nas sínteses, pôde-se caracterizar a CHAL, *m*-CHALBr e a *p*-CHALBr, estas sínteses resultaram no produto desejado puro, sendo assim, não necessitaram de purificação. Já a chalcona, *o*-CHALBr, mesmo formando o produto desejado, apresentou sobra do reagente benzaldeído, necessitando de purificação. Por se tratar de um precipitado gelatinoso, insolúvel em água, foi

feita a lavagem do precipitado em água, para que se pudesse dissolver a sobra de reagente, que foi analisada nos espectros, e posteriormente fazer a coleta do precipitado puro. Na Tabela 3, pode-se observar o rendimento obtido, após a devida purificação.

Tabela 3 – Rendimento das sínteses da CHAL, *o*-CHALBr, *m*-CHALBr e *p*-CHALBr

| Composto         | Rendimento |
|------------------|------------|
| CHAL             | 97,0%      |
| <i>o</i> -CHALBr | 82,7%      |
| <i>m</i> -CHALBr | 72,5%      |
| <i>p</i> -CHALBr | 76,1%      |

Fonte: A autora

### 5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS CHALCONAS POR ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE $^1\text{H}$ E $^{13}\text{C}$

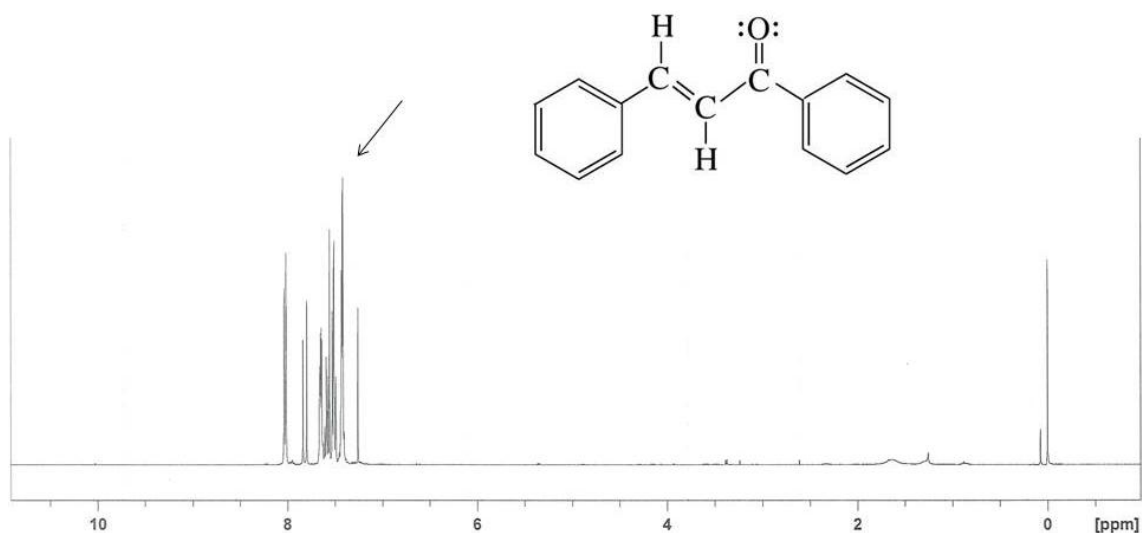
#### 5.3.1 CHAL

Após a síntese para a obtenção da CHAL, o produto foi caracterizado por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Os espectros totais e suas expansões, podem ser visualizados nos Apêndices A e B. Como já descrito anteriormente, foi realizada uma condensação aldólica cruzada entre a acetofenona e o benzaldeído. Ao analisar o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da CHAL foi possível perceber que o sinal referente ao próton do grupo aldeído, que se localiza em torno de 9,0-10,0 ppm não foi encontrado, esta região indicativa de aldeído é muito particular. Isto prova que não há sobra do reagente benzaldeído no produto isolado ao final da reação. Outra observação importante, foi que o deslocamento químico referente ao grupo metila da acetofenona, que apresenta um sinal em torno de 2,1-2,4 ppm, também não foi encontrado, ou seja, não há acetofenona no produto final.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , apresenta picos entre 7-8 ppm, referentes aos hidrogênios aromáticos e vinílicos (Figura 16).

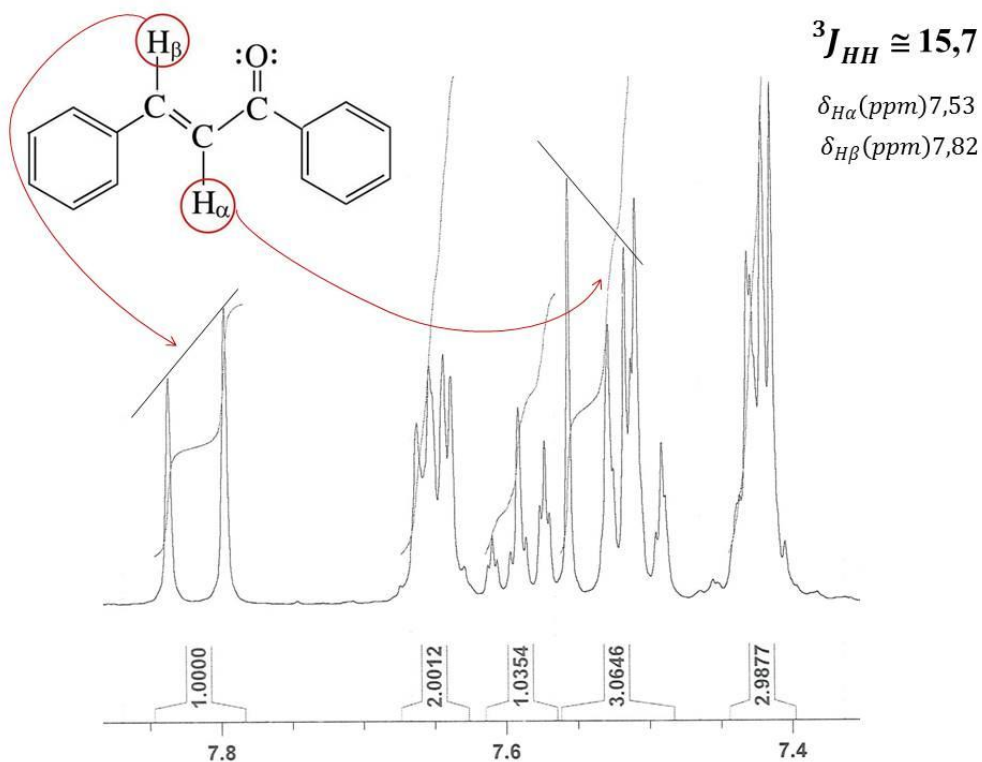
O deslocamento químico do  $\text{H}\beta$ , se apresentou como um duplete centrado em 7,82 ppm (Figura 17). O  $\text{H}\alpha$  foi representado por um duplete de difícil identificação, pois está próximo aos sinais dos hidrogênios aromáticos, com o sinal em 7,53 ppm (Figura 17).

Figura 16 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da CHAL.



Fonte: A autora

Figura 17 – Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da CHAL, deslocamentos químicos e constantes de acoplamentos dos hidrogênios vinílicos.



Fonte: A autora

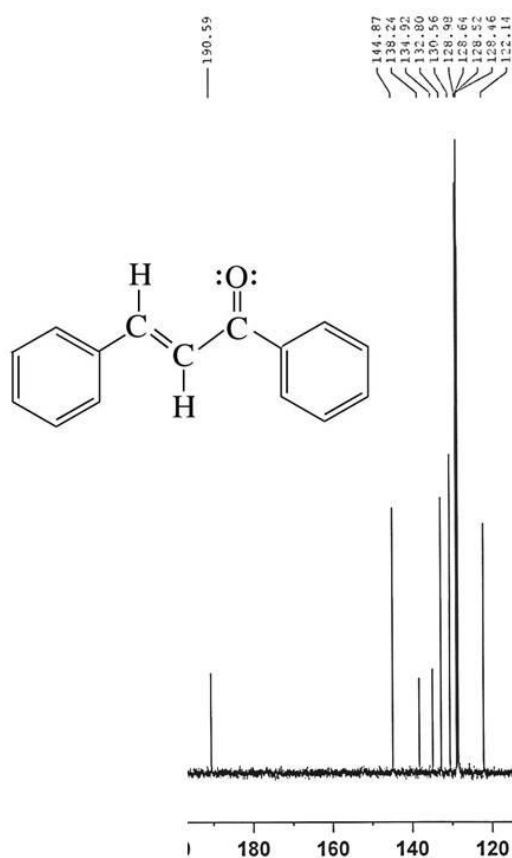
Com o acoplamento entre os hidrogênios vinílicos ( $^3J_{\text{HH}} \approx 15,7$  Hz) (Figura 17) foi possível confirmar a estereoquímica da ligação dupla vinílica deste composto, que caracterizam um valor esperado para acoplamento *trans* próton-próton através da dupla ligação. Ainda analisando o espectro de  $^1\text{H}$  da CHAL, vemos que as integrais indicam que o composto possui um total de doze hidrogênios, que são correspondentes ao número total de hidrogênios da molécula.



Através da análise do espectro de  $^{13}\text{C}$  da CHAL, verificamos a presença de onze sinais que representam a quantidade de carbonos da molécula (Figura 18), porém a CHAL apresenta em sua estrutura quinze carbonos. A menor quantidade de carbonos representados no espectro se deve a existência de carbonos com o mesmo deslocamento químico, ou seja, equivalentes entre si, totalizando desta maneira onze sinais.

Levando em consideração que a análise por RMN de  $^1\text{H}$ , mostrou que não há impurezas de benzaldeído e acetofenona no produto final, podemos atribuir no espectro de  $^{13}\text{C}$  que foi mostrado na Figura 18, o pico 190,59 ppm (Figura 19) como o carbono carbonílico da CHAL.

Figura 18 – Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da CHAL.



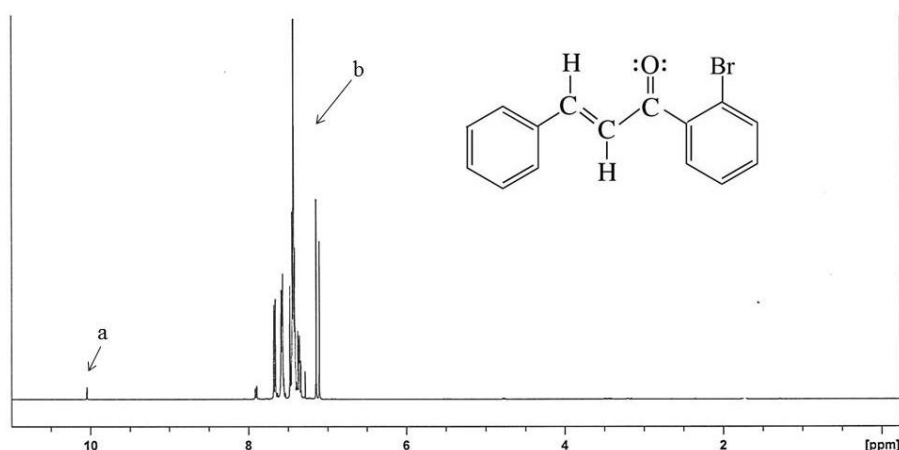
Fonte: A autora

Para caracterizar todos os derivados bromados da CHAL, foi realizada uma discussão detalhada como a que acabou de ser apresentada nesta seção. Entretanto, em alguns momentos, para a leitura não ficar repetitiva a abordagem foi mais simples. Porém todos os dados utilizados na interpretação dos espectros foram apresentados.

### 5.3.2 *o*-CHALBr

A chalcona *o*-CHALBr foi caracterizada por RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e pelos DEPT-90 e 135. Os espectros totais deste composto e suas expansões, podem ser visualizados nos Anexos C, D e E. Os reagentes empregados para a obtenção deste derivado foram a 2'-bromoacetofenona e o benzaldeído. Ao analisar o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  pode-se perceber a existência de um pico com deslocamento químico referente ao próton do grupo aldeído, que se localiza na região de 9,0-10,0. Após esta constatação, foram então realizadas várias lavagens, utilizando água, com o intuito de tentar remover o aldeído que não reagiu e obtido um novo espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , que está representado na Figura 19. Analisando o espectro, mesmo após tratamento, verificou-se a presença de benzaldeído, em menor quantidade, mas ainda presente. Antes de ser realizada a purificação a proporção era de 1:0,066 (*o*-CHALBr : benzaldeído), após a purificação a proporção caiu para 1:0,044, mostrando assim, que a purificação mesmo não tendo sido totalmente eficaz, resultou na diminuição da quantidade do reagente benzaldeído presente no produto final. Observou-se que o deslocamento químico referente ao grupo metila da 2'-bromoacetofenona (sinal em torno de 2,1 ppm), não foi verificado. Sendo assim, o produto final não apresenta resíduos do reagente 2'-bromoacetofenona. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , apresentou picos entre 7-8 ppm, referentes aos hidrogênios aromáticos e vinílicos [Figura 19(b)].

Figura 19 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da *o*-CHALBr.

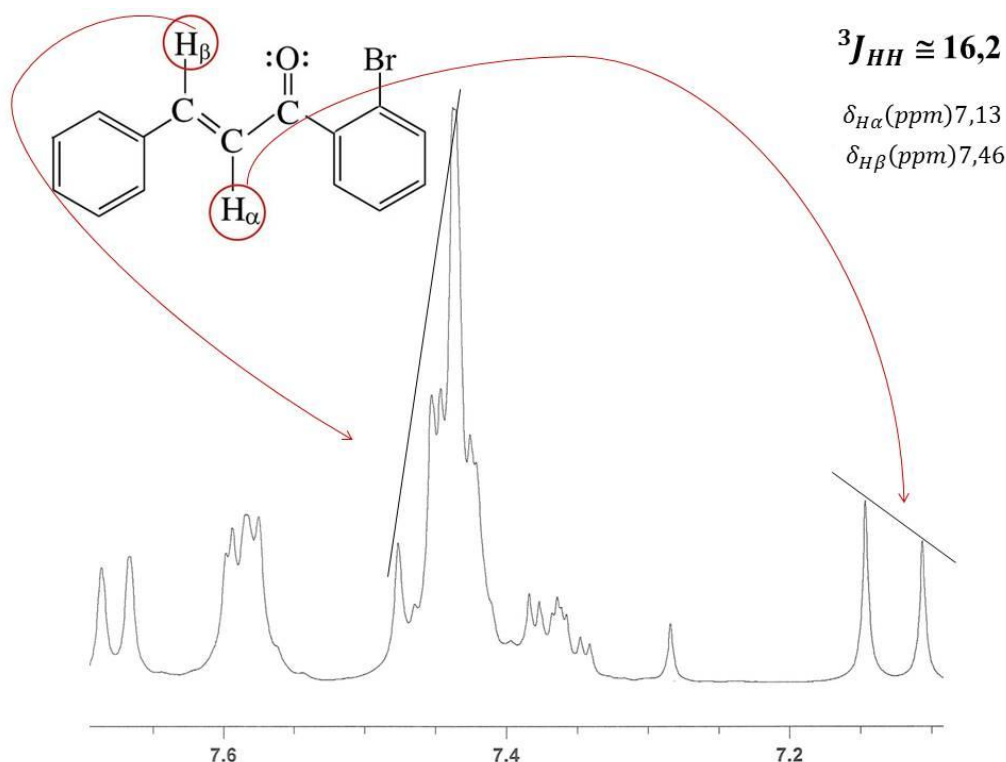


Fonte: A autora

Notas: (a) sinal de hidrogênio do benzaldeído. (b) sinais de hidrogênios aromáticos e vinílicos.

Realizando a mesma abordagem da CHAL apresentada na seção anterior, os hidrogênios  $\text{H}\alpha$  e  $\text{H}\beta$  foram atribuídos, como mostra a Figura 20.

Figura 20 – Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da *o*-CHALBr, deslocamento químico e constantes de acoplamentos dos hidrogênios vinílicos.

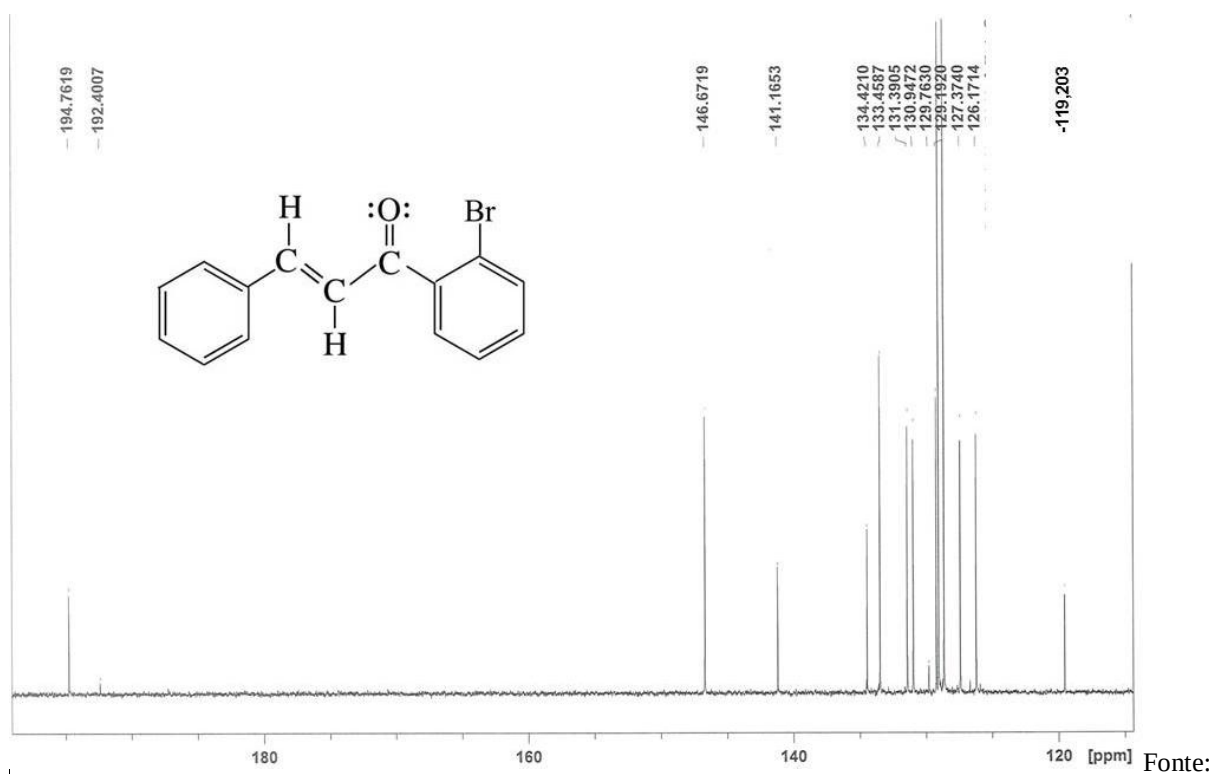


Fonte: A autora

Ainda analisando a figura anterior, os hidrogênios vinílicos apresentaram uma multiplicidade típica para o sistema, dois dupletos. Entretanto, o  $H\alpha$  ficou bem mais resolvido do que o  $H\beta$ , o qual por estar mais próximo dos hidrogênios aromáticos acabou se sobrepondo aos mesmos. Através dos valores das constantes de acoplamento para estes hidrogênios, pode-se analisar a configuração da *o*-CHALBr no que se diz respeito a ligação dupla vinílica. A constante de acoplamento para os  $H\alpha$  e  $H\beta$ , foi de 16,2 Hz, este valor caracteriza valor típico para acoplamento *trans* próton-próton através da dupla ligação carbono-carbono. Também foi possível verificar através do espectro de  $^1\text{H}$  da *o*-CHAL, que as integrais indicam que o composto possui um total de onze hidrogênios, um hidrogênio a menos do que a CHAL, devido a presença do bromo em um dos anéis aromáticos.

Através da análise do espectro de  $^{13}\text{C}$  da *o*-CHALBr (Figura 22), verificamos a presença de treze sinais bem definidos e com intensidade apreciável, os quais são relativos aos carbonos do derivado bromado em *orto*. Além destes, na região típica de carbonos carbonílicos, identificou-se além da carbonila cetônica da chalcona em 194,8 ppm, um sinal pouco intenso na mesma região (192,4 ppm), que confirma a presença de benzaldeído. A quantidade de sinais relatados no espectro, foi menor devido a existência de carbonos equivalentes, mesmo comportamento já discutido na CHAL.

Figura 21 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da *o*-CHALBr.

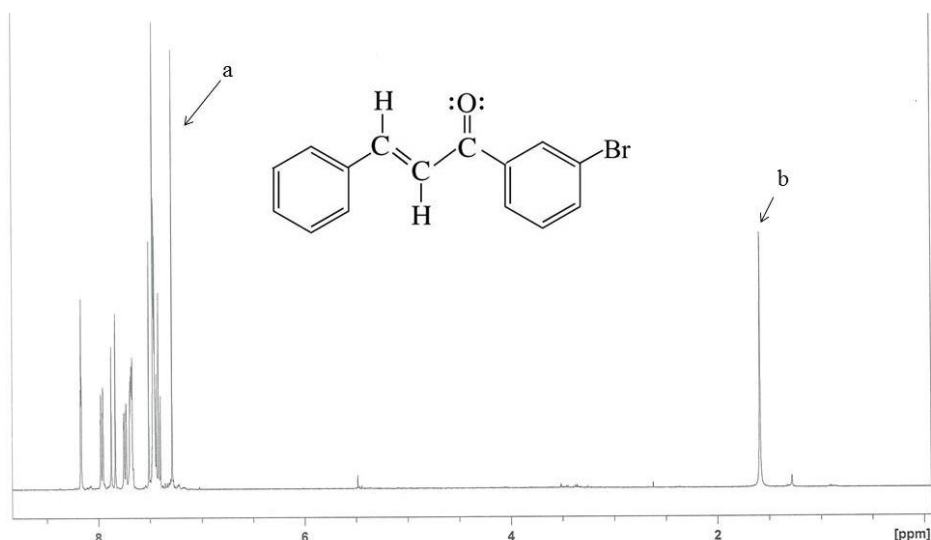


A autora

### 5.3.3 *m*-CHALBr

Os espectros totais da *m*-CHALBr e suas expansões, podem ser visualizados nos Anexos F, G e H. Para a síntese desta chalcona, foi realizada uma condensação aldólica cruzada entre a 3'-bromoacetofenona e o benzaldeído. Ao analisar o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 22) podemos perceber não há sobras dos reagentes de partida. Não identificou-se, nem o sinal do hidrogênio referente ao benzaldeído, nem o sinal dos hidrogênios da metila da respectiva acetofenona. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  apresentou picos apenas na região entre 7-8 ppm, referentes aos hidrogênios aromáticos e vinílicos.

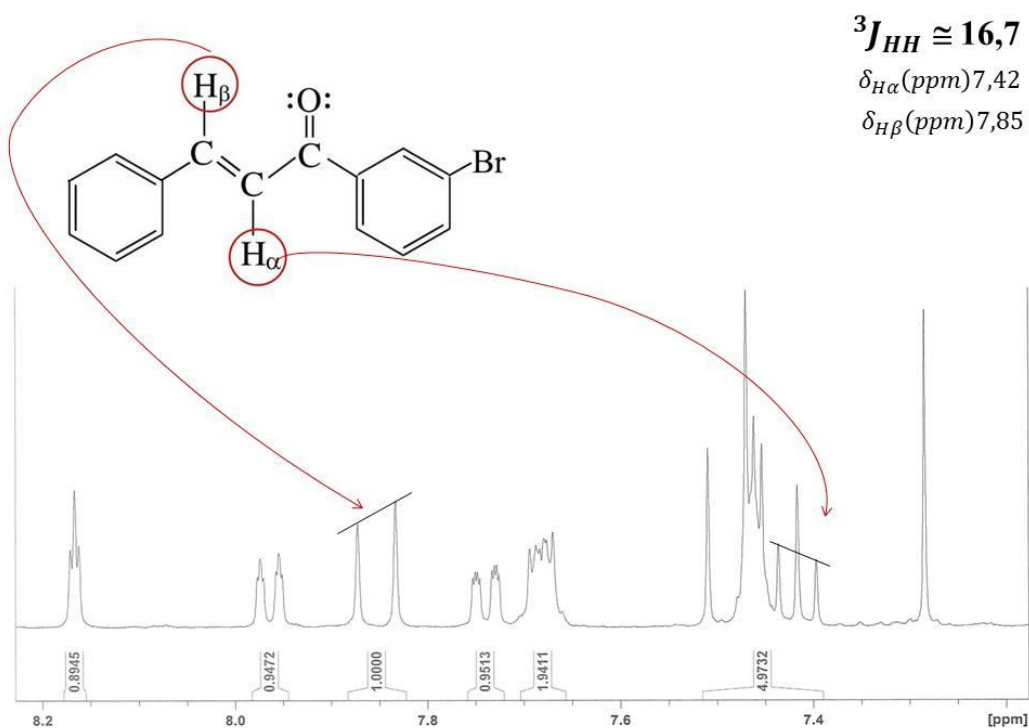
Figura 22 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da *m*-CHALBr.



Fonte: A autora Notas: (a) ausência do sinal do benzaldeído. (b) sinais referentes a umidade.

Com a expansão da região dos aromáticos (Figura 23), foi possível observar os dupletos referentes aos hidrogênios vinílicos, confirmou-se que o duplete centrado em 7,85 ppm é o  $H_\beta$  e o segundo em 7,42 ppm o  $H_\alpha$ .

Figura 23 – Expansão do espectro de RMN de  $^1H$  da *m*-CHALBr, deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos hidrogênios vinílicos



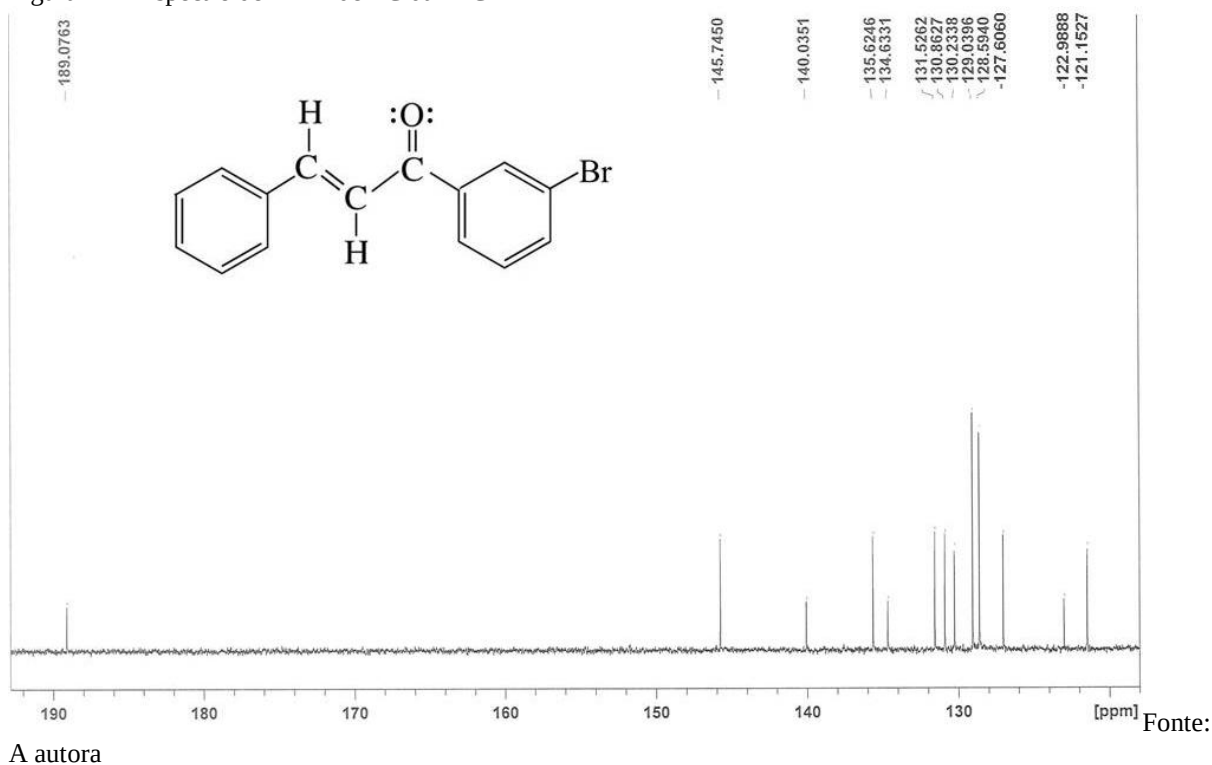
Fonte: A autora

Os valores das constantes de acoplamento dos prótons, mostraram o mesmo padrão de acoplamento das duas chalconas caracterizadas anteriormente. As constantes de acoplamento

para o H $\alpha$  e para o H $\beta$ , foram de 15,72 Hz (Figura 23), ou seja, dupla ligação carbono-carbono com os hidrogênios orientados de maneira *trans*.

Analisando o espectro de  $^{13}\text{C}$  da *m*-CHALBr (Figura 24), verificamos a presença de apenas treze sinais, devido a presença de carbonos quimicamente equivalentes na estrutura deste derivado. Os carbonos com sinais idênticos neste derivado, foram os mesmos que também apresentaram equivalência na *o*-CHALBr.

Figura 24 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da *m*-CHALBr

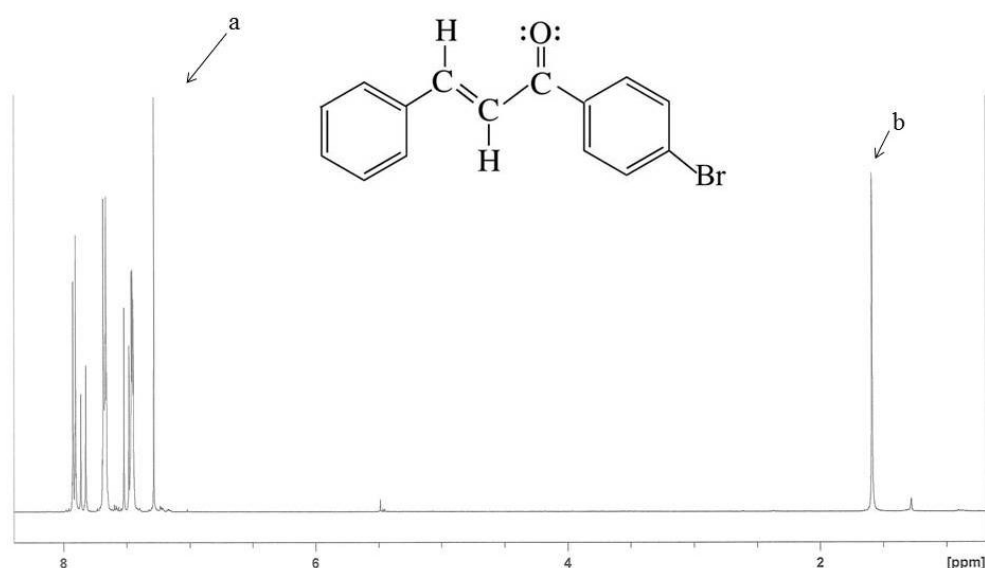


Como a análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , mostrou que não existem impurezas de benzaldeído e 3'-bromoacetofenona no produto final, podemos classificar que o pico 189,08 no espectro de  $^{13}\text{C}$  (Figura 24), é referente ao carbono carbonílico da cetona da *m*-CHALBr. Além do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , foram realizados experimentos de DEPT-135 e 90, com os quais podemos verificar que não existem grupos metilênicos, nem metilas, apenas metinos.

### 5.3.4 *p*-CHALBr

O último derivado bromado da chalcona, a *p*-CHALBr foi identificada com a obtenção dos mesmos espectros utilizados nas demais caracterizações. Os espectros totais deste composto e suas expansões, podem ser visualizados nos Anexos I, J e K. Analisando o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 26), verificou-se apenas sinais referentes ao produto desejado. Não há indícios da presença dos reagentes de partida, o que comprova que o produto está puro. O espectro apresentou picos entre 7-8 ppm, referentes aos hidrogênios aromáticos e vinílicos (Figura 26(b)).

Figura 25 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da *p*-CHALBr.

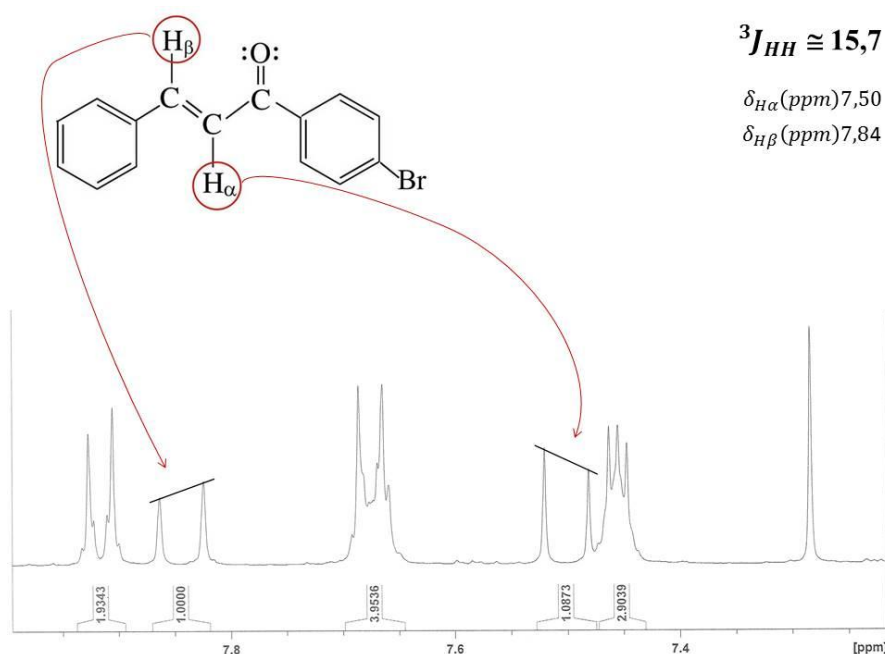


Fonte: A autora

Notas: (a) sinais de hidrogênios aromáticos e vinílicos. (b) sinais referentes a umidade.

Para este composto, a expansão da região entre 7,4 e 7,9 ppm, revelou dupletos mais definidos e sem sobreposições como nos casos anteriores. A atribuição dos hidrogênios vinílicos está apresentada na Figura a seguir. Bem como as constantes de acoplamento,  $^3J_{\text{HH}}$ , (Figura 26) que demonstram a configuração *trans* da dupla ligação.

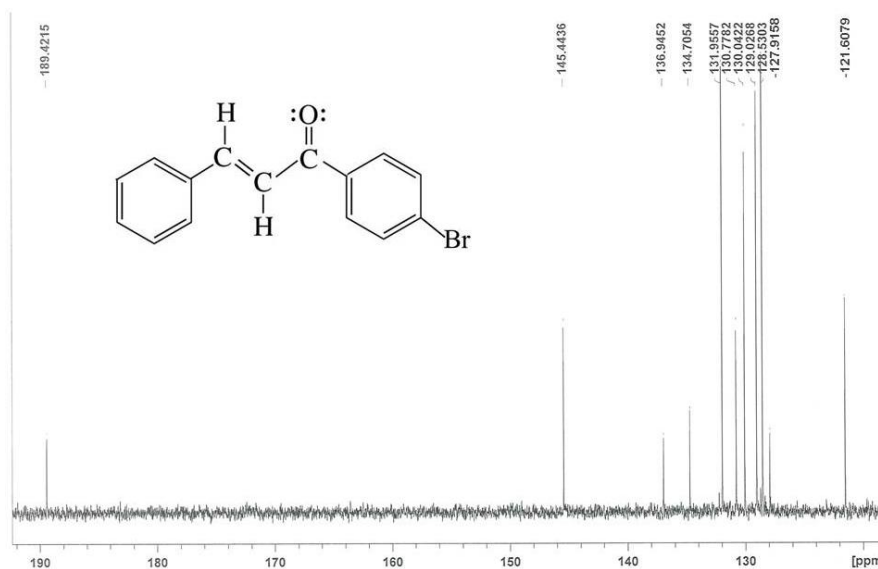
Figura 26 – Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da *p*-CHALBr, deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos hidrogênios vinílicos.



Fonte: A autora

O espectro de  $^{13}\text{C}$  da *p*-CHALBr, apresentou onze sinais para os quinze carbonos da molécula (Figura 27), pois existem mais carbonos equivalentes do que nos derivados anteriores, este fato é justificado devido a orientação *para* do átomo de bromo no anel A. O pico em 189,42 ppm do espectro de  $^{13}\text{C}$  representa o carbono carbonílico da *p*-CHALBr. Através da análise dos espectros de DEPT-135 e 90 (Apendice K), podemos afirmar que há apenas metinos.

Figura 27 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da *p*-CHALBr.



Fonte: A autora



Um resumo com a atribuição dos sinais está demonstrado a seguir. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm e as multiplicidades foram indicadas pelas abreviações: (s) simpleto; (d) duplet e (m) multipletto.

#### CHAL

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 8,0 (m, 2H); 7.82 (d, 1H,  $J$  15.7 Hz, H $\beta$ ); 7.65-7.50 (m, 5H); 7.53 (d, 1H,  $J$  15.7 Hz, H $\alpha$  e H $\beta$ ); 7.43-7.41 (m, 3H).

#### *o*-CHALBr

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 7.65 (m, 1H); 7.55 (m, 2H); 7.44-7.38 (m, 6H); 7.35-7.31 (m, 1H); 7.10 (d, 1H,  $J$  16.1 Hz, H $\alpha$  e H $\beta$ ).

#### *m*-CHALBr

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 8.2(d, 1H)7.96 (d, 1H); 7.85 (d, 1H,  $J$  15.7 Hz, H $\beta$ ); 7.75-7.67 (m, 3H); 7.50-7.41 (m, 4H); 7.4 (d, 1H,  $J$  15.7 Hz, H $\alpha$  e H $\beta$ ).

#### *p*-CHALBr

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 7.89 (m, 2H, Ar-H); 7.82 (d, 1H,  $J$  15.7 Hz, H $\beta$ ); 7.64 (m, 4H, Ar-H); 7.47 (d, 1H,  $J$  15.7 Hz, H $\alpha$  e H $\beta$ ); 7.42 (m, 3H, Ar-H).

Tabela 4 – Resumo dos sinais  $^{13}\text{C}$  RMN (100 Mz,  $\text{CDCl}_3$ )

|                             | CHAL   | <i>o</i> -CHALBr | <i>m</i> -CHALBr | <i>p</i> -CHALBr |
|-----------------------------|--------|------------------|------------------|------------------|
| <b>C = O</b>                | 190,60 | 194,83           | 189,07           | 189,39           |
| <b>C<math>\beta</math></b>  | 138,24 | 146,73           | 145,74           | 145,43           |
| <b>C<math>\alpha</math></b> | 122,13 | 126,15           | 122,99           | 127,91           |
| <b>C – 1'</b>               | 138,34 | 141,13           | 140,03           | 136,93           |
| <b>C – 1</b>                | 134,91 | 134,39           | 135,62           | 134,69           |
| <b>C – 2'</b>               | 128,64 | 119,5            | 134,63           | 128,53           |
| <b>C – 2</b>                | 128,54 | 128,62           | 128,59           | 129,02           |
| <b>C – 3'</b>               | 128,98 | 133,45           | 121,45           | 131,95           |
| <b>C – 3</b>                | 128,46 | 127,37           | 127,00           | 130,78           |
| <b>C – 4'</b>               | 132,79 | 131,40           | 130,86           | 121,48           |
| <b>C – 4</b>                | 130,56 | 130,96           | 130,03           | 130,04           |
| <b>C – 5'</b>               | 128,98 | 129,018          | 131,52           | 131,95           |
| <b>C – 5</b>                | 128,46 | 127,37           | 127,00           | 129,02           |
| <b>C – 6'</b>               | 128,64 | 129,02           | 130,23           | 128,53           |
| <b>C – 6</b>                | 128,54 | 128,62           | 128,59           | 129,02           |

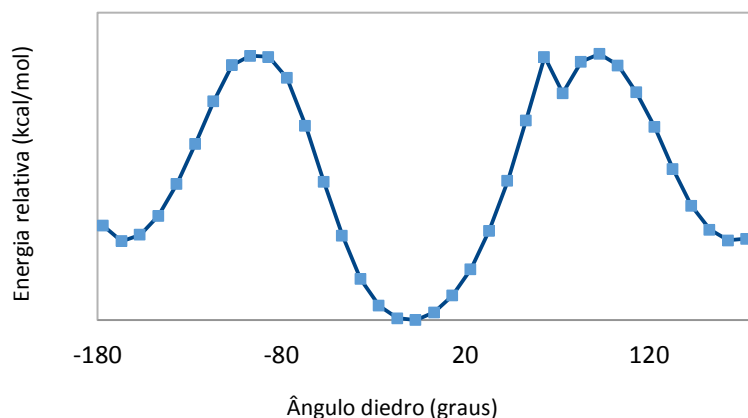
Fonte: A autora

## 5.4 EQUILÍBRIO CONFORMACIONAL POR CÁLCULOS TEÓRICOS

Inicialmente foram realizados cálculos de *scan* em função dos ângulos diedros,  $\theta$ ,  $\tau$  e  $\omega$  (Figura 14). Estes cálculos foram realizados utilizando nível de teoria HF/6-31G (KRISHNAN; BINKLEY; SEEGER; POPLE, 1980).

O cálculo de *scan* combinou o giro em 36 passos a cada  $10^\circ$  dos ângulos diedros, dessa forma se obtém a energia referente a cada conformação, e é possível então, construir um gráfico que expressa a energia total *versus* o ângulo do diedro (SEP). O primeiro diedro, das quatro chalconas, submetido ao procedimento foi o  $C2' = C1' - C_{carbonila} = O$  (numeração de acordo com a Figura 6), diedro ( $\theta$ ) da figura 14, como resultado cada uma das chalconas apresentou um gráfico (SEP) diferente, um exemplo de um dos gráficos obtidos está representado na figura a seguir.

Figura 28 – Exemplo Superfície de energia potencial de um cálculo de scan aplicado para o ângulo diedros ( $\omega$ ). O gráfico foi gerado pelo programa Gaussian 09, utilizando o nível de teoria HF/6-31G



Fonte: A autora.

Como pode-se observar, o gráfico apresenta alguns valores de mínimos, estes pontos mínimos representam as conformações de menor energia, sendo, portanto mais estáveis para cada molécula. A partir dessas conformações mais estáveis, encontradas através do giro do diedro  $\theta$  realizou-se o cálculo de superfície de energia potencial, girando desta vez o diedro  $C2 = C1 - C_\beta = C_\alpha$ , diedro ( $\tau$ ) da Figura 14. Novamente foram utilizadas as conformações de menor energia, geradas no novo gráfico, para novos cálculos de superfície de energia potencial, desta vez girando o diedro  $C_\beta = C_\alpha - C_{carbonila}$ , diedro ( $\omega$ ) da Figura 14.

Obtidas através dos cálculos de *scan* todas as estruturas mais estáveis para cada molécula, e descartadas as conformações correspondentes entre si, foram realizados cálculos

de otimização e frequência, empregando nível de teoria M06-2X/6311++G(2d, 2p), em busca da confirmação das formas de menor energia. A otimização, também conhecida como minimização de energia da geometria, é essencial para conversão das estruturas, pois visa encontrar as coordenadas que minimizem a energia potencial do confôrmero. Consiste basicamente em analisar a superfície de potencial em um sentido decrescente, chegando a um nível mínimo de energia, esse mínimo só é alcançado através dos ajustes nas posições, distorções, ângulos e contatos de toda a estrutura da molécula (ALLINGER; BURKERT, 1982, PASCUTTI, 2002). A frequência considera as vibrações moleculares de baixa energia e a correção com a energia do ponto zero (ZPE) e ainda é capaz de caracterizar as geometrias como pontos mínimos “reais” pela inexistência de frequências imaginárias (FORESMAN; FRISCH, 1996).

Ao final dos cálculos de otimização e frequência observou-se que o número de confôrmeros preferenciais encontrados para cada uma das chalconas foi diferente, como demonstra a Tabela 4.

Tabela 5 – Confôrmeros de maior estabilidade para cada uma das chalconas, suas respectivas energias totais usando o nível de teoria M06-2X/6-311++G(2d, 2p).

| <b>Composto</b>        | <b>Confôrmeros</b>       | <b>Energia Total<br/>(Hartree)</b> | <b><math>\Delta E</math><br/>(kcal.mol<sup>-1</sup>)</b> |
|------------------------|--------------------------|------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| <b>CHAL</b>            | <b>CHAL 1</b>            | -653,94986                         | 0,00                                                     |
| <b>CHAL</b>            | <b>CHAL 2</b>            | -653,94834                         | 0,91                                                     |
| <b><i>o</i>-CHALBr</b> | <b><i>o</i>-CHALBr 1</b> | -3227,5142                         | 0,00                                                     |
| <b><i>o</i>-CHALBr</b> | <b><i>o</i>-CHALBr 2</b> | -3227,5137                         | 0,14                                                     |
| <b><i>o</i>-CHALBr</b> | <b><i>o</i>-CHALBr 3</b> | -3227,5116                         | 1,67                                                     |
| <b><i>m</i>-CHALBr</b> | <b><i>m</i>-CHALBr 1</b> | -3227,5184                         | 0,00                                                     |
| <b><i>m</i>-CHALBr</b> | <b><i>m</i>-CHALBr 2</b> | -3227,5186                         | 0,01                                                     |
| <b><i>m</i>-CHALBr</b> | <b><i>m</i>-CHALBr 3</b> | -3227,5172                         | 0,72                                                     |
| <b><i>m</i>-CHALBr</b> | <b><i>m</i>-CHALBr 4</b> | -3227,517                          | 0,89                                                     |
| <b><i>p</i>-CHALBr</b> | <b><i>p</i>-CHALBr 1</b> | -3227,5191                         | 0,00                                                     |
| <b><i>p</i>-CHALBr</b> | <b><i>p</i>-CHALBr 2</b> | -3227,5177                         | 1,10                                                     |

Fonte: A autora.

Com o auxílio do programa Boltz (Boltzmann distribution), foi possível calcular as populações dos confôrmeros. O cálculo da população pela função de distribuição de Boltzman utiliza o número de conformações e a diferença de energia entre elas para fornecer a população que cada uma teria no equilíbrio em determinada temperatura.

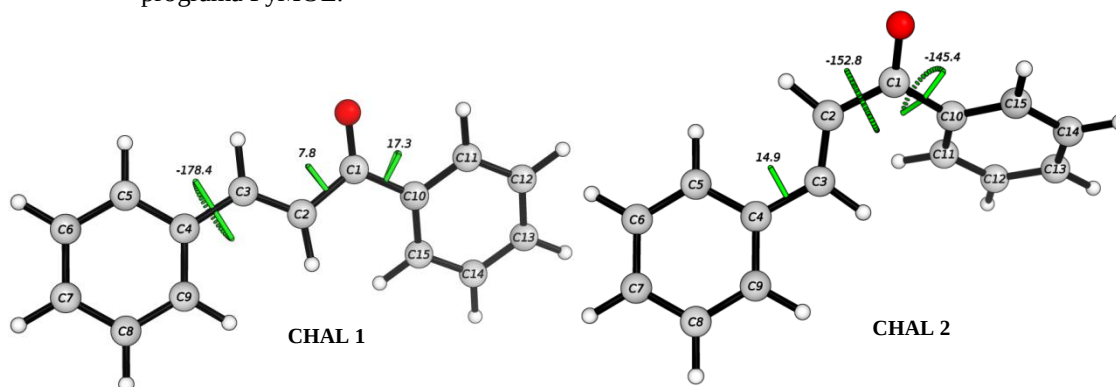
Para verificar a importância dos efeitos eletrônicos, como o efeito hiperconjugativo, interações de orbitais e deslocalização eletrônica foram realizados cálculos de NBO, desta

forma pode-se avaliar se existe alguma interação específica que determina a preferência conformacional.

#### 5.4.1 CHAL

Os dois confôrmeros preferenciais encontrados para a CHAL, estão representados na Figura 29.

Figura 29 – Confôrmeros de menor energia obtidos para a CHAL, usando o nível de teoria M06-2X/6 311++G(2d, 2p). Os ângulos diedros estão destacados em verde. Imagens obtidas através do programa PyMOL.



Fonte: A autora.

Na Tabela 06, estão apresentados os parâmetros obtidos através dos cálculos de otimização e frequência em fase isolada, como a energia associada a cada geometria, o zero point energy (ZPE), a energia total (corrigida com o ZPE e convertida para  $kcal.mol^{-1}$ ), e o valor calculado da população de cada confôrmero.

Tabela 6 – Parâmetros de energia dos confôrmeros preferenciais da CHAL, calculados em fase isolada, usando o nível de teoria M06-2X/6-311++G(2d, 2p). São apresentadas também as populações calculadas para cada confôrmero no equilíbrio.

| Confôrmeros | Energia<br>(Hartree) | ZPE<br>(Hartree) | Energia<br>( $kcal.mol^{-1}$ ) | $\Delta E$<br>( $kcal.mol^{-1}$ ) | Pop.<br>% |
|-------------|----------------------|------------------|--------------------------------|-----------------------------------|-----------|
| CHAL 1      | -653,94986           | 0,2262137        | -410217,8                      | 0,00                              | 82,3      |
| CHAL 2      | -653,94834           | 0,2261442        | -410216,9                      | 0,91                              | 17,8      |

Fonte: A autora.

A CHAL1 é  $0,9 Kcal \cdot mol^{-1}$  mais estável que o confôrmero CHAL2, fornecendo assim, uma população de 82,3% do confôrmero. Como pode-se observar na Figura 29, a estrutura tridimensional dos confôrmeros da chalcona, o confôrmero de maior estabilidade, apresenta uma geometria *s-cis* no que se refere à dupla ligação vinílica e a carbonila, fato este já esperado, pois esta conformação está descrita na literatura como a adotada preferencialmente por confôrmeros mais estáveis. de chalconas, (KOZLOWSKI et al., 2007) pois confere uma

maior planaridade a molécula e este fator tem sido relacionada à maximização do efeito hiperconjugativo.

No caso das chalconas o confômero *s-cis* é mais estável, pois parece ser totalmente plano, enquanto o impedimento estérico no confômero *s-trans* entre átomos de hidrogênio (Figura 7) leva a não planaridade da molécula, fazendo com que o ângulo  $\omega$  (Figura 14) sofra uma torção que foge muito do ideal de planaridade,  $0^\circ$  ou  $180^\circ$ . A diferença de energia entre os dois confômeros foi relatada como de  $5,6 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$  em favor do composto *s-cis*, com uma barreira de  $8,3 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$  (de *s-cis* para *s-trans*) (KOZLOWSKI, et al., 2007).

A geometria mais planar de conformações *s-cis* tem sido relacionada à maior estabilidade pela maximização do efeito hiperconjugativo (XUE; GONG, 2009). A conformação *s-cis* permite que a sobreposição entre dois orbitais (orbitais  $\pi$ ) um ligante e um antiligante seja maior, e assim existe a doação de densidade eletrônica, estabilizando a molécula. Para que as interações entre orbitais  $\pi$ , sejam efetivas, o ângulo dos diedros deve estar o quanto mais próximo de  $0^\circ$  ou  $180^\circ$ , desta forma maior será a sobreposição entre os orbitais, e por consequência maior a interação entre eles. Caso o oposto ocorra, quanto mais próximo de  $90^\circ$  o ângulo dos diedros esteja, menor a interação, pois nesses casos não se consegue ter uma boa sobreposição dos orbitais. Ao fazer a observação dos ângulos diedros na tabela a seguir concluímos que a CHAL 1 possui ângulos com tendência a uma melhor sobreposição de orbitais  $\pi$ .

Tabela 7 – Ângulos diedros em graus dos confômeros preferenciais da CHAL, calculados em fase isolada, usando o nível de teoria M06-2X/6-311++G(2d, 2p).

| Confômeros | Diedro $\theta$ | Diedro $\tau$ | Diedro $\omega$ |
|------------|-----------------|---------------|-----------------|
| CHAL 1     | 17,3            | -178,4        | 7,8             |
| CHAL 2     | -145,4          | 14,9          | -152,8          |

Fonte: A autora.

Com a intenção de analisar os efeitos envolvidos na estabilidade das conformações, foram analisados os cálculos de NBO. Estes cálculos fornecem informações para que o confômero de maior estabilidade teórica seja verificado através dos efeitos estereoeletrônicos, que são: efeitos hiperconjugativos, interações de orbitais e deslocalização eletrônica. Dentre estes, devemos analisar com maior importância o efeito hiperconjugativo, que se trata das interações entre os orbitais  $\pi$ , precisamente o orbital  $\pi$  interagindo com o orbital  $\pi^*$ , fazendo assim uma transferência de densidade eletrônica, ou seja, parte da densidade eletrônica da ligação interage com o orbital antiligante da outra ligação para ajudar na estabilização. Quando

se doa densidade eletrônica de um orbital ligante para um orbital antiligante, ocorre um abaixamento de energia, portanto um aumento na estabilidade da molécula. Como a conformação *s-cis*, devido a planaridade da molécula, favorece essas interações, se espera que as energias envolvidas sejam maiores para o confômero majoritário da CHAL 1. Posterior a análise do efeito hiperconjugativo, foram analisadas as interações entre pares de elétrons livres e orbitais  $\pi$  anti-ligantes, além de considerar também o efeito estérico em cada confômero. Para avaliar a importância dos efeitos estereoeletrônicos foram realizados cálculos de deleção total, nesse cálculo a variação de energia obtida não inclui a deslocalização eletrônica dos orbitais, com isso é possível identificar se as interações são realmente importantes para a estabilização dos confômeros.

Na Tabela 7 foram compiladas as interações entre orbitais, com o resultado da somatória da energia de interação orbital para cada grupo, não importando no caso, se doador ou receptor desta densidade, mas sim importando com a quantidade de energia envolvida em cada uma dessas interações.

Tabela 8 – Principais interações orbitais, efeito estérico e variação de energia por deleção. Cálculo de NBO, usando o nível de teoria M06-2X/6-311++G(2d,2p), para os confômeros preferenciais da CHAL.

| <b>Interações orbitais (kcal.mol<sup>-1</sup>)</b>                                          | <b>CHAL 1</b> | <b>CHAL 2</b> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|---------------|
| <b>Interações <math>\pi \rightarrow \pi^*</math> ou <math>\eta \rightarrow \pi^*</math></b> |               |               |
| <b>Dupla ligação vinílica e Carbonila</b>                                                   | 27,27         | 25,39         |
| <b>Dupla ligação vinílica e Anel B</b>                                                      | 30,95         | 28,72         |
| <b>Carbonila e Anel A</b>                                                                   | 23,15         | 18,13         |
| <b>Anel B</b>                                                                               | 166,55        | 167,56        |
| <b>Anel A</b>                                                                               | 168,04        | 169,48        |
| <b>Par de Elétrons do Oxigênio</b>                                                          | 51,39         | 49,37         |
| <b>Total</b>                                                                                | <b>467,35</b> | <b>458,65</b> |
| <b>Efeito Estérico</b>                                                                      | 416,98        | 414,83        |
| <b>Variação de Energia</b>                                                                  | 1061,7890     | 1057,4830     |

Fonte: A autora.

Como previsto, confirma-se através dos cálculos de NBO que a estabilidade maior da CHAL1 está relacionada com as energias de interação. A planaridade da molécula *s-cis* favoreceu as interações de orbitais  $\pi \rightarrow \pi^*$ , que na maioria dos grupos analisados é mais alta para a conformação de maior estabilidade, sendo a energia total, também a mais alta. Quanto maior o valor da energia total, mais estabilidade foi conferido ao confômero. Pode-se perceber também que a conjugação entre a carbonila e o anel aromático adjacente é maior no confômero

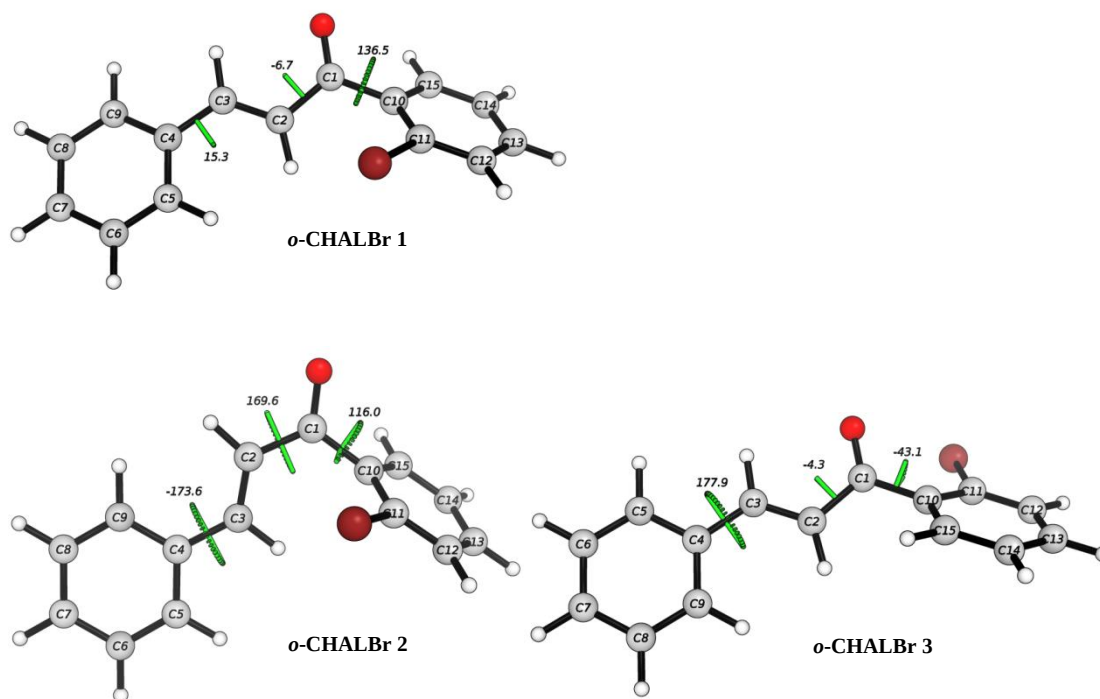
preferencial, coincidindo de forma clara com o ângulo diedro  $\theta$ , onde, conforme discutido anteriormente proporciona ao diedro uma angulação de melhor interação.

Através dos valores de deleção, podemos afirmar que, quem possui a maior variação de energia possui maior estabilidade por efeito hiperconjugativo. Ambas conformações tinham um peso grande de estabilização por hiperconjugações, porém a CHAL1 apresenta um valor maior.

#### 5.4.2 *o*-CHALBr

Os três confôrmeros que fazem parte do equilíbrio conformacional para a *o*-CHALBr, estão representados na Figura 30.

Figura 30 – Confôrmeros de menor energia obtidos para *o*-CHALBr, usando o nível de teoria M06-2X/6 311++G(2d, 2p). Os ângulos diedros estão destacados em verde. Imagens obtidas através do programa PyMOL.



Fonte: A autora.

Na Tabela 8, foram apresentados os parâmetros obtidos através dos cálculos de otimização e frequência em fase isolada, como a energia associada a cada geometria, o zero point energy (ZPE), a energia total (corrigida com o ZPE e convertida para  $kcal.mol^{-1}$ ) e o valor calculado da população de cada confôrmero.

Tabela 9 – Parâmetros de energia dos confôrmeros preferenciais da *o*-CHALBr, calculados em fase isolada, usando o nível de teoria M06-2X/6-311++G(2d, 2p). São apresentadas também as

populações calculadas para cada conformero no equilíbrio.

| Confôrmers               | Energia<br>(Hartree) | ZPE<br>(Hartree) | Energia<br>(kcal.mol <sup>-1</sup> ) | $\Delta E$<br>(kcal.mol <sup>-1</sup> ) | Pop.<br>% |
|--------------------------|----------------------|------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------|-----------|
| <b><i>o</i>-CHALBr 1</b> | -3227,5142           | 0,2162114        | -2025160                             | 0,00                                    | 54,1      |
| <b><i>o</i>-CHALBr 2</b> | -3227,5137           | 0,2159345        | -2025160                             | 0,14                                    | 42,7      |
| <b><i>o</i>-CHALBr 3</b> | -3227,5116           | 0,2162993        | -2025158                             | 1,67                                    | 3,2       |

Fonte: A autora.

A *o*-CHALBr 1 é a conformação de menor energia, 0,14Kcal · mol<sup>-1</sup> mais estável que a conformação *o*-CHALBr 2, fornecendo uma população de 54,1% no equilíbrio e apresentando orientação *s-cis*, o que novamente apresenta concordância com a literatura, como já citado na seção anterior.

Observando-se a representação tridimensional das conformações *o*-CHALBr 1, *o*-CHALBr 2 e *o*-CHALBr 3, na Figura 30, percebemos o aspecto mais plano das conformações *s-cis* *o*-CHALBr 1 e *o*-CHALBr 3. Ao analisar os ângulos diedros (Tabela 9), tendo em vista a planaridade com ângulos mais próximos de 0° e 180°, verificamos que esse requisito é mais bem atendido por ambas as conformações *s-cis*, e ainda pode-se afirmar que se a estabilidade da molécula fosse devido ao único fator de angulação que confere maior planaridade, poderíamos prever que a *o*-CHALBr 3 seria a conformação de maior estabilidade, pois as sobreposições entre orbitais estão sendo favorecidas, e por consequência, maior é a interação entre eles. Porém este conformero fica em terceira opção quanto a sua estabilidade e apresenta uma população de apenas 3,2% no equilíbrio, apesar de ser possivelmente mais bem estabilizada pelo efeito conjugativo, devem-se analisar outros fatores que estão contribuindo para esta instabilidade conferida à molécula.

Tabela 10 – Ângulos diedros em graus dos confôrmers preferenciais da *o*-CHAL, calculados em fase isolada, usando o nível de teoria M06-2X/6-311++G(2d, 2p).

| Confôrmers               | Diedro $\theta$ | Diedro $\tau$ | Diedro $\omega$ |
|--------------------------|-----------------|---------------|-----------------|
| <b><i>o</i>-CHALBr 1</b> | 136,5           | -6,7          | 15,3            |
| <b><i>o</i>-CHALBr 2</b> | 116,0           | 169,6         | -173,6          |
| <b><i>o</i>-CHALBr 3</b> | -43,1           | -4,3          | 177,9           |

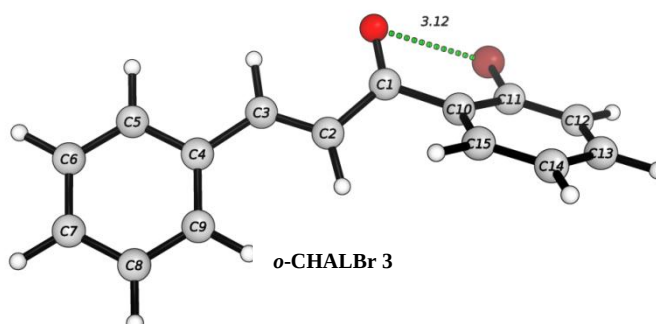
Fonte: A autora.

Observando novamente a representação tridimensional da *o*-CHALBr, em relação ao substituinte bromo, algumas vezes a posição do halogênio muito próxima ao oxigênio, acaba causando repulsão. Como são grupos fortemente negativos, ocorre repulsão e isso é um fator desestabilizante. A Figura 31, mostrou que existe essa grande proximidade entre o átomo de



oxigênio da carbonila e o átomo de bromo, com uma distância de apenas 3,12 Å. O que causa um significativo efeito estérico (repulsão eletrostática) e desestabiliza a conformação.

Figura 31 – Confômero *o*-CHALBr3. A distância entre os átomos de Oxigênio e Bromo (3,12 Å) está destacada em verde. Imagem obtidas através do programa PyMOL.



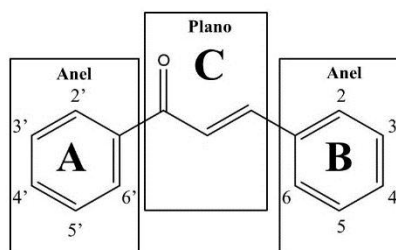
Fonte: A autora.

Como citado anteriormente, amplos estudos já foram realizados no que se diz respeito ao equilíbrio conformacional de diversas chalconas, em relação as conformações *s-cis* e *s-trans*, e a forma termodinamicamente mais estável, que consequentemente a maioria das chalconas apresenta é o isômero *s-cis* (LARSEN; et al 2005).

Mesmo com tais dados literários, ao analisar a conformação *s-trans* da *o*-CHALBr 3, observamos que a mesma teve uma população expressiva de 42,7%. Estudos realizados por Butterworth (1996), investigaram a estabilidade da conformação *s-trans* em relação a *s-cis*, devido a fortes efeitos estéricos, entre a carbonila e o anel aromático adjacente que fazem com que a configuração *s-cis* perca estabilidade.

Ao analisar a estrutura base das chalconas como na figura a seguir, dividindo-a em três partes, que normalmente estão coplanares entre si, consistem em um Anel A, um Anel B e um Plano C (Figura 32), as ligações simples que unem estas partes podem sofrer modificações angulares e conferir a molécula uma conformação diferenciada (AKSÖZ; ERTAN, 2012).

Figura 32 – Estrutura base de uma chalcona, mostrando suas três partes planas.



Fonte: A autora.

A conformação molecular mais estável será determinada pelo equilíbrio de duas forças concorrentes entre si, a estabilizante devido a deslocalização eletrônica e à sobreposição de orbitais, e a desestabilizante devido ao efeito estérico. A estabilização devido ao favorecimento da deslocalização eletrônica e à sobreposição de orbitais que favorece as interações de orbitais  $\pi \rightarrow \pi^*$ , é maior quando toda a molécula é planar. Porém, existe uma repulsão estérica, principalmente entre os hidrogênios vinílicos e aromáticos quando a molécula encontra-se nesta conformação (BUTTERWORTH 1996).

O anel A enfrenta um impedimento estérico, ocasionado devido à posição do oxigênio da carbonila, maior do que o enfrentado pelo anel B, conseqüentemente a estabilização e as forças repulsivas entre o anel A e o plano C estão mais equilibradas. Desta forma o ângulo  $\theta$ , referente ao diedro entre o anel A e o plano C determinará a conformação (*s-cis* ou *s-trans*), que será a preferencial (BUTTERWORTH 1996).

Sem substituintes no anel A, o diedro se adequará em um ângulo  $\alpha$  que irá conferir uma maior planaridade a molécula, porém quando existe a inserção de grupos substituintes em posição *orto* no anel A (carbonos 2' e 6'), este tende a um caráter de maior perpendicularidade em relação ao resto da molécula. Estudos realizados por Xue e Gong (2009) relataram que em alguns casos a conformação *s-trans* pode chegar a ser  $4,8 \text{ kcal. mol}^{-1}$  mais estável que a *s-cis*. Já, a inserção de substituintes apenas no anel B não parece interferir expressivamente na coplanaridade entre o anel B e a molécula, visto que a conjugação do anel A com a carbonila é uma força estabilizadora dominante (BUTTERWORTH 1996). Mesmo o confômero *s-cis* sendo reconhecido como o mais estável na maioria das vezes para as chalconas, devido ao grande obstáculo estérico entre o oxigênio da carbonila e átomo de bromo ligado ao carbono, na posição *orto* do anel, fez com que a segunda conformação em preferência molecular apresentasse o confômero *s-trans*. O previsto é que confômeros *s-cis* também não seja totalmente planar (AKSÖZ; ERTAN, 2012).

Daqui em diante, foram analisados os resultados dos cálculos de NBO (Tabela 11), para investigar possíveis efeitos estabilizantes e desestabilizantes destes confômeros preferenciais da chalcona bromada na posição *orto*. Como pode ser observado, grande parte das energias de interação de orbitais é maior para a *o*-CHALBr 3, a conjugação entre a carbonila e o anel aromático adjacente é expressivamente maior do que a *o*-CHALBr 2, a energia total também, isso mostra o peso da estabilização por essas interações. Julgando apenas o efeito

hiperconjugativo se esperaria que o conformero *o*-CHALBr 3, fosse o mais estável, mas por causa da repulsão eletrostático, que é predominante neste caso, se torna a menos estável.

Tabela 11 – Principais interações orbitais, efeito estérico e variação de energia por deleção. Cálculo de NBO, usando o nível de teoria M06-2X/6-311++G(2d, 2p), para os conformeros preferenciais da *o*-CHAL.

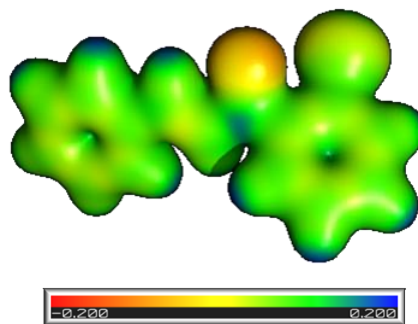
| Interações orbitais (kcal.mol <sup>-1</sup> )                  | <i>o</i> -CHALBr 1 | <i>o</i> -CHALBr 2 | <i>o</i> -CHALBr 3 |
|----------------------------------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Interações $\pi \rightarrow \pi^*$ ou $\eta \rightarrow \pi^*$ |                    |                    |                    |
| Dupla ligação vinílica e Carbonila                             | 28,72              | 30,46              | 27,74              |
| Dupla ligação vinílica e Anel B                                | 29,17              | 30,47              | 31,20              |
| Carbonila e Anel A                                             | 11,47              | 4,19               | 12,89              |
| Anel B                                                         | 167,47             | 166,72             | 166,40             |
| Anel A                                                         | 168,07             | 169,07             | 169,86             |
| Par de Elétrons do Oxigênio                                    | 51,94              | 51,42              | 52,75              |
| Par de Elétrons do Bromo                                       | 24,92              | 25,75              | 26,33              |
| <b>Total</b>                                                   | <b>481,76</b>      | <b>478,08</b>      | <b>487,17</b>      |
| Efeito Estérico                                                | 444,24             | 441,61             | 442,59             |
| Variação de Energia                                            | 1113,4260          | 1114,3480          | 1114,8070          |

Fonte: A autora.

Confirma-se o caráter estabilizador pelo efeito de deslocalização eletrônica nas conformações *o*-CHALBr 1 e *o*-CHALBr 3 (ambas conformações *s-cis*) através da soma dos valores de energia referentes às interações entre orbitais, as quais apresentam valores maiores para ambas, sendo a *o*-CHALBr 3 a que apresentou o maior valor. Isso mostra a contribuição da estabilização por essas interações e ainda realizando a comparação entre os valores de efeito estérico para estes conformeros *s-cis*, percebe-se que a estabilidade é mais favorável para a *o*-CHALBr 3, que possui o valor menor. A julgar estes fatores espera-se que o conformero *o*-CHALBr 3 fosse o mais estável e assim de maior abundância no equilíbrio, mas como citado anteriormente a grande proximidade entre o átomo de oxigênio da carbonila e o átomo de bromo (3,12 Å), faz com que o efeito eletrostático seja predominante neste caso, fornecendo ao conformero *o*-CHALBr 3 a menor porcentagem populacional.

Com a intenção de verifica-se a interferência do efeito eletrostático e o padrão de polaridade nesta conformação, foi gerado o mapa de potencial eletrostático (MPE), a partir da estrutura otimizada da *o*-CHALBr 3, utilizando nível de teoria: M06-2X/6-311++G(2d, 2p). Como esperado, a maior distribuição da densidade eletrônica encontra-se sobre o átomo de oxigênio, em função da polarização da carbonila (coloração mais próximo do vermelho), o que também ocorre sobre o substituinte bromo (coloração mais próxima do amarelo) (Figura 33). Isto mostra que o efeito eletrostático desempenha papel importante na desestabilização da *o*-CHALBr 3.

Figura 33 – Mapa de potencial eletrostático da *o*-CHALBr 3, gerado a partir da estrutura otimizada com o nível de teoria M06-2X/6-311++G(2d, 2p). Imagem obtida através do programa PYMOL.



Fonte: A autora.

Continuando à análise das geometrias em *s-cis* observou-se que conjugação entre a carbonila e o anel aromático adjacente a ela é expressivamente maior para ambas, coincidindo de forma clara com o ângulo diedro  $\alpha$  onde, conforme discutido anteriormente, ocorre maior planaridade do anel com o restante da molécula.

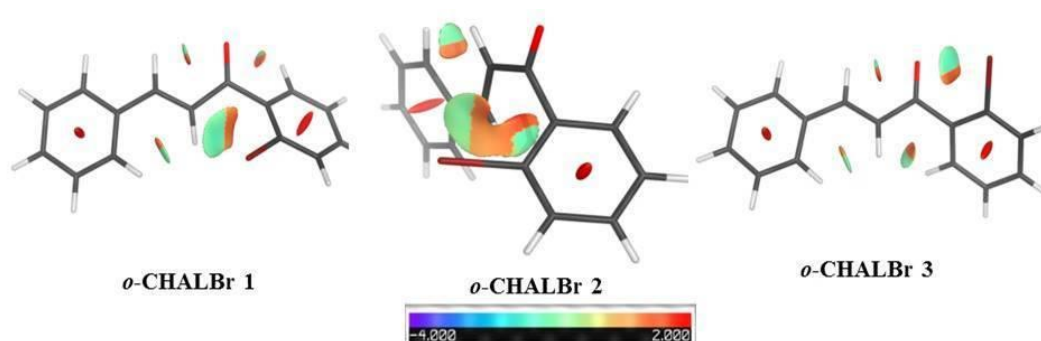
Como também constatado nos estudos de Butterworth (1996); Xue e Gong (2009) e Aksöz e Ertan (2012), o conformero *s-trans* (*o*-CHALBr 2) apresentou o menor efeito estérico dentre as conformações, já que a repulsão estérica é menor na conformação *s-trans*. O balanço de forças desestabilizantes (menor efeito estérico) e estabilizantes (menor deslocalização eletrônica) tornam esse conformero termodinamicamente estável, com uma população expressiva.

Em relação a maior variação de energia, que representa a deleção, pode-se verificar que a conformação *o*-CHALBr 3 possui maior estabilidade devido ao efeito hiperconjugativo.

#### 5.4.2.1 Análise de superfície de NCI *o*-CHALBr

Devido a tendência da chalcona *orto* substituída, em apresentar uma população expressiva de conformero *s-trans*, e levando em consideração que o efeito conjugativo e o efeito estérico são importantes no equilíbrio conformacional, porem sozinhos não explicam o comportamento de alguns dos compostos. Foram realizados os cálculos de superfícies de interações não covalentes para os conformeros preferenciais da chalcona *orto*-substituídas (Figura 34), para investigar outras interações químicas que estariam influenciando na estabilidade. As interações do tipo van der Waals, são de coloração verde com valores de densidade eletrônica próximos de zero e as interações estéricas são de coloração vermelha. O efeito estérico pode ser observado no interior dos anéis benzênicos (ROZADA, 2015).

Figura 34 – Superfícies de interação não covalente dos confôrmeros da *o*-CHALBr substituídos, nível de teoria M06-2X/6-311++G(2d, 2p). Imagens obtidas através do programa PyMOL.



Fonte: A autora.

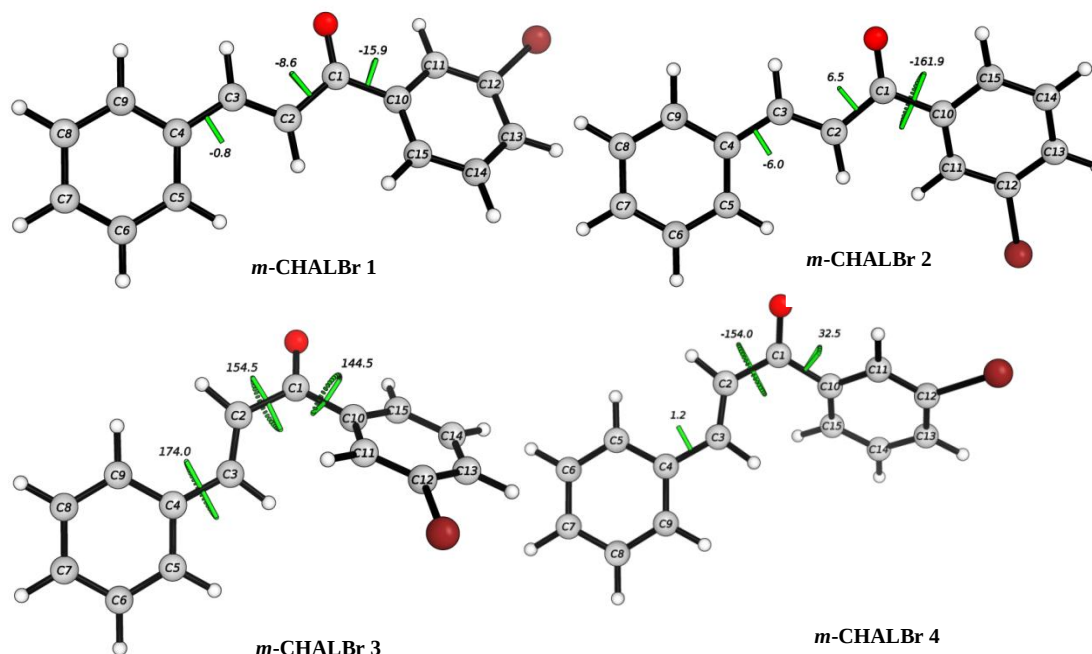
As três superfícies demonstram, a presença de interações estabilizantes do tipo van der Waals, associadas a um componente desestabilizante, o efeito estérico. Porém percebemos que nas conformações *s-cis*, as interações são relativamente menores aos comparadas com a geometria *s-trans*, e se situam entre o hidrogênio  $\alpha$  e hidrogênios aromáticos, e entre o hidrogênio  $\beta$  e o oxigênio da carbonila. Na *o*-CHALBr 1 ocorre uma superfície de interação entre o oxigênio da carbonila e um hidrogênio aromático do anel A, além de uma interação maior entre o substituinte bromo e o hidrogênio  $\alpha$ . Já, na *o*-CHALBr 3, embora mantida a orientação *s-cis*, a mudança da posição do anel substituído em relação à carbonila faz com que o bromo passe a interagir com o átomo de oxigênio da carbonila. Entretanto, a superfície de interação, neste caso, é menor. Este fato, associado à repulsão de cargas que é esperada entre Bromo e oxigênio, auxilia no entendimento da maior população de confôrmeros *o*-CHALBr 1 no equilíbrio se comparados a conformação *s-cis* *o*-CHALBr 3.

Na geometria *s-trans*, ocorre uma superfície maior de interação entre o hidrogênio  $\alpha$  e um hidrogênio aromático do anel B. Além de uma superfície consideravelmente mais extensa localizada entre o hidrogênio  $\beta$  e o substituinte *orto*.

#### 5.4.3 *m*-CHALBr

Os confôrmeros envolvidos no equilíbrio da *m*-CHALBr, estão representados na Figura 35.

Figura 35 – Confôrmeros de menor energia obtidos para *m*-CHALBr, usando o nível de teoria M06-2X/6 311++G(2d, 2p). Os ângulos diedros estão destacados em verde. Imagens obtidas através do programa PyMOL.



Fonte: A autora.

Na Tabela 12, estão apresentados os parâmetros obtidos através dos cálculos de otimização e frequência em fase isolada, como a energia associada a cada geometria, o zero point energy (ZPE), a energia total (corrigida com o ZPE e convertida para  $kcal.mol^{-1}$ ) e o valor calculado da população de cada conformero.

Tabela 12 – Parâmetros de energia dos conformeros preferenciais da *m*-CHALBr, calculados em fase isolada, usando o nível de teoria M06-2X/6-311++G(2d, 2p). São apresentadas também as populações calculadas para cada conformero no equilíbrio.

| Conformeros        | Energia<br>(Hartree) | ZPE<br>(Hartree) | Energia<br>( $kcal.mol^{-1}$ ) | $\Delta E$<br>( $kcal.mol^{-1}$ ) | Pop.<br>% |
|--------------------|----------------------|------------------|--------------------------------|-----------------------------------|-----------|
| <i>m</i> -CHALBr 1 | -3227,5184           | 0,2162923        | -2025162                       | 0,00                              | 40,0      |
| <i>m</i> -CHALBr 2 | -3227,5186           | 0,2164725        | -2025162                       | 0,01                              | 39,3      |
| <i>m</i> -CHALBr 3 | -3227,5172           | 0,2161951        | -2025162                       | 0,72                              | 11,9      |
| <i>m</i> -CHALBr 4 | -3227,517            | 0,2163313        | -2025161                       | 0,89                              | 8,9       |

Fonte: A autora.

Os cálculos de otimização mostraram que a chalcona bromada substituída na posição *meta* apresentou o conformero *m*-CHALBr 1 mais estável, apenas  $0,01 kcal.mol^{-1}$  em relação ao conformero *m*-CHALBr 2. Essa diferença irrisória se deve à similaridade nas características estruturais, que confere uma proximidade extremamente grande em relação a todos os resultados calculados teoricamente. Observando-se as estruturas tridimensionais das duas conformações de maior estabilidade, é possível verificar a similaridade dos dois ângulos diedros  $\tau$  e  $\omega$ , sendo que comparando os ângulos  $\theta$  notou-se que o diedro teve uma torção próxima de  $180^\circ$ , fazendo com que os átomos experimentassem um ambiente químico semelhante. O equilíbrio conformacional deste composto é caracterizado pela predominância da geometria s-

*cis*, característica dos dois conformêros de menor energia, a somatória das populações das geometrias mais estáveis ficou muito próxima de 80%.

Ainda se observou a presença de duas conformações de geometria *s-trans* bem menos abundantes, *m*-CHALBr 3 e *m*-CHALBr 4, com uma contribuição populacional de apenas 20% (11,9% e 8,9% respectivamente) estes conformêros também apresentaram certa similaridade entre si.

Na comparação referente aos ângulos diedros, utilizando os dados da Tabela 13, verificou-se a maior proximidade angular de 0° ou 180°, em todos os diedros das conformações *s-cis*, *m*-CHALBr1 e *m*-CHALBr2, comprovando o que pode-se prever ao analisar a estrutura tridimensional dos conformêros na Figura 35.

Tabela 13 – Ângulos diedros em graus dos conformêros preferenciais da *m*-CHALBr, calculados em fase isolada, usando o nível de teoria M06-2X/6-311++G(2d, 2p).

| Conformêros        | Diedro $\theta$ | Diedro $\tau$ | Diedro $\omega$ |
|--------------------|-----------------|---------------|-----------------|
| <i>m</i> -CHALBr 1 | -15,9           | -0,8          | -8,6            |
| <i>m</i> -CHALBr 2 | -161,9          | -6,0          | 6,5             |
| <i>m</i> -CHALBr 3 | 144,5           | 174,0         | 154,5           |
| <i>m</i> -CHALBr 4 | 32,5            | 1,2           | -154,0          |

Fonte: A autora.

Com a intenção de analisar os efeitos envolvidos na estabilidade das conformações, foram analisados os dados obtidos a partir dos cálculos de NBO (Tabela 13).

Tabela 14 – Principais interações orbitais, efeito estérico e variação de energia por deleção. Cálculo de NBO, usando o nível de teoria M06-2X/6-311++G(2d, 2p), para os conformêros preferenciais da *m*-CHALBr.

| Interações orbitais (kcal.mol <sup>-1</sup> )                  | <i>m</i> -CHAL 1 | <i>m</i> -CHAL 2 | <i>m</i> -CHAL 3 | <i>m</i> -CHAL 4 |
|----------------------------------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Interações $\pi \rightarrow \pi^*$ ou $\eta \rightarrow \pi^*$ |                  |                  |                  |                  |
| Dupla ligação vinílica e Carbonila                             | 27,88            | 28,18            | 26,64            | 26,24            |
| Dupla ligação vinílica e Anel B                                | 31,21            | 30,97            | 30,18            | 30,12            |
| Carbonila e Anel A                                             | 22,53            | 22,53            | 17,00            | 16,79            |
| Anel B                                                         | 166,40           | 166,59           | 166,79           | 166,64           |
| Anel A                                                         | 167,57           | 168,78           | 170,24           | 169,04           |
| Par de Elétrons do Oxigênio                                    | 51,29            | 51,16            | 49,56            | 49,87            |
| Par de Elétrons do Bromo                                       | 24,10            | 23,96            | 24,43            | 24,09            |
| <b>Total</b>                                                   | <b>490,98</b>    | <b>492,17</b>    | <b>484,84</b>    | <b>482,79</b>    |
| Efeito Estérico                                                | 437,20           | 438,44           | 438,64           | 436,22           |
| <b>Variação de Energia</b>                                     | <b>1110,3310</b> | <b>1112,6120</b> | <b>1110,1340</b> | <b>1107,7440</b> |

Fonte: A autora.

O efeito hiperconjugativo, forneceu estabilidade através das interações entre orbitais  $\pi$  e  $\pi^*$ . Analisando as estruturas tridimensionais de ambas as conformações *s-cis* (Figura 35), percebe-se que a grande planaridade da molécula está fazendo com que os orbitais estejam alinhados favorecendo as interações e a estabilidade da molécula, como verificado na Tabela 13, a energia total para estas moléculas é relativamente maior, se comparadas com as mesmas energias para as moléculas de conformação *s-trans*. Observou-se também que a principal interação que leva a estabilização das conformações *s-cis*, é a conjugação entre a carbonila e o anel aromático adjacente a mesma. Este valor está coincidindo com a proximidade do ângulo diedro  $\theta$ , em  $0^\circ$  ou  $180^\circ$ , estabelecendo um caráter de maior planaridade a estes confôrmeros.

Além da energia total, verificou-se que a maior estabilidade está relacionada com as energias de interação, através da variação de energia, depois de remover as interações hiperconjugativas. A geometria que apresentou a maior variação é a, *s-cis m-CHALBr2*, mas tanto a, *s-trans m-CHALBr 3* quanto a, *s-cis m-CHALBr1* possuem um considerável peso de estabilização por hiperconjugações. Porém ao fazer uma comparação com as suas respectivas energias totais de interação entre os orbitais  $\pi$  e  $\pi^*$ , percebeu-se que a interação da *s-cis m-CHALBr 1* é muito maior do que a *s-trans m-CHALBr3*. Isso ajuda a explicar porque a *s-trans m-CHALBr3* tem uma pequena diferença de variação de energia em relação a *s-cis m-CHALBr1*. Pois mesmo possuindo um efeito hiperconjugativo relativamente grande que estabiliza o confôrmeros *m-CHALBr3*, não possui os efeitos de ressonância tão mensuráveis quanto nas outras conformações com maior planaridade (*s-cis*).

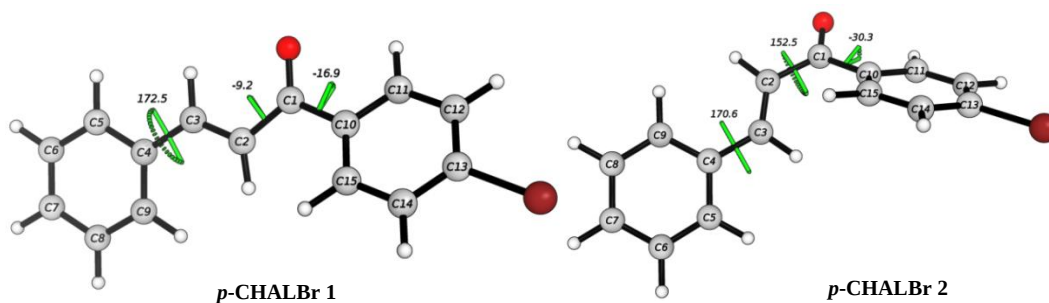
O efeito estérico (desestabilizante) é menor para *s-trans m-CHALBr4*, porém é a que possui menor interação hiperconjugativa, e maior energia relativa. Portanto, a menos estável, pois no balanço de forças que estabilizam ou desestabilizam o confôrmero, existe apenas o efeito estérico a seu favor.

#### 5.4.3.1 *p-CHALBr*

Os dois confôrmeros preferenciais encontrados para a *p-CHALBr*, estão representados na Figura 36.

Figura 36 – Confôrmeros de menor energia obtidos para *p-CHALBr*, usando o nível de teoria M06-2X/6 311++G(2d, 2p). Os ângulos diedros estão destacados em verde. Imagens obtidas através do programa PyMOL.





Fonte: A autora.

Na Tabela 15, estão apresentados os parâmetros obtidos através dos cálculos de otimização e frequência em fase isolada, como a energia associada a cada geometria, o zero point energy (ZPE), a energia total (corrigida com o ZPE e convertida para  $kcal.mol^{-1}$ ) e o valor calculado da população de cada conformero.

Tabela 15 – Parâmetros de energia dos conformeros preferenciais da *p*-CHALBr, calculados em fase isolada, usando o nível de teoria M06-2X/6-311++G(2d, 2p). São apresentadas também as populações calculadas para cada conformero no equilíbrio.

| Conformeros        | Energia (Hartree) | ZPE (Hartree) | Energia ( $kcal.mol^{-1}$ ) | $\Delta E$ ( $kcal.mol^{-1}$ ) | Pop. % |
|--------------------|-------------------|---------------|-----------------------------|--------------------------------|--------|
| <i>p</i> -CHALBr 1 | -3227,5191        | 0,2161617     | -2025163,2                  | 0,00                           | 86,5   |
| <i>p</i> -CHALBr 2 | -3227,5177        | 0,2165286     | -2025162,1                  | 1,10                           | 13,5   |

Fonte: A autora.

Os cálculos de otimização mostraram que a chalcona bromada substituída na posição *para* apresentou dois conformeros, sendo a *p*-CHALBr 1 de conformação *s-cis*,  $1,1 kcal.mol^{-1}$  mais estável em relação ao conformero *p*-CHALBr 2 de conformação *s-trans*. Novamente o equilíbrio conformacional deste composto é caracterizado pela predominância da geometria *s-cis*, em conformidade com os dados da literatura, e apresentou uma população 86,5% no equilíbrio.

Tabela 16 – Ângulos diedros em graus dos conformeros preferenciais da *p*-CHALBr, calculados em fase isolada, usando o nível de teoria M06-2X/6-311++G(2d, 2p).

| Conformeros        | Diedro $\theta$ | Diedro $\tau$ | Diedro $\omega$ |
|--------------------|-----------------|---------------|-----------------|
| <i>p</i> -CHALBr 1 | -16,9           | 172,5         | -9,2            |
| <i>p</i> -CHALBr 2 | -30,3           | 170,6         | 152,5           |

Fonte: A autora.

Observando-se a representação tridimensional das conformações (Figura 38), o conformero mais estável apresentou uma organização mais plana em sua geometria, o que fica confirmado através da análise dos ângulos diedros, que ficaram mais próximos de  $0^\circ$  e  $180^\circ$ . Verificou-se ainda, que esse requisito é melhor atendido pela *p*-CHALBr 1 em comparação com

todas as outras chalconas, analisadas neste trabalho, e também foi a que apresentou a maior porcentagem populacional em relação as demais. Tal fato pode estar relacionado, com a maior planaridade também apresentada, favorecendo a deslocalização eletrônica, que tem caráter estabilizador.

Analisando o confômero preferencial da *p*-CHALBr 1 (Tabela 16), verificou-se mais uma vez a maior estabilização da geometria *s-cis* por efeito hiperconjugativo, onde praticamente todas as energias são maiores para o confômero mais estável, sendo uma das mais expressiva a energia do anel adjacente a carbonila, mostrando que esta sobreposição de orbitais e a deslocalização eletrônica contribuíram na estabilidade deste confômero. O aumento do efeito hiperconjugativo devido a planaridade da geometria, nos mostra mais uma vez que este é um dos fatores de maior importância, responsável pela porcentagem populacional tão significativa para este confômero no equilíbrio. Ao analisar o confômero *s-trans*, podemos observar que este apresenta um efeito estérico menor, o que possivelmente contribui para estabilizá-lo termodinamicamente.

Tabela 17 – Principais interações orbitais, efeito estérico e variação de energia por deleção. Cálculo de NBO, usando o nível de teoria M06-2X/6-311++G(2d, 2p), para os confômeros preferenciais da *p*-CHALBr.

| <b>Interações orbitais (kcal.mol<sup>-1</sup>)</b>                                          | <b><i>p</i>-CHALBr 1</b> | <b><i>p</i>-CHALBr 2</b> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <b>Interações <math>\pi \rightarrow \pi^*</math> ou <math>\eta \rightarrow \pi^*</math></b> |                          |                          |
| <b>Dupla ligação vinílica e Carbonila</b>                                                   | 27,59                    | 25,61                    |
| <b>Dupla ligação vinílica e Anel B</b>                                                      | 30,77                    | 29,63                    |
| <b>Carbonila e Anel A</b>                                                                   | 23,06                    | 18,21                    |
| <b>Anel B</b>                                                                               | 166,66                   | 166,99                   |
| <b>Anel A</b>                                                                               | 185,40                   | 168,41                   |
| <b>Par de Elétrons do Oxigênio</b>                                                          | 51,61                    | 49,53                    |
| <b>Par de Elétrons do Bromo</b>                                                             | 24,40                    | 24,77                    |
| <b>Total</b>                                                                                | <b>509,49</b>            | <b>483,15</b>            |
| <b>Efeito Estérico</b>                                                                      | 437,86                   | 436,90                   |
| <b>Variação de Energia</b>                                                                  | 1112,4900                | 1109,3320                |

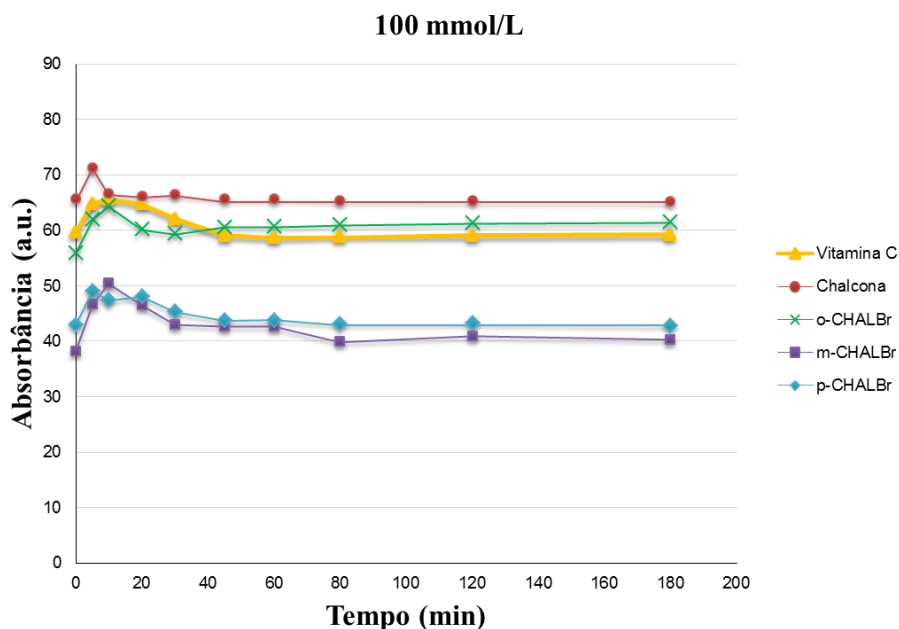
Fonte: A autora.

## 5.5 ANÁLISE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH

A seguir é apresentado os resultados obtidos através da avaliação da atividade antioxidante das quatro chalconas sintetizadas, comparadas à vitamina C, nas concentrações de 20, 30, 50 e 100 mmol.L<sup>-1</sup>, em função do tempo.

Analisando o gráfico (Figura 37) para a concentração de  $100 \text{ mmol.L}^{-1}$  das amostras, verifica-se que a CHAL apresenta uma atividade antioxidante alta, que supera a atividade da vitamina C. Isto demonstra que um estudo mais detalhado, empregando outros métodos que avaliem a atividade antioxidante, deve ser realizado, em trabalhos futuros.

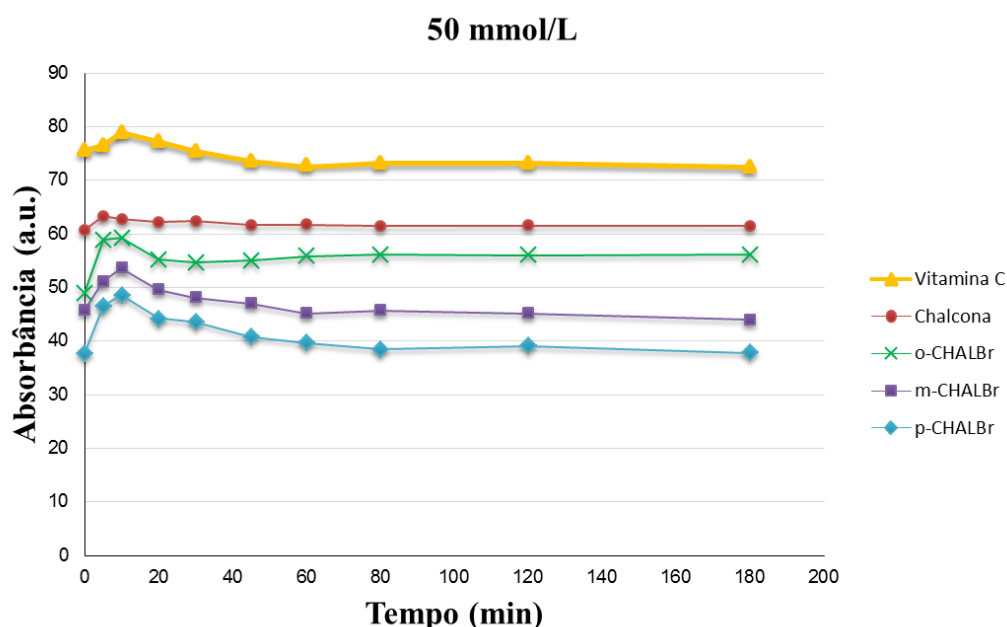
Figura 37 – Atividade antioxidante utilizando concentração de  $100 \text{ mmol.L}^{-1}$  das amostras.



Fonte: A autora.

Analisando-se o gráfico (Figura 38) para a concentração de  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$  das amostras, verifica-se novamente a CHAL com uma atividade antioxidante consideravelmente alta, que chega próximo aos valores da vitamina C. A substituição de um átomo de bromo na posição *orto* do anel aromático, nesta concentração, faz com que a capacidade antioxidante da chalcona sofra uma pequena diminuição. Já quando o bromo é substituído nas posições *meta* e *para* a atividade antioxidante sofre um maior declínio.

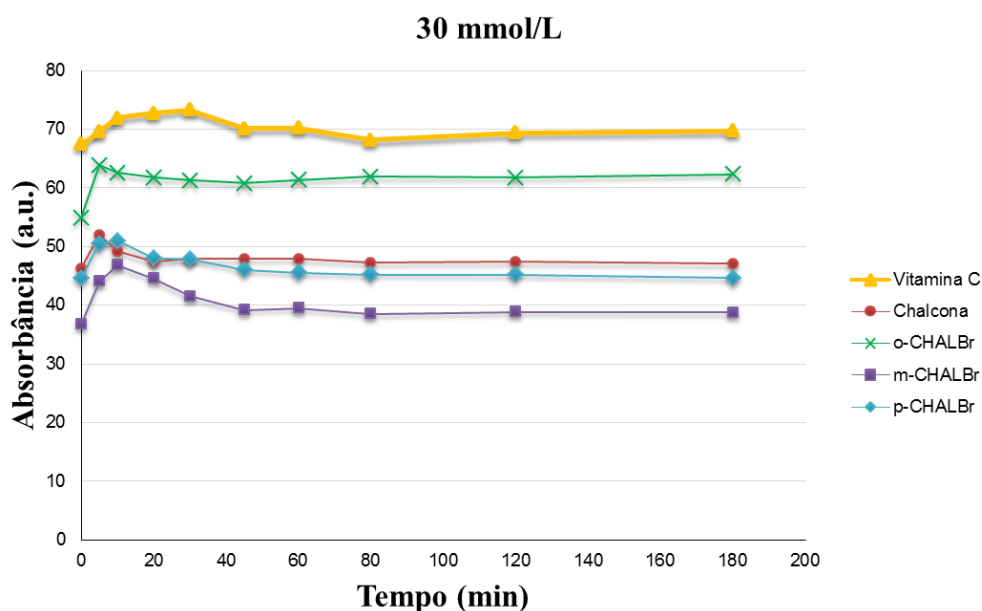
Figura 38 – Atividade antioxidante utilizando concentração de  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$  das amostras.



Fonte: A autora.

Nas concentrações de  $30 \text{ mmol.L}^{-1}$  das amostras, (Figura 39) ocorre uma inversão das atividades antioxidantes, sendo que a o-CHALBr supera os valores da CHAL, chegando muito próximo dos valores calculados para a vitamina C. Bromo como substituinte nas posições *meta* e *para*, nesta concentração, não auxiliam num aumento da atividade, sendo que a chalcona sem substituinte superou os valores da atividade antioxidante de ambas.

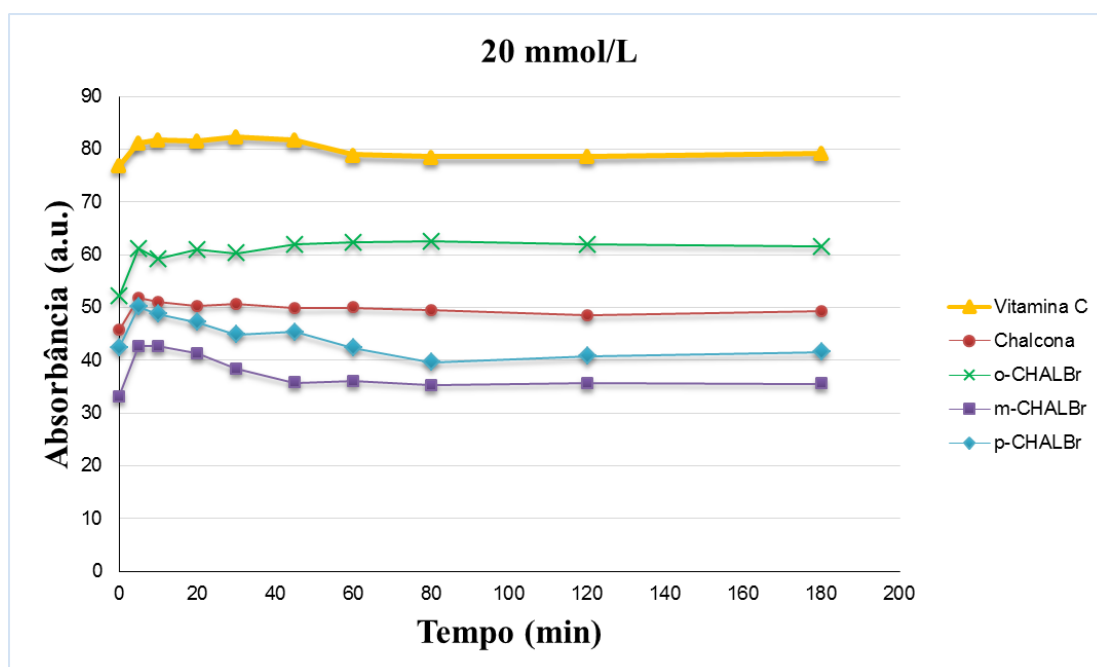
Figura 39 – Atividade antioxidante utilizando concentração de  $30 \text{ mmol.L}^{-1}$  das amostras.



Fonte: A autora.

Nas concentrações de  $20 \text{ mmol.L}^{-1}$  das amostras, (Figura 40) observa-se que a o-CHALBr continua superando os valores da CHAL, mas neste caso, não ficando tão próximos dos valores calculados para a vitamina C. Este gráfico tende a seguir o mesmo padrão da concentração anterior (Figura 39), onde o Bromo substituído nas posições *meta* e *para*, não auxilia no aumento da atividade antioxidante, sendo que a chalcona sem substituinte (CHAL), mais uma vez, superou os valores da atividade antioxidante de ambas.

Figura 40 – Atividade antioxidante utilizando concentração de  $20 \text{ mmol.L}^{-1}$ .



Fonte: A autora.

É possível observar que todas as chalconas apresentam atividade antioxidante, no entanto, fica claro que utilizando apenas estas concentrações, não se pode prever um padrão para esta atividade, pois a variação na concentração das amostras provocou mudanças drásticas na atividade antioxidante. Em relação ao tempo, fica claro um padrão para as atividades, os gráficos demonstram que a eficácia da atividade se dá nos primeiros minutos da reação, sendo que após 40 minutos a atividade antioxidante se mantém praticamente constante, com pequenas variações.

## 5.6 ANÁLISE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELO MÉTODO KIRBY-BAUER

### 5.6.1 Método Kirby -Bauer: disco-difusão

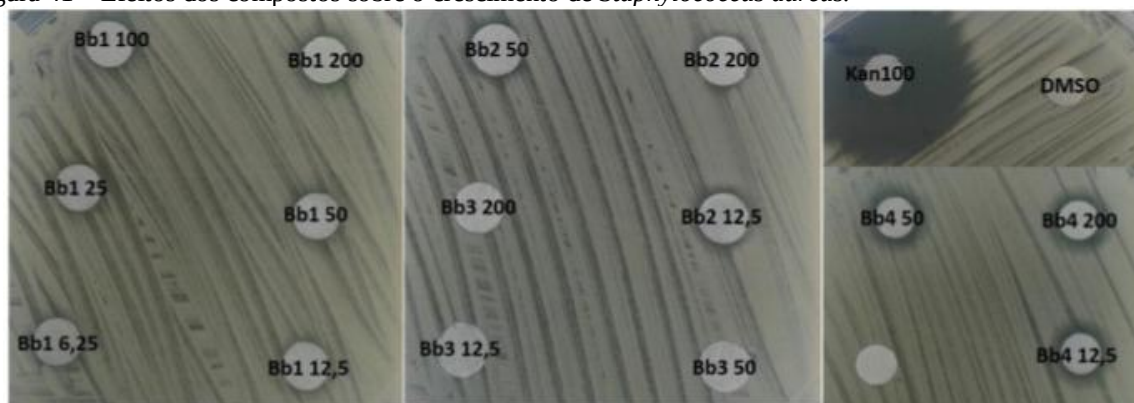
Para o teste de atividade antibacteriana, utilizando a técnica de difusão em disco, foram utilizadas duas espécies Gram positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*) e uma espécie Gram negativa (*Escherichia coli*). Foram testados os três derivados bromados, assim

como a chalcona sem substituinte, todos em diferentes concentrações, além da canamicina na concentração de  $100 \text{ mg.mL}^{-1}$  e o *DMSO* (100%).

### 5.6.2 Análise inibitória contra a bactéria *Staphylococcus aureus*

O controle negativo com o solvente *DMSO* não apresentou atividade antimicrobiana. O controle positivo com canamicina apresentou atividade com halo de inibição de crescimento de  $12 \text{ mm}$ . Os compostos *o*-CHALBr, *m*-CHALBr e CHAL apresentaram halos de inibição de crescimento para *S. aureus* com diferentes extensões. A *o*-CHALBr apresentou halos de  $2 \text{ mm}$  nas concentrações de  $200$  e  $100 \text{ mg.mL}^{-1}$  e halo de  $1,5 \text{ mm}$  em  $50 \text{ mg.mL}^{-1}$ , nas demais concentrações, os halos formados eram pouco visíveis. A *m*-CHALBr inibiu o crescimento, formando halos de  $1,5 \text{ mm}$  nas três concentrações testadas, de  $200$ ,  $50$  e  $12,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ . A CHAL apresentou halos de inibição ligeiramente maiores, com  $2 \text{ mm}$  de extensão, nas três concentrações testadas, de  $200$ ,  $50$  e  $12,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ . A *p*-CHALBr não inibiu o crescimento de *S. aureus* (Figura 41).

Figura 41 – Efeitos dos compostos sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus*.



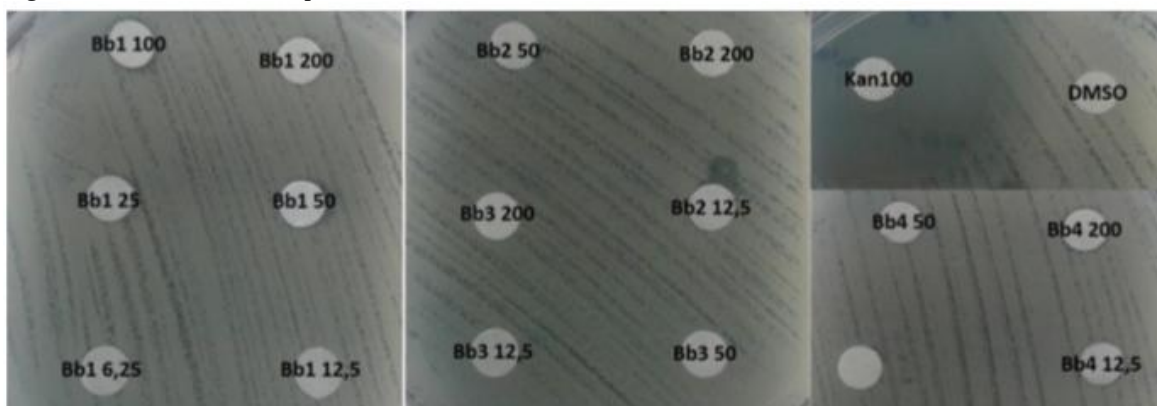
Notas: Bb1 200 (*o*-CHALBr  $200 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), Bb1 100 (*o*-CHALBr  $100 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), Bb1 50 (*o*-CHALBr  $50 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), Bb1 25 (*o*-CHALBr  $25 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), Bb1 12,5 (*o*-CHALBr  $12,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), Bb1 6,25 (*o*-CHALBr  $6,25 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), Bb2 200 (*m*-CHALBr  $200 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), Bb2 50 (*m*-CHALBr  $50 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), Bb2 12,5 (*m*-CHALBr  $12,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), Bb3 200 (*p*-CHALBr  $200 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), Bb3 50 (*p*-CHALBr  $50 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), Bb3 12,5 (*p*-CHALBr  $12,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), Bb4 200 (CHAL  $200 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), Bb4 50 (CHAL  $50 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), Bb4 12,5 (CHAL  $12,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), Kan100 (canamicina  $100 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), DMSO (100%).

### 5.6.3 Análise inibitória contra a bactéria *Bacillus subtilis*

O controle negativo com o solvente *DMSO* não apresentou atividade antimicrobiana. O controle positivo com canamicina apresentou atividade com halo de inibição de crescimento de  $15 \text{ mm}$ . Os compostos *o*-CHALBr e CHAL apresentaram halos de inibição de crescimento para *Bacillus subtilis* com diferentes extensões. A *o*-CHALBr apresentou halo de  $1 \text{ mm}$  na concentração de  $100 \text{ mg.mL}^{-1}$  e halo de  $0,5 \text{ mm}$  em  $50 \text{ mg.mL}^{-1}$ , nas demais concentrações,

não houve formação de halos. A CHAL apresentou halos de inibição com 0,5 mm de extensão, nas três concentrações testadas, de 200, 50 e 12,5 mg.mL<sup>-1</sup>. As *m*-CHALBr e *p*-CHALBr não inibiram o crescimento de *Bacillus subtilis* (Figura 42).

Figura 42 – Efeitos dos compostos listados sobre o crescimento de *Bacillus subtilis*.

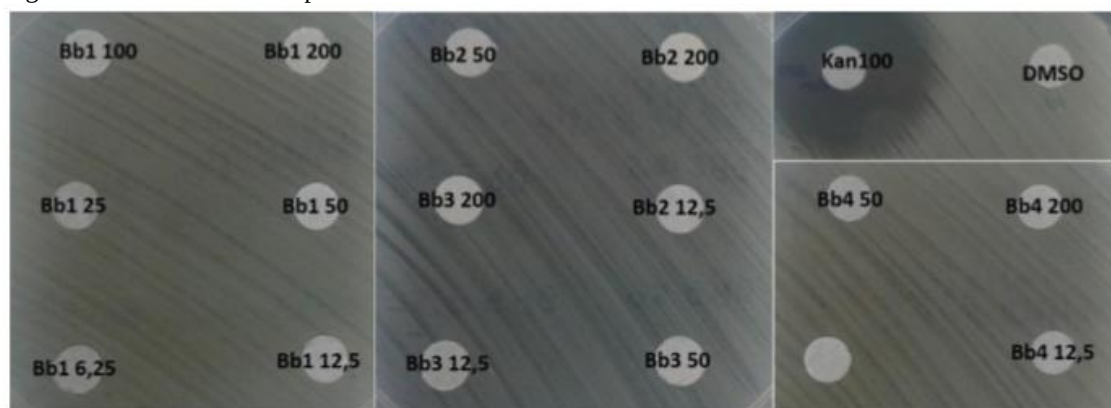


Notas: Bb1 200 (*o*-CHALBr 200mg.mL<sup>-1</sup>), Bb1 100 (*o*-CHALBr 100mg.mL<sup>-1</sup>), Bb1 50 (*o*-CHALBr 50mg.mL<sup>-1</sup>), Bb1 25 (*o*-CHALBr 25mg.mL<sup>-1</sup>), Bb1 12,5 (*o*-CHALBr 12,5mg.mL<sup>-1</sup>), Bb1 6,25 (*o*-CHALBr 6,25mg.mL<sup>-1</sup>), Bb2 200 (*m*-CHALBr 200mg.mL<sup>-1</sup>), Bb2 50 (*m*-CHALBr 50mg.mL<sup>-1</sup>), Bb2 12,5 (*m*-CHALBr 12,5mg.mL<sup>-1</sup>), Bb3 200 (*p*-CHALBr 200mg.mL<sup>-1</sup>), Bb3 50 (*p*-CHALBr 50mg.mL<sup>-1</sup>), Bb3 12,5 (*p*-CHALBr 12,5mg.mL<sup>-1</sup>), Bb4 200 (CHAL 200mg.mL<sup>-1</sup>), Bb4 50 (CHAL 50mg.mL<sup>-1</sup>), Bb4 12,5 (CHAL 12,5mg.mL<sup>-1</sup>), Kan100 (canamicina 100 mg.mL<sup>-1</sup>), DMSO (100%).

#### 5.6.4 Análise inibitória contra a bactéria *Escherichia coli*

Os controles negativos com os solventes *DMSO* e etanol não apresentaram atividade antimicrobiana. O controle positivo com canamicina apresentou atividade com halo de inibição de crescimento de 10 mm. Os compostos testados não apresentaram atividade antimicrobiana sob a *Escherichia coli* (Figura 43).

Figura 43 – Efeitos dos compostos listados sobre o crescimento de *Escherichia coli*.



Notas: Bb1 200 (*o*-CHALBr 200mg.mL<sup>-1</sup>), Bb1 100 (*o*-CHALBr 100mg.mL<sup>-1</sup>), Bb1 50 (*o*-CHALBr 50mg.mL<sup>-1</sup>), Bb1 25 (*o*-CHALBr 25mg.mL<sup>-1</sup>), Bb1 12,5 (*o*-CHALBr 12,5mg.mL<sup>-1</sup>), Bb1 6,25 (*o*-CHALBr 6,25mg.mL<sup>-1</sup>), Bb2 200 (*m*-CHALBr 200mg.mL<sup>-1</sup>), Bb2 50 (*m*-CHALBr 50mg.mL<sup>-1</sup>), Bb2 12,5 (*m*-CHALBr 12,5mg.mL<sup>-1</sup>), Bb3 200 (*p*-CHALBr 200mg.mL<sup>-1</sup>), Bb3 50 (*p*-CHALBr 50mg.mL<sup>-1</sup>), Bb3 12,5 (*p*-CHALBr 12,5mg.mL<sup>-1</sup>), Bb4 200 (CHAL 200mg.mL<sup>-1</sup>), Bb4 50 (CHAL 50mg.mL<sup>-1</sup>), Bb4 12,5 (CHAL 12,5mg.mL<sup>-1</sup>), Kan100 (canamicina 100 mg.mL<sup>-1</sup>), DMSO (100%).

Fazendo-se uma análise de todos as espécies e compostos testados foi possível verificar que a *o*-CHALBr apresentou atividade antibacteriana contra as espécies Gram positivas *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, com halos de inibição de crescimento de 1,5 a 0,5 mm e concentração inibitória mínima de 50 mg.mL<sup>-1</sup> para as duas espécies. Esse resultado reflete a presença de atividade antibacteriana apenas em altas concentrações de composto.

A *m*-CHALBr foi capaz de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* formando halos de 1,5 mm em todas as concentrações testadas. Dessa maneira, não foi possível determinar a concentração inibitória mínima, que deve ser inferior a 12,5 mg.mL<sup>-1</sup> para essa espécie.

A CHAL inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus* com halos de inibição de 2 mm e de *Bacillus subtilis* com halos de inibição de 0,5 mm em todas as concentrações testadas. Portanto, a concentração inibitória mínima não pôde ser determinada, mas deve ser inferior a 12,5 mg.mL<sup>-1</sup> para as duas espécies. Neste caso também não foi possível relacionar a concentração do composto com a extensão do halo de inibição. Finalizando, a *p*-CHALBr não apresentou atividade antimicrobiana contra as espécies testadas nas concentrações utilizadas.

As bactérias *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* são modelos de estudo para bactérias Gram positivas, esse grupo de microrganismos apresenta parede celular mais simples e membrana plasmática mais acessível a compostos com atividade biológica, quando comparado às bactérias Gram negativas. A espécie Gram negativa *Escherichia coli* é modelo para estudos com bactérias deste grupo que apresenta parede celular mais complexa, com membrana externa. Os compostos testados não apresentaram atividade contra *Escherichia coli*. Como demonstrado por Opletalova, (2000) as chalconas atuam inibindo microrganismos Gram-positivos, porém algumas chalconas apresentaram inibição de microrganismos Gram-negativos também.

## 5.7 ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA

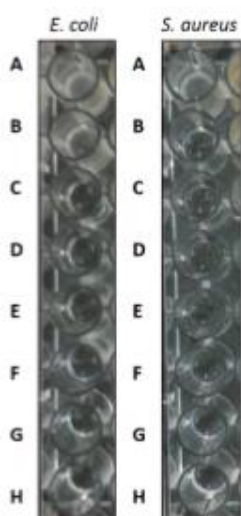
Levando em consideração que a chalcona sem substituinte, a CHAL, já apresentou atividade antimicrobiana contra Gram positivas, e essa atividade não é aumentada pela substituição com bromo, foi então realizado o teste de concentração inibitória mínima (CMI) desta chalcona.



*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foram utilizadas para os testes de determinação da concentração inibitória mínima (CMI). As soluções utilizadas foram: CHAL dissolvida em DMSO, CHAL em DMSO:PEG (1: 16), CHAL em DMSO:PEG (1: 8) e CHAL em DMSO:PEG (1: 1).

O turvamento do meio indica que a presença de 20% de DMSO não inibe o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (Figura 44, linhas A). Já a solução de DMSO:PEG (1: 8), na proporção de 20%, foi capaz de inibir o crescimento tanto de *Staphylococcus aureus* quanto de *Escherichia coli* nas condições testadas (Figura 46, linhas C). Como esperado, não houve crescimento bacteriano na presença de canamicina ( $0,1mg.mL^{-1}$ ) e na ausência de inóculo bacteriano (Figura 44, linhas F e H).

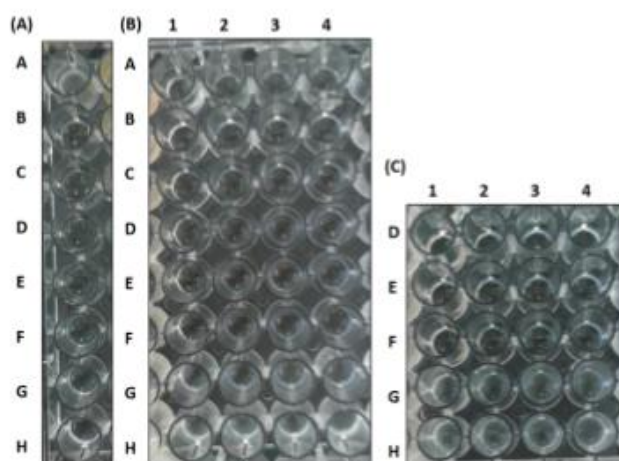
Figura 44 – Placas de microtitulação contendo inóculos bacterianos incubados na presença de controles positivos e negativos para os inóculos de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.



Nota: Linhas A e B:  $30\mu L$  de DMSO; Linhas C a E:  $30\mu L$  de DMSO:PEG (1:8); Linhas E a G: Canamicina  $0,1mg.mL^{-1}$ ; Linha H: ausência de inóculo bacteriano. O volume final nos poços foi de  $150\mu L$ .

A ausência de turvamento nos poços contendo os inóculos de *Staphylococcus aureus* incubados com as maiores concentrações da solução de CHAL dissolvida em DMSO (Figura 45 B, coluna 1) indica que este composto é capaz de inibir o crescimento de *S. aureus* até a concentração mínima inibitória de  $0,021 mg.mL^{-1}$  (Figura 45, B, coluna 1, linha F). O turvamento do meio é visível a partir desta concentração para todas as condições testadas (Figura 45, C, colunas 1 a 4, linhas G e H). Porém, a ausência de crescimento bacteriano nos inóculos incubados com a CHAL dissolvida em diferentes proporções de DMSO:PEG (Figura 45, B, colunas 2 a 4, linhas A a F) pode não indicar atividade antibacteriana deste composto, uma vez que o solvente apresentou atividade de inibição de crescimento bacteriano (Figura 45 A, linhas B, C e D).

Figura 45 – Placas de microtitulação contendo inóculos bacterianos de *S. aureus* incubados na presença dos compostos DMSO, DMSO:PEG, Canamicina e CHAL.



Nota: (A) Coluna contendo os controles positivos e negativos. Linha A: 30 $\mu$ L de DMSO; Linhas B a D: 30 $\mu$ L de DMSO:PEG (1: 8); Linhas E a G: Canamicina 0,1  $mg.mL^{-1}$ ; Linha H: ausência de inóculo bacteriano. (B) Coluna 1: CHAL em DMSO; Coluna 2: CHAL 1: 16 em PEG; Coluna 3: CHAL 1: 8 em PEG; Coluna 4: CHAL 1: 1 em PEG. Linha A: 1  $mg.mL^{-1}$ ; Linha B: 0,33  $mg.mL^{-1}$ ; Linha C: 0,17  $mg.mL^{-1}$ ; Linha D: 0,08  $mg.mL^{-1}$ ; Linha E: 0,04  $mg.mL^{-1}$ ; Linha F: 0,02  $mg.mL^{-1}$ ; Linha G: 0,01  $mg.mL^{-1}$  e Linha H: 0,005  $mg.mL^{-1}$ ; (C) Detalhe das linhas D a H da figura (B).

Os resultados obtidos permitem inferir que a CHAL dissolvida em DMSO apresenta boa atividade de inibição de crescimento contra *Staphylococcus aureus*, com valor de *CIM* próximo a 20 $\mu g.mL^{-1}$ . Não foi possível investigar o efeito da CHAL dissolvida em solução de DMSO:PEG, uma vez que este solvente apresenta atividade de inibição do crescimento bacteriano nas condições testadas.

## 6 CONCLUSÕES

O estudo de derivados de chalconas substituídos permitiu concluir que a reação de Claisen-Schmidt, empregando benzaldeído e derivados da acetofenona nas condições descritas, conduz à formação dos produtos desejados.

Por meio das análises de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  foi possível caracterizar os produtos e confirmar a configuração *cis* do sistema vinílico das chalconas sintetizadas, observando o valor da constante de acoplamento dos hidrogênios  $\text{H}_\alpha$  e  $\text{H}_\beta$ ;

Os cálculos teóricos de análise conformacional permitiram concluir que embora a conformação *s-cis* seja aquela de maior abundância do equilíbrio da maioria das chalconas estudadas, a substituição em *orto*, provoca aumento da estabilização dos confôrmeros *s-trans*, e consequente incremento da proporção destas geometrias no equilíbrio. Tal fato não encontra fundamentação na análise isolada das interações entre orbitais (importantes para o efeito conjugativo estabilizante) e energia estérica. Cálculos de NCI sugerem que o aumento da superfície de interação de forças atrativas mais fracas, como Van der Waals, pode ter influência na maior estabilização de chalconas *orto*-substituídas.

A avaliação da atividade antioxidante das quatro chalconas, apresentou resultados positivos, quando comparados aos da vitamina C. A Chalcona sem substituinte apresentou atividade antioxidante, que pode ser superada substituindo o Bromo na posição *orto* do anel aromático, em determinadas concentrações, em função do tempo. O Bromo nas posições *meta* e *para* aparentemente diminuiu a atividade antioxidante.

A chalcona sem substituinte apresenta atividade antimicrobiana contra Gram positivas, e essa atividade não é aumentada pela substituição com Bromo. O Bromo na posição *para* aparentemente prejudica a atividade antibacteriana. A substituição com Bromo na posição *orto* mantém a atividade contra Gram positivas, enquanto a substituição na posição *meta* mantém a atividade apenas contra *Staphylococcus aureus*. A CHAL dissolvida em DMSO apresenta boa atividade de inibição de crescimento contra *Staphylococcus aureus*, com valor de *CIM* próximo a  $20\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ .

## REFERÊNCIAS

- AKSÖZ, B. E.; ERTAN, R. Chemical and Structural Properties of Chalcones I. **FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 36, p. 223-238, 2011.
- AKSÖZ, B. E.; ERTAN, R. Spectral Properties of Chalcones II. **FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences**, n. 4, v. 37, p.205-211, 2012.
- AMBEKAR, S.; VERNEKAR, S. S.; ACHARYA, S.; RAJAGOPAL, S. A note on the antibacterial action of some halogen substituted chalcones. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.13, p.698-699.
- ÁVILA, H. P.; SMÂNIA, E. F. A; MONACHE, F. D.; SMÂNIA JÚNIOR, A. Structureactivity Relationship of Antibacterial Chalcones. **Bioorganic. Medicine. Chemistry.**: v. 16, p. 9790-9794, 2008.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**. São Paulo, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.
- BECKE, A. D. J. Densityfunctional thermochemistry. III. The role of exact exchange. **The Journal of Chemical Physics**, v. 98, p. 5648, 1993.
- BLOIS, M.S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. **Nature**, v. 181,p. 1199-1200, 1958
- BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. **LWT - Food Science and Technology**, v. 30, p. 609-615, 1997.
- BURKERT, U.; ALLINGER, N. L. **Molecular Mechanics**. ACS Monograph 177, American Chemical Society, Washington, D.C., 1982.
- BUTTERWORTH, S. **Single Crystal X-Ray diffraction studies on small, medium and large molecules**. Tese (Doutorado em Química) University of York, Reino Unido, 1996.
- CALIXTO, J.B.; SIQUEIRA, J.M. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: desafios. **Gazeta médica da Bahia**, 78 (Suplemento 1), p. 98-106, 2008.
- CARVALHO, I. PUPO, M.T.; BORGES, A.D.; BERNARDES, L.S. Introdução à modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 428-438, 2003.
- CERQUEIRA, F.M.; MEDEIROS, M.H.G.; OHARA, A. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Quim Nova** v. 30, p. 441-449, 2007.
- CESARIN, D. S.; FERREIRA, J. N.; DRAZ, R. F.; Efeito da substituição por átomos de flúor no equilíbrio conformacional de chalcona. **Química Nova**. v.24, n.5, p. 604-611, 2011.
- CHLUPACOVA, M., OPLETALOVA V.: Chalcones as potential inhibitors of aldose reductase. **Chemicke Listy**, v.98, p 321–320, 2004.

CLIMENT, M.; CORMA, A.; IBORRA, S.; VELTY, A. Activated hydrotalcites as catalysts for the synthesis of chalcones of pharmaceutical interest. **Journal of Catalysis**, v.221, n.2, p474-482, 2004.

DEVIA, C.M. PAPPANO, N.B.; DEBATTISTA, N.B. Structure-biological activity relationship of synthetic trihydroxylated chalcones. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 29, n. 4, 1998.

DIMMOCK, J. R.; ELIAS, D. W.; BEAZELY, M. A.; KANDEPU, N. M. Bioactivity of chalcones. **Current Medicinal Chemistry**. v. 6; p. 1125-1149, 1999.

DIMMOCK, J. R.; JHA, A.; KUMAR, P.; KUMAR, P.; ZELLO, G. A.; QUAIL, J. W.; OLOO, E. O.; OUCHAREK, J. J.; PASHA, M. K.; SEITZ, D.; SHARMA, R. K.; ALLEN, T. M.; SANTOS, C. L.; MANAVATHU, E. K.; CLERCQ, E. D.; BALZARINI, J.; STABLES, J. P. Cytotoxic 1,4-bis(2-oxo-1-cycloalkylmethylene)benzenes and related compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 37; p. 35-44, 2002.

DIMMOCK, J. R.; JHA, A.; ZELLO, G. A.; ALLEN, T. M.; SANTOS, C. L.; BALZARINI, J.; DE CLERCQ, E.; MANAVATHU, E. K. Cytotoxic 4'-aminochalcones and related compounds. **Pharmazie**. v. 58; p. 227-232, 2003.

DIMMOCK, J. R.; KANDEPU, N. M.; HETERINGTON, M.; QUAIT, W.; PUGAZHENTHI, U.; SUDOM, A. M.; CHAMANKHAH, M.; ROSE, P.; PASS, E.; ALLEN, T. M.; HALLERAN, S.; SZYDLOWSKI, J.; MUTUS, B.; TANNOUS, M.; MANAVATHU, E. K.; MYERS, T.; CLERCQ, E. D.; BALZARINI, J. Cytotoxic activities of Mannich bases of chalcones and related compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 41; p. 1014-126, 1998.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47-95, 2002.

E.L. ELIEL, S.H. WILEN, L.N. MANDER, **Stereochemistry of organic compounds**, p24-42, 743, 1994.

FLÓREZ, S. M.; GONZÁLEZ-GALLEGU, J.; CULEBRAS, J. M. TUÑÓN, M. J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrición Hospitalaria**, v.17, n.16, p.271-278, 2002.

HALL, B.G. Predicting the evolution of antibiotic resistance genes. **Nature Reviews Microbiology**. v. 2, p. 430-435, 2004.

HARAGUCHI H.; TANIMOTO K.; TAMURA, Y.; MIZUTANI K.; KINOSHITA, T. Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. **Phytochemistry**, Londres, v. 48, n. 1, p. 125-129, 1998.

HARBORNE, J. B. GREEN, P. S. **A chemotaxonomic survey of flavonoids in leaves of the Oleaceae**. Botanical Journal of the Linnean Society, v.81: p.155-167. 1980.

HASE, W. L. **Computational Chemistry**. Computing in Science & Engineering, p. 12-13, 2003.

HASSAN, S.Y. Synthesis and biological activity of some new pyrazoline and pyrimidine derivates. **Journal of the Brazilian.Chemical.Society**, v. 22, n. 7, p.1286-1298, 2011.

HEAD-GORDON, M.; POPLE, J. A.; FRISCH, M. J. MP2 energy evaluation by direct methods. **Chemical Physics Letters**, v.153,p. 503-506, 1988.

HIJOVA E. Bioavailability of Chalcones. **Bratislavske lekarske listy**. v.106, p. 80 2007.

HOLLER, F. JAMES; SKOOG, A. DOUGLAS; CROUCH, R. STANLEY; **Princípios de análise instrumental**. Química analítica. Tradução Celio Pasquini. 6º edição. Porto Alegre: Bookman, p. 468-563, 2009.

HORE, P. J.; **Nuclear magnetic ressonance**. New York: Oxford Science Publication, p. 810-820, 1995.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E.F.; VIEIRA, P.C. Principios ativos de plantas superiores. São Carlos: **EdUFSCar**, 2008. p. 09, 60-61.

FORESMAN, J. B.; FRISCH, A. **Exploring chemistry with electronic structure methods**. 2. ed. Pittsburgh: Gaussian, Inc, 1996.

JAYAPRAKASHA, G. K.; PATIL, B. S. In vitro evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 410-418, 2007.

JURCSAK, N. W.; ZAMINI, H. Employing NMR Spectroscopy to evaluate transmission of electronic effects in 4- substituted chalconas. **Journal of Chemical Education**. v. 76, n. 5, p.653-654, 1999.

KANDASWAMI C.; MIDDLETON E. Free Radical Scavenging and Antioxidant Activity of Plant Flavonoids. In: Armstrong D. (eds) Free Radicals in Diagnostic Medicine. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, Springer, Boston, vol 366, p.351-376,1994.

KARPLUS, M.; **Journal American Chemistry Society**.v.85; p.2870, 1963.

KLIMCZAK, I. et al. Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 3-4, p. 313-322, 2007.

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

KRISHNAN R.; BINKLEY J. S.; SEEGER R.; POPLE J. A. Selfconsistent molecular orbital methods. XX. A basis set for correlated wave functions. **The Journal of Chemical Physics**, v. 72, p. 650–654, 1980.

KRINSKY N.; PEACOCKE M. ; RUSSELL R., Antioxidant vitamins, cancer, and cardiovascular disease. **The New England Journal of Medicine**. v. 335, p. 1066–1077, 1996.

KRINSKY N., The antioxidant and biological properties of carotenoids. **Annals of the New York Academy of Sciences** v.854, p.443–447, 1998.

LARSEN, M.; KROMANN, H.; KHARAZMI, A.; NIELSEN, S.F. Conformationally restricted anti-plasmodial chalcones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, n.15, p. 4858-4861, 2005.

LINCOLN, TAIZ; ZEIGER, EDUARDO; **Fisiologia vegetal**. Tradução Armando Molina Divan Junior. 5ª edição. Porto Alegre: Artmed. p.370-400, 2013.

LOPES, R. M.; OLIVEIRA, T. T. de NAGEM, T. J.; PINTO, A. da S. Flavonóides: farmacologia de flavonoides no controle hiperlipidêmico em animais experimentais. **Biotecnologia Ciência & desenvolvimento**, Brasília, n. 17, p. 18-22, 2000.

LÓPEZ, S. N.; CASTELLI, M. V.; ZACCHINO, S. A.; DOMÍNGUEZ, J. N. et al., In vitro antifungal evaluation and structure-activity relationships of a new series of chalcones derivatives and synthetic analogues, with inhibitory properties against polymers of the fungal cell wall. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 9, p. 1999-2013, 2001.

MIDDLETON JÚNIOR, E.; KANDASWASI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. **Pharmacological Reviews**, v.52, n.4, p. 673-735, 2000.

NIELSEN, S. F.; BOESEN, T.; LARSEN, M.; SCHONNING, K.; KROMANN, H. Antibacterial chalcones: bioisosteric replacement of the 4'-hydroxy group, **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 12, p. 3047-3054, 2004.

NIELSEN, S. F.; BOESEN, T.; LARSEN, M.; SCHONNING, K.; KROMANN, H. Cationic chalcone antibiotics. Design, synthesis, and mechanism of action **Journal of Medicinal Chemistry**, Columbus, v. 48, p. 2667-2677, 2005.

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

OPLETALOVA, V. Chalcones and their heterocyclic analogs as potential therapeutic agents in bacterial diseases. **Ceská Slovenská farmacie.**, vol. 49, n. 6, p. 276-284, 2000.

OSÓRIO, T. M.; MONACHE, F.D.; CHIARADIA, L.D.; MASCARELLO, A.; STUMPF, T.R.; ZANETTI, C.R.; SILVEIRA, D.B.; BARARDI, C.M.; SMÂNIA, E.A.; VIANCELLI, A.; GARCIA, L.T.; YUNES, R.A.; NUNES, R. J.; SMÂNIA, A. **Antibacterial activity of chalcones, hydrazones and oxadiazoles against methicillin-resistant Staphylococcus aureus**, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.*, v. 22, p. 225–230, 2012.

PACKER, J.F.; DA LUZ, M.M.S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacologia.**, v. 17, n. 1, p. 102-107, 2007.

PATIL, C.B., MAHAJAN, S.K. AND KATTI, S.A. A Chalcone: a Versatile Molecule. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v.1, n.3, p.11-22, 2009.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. **Introdução à espectroscopia**. Tradução da 4ª edição norte-americana. São Paulo: Cenagage Learning, p. 101-363, 641, 2010.

PASCUTTI P. G., **Introdução à Modelagem e Dinâmica Molecular**. In: Pedro G Pascutti. (Org.). v. 1, p. 1-38, 2002.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v.29, n.4, p. 755-760, 2006.

REBELLO, M. JUSSARA. **A Avaliação da atividade antioxidante e antifúngica se análogos sintéticos da acetofenona e pro-oxidante e antitumoral de chalcona sintética**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina. p. 39-74, 2005.

ROZADA, T. de C. **Análise da associação de aminoácidos e receptores de carboidratos com alguns carboidratos representativos através de RMN e Cálculos teóricos**. 2015. 166 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2015.

SCHRAUFSTATTER E. & BERNT H. Antibacterial Action of Curcumin and Related Compounds. **Nature**. v.164, p.456–457, 1949.

SENS, LARISSA. **Síntese, caracterização, análise conformacional e atividade antioxidante de análogos de chalconas bromadas e hidroxiladas**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Ponta Grossa. p. 20-106, 2014.

SHAIK KHADAR Y.; VIDYA S. D.; AFZAL B. S. Chemical and Biological Potentials of Chalcones: A Review. **Organic & Medicinal Chemistry International Journal**. v.1, 2015.

SHIMOKORIYAMA, M.; Flavanones, chalcones and Aurones. Geissman . **The Macmillan Company**, New York: 286-316. (Index to Reviews, symposia volumes and monographs in organic chemistry: for the period 1961-1962). 1962.

SILVERSTEIN R. M.; WEBSTER, FRANCIS X.; KIEMLE, DAVID J.; **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Tradução Ricardo Bicca de Alencastro. 7.ed. Rio de Janeiro: LTC. p. 123-237, 2007.

SIVAKUMAR, P.M.; PRABHAKAR, P.K.; DOBLE, M. Synthesis, antioxidant evaluation and QSAR studies of chalcones. **Medicinal Chemistry Research**. v. 20, p. 482-492, 2011.

SOARES, S. E.; Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista Nutrição**, v.15, n.1, p 71-81, 2002.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química orgânica 1**; Tradução de Robson Mendes Matos. 10. Ed. Rio de Janeiro: LTC, p 49-82, 2012.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química orgânica 2**; Tradução de Robson Mendes Matos. 10. Ed. Rio de Janeiro: LTC, p 65-70, 2012.

STANTON, M. A. **Respostas a herbívora em asclepias curassavica: Defender, crescer ou reproduzir**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas. São Paulo, 2008.



TORTORA, J. GERARD; FUNKE R. BERDELL; CASE L. CHRISTINE. **Microbiologia**. Tradução de Roberta Marchiori Martins. 8. Ed. Porto Alegre: Artmed, p. 559-589, 2005.

VOLP, P. A.; RENHE, T. R. I; STRINGUETA, C. P. **Flavonoides antocianinas: características e propriedades da nutrição e saúde**. Rev. Bras. Nutri. Clin. V.23; n. 2, 2008.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3.Ed.Porto Alegre: Artmed, p.309-332, 2006.

THALER, J. S. Jasmonate inducible plant defenses cause increased parasitism of herbivores. **Nature**. 399. P 686-688, 1999.

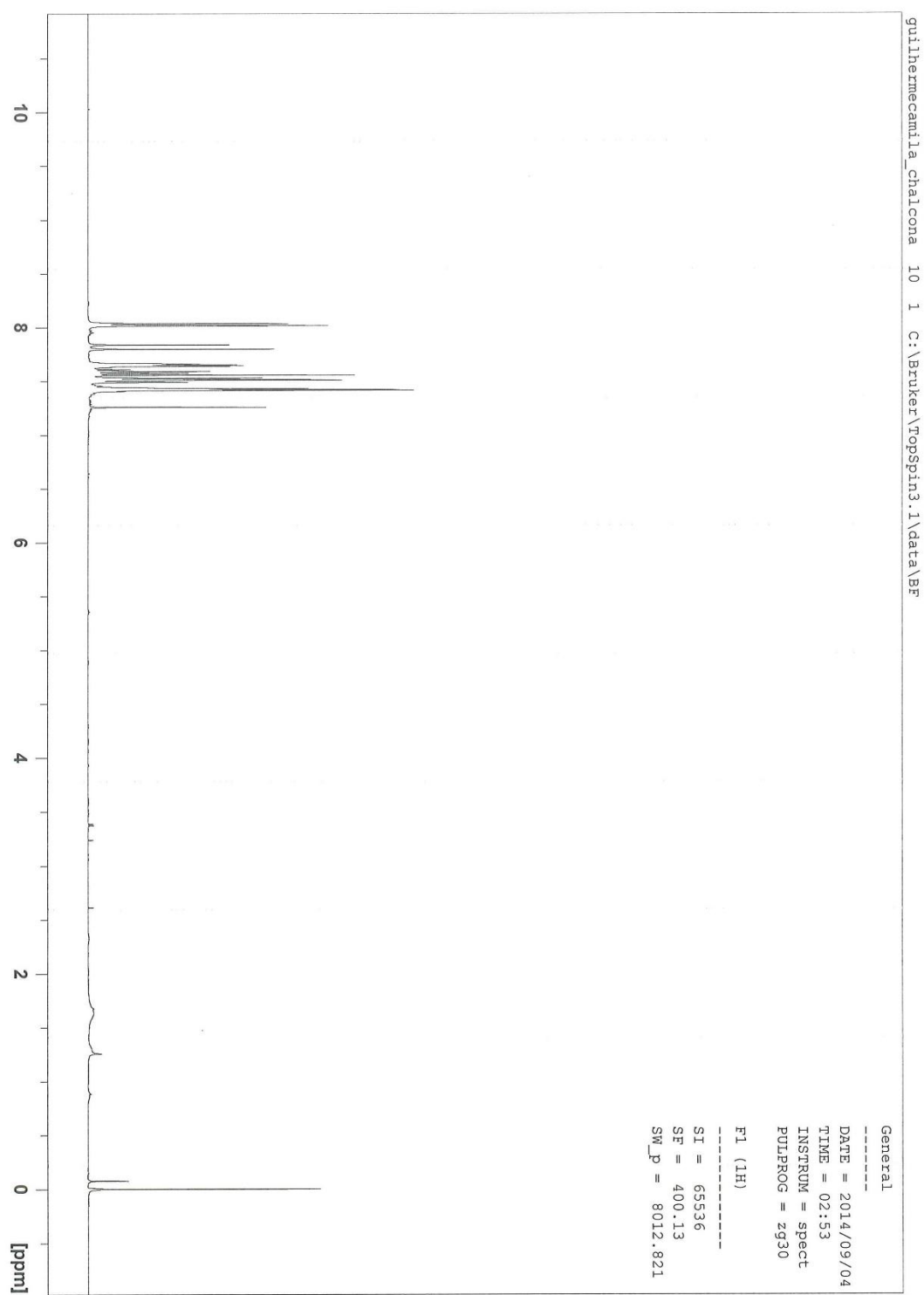
WEINHOLD, F.; LANDIS, C. R.; GLENDENING, E. D. What is NBO analysis and how is it useful? **International Reviews in Physical Chemistry**, n. 35, v. 3, p. 399-440, 2016.

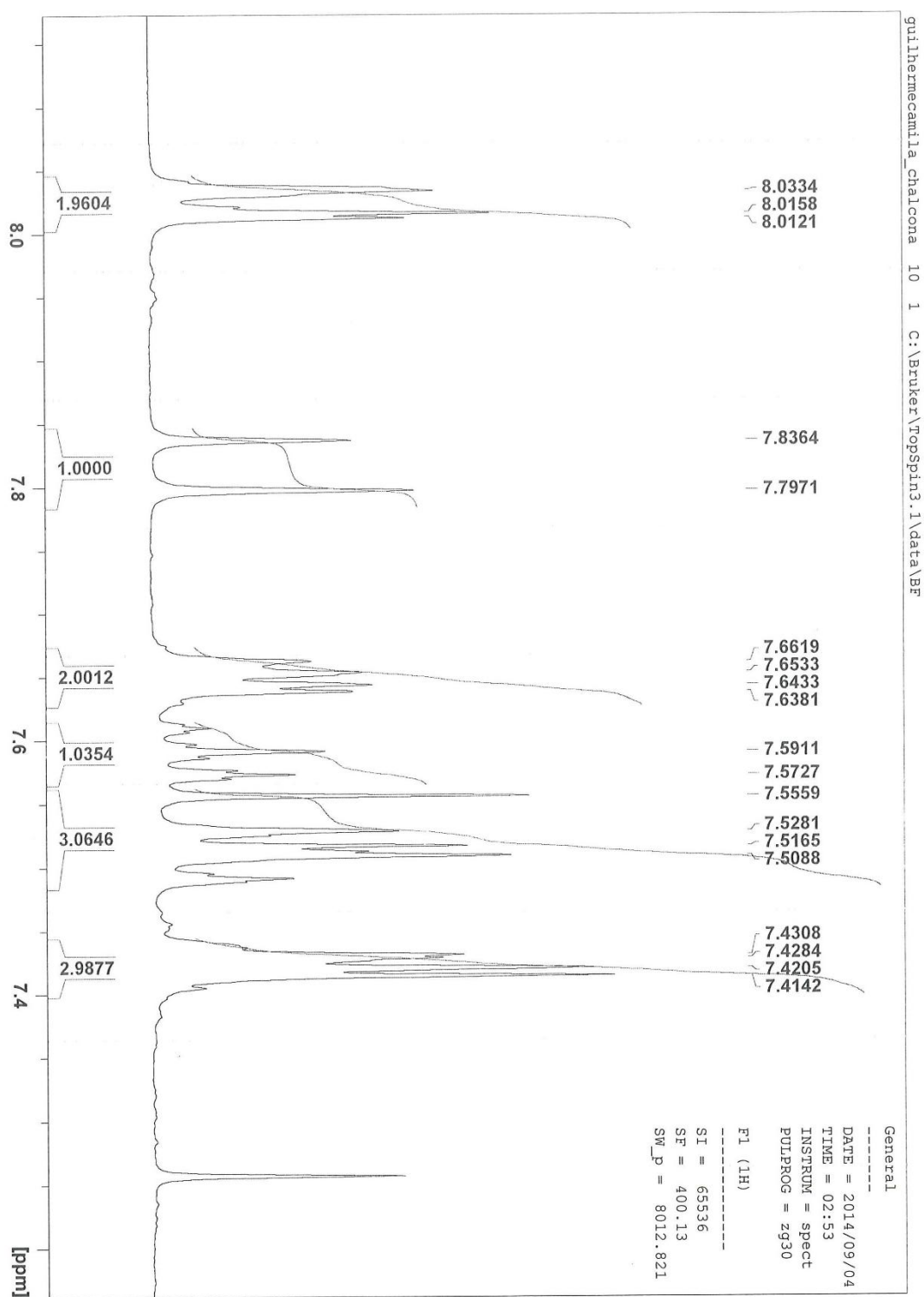
WERMUTH, C, G.: **The Practice of Medicinal Chemistry**. San Diego: Academic Press,. p. 672-715, 1996.

XUE, Y.; GONG, X. The conformational, electronic and spectral properties of chalcones: A density functional theory study. **Journal of Molecular Structure**. v. 901, p. 226–231, 2009.

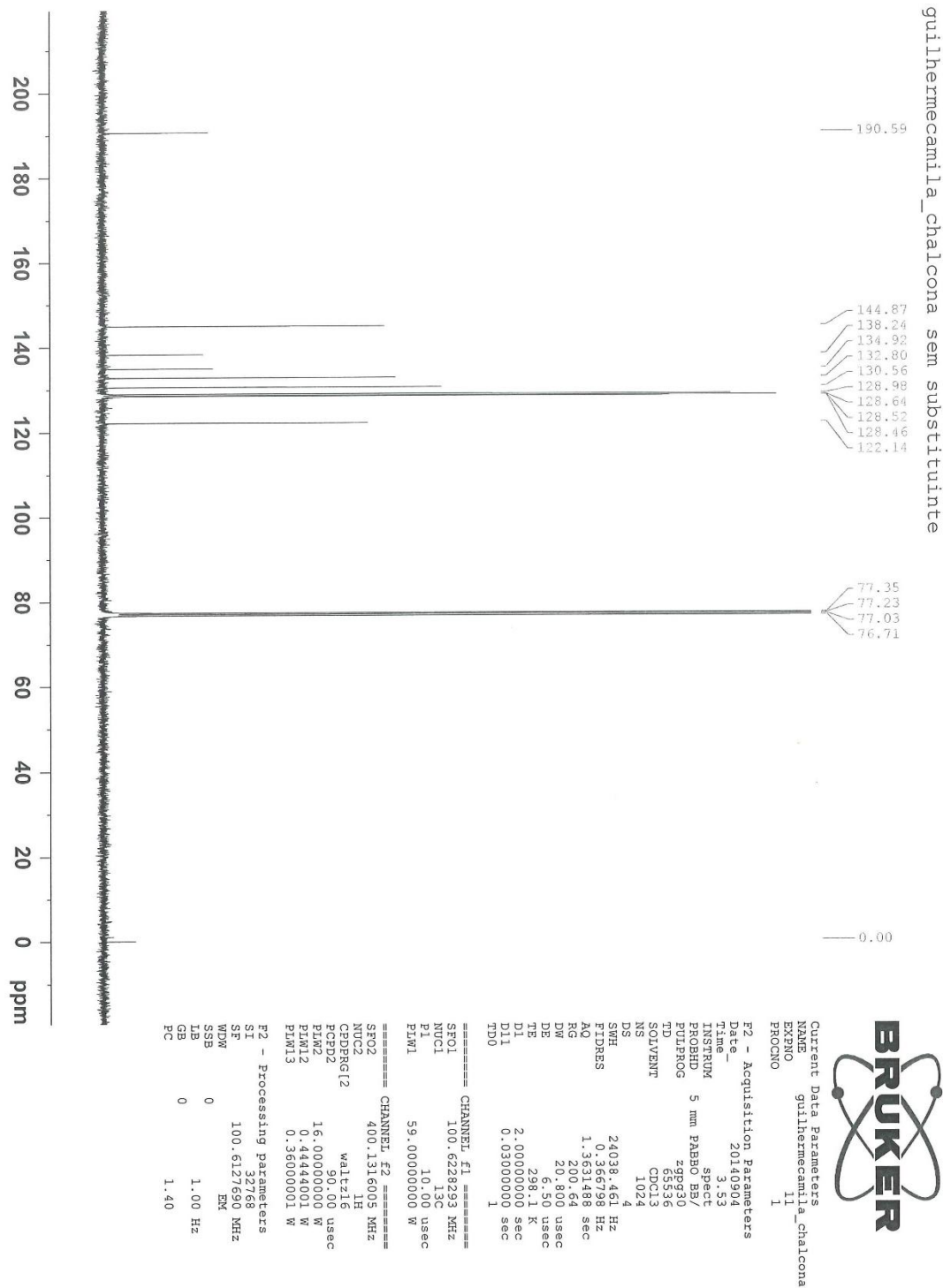
YAZDAN, S. K., SAGAR, V., SHAIK, A. B., Chemical and biological potentials of chalcones: A review, **Organic & Medicinal Chemistry** v.1, 2015.

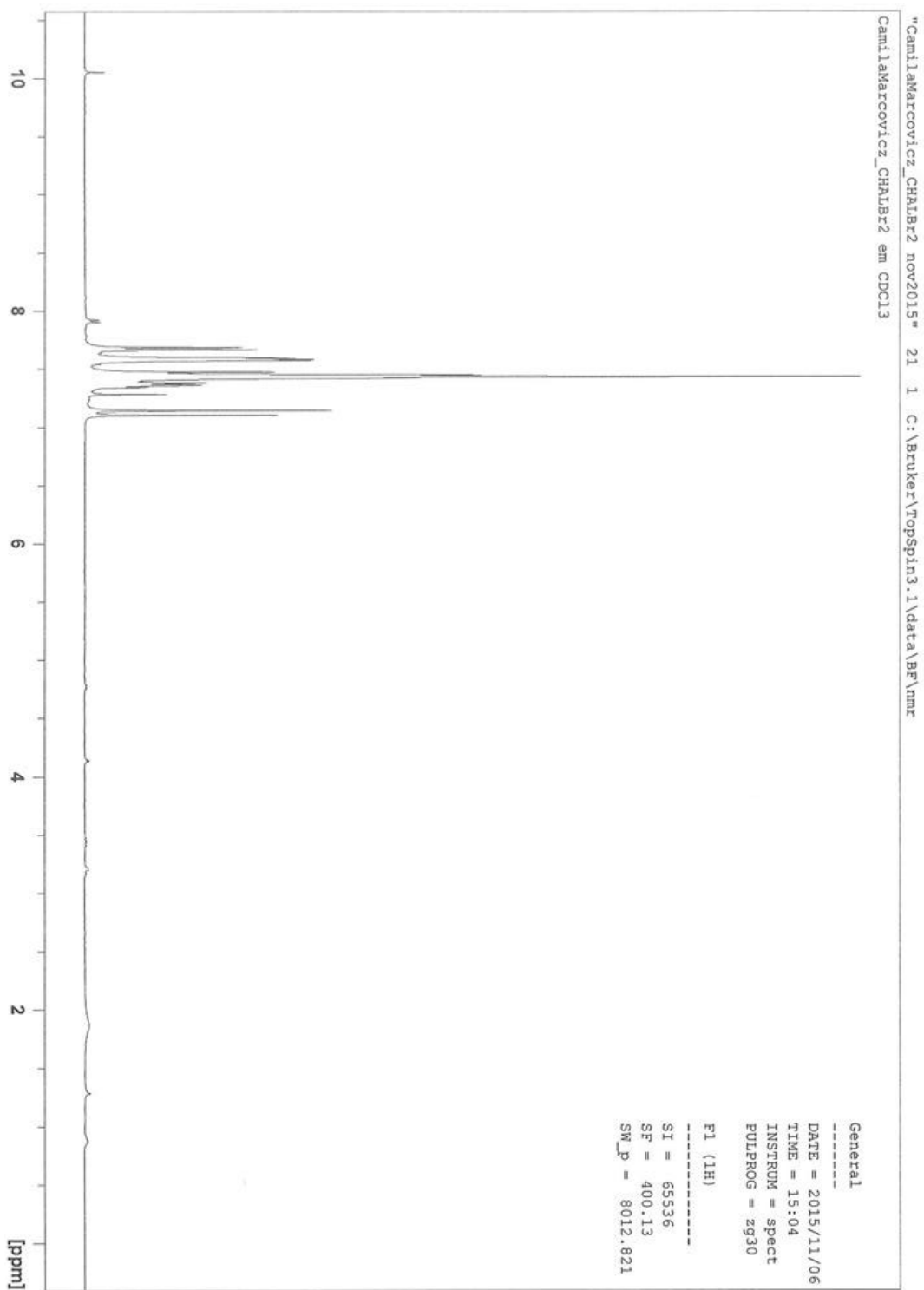
## APÊNDICE

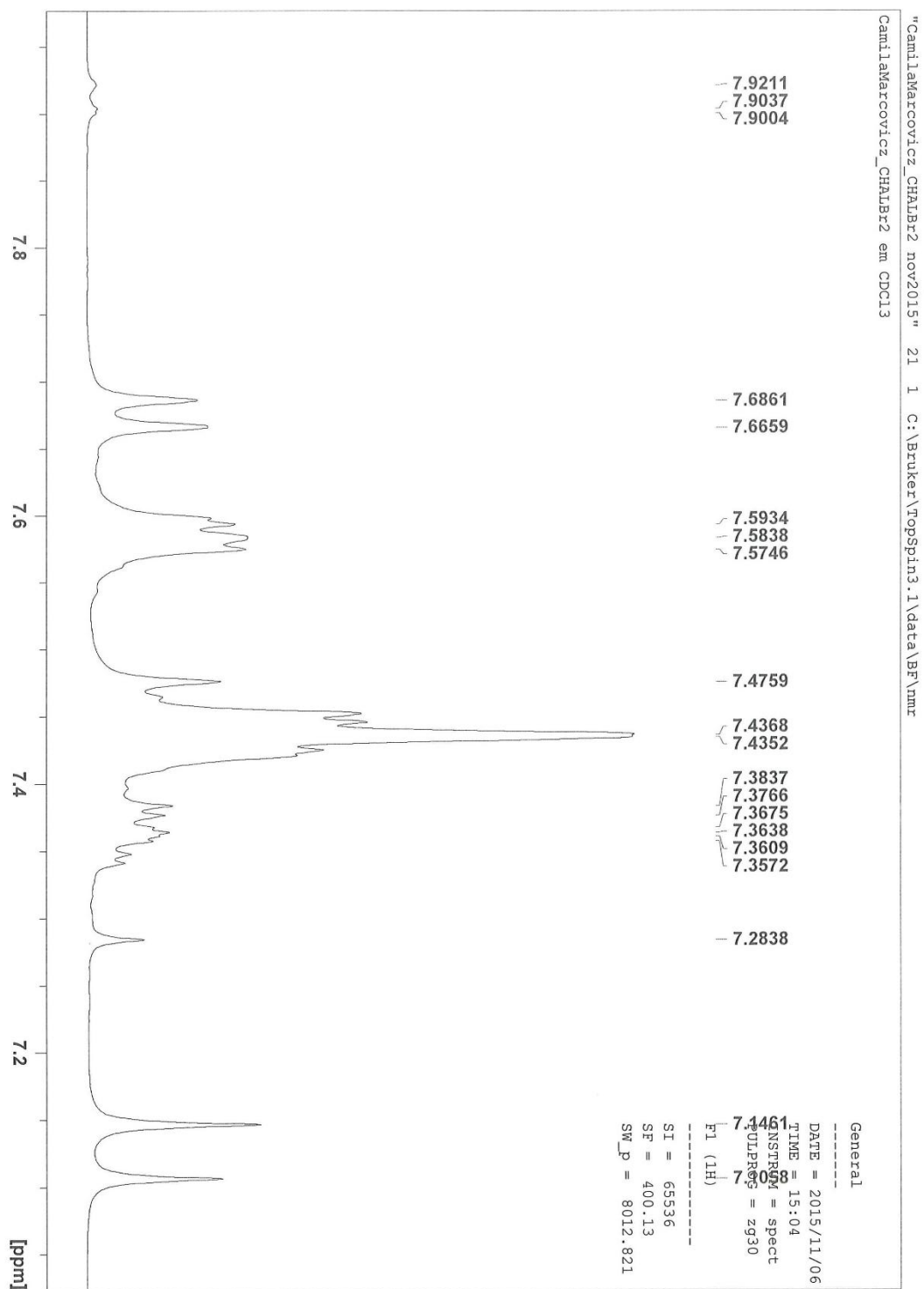
APÊNDICE A – ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  A 400MHZ DA CHAL EM  $\text{CDCl}_3$ 

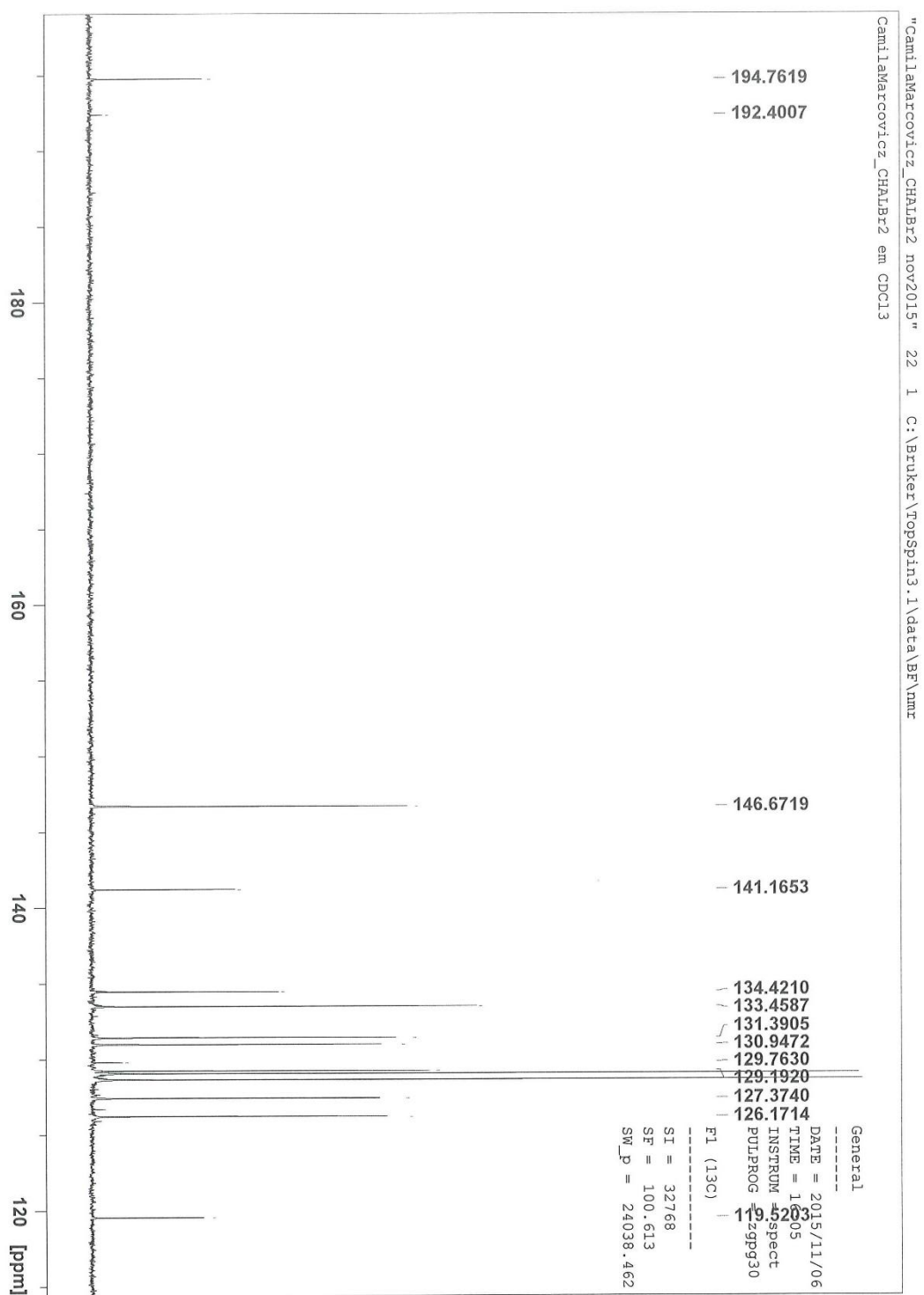
EXPANSÃO ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  A 400MHZ DA CHAL EM  $\text{CDCl}_3$ 

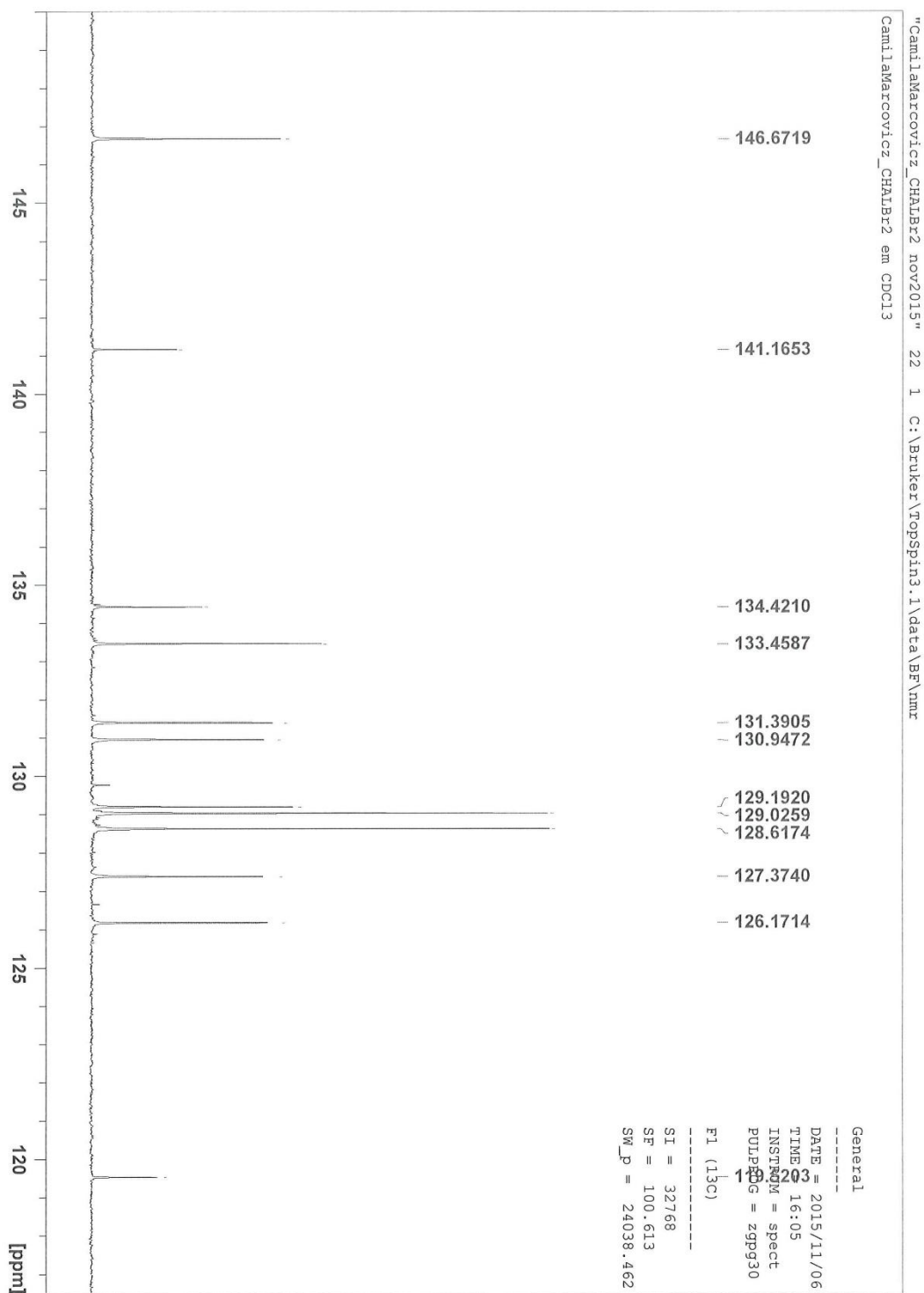
APÊNDICE B – ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup>C 100MHZ DA CHAL EM CDCL<sub>3</sub>



APÊNDICE C – ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  A 400MHZ DA *o*-CHALBr EM  $\text{CDCl}_3$ 

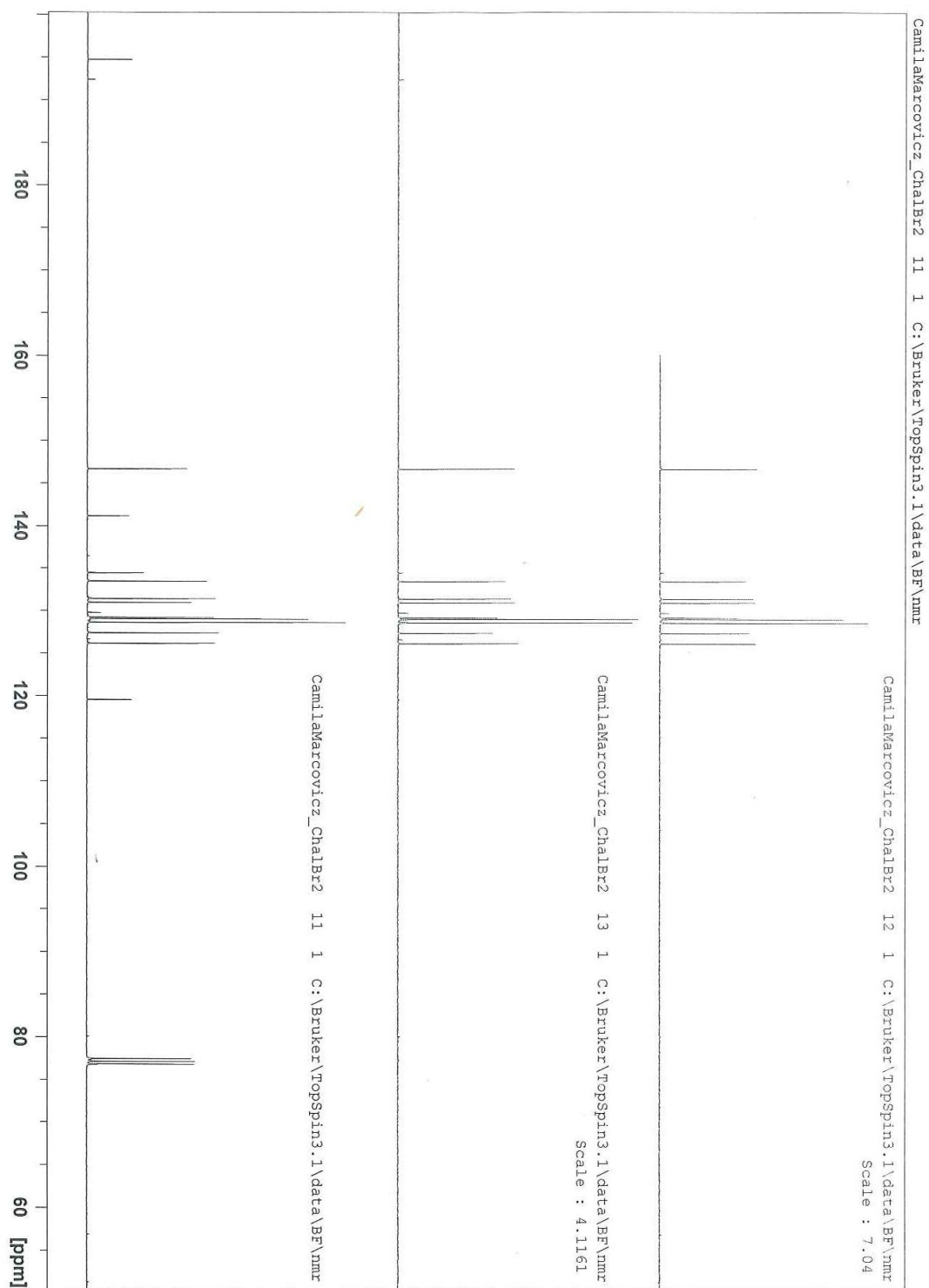
EXPANSÃO ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  A 400MHZ DA *o*-CHALBr EM  $\text{CDCl}_3$ 

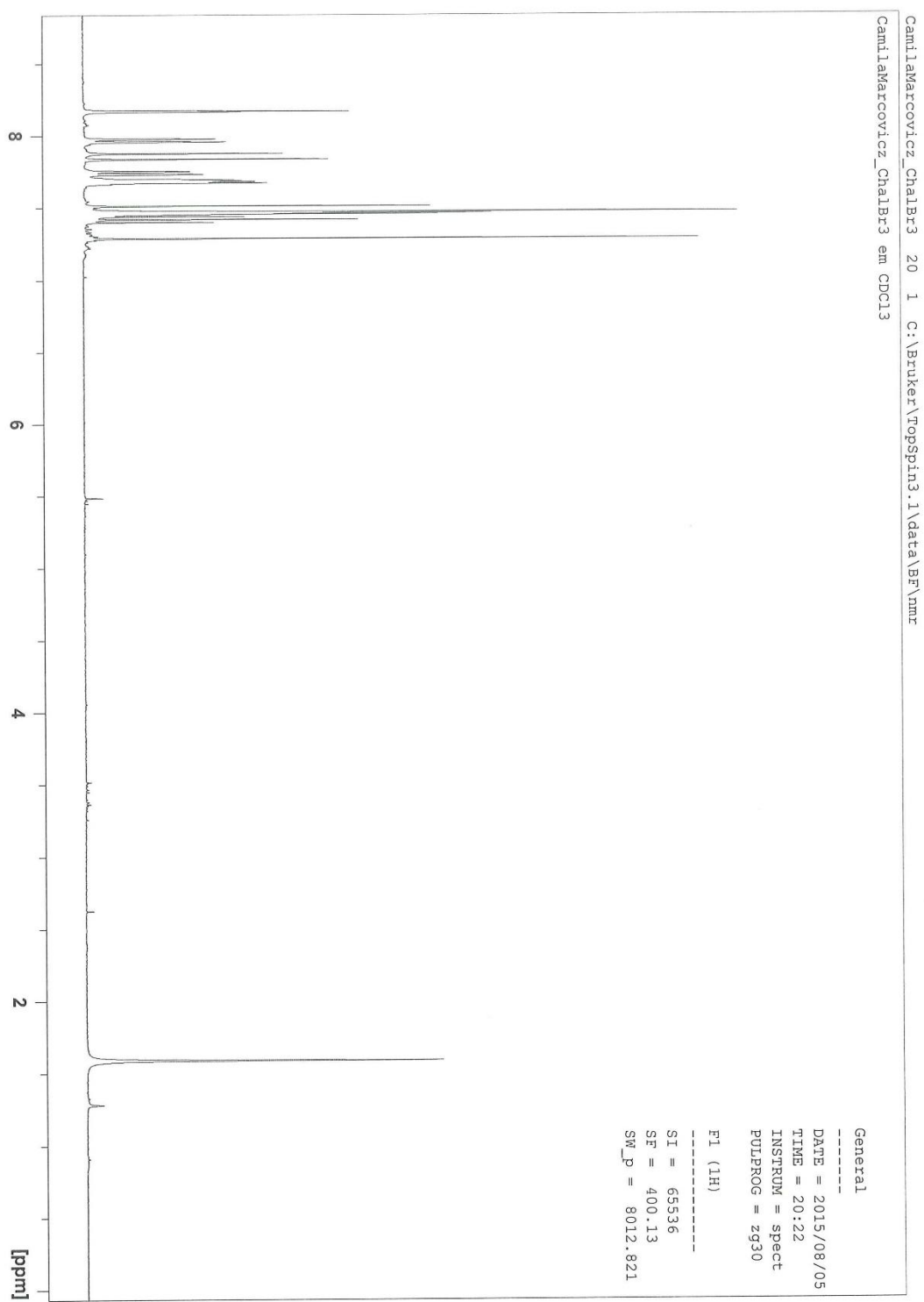
APÊNDICE D – ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  A 100MHZ DA *o*-CHALBr EM  $\text{CDCl}_3$ 

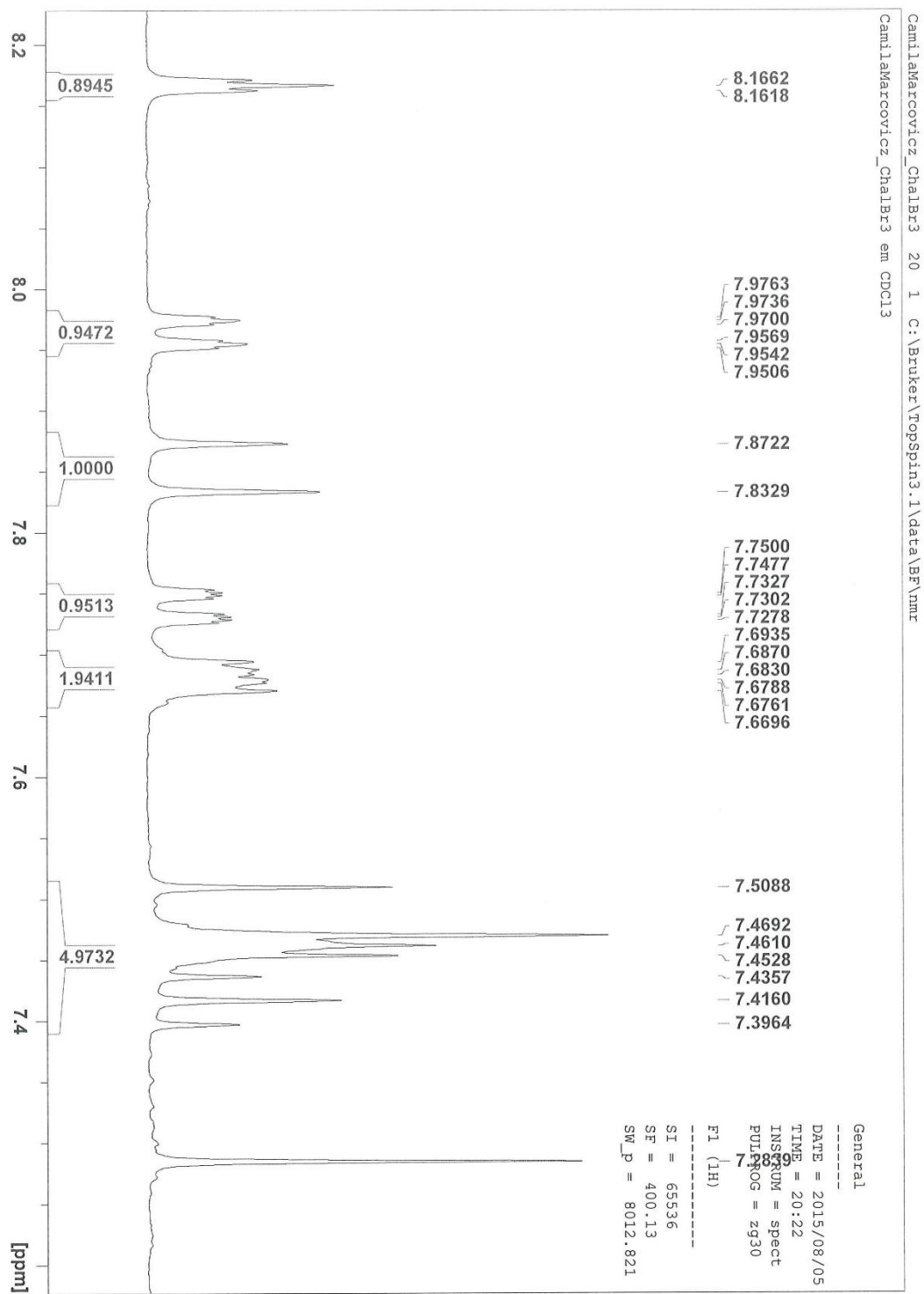
EXPANSÃO ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  A 100MHZ DA *o*-CHALBr EM  $\text{CDCl}_3$ 

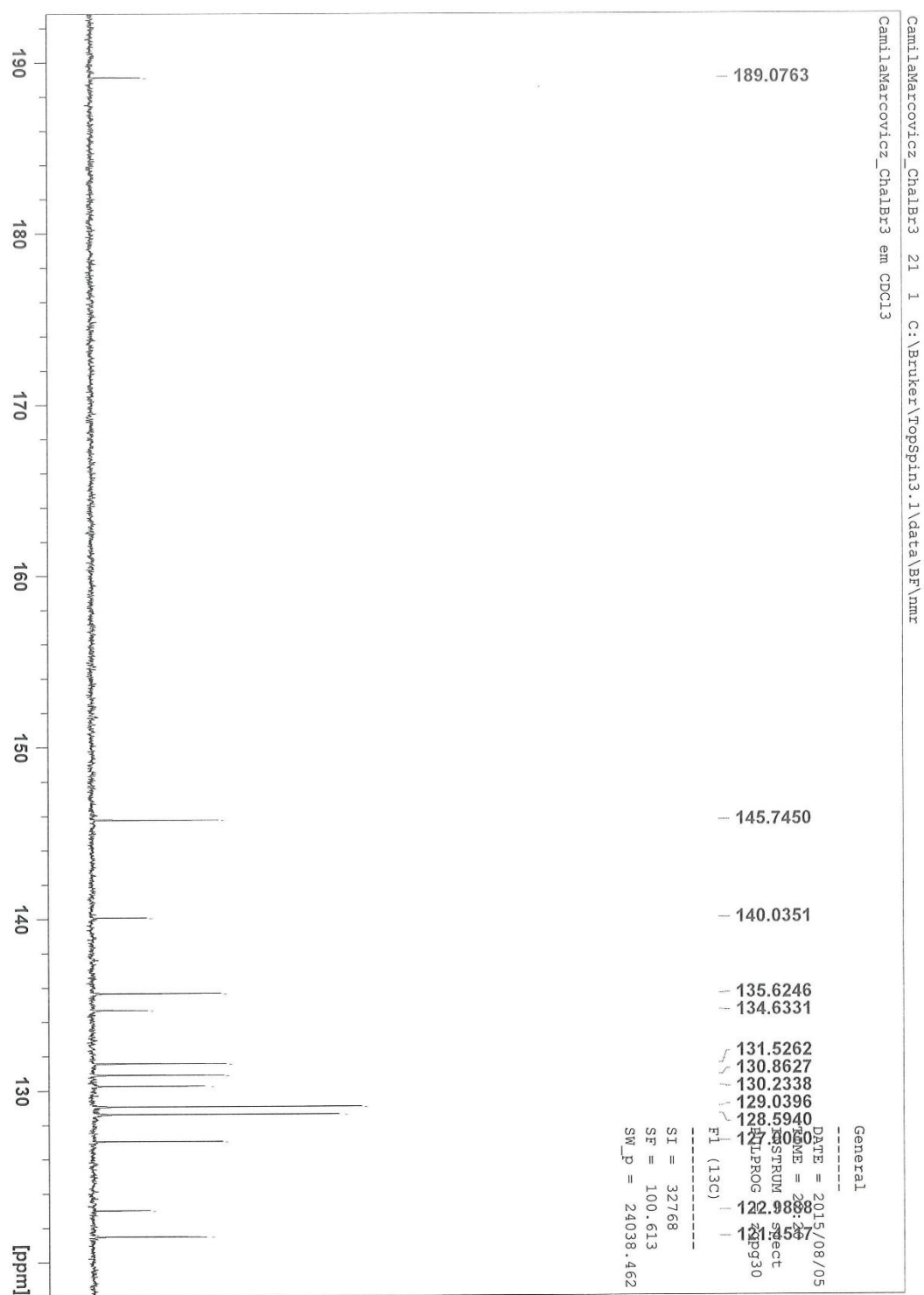


APÊNDICE E - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$ , DEPT-90, DEPT-135 A 100MHZ DA  
*o*-CHALBr EM  $\text{CDCl}_3$ .

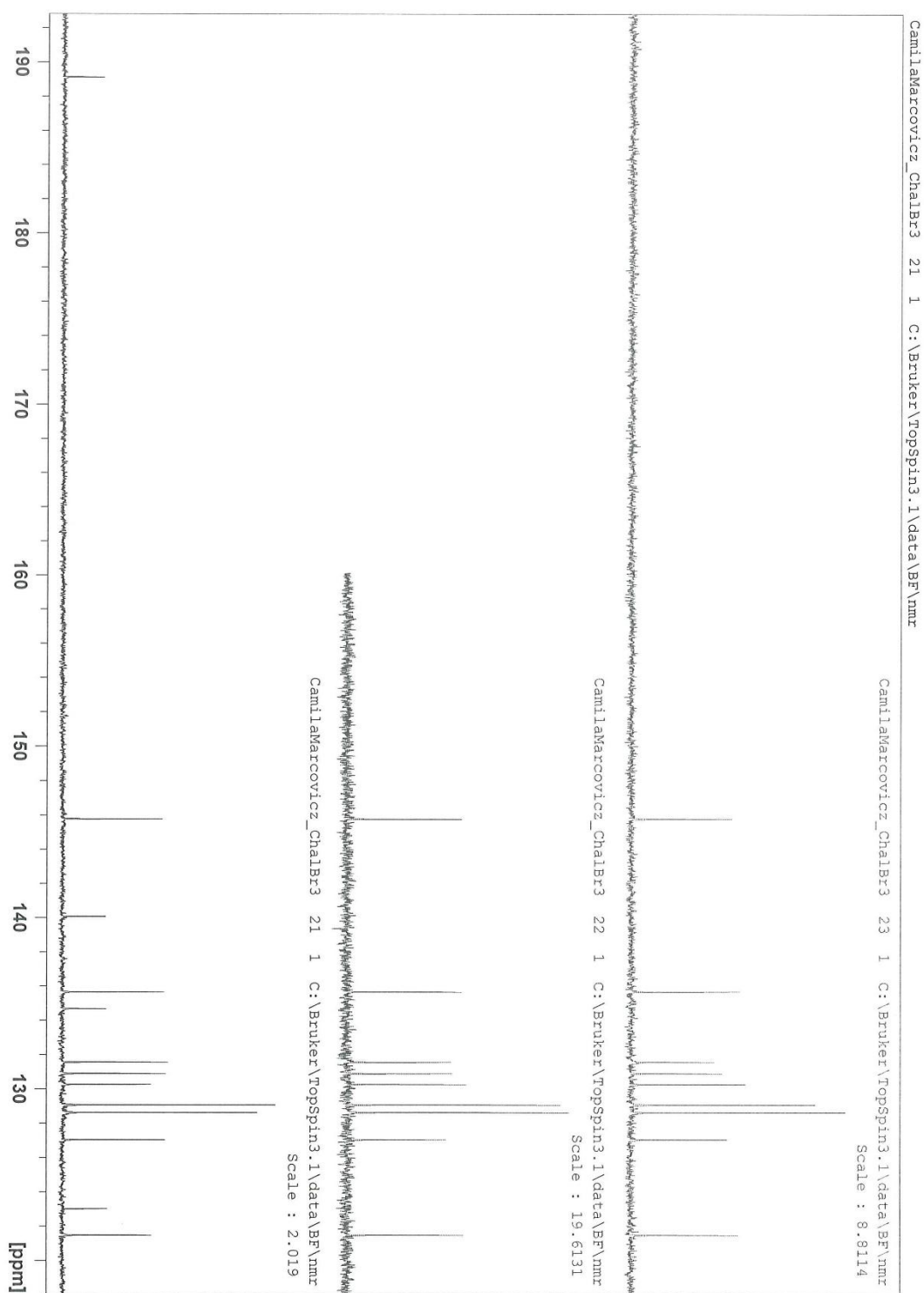


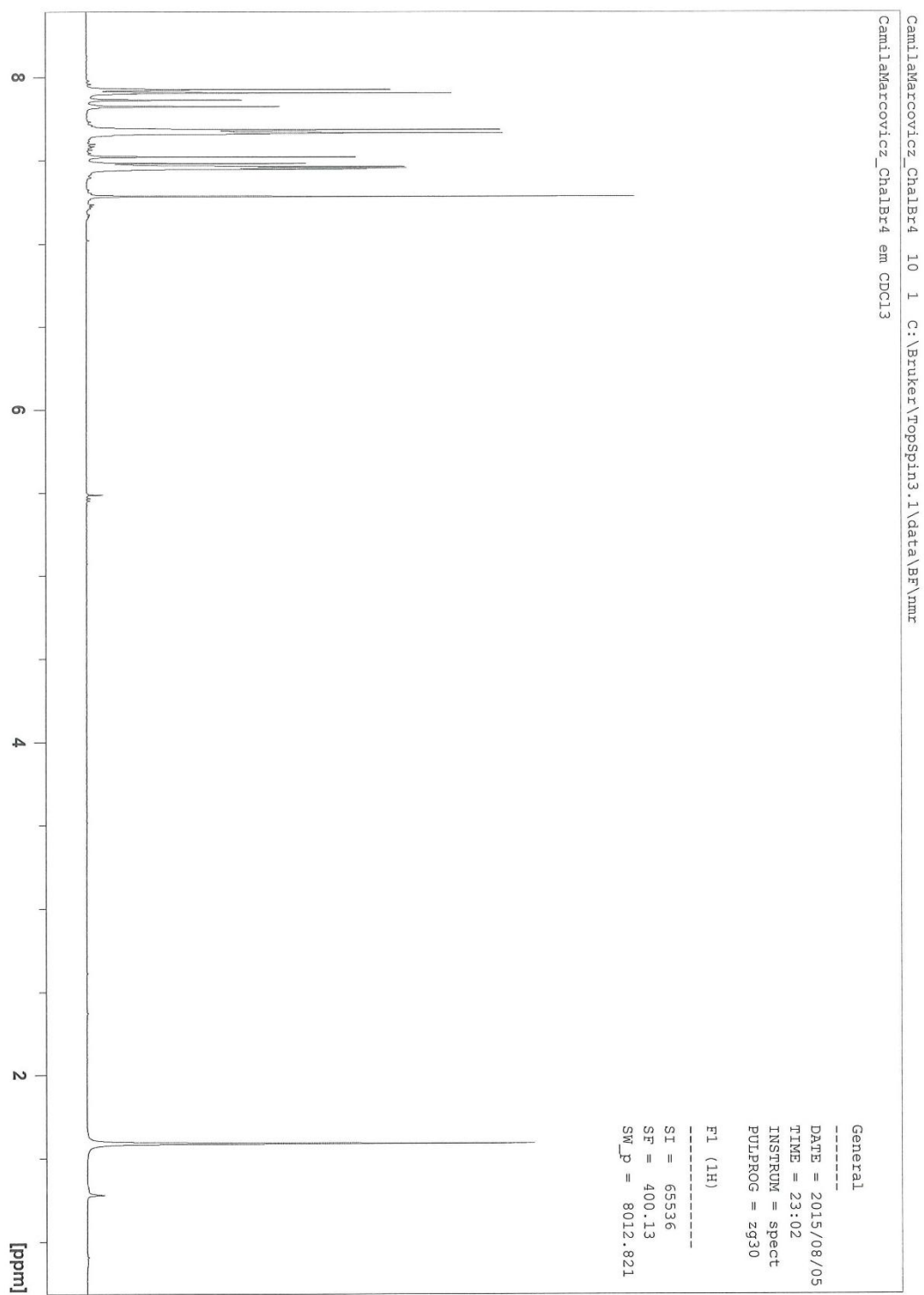


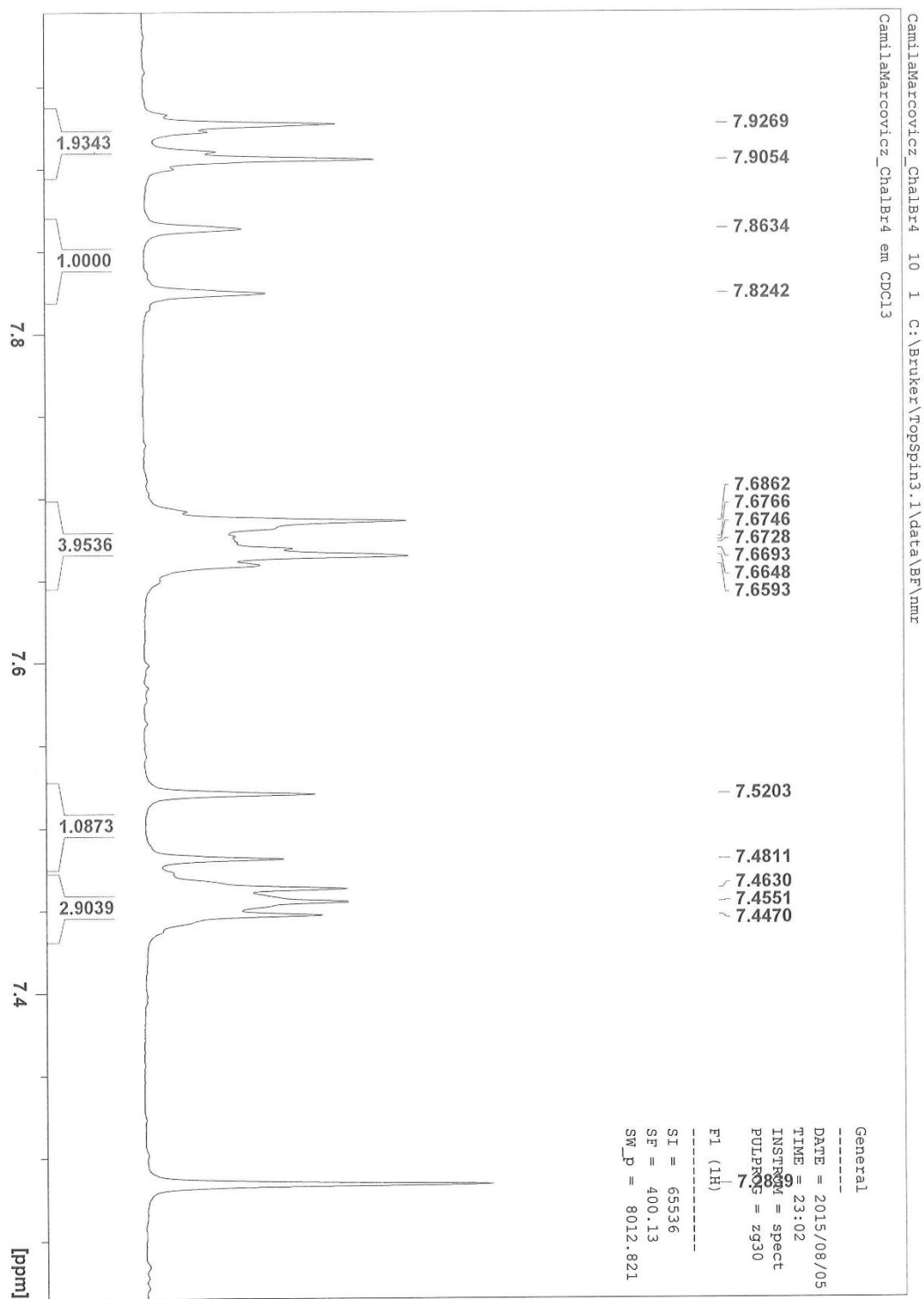
EXPANSÃO ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  A 400MHZ DA *m*-CHALBr EM  $\text{CDCl}_3$ 

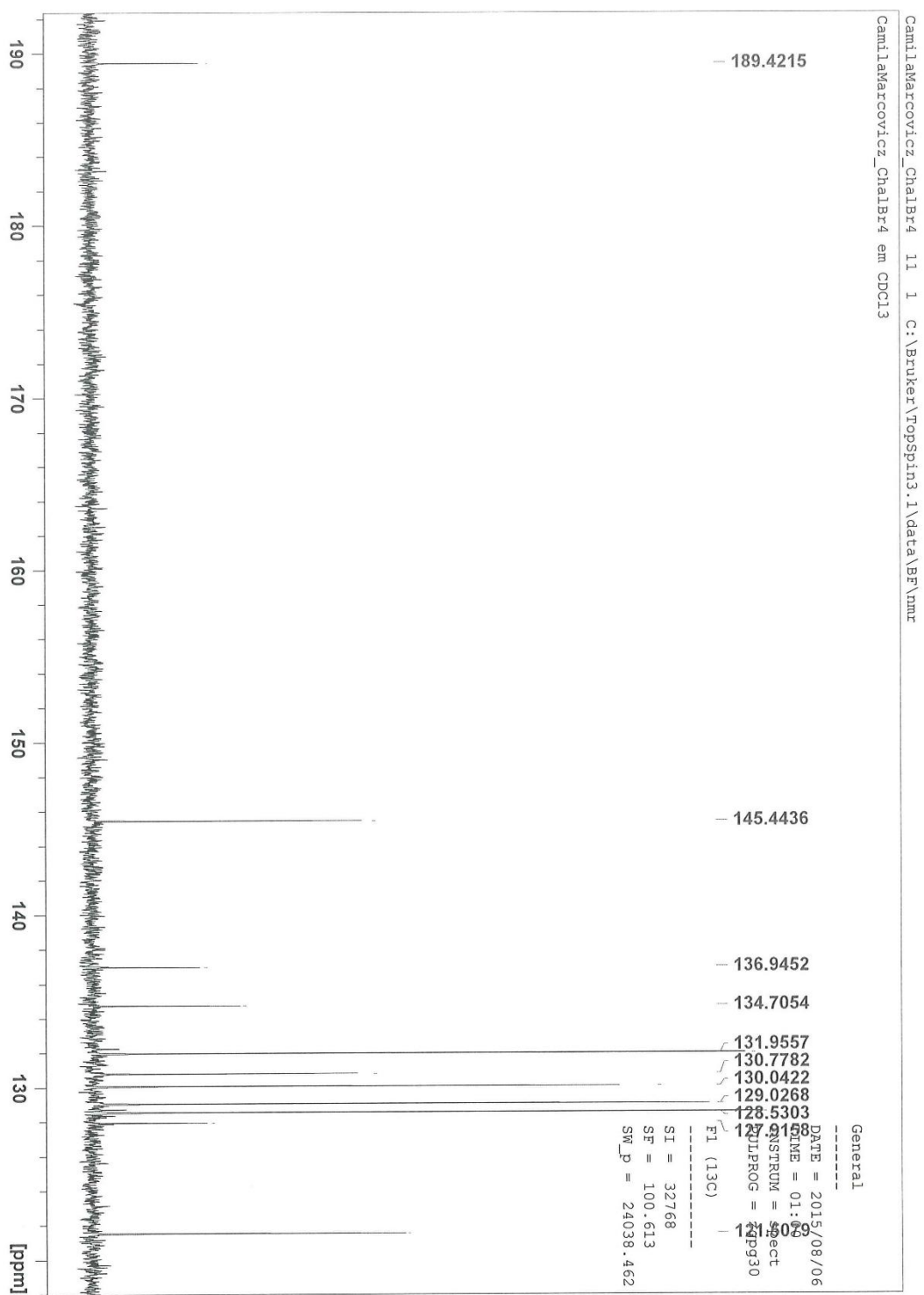


APÊNDICE H - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$ , DEPT-90, DEPT-135 A 100MHZ  
DA *m*-CHALBr EM  $\text{CDCl}_3$



APÊNDICE I - ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  A 400MHZ DA *p*-CHALBr EM  $\text{CDCl}_3$ 

EXPANSÃO ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  A 400MHZ DA *p*-CHALBr EM  $\text{CDCl}_3$ 

APÊNDICE J - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  A 100MHZ DA *p*-CHALBr EM  $\text{CDCl}_3$ 



APÊNDICE K - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$ , DEPT-90, DEPT-135 A 100MHZ  
DA *p*-CHALBr EM  $\text{CDCl}_3$

