

Síntese e Avaliação Farmacológica de Chalconas como Novos Candidatos a Protótipos de Fármacos Antitumorais

Amanda F. Cidade, Thiago Freitas, Luciano M. Lião, Cláudia Pessoa,
Anderson C. S. Feitosa, Assuero Meira & Gilberto L. B. Aquino

Uma série de 34 derivados chalconas foi sintetizada e as suas atividades citotóxicas avaliadas como potenciais protótipos antitumorais. Estes compostos foram testados para avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro* frente às linhagens tumorais MDAMB-435 (Melanoma Humano), HCT-8 (Cólon) e SF-295 (Sistema Nervoso), utilizado o método do MTT. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade biológica de chalconas com diferentes padrões de substituição nos anéis A e B dos anéis fenila destes compostos. Em resumo, neste estudo 25 derivados chalconas demonstraram potencial citotóxico relevante permitindo classifica-los como potenciais agentes anti-câncer.

Palavras-chave: *combretastatinas; chalconas; atividade antitumoral.*

A series of 34 chalcones derivatives was synthesized and their cytotoxic activities evaluated as potential antitumoral. These compounds were tested to evaluate the *in vitro* antiproliferative activity against the tumor cell lines MDAMB-435 (human melanoma), HCT-8 (colon) and SF-295 (Nervous System), used the method of MTT. The purpose this study was to evaluate the biological activity of chalcones with different substitution patterns on the rings a and B of the phenyl rings of these compounds. In summary, this study 25 demonstrated potent cytotoxic chalcones derivatives allowing relevant classifies them as potential anti-cancer agents.

Keywords: *combretastatin A-4; chalcones; antitumor activity.*

Introdução

O câncer é uma doença que se caracteriza pela perda da capacidade de controlar o processo de replicação celular. Nesse contexto, a replicação descontrolada leva a alterações na fisiologia do local onde o processo se desenvolve, culminando na falência do órgão¹. Atualmente o câncer é responsável por um em cada quatro óbitos, sendo considerada a segunda causa de morte de morte no mundo². No Brasil, a previsão do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para 2013 aponta a ocorrência de 520 mil novos casos, o que reforça a magnitude do problema no país³.

Neste cenário, a busca por medicamentos antitumorais tem aumentado objetivando tratamentos mais efetivos e seletivos. Baseadas nos avanços da biologia do câncer, as pesquisas buscam moléculas que atuem por mecanismos específicos de combate a doença, como por exemplo a inibição da polimerização de microtubulinas, sistema que interfere na mitose de células eucarióticas afetando o crescimento de tumores e supressão do câncer. Moléculas que atuam por este mecanismo representam grupo das substâncias mais atrativas e promissoras como anticancerígenas de aplicação clínica atualmente, sendo o paclitaxel (Taxol®) o principal representante dessa classe⁴.

Impulsionados pelas expectativas mundiais, a investigação sobre as propriedades antitumorais de chalconas **1** (figura 1) tem recebido atenção significativa ao longo dos últimos anos, especialmente devido a sua semelhança estrutural com os compostos combretastatinas^{5,6}. Essas substâncias foram isoladas da casca da árvore sul africana *Combretum caffrum*, sendo que o mais ativo destes compostos é a combretastatina A-4 (CA-4) **2**, um potente agente citotóxico que inibe a polimerização dos microtubulinas, resultando na paralisação do crescimento de células tumorais na fase G2-M^{7,8}. Porém, o desenvolvimento do CA-4 como um fármaco antitumoral tem seu potencial comprometido devido a sua baixa solubilidade em meios biológicos, o que tem alimentado as investigações sobre os análogos estruturais destes compostos⁹⁻¹¹.

Estudos têm demonstrado que chalconas, análogos diretos das combretastatinas, podem se ligar às tubulinas evitando sua polimerização em microtúbulos, porém

os mecanismos ainda são incertos. Modificações estruturais em chalconas conduziram a melhoria na sua biodisponibilidades e alguns derivados mostraram citotoxicidades seletiva contra células tumorais^{6,8}, neste sentido a triagem de derivados chalconas que apresentem efeitos sinérgicos para atividades antitubulinas e anticâncer é essencial.

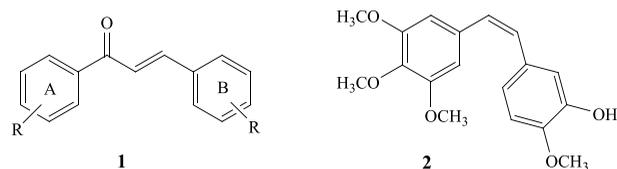


Figura 1. Estrutura geral de chalconas **1**, combretastatina A-4 (CA-4) **2**.

As chalconas ou 1,3-difenil-2-propen-1-ona **1** são precursores da biosíntese dos flavonóides e isoflavonóides, importantes metabólitos secundários de plantas medicinais. Estes compostos podem ser extraídos de plantas ou obtidos por meios sintéticos, em sua estrutura encontram-se a porção olefinica e a carbonila conjugada ligada a dois anéis fenila^{12,13}. Derivados chalconas têm recebido atenção devido as suas estruturas relativamente simples, e em virtude da grande variedade de ações farmacológicas descritas para estes compostos, incluindo atividade bactericida^{14,15}, fungicida¹⁶, antiprotozoária^{17,18}, inseticida¹⁹, antiinflamatória^{20,21}, propriedade de inibição enzimática²², citotóxica²³⁻²⁶ dentre outras atividades^{12,27}.

Estudos têm demonstrado que essas atividades biológicas são em grande parte atribuídas a porção olefinica de chalconas, além disso, o padrão de substituição dos anéis A e B de chalconas podem resultar em compostos com propriedades farmacológicas totalmente distintas. A variedade destes compostos é assunto de grande interesse, pois permite o estudo entre estrutura química e atividade biológica conduzindo, portanto, a conclusões úteis à síntese de novos derivados de chalconas antitumorais²⁸.

Em virtude da semelhança estrutural das chalconas com os compostos naturais antimetabólitos combretastatinas, realizou-se neste trabalho a síntese bem como a avaliação do potencial citotóxico *in vitro* de 34 derivados chalconas, frente as linhagens de células tumorais HCT-8 (côlon), MDA-MB-435 (melanoma) e SF-295 (sistema nervoso).

Materiais e Métodos

PROCEDIMENTO GERAL PARA SÍNTESE DE CHALCONAS

Os derivados chalconas **1-34** foram obtidos via condensação aldólica clássica de Claisen-Schmid, segundo figura 2. Diferentes acetofenonas e benzaldeídos substituídos em quantidades equimolares, foram dissolvidos em solução de NaOH (50% p/v) em metanol. A mistura resultante foi agitada a temperatura ambiente durante 24 horas, após esse tempo vertida em água gelada e neutralizada com solução de HCl 50%. O precipitado resultante foi filtrado, lavado com água e recristalizados em etanol^{12,29}.

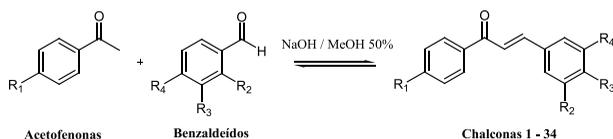


Figura 2. Esquema geral para a síntese dos derivados chalconas **1-34**.

LINHAGENS CELULARES, OBTENÇÃO E CULTIVO.

A avaliação do potencial citotóxico *in vitro* do composto foi estudado frente às linhagens celulares tumorais humanas MDA-MB-435 (Melanoma), HCT-8 (Cólon) e SF-295 (sistema nervoso), realizados no Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. Tais linhagens celulares foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

ENSAIO CITOTÓXICO

A citotoxicidade foi obtida através do método do MTT³⁰, no qual a quantidade de MTT reduzido a formazan é proporcional ao número de células viáveis. As células tumorais foram distribuídas em multiplacas de 96 poços com densidade de 0,3 x 10⁶ células/mL, para células suspensas, 0,7 x 10⁵ células/mL para as aderidas. Os composto alvo foram testados em concentração única de 5µg e incubado durante 72 horas juntamente com a suspensão de células. Após o período de incubação, 200 µL da solução de MTT foram adicionados em cada

poço da multiplaca. Depois de um período adicional de 3 horas, 150µl de DMSO foi adicionado em cada poço. Para a quantificação do sal reduzido nas células vivas, as absorbâncias foram lidas com o auxílio do espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 595 nm. A absorbância das multiplacas de controle foi fixada como 100% e os resultados foram expressos como porcentagem do controle.

Resultado e Discussão

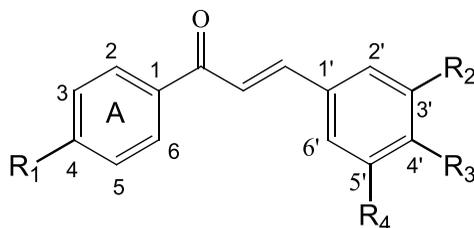
Com base nos resultados obtidos em estudos anteriores, sintetizamos 34 derivados chalconas com diferentes substituintes no anel A e B, a fim de avaliarmos os efeitos citotóxicos destes derivados. Estas chalconas foram divididas em seis subtipos: metoxichalconas (**1-10**), metilchalconas (**11-19**), fluorchalconas (**20-23**), nitrochalconas (**24-27**), aminochalconas (**28 e 29**) e benzochalconas de acordo com os substituintes no anel A dos derivados. Todos os compostos sintetizados estão listados na tabela 1.

Para investigar o efeito antiproliferativo das chalconas (**1-34**) frente às linhagens tumorais MDAMB-435 (Melanoma - Humano), HCT-8 (Cólon - Humano) e SF-295 (Sistema Nervoso - Humano) foi utilizado o método do MTT³⁰. Este ensaio consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) para formazan, pela atividade da enzima succinil-desidrogenase presente na mitocôndria da célula viável, permitindo dessa maneira quantificar a porcentagem de células vivas.

Para o teste MTT são considerados resultados relevantes os valores de potencial de inibição do crescimento tumoral maiores que 90% para pelo menos duas das linhagens testadas, neste trabalho foi utilizado como controle positivo a doxorubicina, fármaco utilizado na terapia contra o câncer. As atividades citotóxicas das amostras frente às três linhagens de células tumorais estão expressas na Tabela 2, com seus respectivos percentuais de inibição (GI%).

De acordo com os dados da tabela 2, os testes realizados *in vitro* mostraram notável efeito citotóxico para a maioria dos compostos. Dentre as metoxichalconas (**1-10**) testadas, os composto **2, 5 e 10** não demonstraram perfis favoráveis de inibição. Por outro lado com o aumento de substituintes

Tabela 1. Chalconas sintetizadas via condensação de Claisen - Shimidit.



Chalconas	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Chalconas	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
1	OCH ₃	H	H	H	18	CH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
2	OCH ₃	H	CH ₃	H	19	CH ₃	H	NO ₂	H
3	OCH ₃	H	CH ₂ CH ₃	H	20	F	H	OCH ₃	H
4	OCH ₃	H	OH	H	21	F	H	OCH ₂ CH ₃	H
5	OCH ₃	H	OCH ₃	H	22	F	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
6	OCH ₃	H	OCH ₂ CH ₃	H	23	F	H	OH	OCH
7	OCH ₃	OCH	H	OCH ₃	24	NO	H	OH	H
8	OCH ₃	OCH	OCH ₃	OCH ₃	25	NO ₂	H	OCH ₃	H
9	OCH ₃	H	OH	OCH	26	NO ₂	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
10	OCH ₃	H	NO ₂	H	27	NO ₂	H	OH	OCH ₃
11	CH ₃	H	CH ₃	H	28	NH ₂	OCH ₃	H	OCH ₃
12	CH ₃	H	CH ₂ CH ₃	H	29	NH ₂	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
13	CH ₃	H	OH	H	30	H	H	CH ₃	H
14	CH ₃	H	OCH ₃	H	31	H	H	OCH ₃	H
15	CH ₃	H	OCH ₂ CH ₃	H	32	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
16	CH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃	33	H	H	OH	OCH ₃
17	CH ₃	OCH ₃	OH	OCH ₃	34	H	H	NO ₂	H

metoxila no anel B (4-OCH₃, 3,5-OCH₃, 3,4,5 - OCH₃) ocorre diminuição da seletividade entre as células e aumento dos percentuais de inibição (GI%) para as três linhagens. Segundo estudos de relação estrutura atividade entre compostos combrestatina, unidades metoxila seria um dos requisitos estruturais necessários á atividade antitumoral deste grupo de composto^{25,28}, podendo desta forma ser estendido ás atividades das metoxichalconas.

Dentre as metilchalconas (**11-19**) analisadas, os compostos **11** e **34** não demonstraram potencial citotóxico relevante. Porém, uma comparação entre as séries de compostos metoxichalconas (**1-10**) e metilchalconas (**11-19**), demonstra aumento da atividade antiproliferativa com a inserção de grupos metila na posição 4 do anel A. A introdução de halogênio na posição 4 do anel A das chalconas não altera o percentual de inibição, mantendo o perfil citotóxico considerável das fluorchalconas (**20-23**), muito embora uma grande número de fármacos utilizados para o tratamento de câncer sejam halogenados³².

Para as nitrochalconas apresentadas neste estudo, apenas a chalcona **27** manteve inibição, o que demonstra ser desfavorável a inserção deste grupo quando comparado ao controle positivo doxorrubicina.

A introdução do grupo amino no anel A das chalconas, teve um efeito positivo para os composto **28** e **29**, o que pode estar aliado á inserção de grupos metoxila nas posições 3', 4' e 5' do anel B, unidade que esta relacionada á impedir a polimerização das microtubulinas⁶. As atividades dos compostos **30** á **34** foram relevantes, o caráter inibitório é mantido apenas com a inserção de substituintes metoxila nas posições 3', 4' e 5' do anel B.

A partir dos resultados expostos acima, 25 análogos chalconas demonstraram perfil citotóxico promissor para a atividade antitumoral. As considerações preliminares feitas neste trabalho nos impulsionam a continuar a triagem dentre o compostos apresentados neste estudo, afim de elucidar as características estruturais e físico-químicas necessárias á atividade citotóxica de chalconas frente a linhagens tumorais MDAMB-435, HCT-8 e SF-295.

Conclusão

Na presente investigação foram sintetizados 34 derivados chalconas, dos quais 25 destes compostos demonstraram relevante potencial citotóxico. Nossos

Tabela 2. Percentuais de inibição (GI%) das chalconas 1-34, frentes ás células MDA-MB-435, HCT-8 e SF-295 utilizando o método MTT.

v	GI (%)		
	MDA-MB-435	HCT-8	SF-295
1	95,84	97,8	96,27
2	81,53	79,49	81,16
3	101,84	102,59	104,25
4	96,64	53,75	101,39
5	104,4	85,3	56,8
6	105,13	102,48	105,64
7	103,68	50,82	105,9
8	104,56	102,31	105,99
9	99,12	101,13	101,47
10	70,62	60,88	76,28
11	83,74	82,48	70,59
12	102,24	98,48	104,6
13	99,2	100,23	104,08
14	97,84	97,01	103,9
15	105,77	102,87	107,37
16	103,6	100,79	105,12
17	93,43	86,31	88,12
18	98,16	100,62	105,9
19	99,76	84,9	100,17
20	97,76	94,82	103,73
21	98,4	86,48	96,88
22	96,8	96,39	104,34
23	102,8	93,86	93,41
24	71,39	57,13	54,2
25	70,84	61,96	76,13
26	85,35	80,28	67,73
27	96,48	89,69	97,48
28	100,46	101,16	93,09
29	98,64	92,62	103,38
30	101,84	95,38	102,34
31	101,44	94,42	98,53
32	92,31	96,62	100,17
33	99,44	96,68	103,12
34	97,6	93,86	98,87
Doxorrubicina	97,3	96,94	87,67

resultados demonstraram que os requisitos estruturais necessárias à atividade antitumoral frente às células MDAMB-435, HCT-8 e SF-295, podem estar relacionados a inserção de grupos metila e metoxila no anel A das chalconas, e ainda o aumento de grupos metoxila no anel B pode favorecer o perfil citotóxico destes compostos. Este estudo indica que os compostos relevantes deste trabalho podem ser considerados promissores agentes anti-câncer.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos órgãos financiadores FAPEG, CAPES e CNPq.

Referências bibliográficas

- Gatenby, R. A.; Gillies, R. J. *Nat. Rev. Cancer* 2004, 4, 891.
- <http://www.who.int/topics/cancer/en/>, acessada em Março 2013.
- <http://www.inca.gov.br/vigilancia/mortalidade>, acessada em Março 2013.
- Altmann, K. H.; Gertsch, J.; *Nat. Prod. Rep.* 2007, 24, 327.
- Ducki, S.; Rennison, D.; Woo, M.; Kendall, A.; Chabert, J. F. D.; McGown, A. T.; Lawrence, N.; *J. Bioorg. Med. Chem.* 2009, 17, 7698.
- Prakasham, a P.; Saxena, a K.; Luqman, S.; Chanda, D.; Kaur, T.; Gupta, A.; Yadav, D. K.; hanotiya, C. S.; Shanker, K.; Khan, F.; Negi, A. S. J.; *Bioorg. Med. Chem* 2012, 20, 3049.
- Kong, Y.; Wang, K.; Edler, M. C.; Hamel, E.; Mooberry, S. L.; Paige, M. a; Brown, M. L.; *Bioorg. Med. Chem.* 2010, 18, 971.
- Zhang, H.; Liu, J.-J.; Sun, J.; Yang, X.-H.; Zhao, T.-T.; Lu, X.; Gong, H.-B.; Zhu, H.-L.; *Bioorg. Med. Chem.* 2012, 20, 3212.
- Neves, M. P.; Cravo, S.; Lima, R. T.; Vasconcelos, M. H.; Nascimento, M. S. J.; Silva, A. M. S.; Pinto, M.; Cidade, H.; Corrêa, A. G.; *Bioorg. Med. Chem.* 2012, 20, 25.
- Boumendjel, A.; Ronot, X.; Boutonnat.; *J. Curr. Drug Targ.* 2009, 10, 363.
- Lawrence, N. J.; McGown, A. T.; *Curr. Pharm. Des.* 2005, 11, 1679.
- Patil, C. B.; Mahajan, S. K.; Katti, S. A.; *J. Pharm. Sci. & Res.* 2009, 1, 11.
- Katsori, a-M.; Hadjipavlou-Litina, D.; *Curr. Med. Chem.* 2009, 16, 1062.
- Latif, F.; Baseer, M.; Iftikhar, F.; Kulsoom, S.; *Arkivoc* 2009, 20, 318.
- Sharma, V.; Singh, G.; Kaur, H.; Saxena, A. K.; Ishar, M. P. S.; *Bioorg. Med. Chem lett.* 2012, 22, 6343.
- Sivakumar, P. M.; Muthu Kumar, T.; Doble, M.; *Chem. Biol. & Drug Des.* 2009, 74, 68.
- Das, B. C.; Mariappan, G.; Saha, S.; Bhowmik, D.; *J. Chem. Pharm. Sci.* 2010, 2, 113.
- Aponte, J. C.; Verástegui, M.; Málaga, E.; Zimic, M.; Quiliano, M.; Vaisberg, A. J.; Gilman, R. H.; Hammond, G. B.; *J. Med. Chem.* 2008, 51, 6230.
- Filho, L. S. S.; *Plan. Dan.* 2007, 25, 747.
- Yang, H.-M.; Shin, H.-R.; Cho, S.-H.; Bang, S.-C.; Song, G.-Y.; Ju, J.-H.; Kim, M.-K.; Lee, S.-H.; Ryu, J.-C.; Kim, Y.; Jung, S.-H.; *Bioorg. Med. Chem.* 2007, 15, 104.
- Nowakowska, Z.; *Eur. J. Med. Chem.* 2007, 42, 125.
- Najafian, M.; Ebrahim-Habibi, A.; Hezareh, N.; Yaghmaei, P.; Parivar, K.; Larijani, B.; *Mol. Biol. Rep.* 2011, 38, 1617.
- Wang, G.; Peng, F.; Cao, D.; Yang, Z.; Han, X.; Liu, J.; Wu, W.; He, L.; Ma, L.; Chen, J.; Sang, Y.; Xiang, M.; Peng, A.; Wei, Y.; Chen, L.; *Bioorg. Med. Chem.* 2013.
- Roman, B. I.; Ryck, T. De; Dierickx, L.; Vanhoecke, B. W. a; Katritzky, A. R.; Bracke, M.; Stevens, C. V.; *Bioorg. Med. Chem.* 2012, 20, 4812.
- Hu, Y.; Lu, X.; Chen, K.; Yan, R.; Li, Q.-S.; Zhu, H.-L.; *Bioorg. Med. Chem.* 2012, 20, 903.
- John, R.; Sukumarana, K.; Kuttana, G.; Raob, M. N. A.; Subbarajuc, V.; Kuttana, R.; *Can. Lett.* 1995, 97, 33.
- Hadjeri, M.; Beney, C.; Boumendjel, A. *Cur. Org. Chem.* 2003, 7, 679.
- Bandgar, B. P.; Gawande, S. S.; Bodade, R. G.; Totre, J. V.; Khobragade, C. N.; *Bioorg. Med. Chem.* 2010, 18, 1364.
- Bukhari, S. N. A.; Jasamai, M.; Jantan, I.; *Min. Rev. Med. Chem.* 2012, 12, 1394.
- Mosmann, T.; *J. Immunol. Methods*, 1983, 65, 55.
- Chang, J.; Hsieh, H.; Chang, C.; *Biol. Pharm. Bull.* 2006, 49, 6656.
- Enmi, K. H.; Iwatashi, Y. H.; Ikita, E. H.; Oyama, N. T.; Irano, T. H.; *Biol. Pharm. Bull.* 2009, 32, 1109.

Amanda F. Cidade¹, Thiago Freitas¹, Luciano M. Lião², Cláudia Pessoa³, Anderson C. S. Feitosa³, Assuero Meira³ & Gilberto L. B. Aquino¹

¹Universidade Estadual de Goiás, Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas, Anápolis, GO

²Universidade Federal de Goiás, Campus II Samambaia, CP 131, Goiânia, GO.

³Universidade Federal do Ceará, Laboratório de Oncologia Experimental, Fortaleza, CE.

*e-mail: gilberto.benedito@ueg.br