ESTUDO CONFORMACIONAL E DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE ANÁLOGOS HALOGENADOS DE CHALCONAS

Bianca Scharr (BIC/Fundação Araucária), Barbara Celânia Fiorin (Orientadora), e-mail: barbarafiorin@yahoo.com.br.

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Química

Química; Química orgânica.

Palavras-chave: 1,3-difenil-2-propen-1-ona, análise conformacional, atividade biológica.

Resumo

Chalconas substituídas despertam grande interesse devido a enorme gama de atividades biológicas que apresentam e a sua versatilidade sintética. Estudou-se a substituição da estrutura fundamental da chalcona com os halogênios bromo e flúor na posição *orto*, com relação a influência destas substituições no equilíbrio conformacional, através de cálculos teóricos, e na sua atividade antibacteriana. Os compostos foram caracterizados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). Verificou-se que o efeito hiperconjugativo, efeito estérico e de repulsão de cargas influenciam na preferência conformacional dos compostos. Também foi mostrado que tanto a chalcona sem substituintes quanto as chalconas halogenadas interferem no crescimento bacteriano de espécies modelo de microrganismos gram positivos.

Introdução

Chalconas são as precursoras biossintéticas naturais de flavonoides, uma classe de metabólitos secundários fenólicos de ampla distribuição no reino vegetal, muitos dos quais estão presentes em plantas medicinais. (DEWICK, 2002). Correspondem estruturalmente ao 1,3-difenil-2-propen-1-ona, dois anéis aromáticos (anéis A e B) unidos por três carbonos em um sistema carbonílico α, β insaturado.

Chalconas substituídas despertam um interesse particular, devido as atividades biológicas que apresentam, em função do substituinte, podendo ser usadas também como precursoras na síntese de diferentes compostos heterocíclicos bioativos (AVUPATI; YEJELLA, 2014). Apresentam ainda versatilidade sintética, uma vez que podem ser obtidas em laboratório através de protocolos convencionais de síntese orgânica (ORTOLAN, 2013). Pode-se considerar, portanto, que as chalconas são promissoras “moléculas-protótipo” para o desenvolvimento de novas drogas, com potencial farmacológico bastante abrangente.

Neste trabalho, estudou-se a substituição da estrutura fundamental da chalcona (Chal) com os halogênios flúor e bromo na posição *orto* do anel A (ChalF e ChalBr, respectivamente), com relação à influência destas substituições no equilíbrio conformacional e na propriedade antibacteriana de chalconas.

Materiais e Métodos

1. Síntese Orgânica: Empregou-se o método de síntese conhecido por condensação de Claisen-Schmidt. Inicialmente, 10 mmol de benzaldeído foram misturados com 20 mL de metanol. Em banho de gelo e com agitação magnética, foi adicionada uma alíquota de 10 mL de solução aquosa de NaOH 4,8 $mol.L^{-1}$. Em seguida, 12 mmol de acetofenona halogenada começaram a ser lentamente gotejados à mistura reacional. A reação transcorreu em temperatura ambiente, em sistema protegido de luz, com constante agitação por 24 horas, segundo metodologia adaptada de SENS (2014). A Chal foi submetida à purificação por recristalização em mistura de solventes (acetona e água). Já a ChalBr e ChalF foram submetidas a sucessivas lavagens com solventes de diferentes polaridades (diclorometano e água).

2. Caracterização Espectroscópica: Espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C foram adquiridos em Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear BRUKER. Amostras dos compostos foram preparadas com cerca de 20 mg dos mesmos em 0,6 mL de clorofórmio-*d.*

3. Cálculos teóricos: As chalconas foram estudadas quanto a sua geometria molecular, empregando o pacote de programas GAUSSIAN 09 e o programa de visualização molecular GAUSS-VIEW 5.0.8.

Inicialmente, foi conduzida uma busca preliminar dos confôrmeros mais estáveis através de cálculos de scan, que giram os ângulos diedros de forma gradativa, em um determinado número de passos, calculando a energia da geometria gerada em cada passo. Três ângulos diedros das chalconas (γ,δ e ε) foram selecionados e submetidos a estes cálculos, empregando um nível de teoria HF/6-31G. A partir dos pontos mínimos dos gráficos foram realizados cálculos de otimização e frequência, empregando nível de teoria M06-2X/6-311++G(2d, 2p), obtendo-se ao final dos mesmos os confôrmeros mais estáveis para cada chalcona. Para todos os valores de energia dos confôrmeros, foi feita a correção com o *zero point energy* (ZPE).

Foram empregados também cálculos de NBO (baseados na teoria dos orbitais naturais de ligação, do inglês, natural bond orbital), a fim de verificar a influência dos efeitos estereoeletrônicos para a estabilização dos confôrmeros.

4. Atividade antibacteriana: Utilizou-se a técnica de difusão em disco. Foram utilizados discos de papel de filtro Whatman, 6mm de diâmetro, estéreis e saturados com 5µL das soluções dos compostos.

Foram utilizadas as seguintes soluções: DMSO (controle negativo referente ao solvente no qual as amostras foram solubilizadas), DMSO + 5% de benzaldeído (controle negativo referente ao principal produto contaminante esperado para as chalconas), amostras das chalconas em DMSO (100 mg/mL) e canamicina 100mg/mL (controle positivo). Após a adição de 5µL das soluções, os discos de papel filtro foram secos ao ar em atmosfera estéril por 30 minutos e transferidos para as placas de Petri contendo meio sólido.

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. Os pré-inóculos foram preparados em meio líquido Luria Bertani e incubados sob agitação a 37°C (*E. coli* e *S. aureus*) ou a 30°C (*B. subtilis*) durante 16h. Os cultivos foram transferidos para meio sólido ágar

Mueller Hinton e espalhados com o auxílio de swabs estéreis. Após incubação em temperaturas apropriadas, durante 24 horas, as placas foram analisadas.

Resultados e Discussão

A Chal, ChalBr e ChalF apresentaram características físicas distintas: Chal foi obtida na forma de cristais sólidos de coloração amarela, enquanto a ChalBr e ChalF foram obtidas como óleos amarelos de elevada viscosidade. A espectroscopia de RMN de ^{1}H e ^{13}C forneceu os deslocamentos químicos esperados para os compostos, a partir dos quais se confirmou a obtenção dos produtos desejados. Indicou, também, resíduos do reagente benzaldeído para a ChalBr. Além disso, verificou-se a presença de sinais referentes à contaminantes para a ChalF, os quais não indicam resíduos dos reagentes (ausência do sinal característico do hidrogênio de aldeídos e da metila da acetofenona). Estes sinais podem ser atribuídos a possíveis subprodutos da reação ou contaminantes do solvente diclorometano utilizado no processo de extração.

A partir dos cálculos teóricos foram encontradas duas conformações de maior estabilidade para a Chal, das quais a de menor energia é aquela que assume a conformação *s-cis*. Já a conformação *s-trans* contribuiu em menor grau para o equilíbrio conformacional. Analisando os cálculos de NBO e os ângulos diedros assumidos por esses dois confôrmeros, percebe-se que a doação de densidade eletrônica estabilizante é maior na conformação *s-cis*, ou seja, as interações de estabilização entre orbitais envolvendo o anel aromático A, a dupla ligação vinílica e a carbonila contribuem para que a energia do confôrmero *s-cis* seja menor que a do confôrmero *s-trans*.

Tal como a Chal, a ChalBr apresenta duas conformações mais estáveis, sendo a primeira delas na orientação *s-cis* e a segunda na orientação *s-trans*. Além disso, os cálculos também demonstraram a ocorrência de um segundo confôrmero *s-cis*, o qual contribui em menor proporção para o equilíbrio conformacional. Verificando os dados do NBO, percebe-se que a adição de um átomo de halogênio na posição orto à estrutura da chalcona gera um cenário no qual a repulsão eletrostática e o efeito estérico desempenham papéis mais determinantes na definição das geometrias mais estáveis. Neste caso, verifica-se que as geometrias nas quais o átomo de oxigênio e bromo estão mais distantes entre si são mais estáveis.

Para a ChalF foram encontradas quatro conformações majoritárias, sendo duas conformações *s-cis* e duas *s-trans*. Aqui, novamente, o efeito hiperconjugativo não explica sozinho, a determinação da preferência conformacional deste composto. As duas geometrias nas quais o átomo de oxigênio da carbonila e o átomo de flúor estão orientados no mesmo sentido no espaço, em uma relação de maior proximidade, contribuem juntas com menos de 2,5% da população de confôrmeros no equilíbrio, demonstrando novamente que a repulsão de cargas entre esses átomos desempenha um papel importante, sendo neste caso, ainda mais relevante se levado em comparação com o composto anterior, uma vez que o flúor apresenta um caráter mais eletronegativo que o bromo. Além disso, a ocorrência de um confôrmero *s-trans* a mais do que foi verificado para a ChalBr, pode estar relacionado a um menor efeito estérico do átomo de flúor, que se constitui em um grupamento menos volumoso que o átomo de bromo.

Com relação à atividade antibacteriana, os controles negativos com o solvente DMSO e DMSO contendo 5% de benzaldeído não apresentaram atividade antimicrobiana quando testados frente a *S. aureus* e *E. coli*. O controle positivo com canamicina apresentou atividade com halo de inibição de crescimento de 10 a 12 mm. As chalconas de forma geral, não apresentaram ação sobre o crescimento de *E. coli*, que é o modelo de estudo para bactérias Gram negativas.

Os compostos testados, porém, apresentaram discreta atividade inibitória sobre o crescimento das bactérias usadas como modelos de microrganismos gram positivos (halos de inibição entre 1-4 mm). Esse grupo de microrganismos apresenta parede celular mais simples quando comparado às bactérias Gram negativas, e a atividade dos compostos provavelmente decorre do fato da sua membrana plasmática ser mais acessível.

Conclusões

A introdução dos substituintes halogênios bromo e flúor ao esqueleto carbônico da chalcona influencia no seu equilíbrio conformacional, de forma que tanto o efeito hiperconjugativo, quanto o efeito estérico e de repulsão de cargas determinam a preferência conformacional dos compostos. Também foi mostrado que tanto a chalcona sem substituintes quanto as chalconas halogenadas interferem no crescimento bacteriano de espécies modelo de microrganismos gram positivos. Uma investigação mais detalhada através da determinação da concentração inibitória mínima dos compostos frente ao crescimento bacteriano pode ajudar a aprofundar o entendimento da atividade antibacteriana de chalconas substituídas.

Agradecimentos

À Fundação Araucária, ao Laboratório de química computacional GSQC da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), pela estrutura para a realização dos cálculos computacionais, à Universidade Estadual de Maringá (UEM) pela realização dos espectros de ressonância magnética nuclear.

Referências

AVUPATI, V. R.; YEJELLA, R. P. Chalcones: a mini review. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 10, p. 1713-1742, 2014

DEWICK, P. M. Flavonoids and stilbenes. In: **Medicinal Natural Products**. 2. ed. John Wiley & Sons, Ltd, 2002. p. 150

ORTOLAN, X. R. Avaliação do potencial osteogênico de chalconas. 2013. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Vale do Itajaí. Itajaí, 2013

SENS, L. Síntese, caracterização, análise conformacional e atividade antioxidante de análogos de chalconas bromadas e hidroxiladas. 2014. 110 f. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) – Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2014.