

TÁSSIA DE SOUSA COSTA

**SÍNTESE DE SAIS DE FLAVÍLIO PARA ESTUDO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA  
E PROPRIEDADES FOTOQUÍMICAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

C837s  
2019  
Costa, Tássia de Sousa, 1994-  
Síntese de sais de flavílio para estudo de suas atividades  
biológicas e propriedades fotoquímicas / Tássia de Sousa Costa.  
– Viçosa, MG, 2019.  
xviii, 126f : il. ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Vânia Maria Teixeira Carneiro.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.67-74.

1. Antocianinas. 2. Síntese orgânica. 3. Citotoxicidade .  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Química.  
Programa de Pós-Graduação em Agroquímica. II. Título.

CDD 22 ed. 572.59

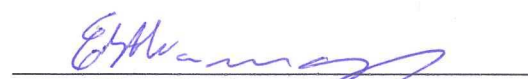
TÁSSIA DE SOUSA COSTA

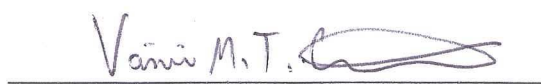
**SÍNTESE DE SAIS DE FLAVÍLIO PARA ESTUDO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA  
E PROPRIEDADES FOTOQUÍMICAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*

APROVADA: 31 de julho de 2019.

  
Lidervan de Paula Melo

  
Elson Santiago de Alvarenga  
(Coorientador)

  
Vânia Maria Teixeira Carneiro  
(Orientadora)

*Aos meus maiores incentivadores, meus pais  
Otacílio e Ioná, dedico este trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado forças para vencer mais essa etapa; só Ele sabe o quanto foi e está sendo difícil esta jornada.

Agradeço de forma especial aos meus pais, Otacílio e Ioná, pelo amor incondicional e por não medirem esforços para que eu pudesse levar meus estudos adiante. Aos meus irmãos Tálles, Marcos e Silas e aos meus familiares pelo apoio, torcida e, principalmente, pelas orações.

Ao Vinícius, pelo companheirismo e carinho, sempre me amparando nos momentos mais difíceis. Mesmo com todas as adversidades encontradas ao longo dessa trajetória, você sempre foi paciente e compreensivo.

À Professora Vânia, pela paciência, dedicação e ensinamentos que me possibilitaram a realização deste trabalho. É com imensa alegria e honra que finalizo minhas atividades ao lado de uma pessoa tão competente e que, acima de tudo, ama o trabalho que exerce. Obrigada por jamais ter desistido de mim ou desse projeto, mesmo quando eu já não conseguia dar seguimento. Obrigada por acreditar no meu potencial e acreditar que eu seria capaz de concluir essa etapa. Obrigada por todo auxílio e preocupação prestados durante todos esses anos de colaboração. Obrigada por me orientar e que você possa ser a fonte de inspiração de muitos outros alunos ao longo de sua carreira. Obrigada por se importar.

Ao professor Elson Santiago de Alvarenga pelos ensinamentos compartilhados, especialmente, nos ensaios fitotóxicos e por aceitar o convite para participar da banca avaliadora.

Ao professor Lidervan de Paula Melo, por aceitar o convite para participar da banca avaliadora e pelo paciente trabalho de revisão da redação. Às professoras Célia e Patrícia, pela disponibilidade de serem suplentes.

Ao grupo de pesquisa orientado pela professora Vânia: Vinícius Viana, Fabiana Lopes, Larissa Soares, Izabel Oliveira, Renan Lima, que me auxiliaram ao longo desse projeto. Em especial ao Vinícius e Fabiana, que foram cruciais na realização dos experimentos, além de todo o suporte moral e psicológico fornecidos a mim.

Ao Laboratório de Síntese de Agroquímicos, bem como todos seus integrantes. Em especial ao Bryan, Sabriny, Diana, Dayana, Dayane, Danielle, Lucas, Anni, Gabriella, Kariny, Jilma, Vivian, Cristiane, Júnio, Bianca, Ueveton, Lorena, Amanda, Liss, pelo companheirismo ao longo dos dias dentro do laboratório. Aos ex-membros Fernanda, Alex e Simone, que me acolheram no laboratório ainda na iniciação científica, se dispondo a repassar todos os seus

conhecimentos a uma iniciante; os ensinamentos que vocês me propuseram foram cruciais para a minha formação. Aos amigos que fiz ao longo dessa caminhada, pelas melhores recordações, ensinamentos e por todo o apoio que me deram ao longo desses 2 anos de mestrado.

Ao professor Jason Guy Taylor, por gentilmente me receber em seu laboratório no Instituto de Ciências Exatas e Biológicas (UFOP) para a preparação e obtenção dos espectros de RMN e às suas alunas, Gabriela e Betânia, por me auxiliarem nesse processo.

Ao professor Gustavo Costa Bressan, bem como seus alunos Victor e Raoni, do Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos da Universidade Federal de Viçosa, pela realização dos testes de atividade citotóxica.

Ao professor Frank Herbert Quina, por gentilmente me receber em seu laboratório no Instituto de Química (USP), possibilitando o aprendizado em fotofísica e fotoquímica de antocianinas. Aos seus alunos Gustavo, Karen e, em especial, ao Cássio, pelo acolhimento e pelos ensinamentos compartilhados ao longo da minha estadia.

Aos técnicos José Luiz, Cristiane Cerceau, Camila Belo e Márcio Alvarenga, pela paciência e disponibilidade para a realização das análises necessárias para a conclusão do meu trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, bem como todo seu corpo docente que, com dedicação, trabalham incansavelmente para que nós, alunos, possamos contar com um ensino de qualidade.

Às minhas companheiras de apartamento, Ana Luiza e Thaianne, pelo apoio e amizade em todos os momentos. Às minhas amigas que ganhei da química, Héryca, Giovana, Ana Cláudia, Kamylla, Marina, Letícia e Jéssica, por todo apoio e preocupação. Aos amigos que fiz ao longo dessa caminhada, pelas melhores recordações, ensinamentos e por todo o apoio que me deram ao longo desses 7 anos de UFV.

À Escola de Idiomas WIZARD, bem como seus professores João e Jonatas e funcionárias Pâmela e Talita, pelos ensinamentos fornecidos que facilitaram a leitura de muitos artigos e livros durante a realização desse trabalho e pela atenção e carinho, sempre se preocupando com o bem-estar de seus alunos.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	vii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	x
<b>LISTA DE ESQUEMAS</b> .....	xi
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	xii
<b>RESUMO</b> .....	xv
<b>ABSTRACT</b> .....	xvii
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>CAPÍTULO 1: SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS SAIS DE FLAVÍLIO</b> .....	7
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	7
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	10
<b>2.1. GENERALIDADES METODOLÓGICAS</b> .....	10
<b>2.2. SÍNTESE DA 4-METOXIBENZOILACETONA</b> .....	11
<b>2.3. SÍNTESE DOS SAIS DE 4-METIL FLAVÍLIO</b> .....	12
<b>2.4. OTIMIZAÇÃO DA SÍNTESE DOS SAIS DE FLAVÍLIO SEM SUBSTITUINTES EM C4</b> .....	18
<b>2.5. SÍNTESE DOS SAIS DE FLAVÍLIO SEM SUBSTITUINTES EM C4</b> .....	18
<b>2.6. SÍNTESE DOS SAIS DE PIRANOFLAVÍLIO</b> .....	25
<b>2.7. CÁLCULOS TEÓRICOS</b> .....	27
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	28
<b>3.1. SÍNTESE DOS SAIS DE 4-METIL FLÁVILIO</b> .....	29

3.2. OTIMIZAÇÃO E SÍNTESE DOS SAIS DE FLAVÍLIO SEM SUBSTITUINTES EM C4 .....	42
3.1. SÍNTESE DOS SAIS DE PIRANOFLAVÍLIO.....	51
4. CONCLUSÕES .....	54
<b>CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS SAIS DE FLAVÍLIO .....</b>	<b>55</b>
1. INTRODUÇÃO .....	55
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	56
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	58
4. CONCLUSÕES.....	65
CONCLUSÕES GERAIS .....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	67
ANEXOS .....	75

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> (A) Estrutura geral das antocianinas: R <sub>1</sub> e R <sub>2</sub> = H, OH, ou OCH <sub>3</sub> ; R <sub>3</sub> = glicosil ou H; e R <sub>4</sub> = glicosil ou OH. (B) Cátion flavílio. ....	2
<b>Figura 2.</b> As seis antocianidinas mais comuns (DAVIES; SCHWINN; GOULD, 2016).....	3
<b>Figura 3.</b> Compostos modelo utilizados para o estudo das propriedades químicas, fotoquímicas e redox das antocianinas. ....	5
<b>Figura 4.</b> Espectro de infravermelho (IV) do flavílio <b>1</b> .....	34
<b>Figura 5.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do flavílio <b>1</b> (acetonitrila- <i>d</i> <sub>3</sub> , 300 MHz).....	35
<b>Figura 6.</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C do flavílio <b>1</b> (acetonitrila- <i>d</i> <sub>3</sub> , 75 MHz). ....	36
<b>Figura 7.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do flavílio <b>1</b> (metanol- <i>d</i> <sub>4</sub> , 300 MHz).....	37
<b>Figura 8.</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C do flavílio <b>1</b> (metanol- <i>d</i> <sub>4</sub> , 75 MHz).....	38
<b>Figura 9.</b> Espectro de massas do flavílio <b>1</b> .....	39
<b>Figura 10.</b> Fragmentação do cátion flavílio <b>1</b> para formação do fragmento que dá origem ao pico base. ....	39
<b>Figura 11.</b> Espectro de infravermelho (IV) do flavílio <b>9</b> .....	48
<b>Figura 12.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do flavílio <b>9</b> (metanol- <i>d</i> <sub>4</sub> , 300 MHz).....	49
<b>Figura 13.</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C do flavílio <b>9</b> (metanol- <i>d</i> <sub>4</sub> , 75 MHz).....	50
<b>Figura 14.</b> Espectro de massas do flavílio <b>9</b> . ....	51
<b>Figura 15.</b> Estrutura do MMT e dos Formazan .....	57
<b>Figura 16.</b> Perfil de dose-resposta de células HepG2 (A) e HeLa (B) tratadas com concentrações crescentes (0-200 µM) do composto <b>6</b> por 48 h. ....	61
<b>Figura 17.</b> Espectro de infravermelho (IV) do composto <b>27</b> .....	76
<b>Figura 18.</b> Espectro de massas do composto <b>27</b> .....	77
<b>Figura 19.</b> Espectro de infravermelho (IV) do flavílio <b>2</b> .....	78
<b>Figura 20.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do flavílio <b>2</b> (metanol- <i>d</i> <sub>4</sub> , 300 MHz).....	79

<b>Figura 21.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do flavílio <b>2</b> (metanol- $d_4$ , 75 MHz).....	80
<b>Figura 22.</b> Espectro de massas do flavílio <b>2</b> .....	81
<b>Figura 23.</b> Espectro de infravermelho (IV) do flavílio <b>3</b> .....	82
<b>Figura 24.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do flavílio <b>3</b> (metanol- $d_4$ , 300 MHz).....	83
<b>Figura 25.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do flavílio <b>3</b> (metanol- $d_4$ , 75 MHz).....	84
<b>Figura 26.</b> Espectro de massas do flavílio <b>3</b> .....	85
<b>Figura 27.</b> Espectro de infravermelho (IV) do flavílio <b>4</b> .....	86
<b>Figura 28.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do flavílio <b>4</b> (metanol- $d_4$ , 400 MHz).....	87
<b>Figura 29.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do flavílio <b>4</b> (metanol- $d_4$ , 100 MHz).....	88
<b>Figura 30.</b> Espectro de massas do flavílio <b>4</b> .....	89
<b>Figura 31.</b> Espectro de infravermelho (IV) do flavílio <b>5</b> .....	90
<b>Figura 32.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do flavílio <b>5</b> (metanol- $d_4$ , 400 MHz).....	91
<b>Figura 33.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do flavílio <b>5</b> (metanol- $d_4$ , 100 MHz).....	92
<b>Figura 34.</b> Espectro de massas do flavílio <b>5</b> .....	93
<b>Figura 35.</b> Espectro de infravermelho (IV) do flavílio <b>6</b> .....	94
<b>Figura 36.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do flavílio <b>6</b> (metanol- $d_4$ , 400 MHz).....	95
<b>Figura 37.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do flavílio <b>6</b> (metanol- $d_4$ , 100 MHz).....	96
<b>Figura 38.</b> Espectro de massas do flavílio <b>6</b> .....	97
<b>Figura 39.</b> Espectro de infravermelho (IV) do flavílio <b>7</b> .....	98
<b>Figura 40.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do flavílio <b>7</b> (metanol- $d_4$ , 300 MHz).....	99
<b>Figura 41.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do flavílio <b>7</b> (metanol- $d_4$ , 75 MHz).....	100
<b>Figura 42.</b> Espectro de massas do flavílio <b>7</b> .....	101
<b>Figura 43.</b> Espectro de infravermelho (IV) do flavílio <b>8</b> .....	102
<b>Figura 44.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do flavílio <b>8</b> (metanol- $d_4$ , 300 MHz).....	103
<b>Figura 45.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do flavílio <b>8</b> (metanol- $d_4$ , 75 MHz).....	104

<b>Figura 46.</b> Espectro de massas do flavílio <b>8</b> .....	105
<b>Figura 47.</b> Espectro de infravermelho (IV) do flavílio <b>10</b> .....	106
<b>Figura 48.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do flavílio <b>10</b> (metanol- $d_4$ , 300 MHz).....	107
<b>Figura 49.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do flavílio <b>10</b> (metanol- $d_4$ , 75 MHz).....	108
<b>Figura 50.</b> Espectro de massas do flavílio <b>10</b> .....	109
<b>Figura 51.</b> Espectro de infravermelho (IV) do flavílio <b>11</b> . ....	110
<b>Figura 52.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do flavílio <b>11</b> (acetonitrila- $d_3$ /TFA, 400 MHz).....	111
<b>Figura 53.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do flavílio <b>11</b> (acetonitrila- $d_3$ /TFA, 100 MHz).....	112
<b>Figura 54.</b> Espectro de massas do flavílio <b>11</b> .....	113
<b>Figura 55.</b> Espectro de infravermelho (IV) do flavílio <b>12</b> .....	114
<b>Figura 56.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do flavílio <b>12</b> (acetonitrila- $d_3$ /TFA, 400 MHz).....	115
<b>Figura 57.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do flavílio <b>12</b> (acetonitrila- $d_3$ /TFA, 100 MHz).....	116
<b>Figura 58.</b> Espectro de massas do flavílio <b>12</b> .....	117
<b>Figura 59.</b> Espectro de infravermelho (IV) do flavílio <b>13</b> .....	118
<b>Figura 60.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do flavílio <b>13</b> (acetonitrila- $d_3$ /TFA, 400 MHz).....	119
<b>Figura 61.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do flavílio <b>13</b> (acetonitrila- $d_3$ /TFA, 100 MHz).....	120
<b>Figura 62.</b> Espectro de massas do flavílio <b>13</b> .....	121
<b>Figura 63.</b> Espectro de infravermelho (IV) do flavílio <b>14</b> .....	122
<b>Figura 64.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do flavílio <b>14</b> (acetonitrila- $d_3$ /TFA, 400 MHz).....	123
<b>Figura 65.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do flavílio <b>14</b> (acetonitrila- $d_3$ /TFA, 100 MHz).....	124
<b>Figura 66.</b> Espectro de massas do flavílio <b>14</b> .....	125
<b>Figura 67.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do piranoflavílio <b>15</b> (acetonitrila- $d_3$ , 500 MHz). ....	126

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Frequências de RMN experimentais e calculadas para as estruturas candidatas <b>1a</b> e <b>1b</b> .....	41
<b>Tabela 2.</b> Síntese dos sais de flavílios <b>7-10</b> .....	43
<b>Tabela 3.</b> Estudo de otimização da síntese do sal de flavílio <b>7</b> .....	44
<b>Tabela 4.</b> Síntese dos sais de flavílios <b>7-10</b> , empregando condições otimizadas. ....	45
<b>Tabela 5.</b> Viabilidade de células cancerosas após 48 horas.....	60
<b>Tabela 6.</b> Propriedades calculadas para todos os derivados avaliados de antocianidinas. ....	63

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1.</b> Reatividade das antocianinas nos estados fundamental e excitado (*).....	4
<b>Esquema 2.</b> Metodologia geral empregada para a preparação dos sais de 4-metilflavílios. ....	7
<b>Esquema 3.</b> Metodologia geral empregada para a preparação dos flavílios contendo hidrogênio em C4. ....	8
<b>Esquema 4.</b> Metodologias empregadas para a síntese de flavílios com cadeias laterais alquílicas.....	8
<b>Esquema 5.</b> Metodologia alternativa para a preparação dos flavílios sem substituintes em C4. ....	9
<b>Esquema 6.</b> Metodologia para a preparação de sais de flavílio sem substituintes em C4 empregando catalisador heterogêneo e micro-ondas.....	9
<b>Esquema 7.</b> Síntese dos sais de 4-metilflavílio <b>1-3</b> . ....	29
<b>Esquema 8.</b> Mecanismo proposto para a obtenção dos sais de 4-metilflavílio <b>1-3</b> .....	30
<b>Esquema 9.</b> Reação de formação da 1-(4-metoxifenil)butano-1,3-diona ( <b>17</b> ). ....	31
<b>Esquema 10.</b> <i>Proposta de mecanismo para a condensação de Claisen</i> .....	32
<b>Esquema 11.</b> Síntese dos sais de 4-metilflavílio <b>4-6</b> . *Os rendimentos foram calculados para uma sequência de duas etapas partindo da 4-metoxiacetofenona ( <b>28</b> ). ....	33
<b>Esquema 12.</b> Estruturas candidatas para a condensação entre o 3-metoxifenol ( <b>18</b> ) e a benzoilacetona ( <b>17</b> ). ....	40
<b>Esquema 13.</b> Mecanismo proposto para a formação da estrutura candidata 1b.....	42
<b>Esquema 14.</b> Síntese dos sais de flavílio <b>11-14</b> empregando condições otimizadas.....	46
<b>Esquema 15.</b> Mecanismo da reação de condensação para formação do sal de flavílio <b>7</b> .....	47
<b>Esquema 16.</b> Síntese dos sais de piranoflavílio <b>15</b> e <b>16</b> . ....	52
<b>Esquema 17.</b> Proposta de mecanismo para a síntese dos sais de piranoflavílio <b>15</b> e <b>16</b> . ....	53
<b>Esquema 18.</b> Sais de flavílios <b>1-10</b> avaliados citotxicamente.....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ac<sub>2</sub>O – Anidrido acético

AcOEt – Acetato de etila

AcOH – Ácido acético

ATR – Reflectância Total Atenuada (Attenuated Total Reflectance)

B16F10 – Melanoma metastático murinho

B3LYP - Funcional de troca Becke com 3 parâmetros de correlação Lee, Yang e Parr

br,d – duplete largo (broad doublet)

br,s – simpleto largo (broad singlet)

br,t – tripleto largo (broad singlet)

Calc – Calculado

CCD – Cromatografia em camada delgada

CHMF – Ácido 7-hidroxi-flavílio-4-carboxílico

d – Duplete

DCM - Diclorometano

dd – Duplete duplo

DFT – Teoria do funcional da densidade (Density Functional Theory)

DMSO – Dimetilsulfóxido

*E* – Energia total

*E*<sub>HOMO</sub> – Energia do Orbital Molecular Ocupado de Mais Alta Energia

*E*<sub>LUMO</sub> – Energia do Orbital Molecular Desocupado de Mais Baixa Energia

EM – Espectrometria de Massas

EMAR – Espectrometria de Massas de Alta Resolução

equiv. – equivalente molar

ESI-TOF – Ionização por Eletrospray – Tempo de voo (Electrospray Ionization Time-of-Flight)

Et<sub>2</sub>O – Éter dietílico

EtOH - Etanol

Expt - Experimental

FM – Fórmula molecular

HBA – Número de aceptores de ligação de hidrogênio

HBD – Número de doadores de ligação de hidrogênio

HeLa – Adenocarcinoma cervical humano

HepG2 - Carcinoma hepatocelular humano

HHMF – 6-(n-Hexil)-7-hidróxi-4-metilflavílio

HMF – 7-Hidróxi-4-metilflavílio

HOMO – Orbital Molecular Ocupado de Mais Alta Energia (Highest Occupied Molecular Orbital)

Hz – Hertz

IC<sub>50</sub> – Concentração Inibitória Média

IE – Impacto eletrônico

IV – Infravermelho

*J* – Constante de acoplamento

LUMO – Orbital Molecular Desocupado de Mais Baixa Energia (Lowest Unoccupied Molecular Orbital)

m – Multiplete

m/z – Relação massa/carga

MDA-MB-231 – Adenocarcinoma de mama humano

MHz - Mega-hertz

MM – Massa molar

MMF – 4-Metil-7-metoxiflavílio

MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2*H*-tetrazólio

MW – Micro-ondas

ppm – Partes por milhão

PSA – Superfície de área polar

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMN de  $^{13}\text{C}$  – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

RMN de  $^1\text{H}$  – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

s – Simpleto

$\text{SiO}_2$  – Sílica gel

t – Tripleto

t.a. – Temperatura ambiente

TFA – Ácido trifluoroacético

THF – Tetrahidrofurano

TMSCl – Cloreto de trimetilsilano

UV – Ultravioleta

$\delta$  – Deslocamento químico

$\Delta E_{\text{HOMO-LUMO}}$  – Diferença de energia entre HOMO e LUMO

## RESUMO

COSTA, Tássia de Sousa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2019. **Síntese de sais de flavílio para estudo de suas atividades biológicas e propriedades fotoquímicas.** Orientadora: Vânia Maria Teixeira Carneiro. Coorientador: Elson Santiago de Alvarenga.

A busca por novos fármacos e agroquímicos é um dos maiores desafios da química moderna. No entanto, a natureza exerce em excelente papel como fonte de novos princípios ativos ou mesmo como inspiração para a síntese de novos derivados, atuando como aliada da pesquisa científica. As antocianinas e as antocianidinas são exemplos de produtos naturais de grande importância científica e industrial, devido a suas propriedades biológicas, antioxidantes e capacidade de atuar como corantes, entre outros. Visando contribuir para o estudo dessa classe de compostos, o presente trabalho teve como objetivo sintetizar e caracterizar derivados sintéticos das antocianidinas, denominados sais de flavílio. Foram preparados quatorze sais de flavílios, sendo seis deles metilados na posição C4 [cloreto de 4-metil-7-metoxiflavílio (**1**); cloreto de 7-hidróxi-4-metilflavílio (**2**); cloreto de 5,7-dihidróxi-4-metilflavílio (**3**); cloreto de 4-metil-4',7-dimetoxiflavílio (**4**); cloreto de 7-hidróxi-4-metil-4'-metoxiflavílio (**5**) e cloreto de 5,7-dihidróxi-4-metil-4'-metoxiflavílio (**6**)] e oito não metilados [cloreto de 4'-hidróxi-7-metoxiflavílio (**7**); cloreto de 7-hidróxi-4'-metoxiflavílio (**8**); cloreto de 4',7-dimetoxiflavílio (**9**); cloreto de 4',7-dihidroxiflavílio (**10**); cloreto de 7-hidróxi-3',4',5'-trimetoxiflavílio (**11**); cloreto de 7-hidróxi-3',4'-dimetoxiflavílio (**12**); cloreto de 7-hidróxi-3'-metoxiflavílio (**13**) e cloreto de 3'-hidróxi-7-metoxiflavílio (**14**)]. Os sais de 4-metilflavílios foram sintetizados a partir de condensações de derivados da benzoilacetona com derivados fenólicos. Em contrapartida, as sínteses dos sais de flavílio não metilados em C4 foram realizadas a partir das condensações entre derivados de acetofenonas e 2-hidroxibenzaldeídos, tendo sido necessários estudos de otimização das condições reacionais. O cloreto de 5,7-dihidróxi-4-metil-4'-metoxiflavílio (**6**) foi utilizado para a produção de dois sais de piranoflavílio [cloreto de 5-(4-(dimetilamino)fenil)-8-hidroxi-2-(4-metoxifenil)pirano[4,3,2-de]cromen-1-íleo (**15**) e cloreto de 8-hidroxi-2,5-bis(4-metoxifenil)pirano[4,3,2-de]cromen-1-íleo (**16**)]. Os compostos sintetizados foram caracterizados por espectroscopia do IV, RMN de <sup>1</sup>H, RMN de <sup>13</sup>C e espectrometria de massas. Os dez primeiros sais de flavílio (**1-10**) obtidos nesse trabalho foram submetidos a ensaios de avaliação citotóxica frente a quatro linhagens celulares tumorais: melanoma metastático murino (B16F10), carcinoma hepatocelular humano (HepG2), adenocarcinoma da mama humano (MDA-MB-231) e adenocarcinoma cervical humano

(HeLa). Os compostos **3**, **6**, **7**, **8** e **10** foram capazes de reduzir a viabilidade celular de forma significativa, sendo o flavílio **6** o mais citotóxico. Tentativas de correlação da atividade com as propriedades moleculares indicaram que a maior atividade observada para **6** pode estar relacionada com uma maior permeabilidade celular. Todos os compostos produzidos estão sendo submetidos a estudos fotoquímicos e de estabilidade.

## ABSTRACT

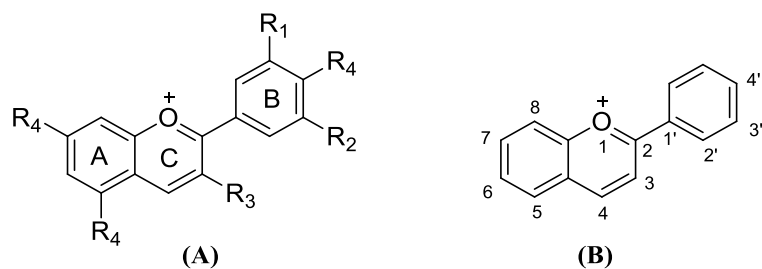
COSTA, Tássia de Sousa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2019. **Synthesis of flavylium salts for study of their biological activities and photochemical properties.** Adviser: Vânia Maria Teixeira Carneiro. Co-adviser: Elson Santiago de Alvarenga.

The search for new drugs and agrochemicals is one of the biggest challenges of modern chemistry. However, nature exerts an excellent role as a source of new active principles or even as inspiration for the synthesis of novel derivatives, acting as an ally of scientific research. Anthocyanins and anthocyanidins are examples of natural products of great scientific and industrial importance, due to their biological properties, antioxidants and the ability to act as dyes, among others. Aiming to contribute to the study of this class of compounds, the present work had the objective of synthesizing and characterizing synthetic derivatives of anthocyanidins, called flavylium salts. Fourteen flavylium salts were prepared, six of them methylated at the C4 position [7-methoxy-4-methylflavylium chloride (**1**); 7-hydroxy-4-methylflavyl chloride (**2**); 5,7-dihydroxy-4-methylflavylium chloride (**3**); 4-methyl-4',7-dimethoxyflavylium chloride (**4**); 4'-methoxy-4-methylflavylium chloride (**5**) and 5,7-dihydroxy-4'-methoxy-4-methylflavylium chloride (**6**)] and eight non methylated [4'-hydroxy-7-methoxyflavylium chloride (**7**); 7-hydroxy-4'-methoxyflavylium chloride (**8**); 4',7-dimethoxyflavylium chloride (**9**); 4',7-dihydroxyflavylium chloride (**10**); 7-hydroxy-3',4',5'-trimethoxyflavylium chloride (**11**); 7-hydroxy-3',4'-dimethoxyflavylium chloride (**12**); 7-hydroxy-3'-methoxyflavylium chloride (**13**) and 3'-hydroxy-7-methoxyflavylium chloride (**14**)]. The 4-methylflavylium salts were synthesized from condensations of benzoylketone derivatives with phenolic derivatives. In contrast, syntheses of flavylium salts without methyl group in C4 were performed from the condensations between acetophenones and 2-hydroxybenzaldehydes, and optimization studies of the reaction conditions were required. The 5,7-dihydroxy-4'-methoxy-4-methylflavylium chloride (**6**) was used for the production of two pyranflavylium salts [5-(4-(dimethylamino)phenyl)-8-hydroxy-2-(4-methoxyphenyl)pyrano[4,3,2-de]chromen-1-ium chloride (**15**) and 8-hydroxy-2,5-bis(4-methoxyphenyl)pyrano[4,3,2-de]chromen-1-ium chloride (**16**)]. The synthesized compounds were characterized by IR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR and mass spectrometry. The first ten flavylium salts (**1-10**) obtained in this work were submitted to cytotoxic assays against four tumor cell lines: murine metastatic melanoma (B16F10), human hepatocellular carcinoma (HepG2), human breast adenocarcinoma (MDA-MB -231) and human cervical adenocarcinoma (HeLa). Compounds **3**, **6**, **7**, **8** and **10** were able to significantly reduce cell viability and flavylium salt

**6** was the most cytotoxic. Attempts to correlate activity with molecular properties indicated that the highest activity observed for **6** may be related to increased cell permeability. All the compounds produced are being submitted to photochemical and stability studies.

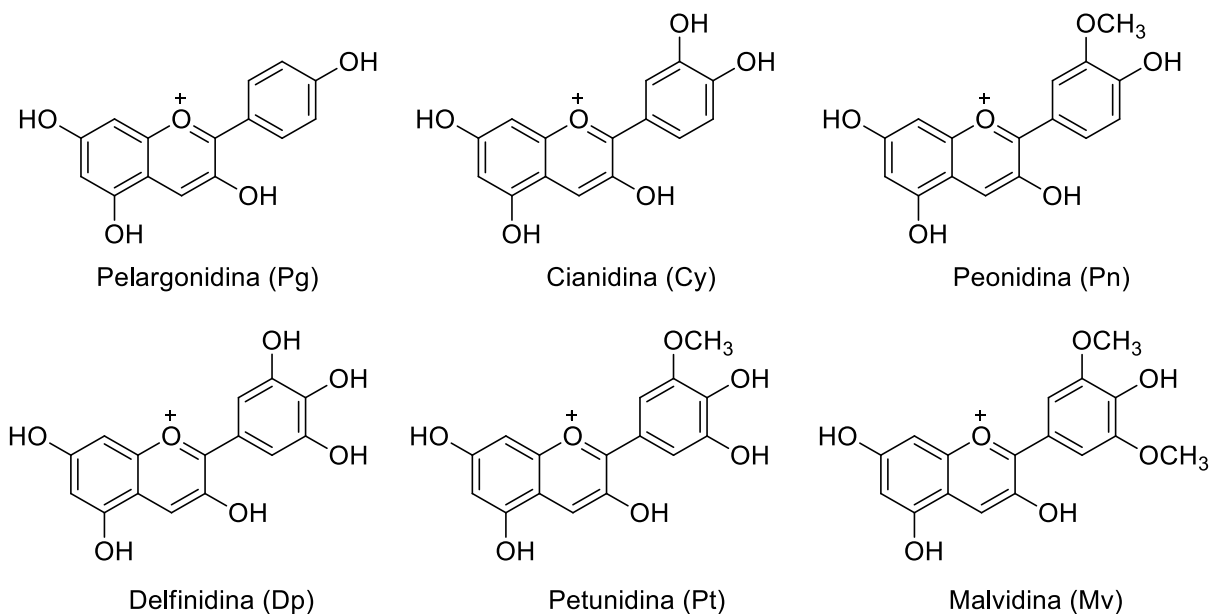
## INTRODUÇÃO GERAL

A palavra antocianina (do grego *anthos* = flor e *kyanos* = azul escuro) é empregada para caracterizar uma classe de metabólitos secundários das plantas que são responsáveis pelas cores azul, púrpura e vermelha de muitos tecidos vegetais. Depois da clorofila, as antocianinas são o mais vasto e mais importante grupo de pigmentos naturais solúveis em água visíveis ao olho humano (DAVIES; SCHWINN; GOULD, 2017; DELGADO; LOPEZ; JIMÉNEZ, 2012; HARBORNE; WILLIAMS, 2000; HE; GIUSTI, 2010; JACKMAN *et al.*, 1987; RAMIREZ-TORTOSA *et al.*, 2001). Além de colorir órgãos específicos de plantas, muitas vezes para atrair polinizadores e/ou dispersores, elas podem servir para proteger os tecidos fotossintéticos do estresse oxidativo induzido pela luz sob condições estressantes (DELGADO; LOPEZ; JIMÉNEZ, 2012; GLOVER; MARTIN, 2012). Quimicamente, seu cromóforo básico consiste em um esqueleto contendo 15 carbonos: um anel aromático (A) ligado a um anel heterocíclico (C) contendo oxigênio, que também é ligado por uma ligação carbono-carbono a um terceiro anel aromático (B) (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), chamado cátion flavílio, variando apenas no número e posição dos grupos hidroxila/metila, podendo ainda conter uma ou mais moléculas de açúcar ligadas em diferentes posições hidroxiladas da estrutura básica (BROUILLARD, 1982; CASTAÑEDA-OVANDO *et al.*, 2009; DELGADO; LOPEZ; JIMÉNEZ, 2012). Na natureza este cromóforo geralmente apresenta substituintes hidroxila nas posições 3 e 5 e substituintes hidroxila ou metoxila no anel B. Estas substâncias polifenólicas pertencentes a classe dos flavonóides são encontradas muitas vezes como glicosídeos dos derivados polihidroxi e polimetoxi substituídos de sais de 2-fenilbenzopirílio ou flavílio (CASTAÑEDA-OVANDO *et al.*, 2009; DAVIES; SCHWINN; GOULD, 2017; DELGADO; LOPEZ; JIMÉNEZ, 2012; HARI; PATEL; MARTIN, 1994; HE; GIUSTI, 2010; JACKMAN *et al.*, 1987; KONG *et al.*, 2003). A **Figura 1** ilustra a estrutura geral das antocianinas e do cátion flavílio.



**Figura 1.** (A) Estrutura geral das antocianinas: R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> = H, OH ou OCH<sub>3</sub>; R<sub>3</sub> = glicosil ou H; e R<sub>4</sub> = glicosil ou OH. (B) Cátion flavílio.

A estrutura fenólica das antocianinas desempenha uma importante atividade antioxidante em sistemas modelo por meio da doação de elétrons ou átomos de hidrogênio das porções hidroxila para os radicais livres (RAMIREZ-TORTOSA *et al.*, 2001). A presença de uma hidroxila glicosilada na posição 3, determina a estabilidade térmica desta classe de compostos e o grupo hidroxila comumente encontrado na posição 5 pode estar ou não glicosilado, sendo que, esse fator depende principalmente da origem do pigmento (BRIDLE; TIMBERLAKE, 1997; TIMBERLAKE; BRIDLE, 2014). Contudo, quando as antocianinas não estão em sua forma glicosídica, estas são conhecidas como antocianidinas ou agliconas (CASTAÑEDA-OVANDO *et al.*, 2009). Pelo menos 18 antocianidinas diferentes já foram identificadas na natureza, mas existem seis mais comuns em plantas superiores, que estão mostradas na **Figura 2**, sendo elas: pelargonidina (Pg), peonidina (Pn), cianidina (Cy), malvidina (Mv), petunidina (Pt) e delphinidina (Dp) (BROUILLARD, 1982; CASTAÑEDA-OVANDO *et al.*, 2009; DAVIES; SCHWINN; GOULD, 2017; DELGADO; LOPEZ; JIMÉNEZ, 2012; KONG *et al.*, 2003).



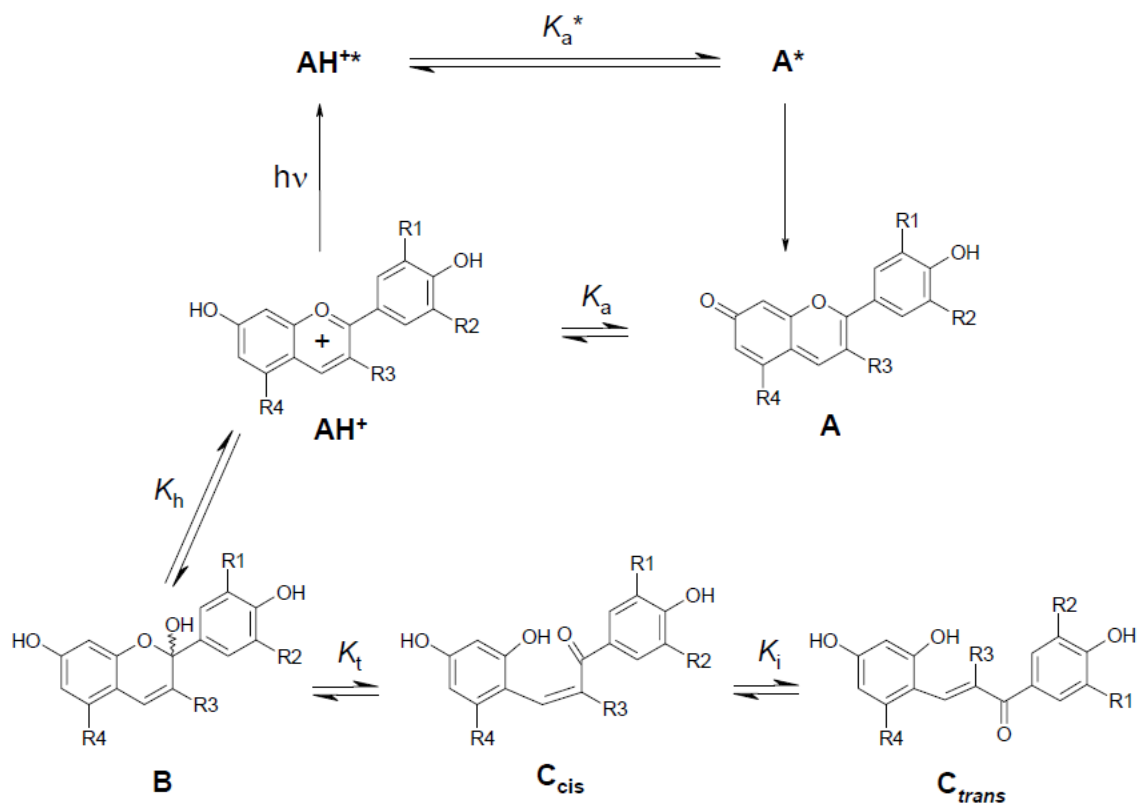
**Figura 2.** As seis antocianidinas mais comuns (DAVIES; SCHWINN; GOULD, 2016).

A ingestão de antocianinas é elevada em comparação com outros flavonóides, devido à sua ampla distribuição em materiais vegetais (HE; GIUSTI, 2010). A estabilização química das antocianinas é o foco principal de estudos recentes devido à sua ampla aplicabilidade, aos seus efeitos benéficos à saúde e ao seu uso como alternativa aos corantes artificiais. Apesar do grande potencial de aplicação que tais compostos representam para as indústrias alimentar, farmacêutica e cosmética, o seu uso tem sido limitado devido às baixas porcentagens de extração e à sua instabilidade inerente, especialmente em sistemas complexos, como alimentos.

As antocianinas apresentam maior estabilidade sob condições ácidas, mas geralmente são instáveis em pH básico e degradam facilmente quando isoladas, por um dos vários mecanismos possíveis para formar os primeiros produtos incolores e de coloração castanha insolúveis. Essas alterações podem ocorrer sob condições normais de processamento e armazenamento. A presença de um íon oxônio, adjacente ao carbono 2, torna as antocianinas particularmente suscetíveis ao ataque nucleofílico por compostos como dióxido de enxofre, ácido ascórbico, peróxido de hidrogênio e até água. A alteração ou perda da pigmentação da antocianina também ocorre na presença de oxigênio e várias enzimas, outros flavonóides,

ácidos orgânicos e íons metálicos, bem como com a variação de temperatura e pH do meio (BRIDLE; TIMBERLAKE, 1997; BROUILLARD, 1982; CASTAÑEDA-OVANDO *et al.*, 2009; DAVIES; SCHWINN; GOULD, 2017; HE; GIUSTI, 2010; JACKMAN *et al.*, 1987; SANTOS *et al.*, 1993; SILVA *et al.*, 2016).

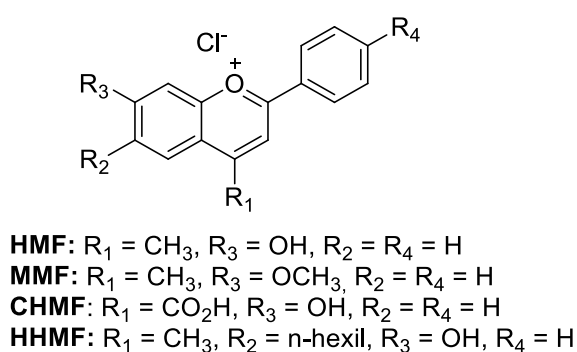
Tanto as antocianinas naturais como boa parte dos seus análogos sintéticos (os sais de flavílio) possuem elevada reatividade química em meio aquoso, envolvendo uma série de equilíbrios simultâneos, mostrados no **Esquema 1**, dependentes do pH do meio: (A) equilíbrio ácido-base na escala de tempo de nano- a microssegundos; (B) equilíbrio de hidratação e abertura do anel flavílio na escala de tempo de segundos a minutos; e, (C) equilíbrios de tautomerização e isomerização das chalconas, resultantes da abertura do anel flavílio, na escala de tempo de minutos a horas (BRIDLE; TIMBERLAKE, 1997; LIMA *et al.*, 1998; QUINA *et al.*, 2006).



**Esquema 1.** Reatividade das antocianinas nos estados fundamental e excitado (\*).

Neste contexto, tem sido comum o emprego de compostos sintéticos contendo o cromóforo 7-hidroxi-flavílio (com reatividade, carga ou hidrofobicidade alteradas) como modelos para o estudo das propriedades químicas, fotoquímicas e redox das antocianinas. Sendo que, os resultados obtidos nestes estudos apresentam relevância direta na obtenção de indícios sobre possíveis funções *in vivo* (filtro solar, antioxidante, anticancerígeno, etc.) e aplicações tecnológicas das antocianinas (exemplo como corantes alimentícios) (QUINA *et al.*, 2006, 2009).

Exemplos de modelos sintéticos com reatividade bloqueada incluem os íons 4-metil-7-metoxiflavílio (MMF, **1**) e 7-hidróxi-4-metilflavílio (HMF, **2**), que por não sofrerem hidratação em água permitem o estudo da reatividade ácido-base sem a competição com esta reação (QUINA *et al.*, 2006, 2009). Já os modelos com carga ou hidrofobicidade alterada incluem o ácido 7-hidroxi-flavílio-4-carboxílico (CHMF), que pode ser catiônico, zwitteriônico ou aniônico, dependendo do pH do meio, e íons como o 6-(n-hexil)-7-hidróxi-4-metilflavílio (HHMF), munidos de cadeias alifáticas que são insolúveis em água (FERNANDES *et al.*, 2004). As estruturas dos modelos sintéticos empregados no estudo das propriedades das antocianinas foram ilustradas na **Figura 3**.



**Figura 3.** Compostos modelo utilizados para o estudo das propriedades químicas, fotoquímicas e redox das antocianinas.

Apesar dos inúmeros estudos realizados com essa classe de compostos, novas pesquisas devem ser feitas com o intuito de encontrar substâncias derivadas das antocianinas com

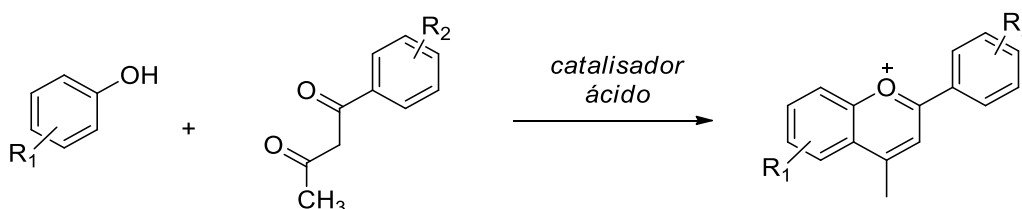
aplicação industrial e econômica. Sendo assim, visando contribuir nesta área, este trabalho teve como foco principal a síntese de sais de flavílio para serem empregados em estudos que visam determinar suas propriedades químicas e biológicas.

# CAPÍTULO 1: SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS SAIS DE FLAVÍLIO

## 1. INTRODUÇÃO

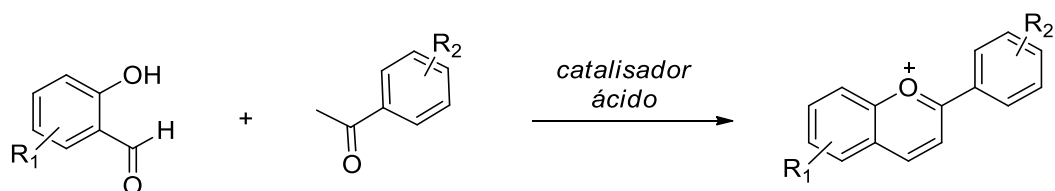
A seguir foi realizada uma breve revisão sobre as principais metodologias utilizadas para a síntese dos sais de flavílio derivados das antocianinas naturais. Dentre as metodologias utilizadas, duas podem ser destacadas: uma para a síntese de cátions flavílio metilados na posição 4 (4-metilflavílios) e outra para a obtenção de flavílios sem este substituinte.

Os cátions 4-metilflavílios têm sido comumente preparados a partir de reações de condensação entre fenóis e benzoiacetonas catalisadas por ácidos fortes, tais como, cloreto de hidrogênio (HCl), ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>) e ácido hexafluorofosfórico (HPF<sub>6</sub>) (CHASSAING *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2008). Os principais solventes empregados nestas reações tem sido acetato de etila (AcOEt) e ácido acético (AcOH), tetrahidrofurano (THF), e diclorometano (DCM). O **Esquema 2** ilustra a metodologia geral empregada.



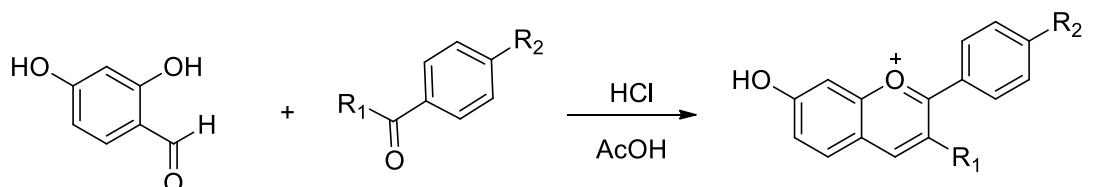
**Esquema 2.** Metodologia geral empregada para a preparação dos sais de 4-metilflavílios.

Já os cátions flavílio que não possuem substituintes em C4 podem ser obtidos através da condensação catalisada por ácido de 2-hidroxibenzaldeídos e acetofenonas, ambos contendo variados substituintes em seu anel aromático como exemplificado no **Esquema 3** (AL-OBAIDI, 2014; BARCENA; CHEN; TUACHI, 2015; ITO *et al.*, 2004; MORA-SOUMILLE *et al.*, 2013; WERBOVETZ *et al.*, 2008). Estudos demonstraram também que a geração controlada de HCl *in situ*, através da reação entre cloreto de trimetilsilano (TMSCl) e metanol pode evitar problemas causados pelo excesso de HCl na produção de flavílios glicosilados ou com variados padrões de substituição (AL BITTAR *et al.*, 2016).

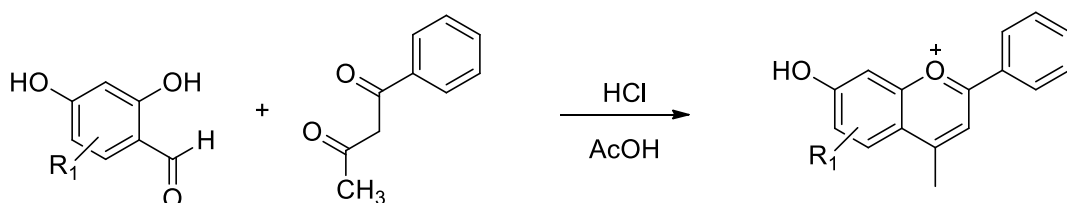


**Esquema 3.** Metodologia geral empregada para a preparação dos flavílios contendo hidrogênio em C4.

Utilizando metodologias semelhantes de condensação catalisada por ácido forte vários sais de flavílio contendo cadeias laterais alquílicas foram preparados, como ilustrado no **Esquema 4**, com o objetivo de realizar a determinação de suas propriedades fotofísicas e seu comportamento em meio micelar (FERNANDES *et al.*, 2004).



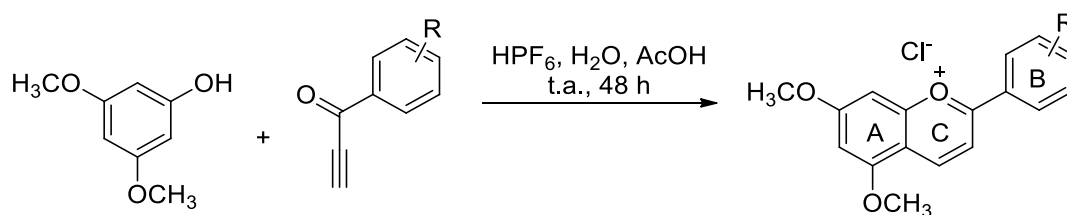
R<sub>1</sub> = octil ou decil; R<sub>2</sub> = H  
R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub> = octil ou decil



R<sub>1</sub> = 5-pentil; 6-hexil ou 6-dodecil

**Esquema 4.** Metodologias empregadas para a síntese de flavílios com cadeias laterais alquílicas.

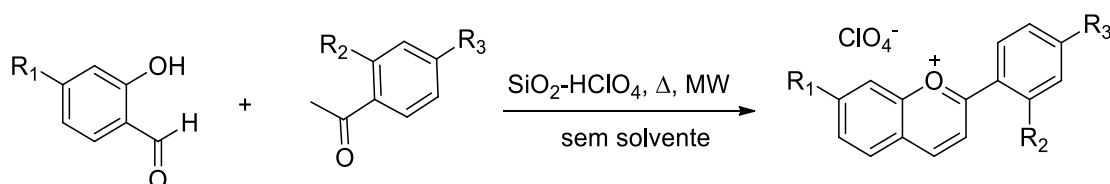
Uma síntese alternativa para flavílios sem substituinte em C4 foi realizada através da reação de condensação catalisada pelo ácido hexafluorofosfórico entre o fenol, derivado do fluoroglucinol, e aril etinil cetonas, como mostrado no **Esquema 5** (KUENY-STOTZ *et al.*, 2007). No entanto, o método mostrado no **Esquema 5** foi testado apenas para a obtenção de cátions que contenham grupos metoxila nas posições 5 e 7 do anel A.



**Esquema 5.** Metodologia alternativa para a preparação dos flavílios sem substituintes em C4.

Outras sínteses de sais de flavílio tem sido descritas na literatura, dentre a síntese de sais de flavílio com substituintes 4-fenilacilidenos utilizando ácido bórico como catalisador (CHEN *et al.*, 2017). Outro trabalho que merece ser mencionado nessa breve revisão é a síntese de sais de flavílio contendo substituinte fenil na posição C4, para a obtenção destes compostos realizou-se a condensação entre fenóis e benzoilacetonas de maneira semelhante à aquela mostrada no **Esquema 2** (p. 7), no entanto, no lugar do grupo metil da benzoilacetona foram inseridos grupos fenil com variados padrões de substituição (DEKIĆ *et al.*, 2017).

Visando metodologias ambientalmente corretas, em 2014 foi desenvolvido um método para a preparação de sais de flavílio não substituídos na posição C4 empregando condensações entre 2-hidroxialdeídos e acetofenonas através de catálise ácida heterogênea (**Esquema 6**). O catalizador ácido heterogêneo foi previamente preparado através da impregnação de  $\text{HClO}_4$  em sílica, sendo esta o suporte sólido utilizado. As reações foram conduzidas com aquecimento convencional ou utilizando aquecimento por micro-ondas, mostrando a versatilidade da reação e os elevados rendimentos obtidos. No entanto, quando as reações foram conduzidas em aparelho de micro-ondas os tempos reacionais foram reduzidos significativamente (MOGHADDAM *et al.*, 2014).



**Esquema 6.** Metodologia para a preparação de sais de flavílio sem substituintes em C4 empregando catalisador heterogêneo e micro-ondas.

Apesar do método empregando catalisador ácido heterogêneo parecer um método bastante interessante para a síntese dos sais de flavílio, optou-se inicialmente pela realização do método clássico de condensação catalisada pelo cloreto de hidrogênio (HCl), gerado em um frasco a parte através da reação entre cloreto de sódio (NaCl) e ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

Trabalhos posteriores terão como propósito o estudo da viabilidade da substituição do HCl por um catalisador ácido heterogêneo menos corrosivo e de fácil remoção do meio reacional.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. GENERALIDADES METODOLÓGICAS**

Os solventes e reagentes descritos neste trabalho foram utilizados sem purificação prévia, exceto o acetato de etila (AcOEt) utilizado nas sínteses dos sais de flavílios, que foi seco através do tratamento com peneira molecular 4Å por 72 horas. Para cada 100 mL de AcOEt utilizou-se 2 g de peneira molecular de 4Å (WILLIAMS; LAWTON, 2010).

Foram utilizadas placas de sílica gel 60 G-F254 disponíveis comercialmente, com 0,25mm de espessura, para a cromatografia em camada delgada (CCD). Após a eluição, as placas foram observadas em câmara de luz ultravioleta ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ).

Os espectros de IV foram realizados empregando Reflectância Total Atenuada (ATR), em espectrofotômetro Perkin Elmer Spectrum 1000 (Departamento de Química da UFV).

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de <sup>1</sup>H em 300 MHz e <sup>13</sup>C em 75 MHz foram obtidos no espectrômetro VARIAN MERCURY 300 MHz (Departamento de Química, UFV). Os espectros RMN de <sup>1</sup>H em 400 MHz e <sup>13</sup>C em 100 MHz foram obtidos no espectrômetro BRUKER BIOSPIN 400 MHz (Laboratório Multiusuário de Caracterização de Moléculas, Universidade Federal de Ouro Preto). Os espectros RMN de <sup>1</sup>H em 500 MHz foram obtidos no espectrômetro BRUKER AVANCE III 500 MHz (Central Analítica do instituto de

Química da USP). Os solventes utilizados para as análises foram metanol deuterado (metanol- $d_4$ ) e acetonitrila deuterada (acetonitrila- $d_3$ ). As constantes de acoplamento escalar ( $J$ ) foram expressas em Hertz (Hz).

Os espectros de massa por impacto eletrônico (IE) foram obtidos em um equipamento CG-EM SHIMADZU GCMS-QP5050A, por inserção direta, do Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA) (Departamento de Química, UFV).

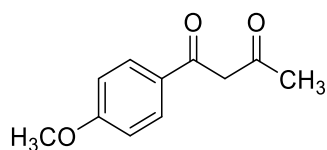
Os espectros de massas de alta resolução foram feitos em espectrômetro Bruker Daltonics Microtof Eletrospray do Laboratório de Fotodinâmica Molecular (Instituto de Química, USP).

Não foi possível determinar as temperaturas de fusão dos produtos, pois os mesmos apresentavam decomposição em temperaturas acima de 140 °C.

## **2.2. SÍNTESE DA 4-METOXIBENZOILACETONA**

Em um balão contendo a 4-metoxiacetofenona (1 mmol) dissolvida em AcOEt anidro (9 mL), adicionou-se, lentamente, pequenos pedaços de sódio metálico (2 mmol). A mistura reacional ficou sob agitação por 4 horas à temperatura ambiente, sendo a reação acompanhada por CCD. Ao término da reação, adicionou-se água destilada previamente resfriada (10 mL), solução aquosa de ácido clorídrico ( $1 \text{ mol.L}^{-1}$ ) gota a gota até  $\text{pH} < 7$  e AcOEt comercial (15 mL). As fases orgânicas e aquosas foram separadas e a fase aquosa foi extraída com acetato de etila (4 x 15 mL). As fases orgânicas foram reunidas, lavadas com uma solução saturada de cloreto de sódio (20 mL), secas com sulfato de magnésio anidro, filtradas e concentradas sob pressão reduzida em evaporador rotatório. O produto desejado foi utilizado sem purificação prévia para a preparação dos sais de flavílio.

### 1-(4-metoxifenil)butan-1,3-diona:



Rendimento: conversão completa

FM: C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>. MM: 192,21 g/mol.

Solubilidade: Solúvel em acetato de etila e clorofórmio.

Aspecto: Óleo castanho amarelado.

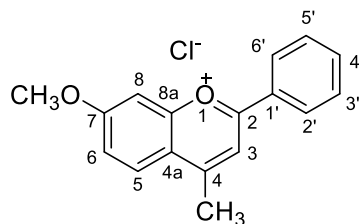
IV (ATR)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 2937, 2834, 1601, 1251, 1170, 1026, 843, 777.

EM m/z (%): 192 ([M]<sup>+</sup>, 54), 177 (32), 161 (8), 135 (100), 109 (21), 107 (18), 92 (16), 77 (33), 69 (31).

### 2.3. SÍNTESE DOS SAIS DE 4-METIL FLAVÍLIO

Uma solução contendo o fenol (1 mmol) e a benzilacetona (1 mmol) correspondentes, em AcOH glacial (5 ml), foi borbulhada por um período de 4 h com cloreto de hidrogênio gasoso (preparado, em um frasco à parte, pela reação entre NaCl e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado). Terminado o borbulhamento, a mistura reacional foi deixada sob repouso à temperatura ambiente por cerca de 24 h. Em seguida, tetrahidrofurano (THF) foi adicionado para promover a precipitação do produto e a mistura foi deixada em banho de gelo. O precipitado formado foi filtrado sob vácuo, lavado com THF previamente resfriado e deixado em dessecador sob vácuo por aproximadamente 24 h. Os produtos desejados foram obtidos na sua forma pura.

### Cloreto de 4-metil-7-metoxiflavílio (1):



Rendimento: 92%.

FM: C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>ClO<sub>2</sub>.1H<sub>2</sub>O. MM: 304,77 g/mol.

Aspecto: Sólido amarelo/esverdeado.

Solubilidade: Solúvel em metanol, acetonitrila, piridina e água.

IV (ATR)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 3061; 1624; 1572; 1522; 1474; 1380; 1233; 681; 439.

RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, metanol-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$ : 4,19 (s; 3H; OCH<sub>3</sub>); 7,61 (dd; *J* = 9,3 e 2,5 Hz; 1H; H<sub>6</sub>); 7,75-7,80 (m; 2H; H<sub>3'</sub> e H<sub>5'</sub>); 7,85-7,90 (m; 1H; H<sub>4'</sub>); 7,91 (d; *J* = 2,5 Hz; 1H; H<sub>8</sub>); 8,46 (d; *J* = 9,3 Hz; 1H; H<sub>5</sub>); 8,52-8,55 (m; 2H; H<sub>2'</sub> e H<sub>6'</sub>); 8,62 (s; 1H; H<sub>3</sub>).

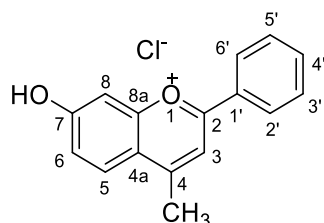
RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, metanol-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$ : 59,2 (OCH<sub>3</sub>); 101,7 (C<sub>8</sub>); 117,0 (C<sub>3</sub>); 121,6 (C<sub>4a</sub>); 123,3 (C<sub>6</sub>); 130,0 (C<sub>5</sub>); 130,4 (C<sub>1'</sub>); 130,4 (C<sub>2'</sub> e C<sub>6'</sub>); 131,2 (C<sub>3'</sub> e C<sub>5'</sub>); 137,2 (C<sub>4'</sub>); 160,6 (C<sub>8a</sub>); 171,1 (C<sub>7</sub>); 172,1 (C<sub>2</sub>); 172,3 (C<sub>4</sub>).

RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, acetonitrila-*d*<sub>3</sub>)  $\delta$ : 3,07 (s; 3H; CH<sub>3</sub>); 4,13 (s; 3H; OCH<sub>3</sub>); 7,57 (dd; *J* = 9,3 e 1,6 Hz; 1H; H<sub>6</sub>); 7,74 (br,s; 1H; H<sub>8</sub>); 7,74-7,78 (m; 2H; H<sub>3'</sub> e H<sub>5'</sub>); 7,87 (br,t; *J* = 7,3 Hz; 1H; H<sub>4'</sub>); 8,36 (d; *J* = 9,3 Hz; 1H; H<sub>5</sub>); 8,42 (s; 1H; H<sub>3</sub>); 8,44 (d; *J* = 7,3 Hz; 2H; H<sub>2'</sub> e H<sub>6'</sub>).

RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, acetonitrila-*d*<sub>3</sub>)  $\delta$ : 21,4 (CH<sub>3</sub>); 58,5 (OCH<sub>3</sub>); 101,7 (C<sub>8</sub>); 117,1 (C<sub>3</sub>); 121,2 (C<sub>4a</sub>); 122,9 (C<sub>6</sub>); 129,8 (C<sub>5</sub>); 129,9 (C<sub>1'</sub>); 130,1 (C<sub>2'</sub> e C<sub>6'</sub>); 131,1 (C<sub>3'</sub> e C<sub>5'</sub>); 137,1 (C<sub>4'</sub>); 160,0 (C<sub>8a</sub>); 170,5 (C<sub>7</sub>); 171,4 (C<sub>2</sub>); 172,1 (C<sub>4</sub>). As atribuições dos sinais de carbono foram baseadas nos deslocamentos químicos típicos e podem estar trocadas.

EM m/z (%): 252 ( $[M+1 - Cl]^+$ , 2); 251 ( $[M - Cl]^+$ , 19); 250 (100).

**Cloreto de 7-hidróxi-4-metilflavílio (2):**



Rendimento: 92%.

FM:  $C_{16}H_{13}ClO_2 \cdot 1H_2O$ . MM: 290,74 g/mol.

Aspecto: Sólido amarelo.

Solubilidade: Solúvel em metanol.

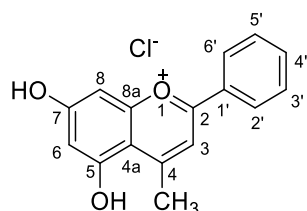
IV (ATR)  $\nu_{max}/cm^{-1}$ : 3029; 2483; 1523; 1342; 1226; 834; 785; 683; 476.

RMN de  $^1H$  (300 MHz, metanol- $d_4$ )  $\delta$ : 7,50 (dd;  $J = 9,2$  e  $2,2$  Hz; 1H; H6); 7,57 (br, d;  $J = 2,2$  Hz; 1H; H8); 7,72-7,77 (m; 2H; H3' e H5'); 7,82-7,87 (m; 1H; H4'); 8,42-8,49 (m; 3H; H5, H2' e H6'); 8,51 (s; 1H; H3). As atribuições dos sinais de carbono foram baseadas nos deslocamentos químicos típicos e podem estar trocadas.

RMN de  $^{13}C$  (75 MHz, metanol- $d_4$ )  $\delta$ : 103,8 (C8); 116,1 (C3); 120,9 (C4a); 123,1 (C6); 130,2 (C2' e C6'); 130,5 (C1'); 130,8 (C5); 131,2 (C3' e C5'); 136,9 (C4'); 160,5 (C8a); 170,9 (C7); 171,5 (C2); 171,7 (C4).

EM m/z (%): 238 ( $[M+1 - Cl]^+$ , 4); 237 ( $[M - Cl]^+$ , 27); 236 (100).

**Cloreto de 5,7-dihidróxi-4-metilflavílio (3):**



Rendimento: 86%.

FM: C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>ClO<sub>3</sub>.1H<sub>2</sub>O. MM: 306,74 g/mol.

Aspecto: Sólido alaranjado.

Solubilidade: Solúvel em metanol.

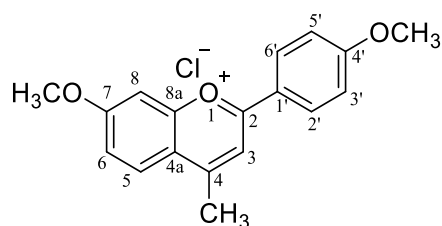
IV (ATR)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 3850; 2666; 1633; 1515; 1351; 1248; 1238; 756; 670.

RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, metanol-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$ : 6,72 (s; 1H; H6); 7,00 (s; 1H; H8); 7,67-7,72 (m; 2H; H3' e H5'); 7,76-7,81 (m; 1H; H4'); 8,12 (s; 1H; H3); 8,35 (d; *J* = 7,8 Hz; 2H; H2' e H6').

RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, metanol-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$ : 96,7 (C8); 104,3 (C6); 114,4 (C4a); 115,2 (C3); 129,6 (C2' e C6'); 130,3 (C1'); 131,0 (C3' e C5'); 136,2 (C4'); 160,4 (C8a); 163,2 (C5); 169,0 (C7); 171,9 (C2); 172,6 (C4). As atribuições dos sinais de carbono foram baseadas nos deslocamentos químicos típicos e podem estar trocadas.

EM m/z (%): 254 ([M+1 – Cl]<sup>+</sup>, 3); 253 ([M – Cl]<sup>+</sup>, 20); 252 (100); 224 (29).

#### Cloreto de 4-metil-4',7-dimetoxiflavílio (4):



Rendimento: 39%.

FM: C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>ClO<sub>3</sub>.1H<sub>2</sub>O. MM: 334,79 g/mol.

Solubilidade: Solúvel em metanol.

Aspecto: Sólido vermelho.

IV (ATR)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 3022; 1628; 1581; 1508; 1371; 1232; 1169; 847; 557.

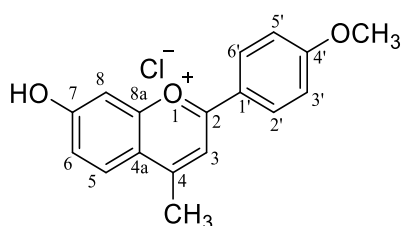
RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, metanol- $d_4$ )  $\delta$ : 3,94 (s; 3H;  $\text{OCH}_3$ ); 4,09 (s; 3H;  $\text{OCH}_3$ ); 7,17 – 7,26 (m; 2H;  $\text{H}_{3'}$  e  $\text{H}_{5'}$ ); 7,46 (dd;  $J = 9,3$  e  $2,4$  Hz; 1H;  $\text{H}_6$ ); 7,75 (d;  $J = 2,4$  Hz; 1H;  $\text{H}_8$ ); 8,29 (d;  $J = 9,3$  Hz; 1H;  $\text{H}_5$ ); 8,39 (s; 1H;  $\text{H}_3$ ); 8,42 – 8,50 (m; 2H;  $\text{H}_{2'}$  e  $\text{H}_{6'}$ ).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz; metanol- $d_4$ )  $\delta$ : 56,9 ( $\text{OCH}_3$ ); 57,9 ( $\text{OCH}_3$ ); 101,7 (C8); 115,9 (C3); 117,0 ( $\text{C}_{3'}$  e  $\text{C}_{5'}$ ); 120,5 (C4a); 122,2 ( $\text{C}_{1'}$ ); 122,3 (C6); 129,6 (C5); 133,5 ( $\text{C}_{2'}$  e  $\text{C}_{6'}$ ); 159,5 (C8a); 168,5 ( $\text{C}_{4'}$ ); 169,9 (C7); 170,1 (C2); 172,2 (C4). As atribuições dos sinais de carbono foram baseadas nos deslocamentos químicos típicos e podem estar trocadas.

EMAR (ESI-TOF) m/z:  $[\text{M}]^+$  calculado para  $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{O}_3^+$  281,1172; Encontrado 281,1173.

EMAR (ESI-TOF) m/z:  $[\text{M} - \text{H} + \text{Na}]^+$  calculado para  $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{NaO}_3^+$  303,0992; Encontrado 303,0994.

#### **Cloreto de 7-hidróxi-4-metil-4'-metoxiflavílio (5):**



Rendimento: 60%.

FM:  $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{ClO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . MM: 320,77 g/mol.

Solubilidade: Solúvel em metanol.

Aspecto: Sólido laranja amarelado.

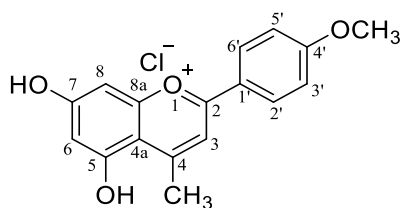
IV (ATR)  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 3300; 1626; 1593; 1529; 1348; 1224; 846; 563.

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, metanol- $d_4$ )  $\delta$ : 3,97 (s; 3H;  $\text{OCH}_3$ ); 7,21 – 7,26 (m; 2H;  $\text{H}_{3'}$  e  $\text{H}_{5'}$ ); 7,39 (dd;  $J = 9,1$  e  $2,3$  Hz; 1H;  $\text{H}_6$ ); 7,45 (d;  $J = 2,3$  Hz; 1H;  $\text{H}_8$ ); 8,29 (d;  $J = 9,1$  Hz; 1H,  $\text{H}_5$ ); 8,31 (s; 1H;  $\text{H}_3$ ); 8,39 – 8,47 (m; 2H;  $\text{H}_{2'}$  e  $\text{H}_{6'}$ ).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, metanol- $d_4$ )  $\delta$ : 56,8 (OCH<sub>3</sub>); 103,8 (C8); 115,1 (C3); 116,9 (C3' e C5'); 119,9 (C4a); 122,1 (C1'); 122,4 (C6); 130,4 (C5); 133,1 (C2' e C6'); 159,6 (C8a); 168,2 (C4'); 169,6 (C7); 169,76 (C2); 171,7 (C4). As atribuições dos sinais de carbono foram baseadas nos deslocamentos químicos típicos e podem estar trocadas.

EMAR (ESI-TOF) m/z: [M]<sup>+</sup> calculado para C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup> 267,1016; Encontrado 267,1020.

### Cloreto de 5,7-dihidróxi-4-metil-4'-metoxiflavílio (6):



Rendimento: 68%.

FM: C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>ClO<sub>4</sub>.1H<sub>2</sub>O. MM: 336,77 g/mol.

Aspecto: Sólido vermelho tijolo.

Solubilidade: Solúvel em metanol.

IV (ATR)  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 3396; 2983; 1637; 1560; 1510; 1352; 1257; 835.

RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, metanol- $d_4$ )  $\delta$ : 4,00 (s; 3H; OCH<sub>3</sub>); 6,68 (d;  $J = 2,3$  Hz; 1H, H6); 6,94 (d;  $J = 2,3$  Hz; 1H; H8); 7,19 – 7,30 (m; 2H; H3' e H5'); 7,97 (s; 1H; H3); 8,31 – 8,42 (m; 2H; H2' e H6').

EMAR (ESI-TOF) m/z: [M]<sup>+</sup> calculado para C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup> 283,0965; Encontrado 283,0965.

EMAR (ESI-TOF) m/z: [M – H + Na]<sup>+</sup> calculado para C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>NaO<sub>4</sub><sup>+</sup> 305,0784; Encontrado 305,0785.

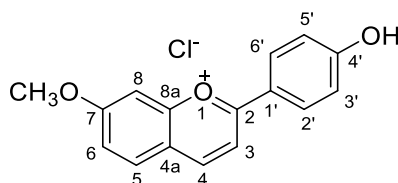
## **2.4. OTIMIZAÇÃO DA SÍNTESE DOS SAIS DE FLAVÍLIO SEM SUBSTITUINTES EM C4**

Uma solução contendo o 2-hidróxi-4-metoxibenzaldeído (152 mg; 1,00 mmol) e a 1-(4-hidroxifenil)etan-1-ona (136 mg; 1,00 mmol) em 5 mL de solvente – AcOH, AcOH/Ac<sub>2</sub>O 9:1, AcOH/Ac<sub>2</sub>O 1:1, AcOEt ou AcOEt/Ac<sub>2</sub>O 9:1 – foi borbulhada por 2-4 h com cloreto de hidrogênio gasoso (preparado pela reação entre NaCl e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado). Após borbulhamento, a mistura reacional foi deixada sob repouso à temperatura ambiente por 24 h. No caso das reações conduzidas em AcOH, AcOH/Ac<sub>2</sub>O 9:1 ou AcOH/Ac<sub>2</sub>O 1:1, o produto foi precipitado com o auxílio de THF e filtrado sob vácuo, após resfriamento em banho de gelo. Nas reações realizadas em AcOEt ou AcOEt/Ac<sub>2</sub>O 9:1, após 24 h à temperatura ambiente, a mistura reacional foi deixada em congelador por cerca de 17 h e o precipitado formado foi filtrado sob vácuo e lavado com AcOEt previamente resfriado. Em todos os casos, o produto foi mantido em dessecador sob vácuo por aproximadamente 24 h. Os dados espectroscópicos do cloreto de 4'-hidróxi-7-metoxiflavílio (**7**) foram descritos no item 2.5.

## **2.5. SÍNTESE DOS SAIS DE FLAVÍLIO SEM SUBSTITUINTES EM C4**

Uma solução contendo o aldeído (1 mmol) e a metilcetona (1 mmol) correspondentes em AcOEt anidro (5 ml) foi borbulhada durante 4 h com cloreto de hidrogênio gasoso (preparado pela reação entre NaCl e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado). Após término do borbulhamento, a mistura reacional foi deixada sob repouso à temperatura ambiente por cerca de 24 h. Em seguida, a mistura foi resfriada em congelador por 18 h. O sólido obtido foi filtrado sob vácuo, lavado com AcOEt comercial previamente resfriado e deixado em dessecador sob vácuo para secagem dos resíduos de solvente. Os produtos foram obtidos na sua forma pura, dispensando procedimentos de purificação.

### Cloreto de 4'-hidróxi-7-metoxiflavílio (7):



Rendimento: 89%.

FM: C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>ClO<sub>3</sub>·1H<sub>2</sub>O. MM: 306,74 g/mol.

Aspecto: Sólido alaranjado.

Solubilidade: Solúvel em metanol.

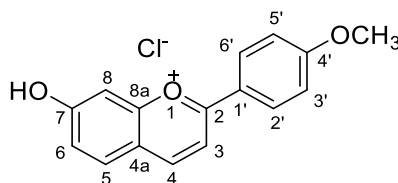
IV (ATR)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 3353; 3007; 1574; 1501; 1341; 1225; 1169; 1144; 842; 510.

RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, metanol-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$ : 4,15 (s; 3H; OCH<sub>3</sub>); 7,10 (d; *J* = 8,9 Hz; 2H; H3' e H5'); 7,49 (dd; *J* = 9,03 e 2,0 Hz; 1H; H6); 7,80 (br, d; *J* = 2,0 Hz; 1H; H8); 8,15 (d; *J* = 9,0 Hz; 1H; H5); 8,38 (d; *J* = 8,9 Hz; 1H; H3); 8,45 (d; *J* = 8,9 Hz; 2H; H2' e H6'); 9,10 (d; *J* = 8,9 Hz; 1H; H4).

RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, metanol-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$ : 58,0 (OCH<sub>3</sub>); 101,6 (C8); 114,4 (C3); 118,7 (C3' e C5'); 120,5 (C4a); 121,1 (C1'); 122,3 (C6); 133,0 (C5); 134,4 (C2' e C6'); 154,4 (C4); 160,1 (C8a); 168,5 (C4'); 170,4 (C7); 174,2 (C2). As atribuições dos sinais de carbono foram baseadas nos deslocamentos químicos típicos e podem estar trocadas.

EM *m/z* (%): 254 ([M+1 – Cl]<sup>+</sup>, 54); 253 ([M – Cl]<sup>+</sup>, 82); 252 (6); 137 (35); 50 (100).

### Cloreto de 7-hidróxi-4'-metoxiflavílio (8):



Rendimento: 78%.

FM: C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>ClO<sub>3</sub>.1H<sub>2</sub>O. MM: 306,74 g/mol.

Aspecto: Sólido avermelhado.

Solubilidade: Solúvel em metanol.

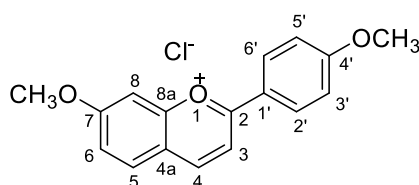
IV (ATR)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 3445; 1499; 1342; 1229; 1179; 850; 755; 547; 425.

RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, metanol-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$ : 3,98 (s; 3H; OCH<sub>3</sub>); 7,23 (d; *J* = 8,9 Hz; 2H; H3' e H5'); 7,41 (dd; *J* = 8,8 e 1,9 Hz; 1H; H6); 7,50 (br, s; 1H; H8); 8,15 (d; *J* = 8,8 Hz; 1H; H5); 8,34 (d; *J* = 8,8 Hz; 1H; H3); 8,44 (d; *J* = 8,9 Hz; 2H; H2' e H6'); 9,11 (d; *J* = 8,8 Hz; 1H; H4).

RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, metanol-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$ : 56,9 (OCH<sub>3</sub>); 103,7 (C8); 113,5 (C3); 117,1 (C3' e C5'); 120,3 (C4a); 122,5 (C1'); 122,7 (C6); 133,4 (C2' e C6'); 134,1 (C5); 155,0 (C4); 160,4 (C8a); 168,5 (C4'); 170,6 (C7); 173,3 (C2). As atribuições dos sinais de carbono foram baseadas nos deslocamentos químicos típicos e podem estar trocadas.

EM *m/z* (%): 254 ([M+1 – Cl]<sup>+</sup>, 60); 253 ([M – Cl]<sup>+</sup>, 100); 252 (77), 224 (51).

### Cloreto de 4',7-dimetoxiflavílio (9):



Rendimento: 82%.

FM: C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>ClO<sub>3</sub>.1H<sub>2</sub>O. MM: 320,77 g/mol.

Aspecto: Sólido alaranjado.

Solubilidade: Solúvel em metanol.

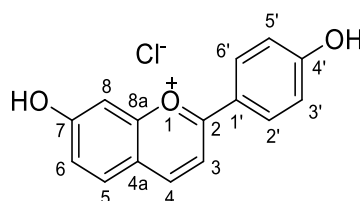
IV (ATR)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 3069; 1570; 1497; 1471; 1457; 1345; 1224; 1173; 1000; 849; 522; 410.

RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz, metanol- $d_4$ )  $\delta$ : 4,03 (s; 3H;  $\text{OCH}_3$ ); 4,18 (s; 3H;  $\text{OCH}_3$ ); 7,28-7,33 (m; 2H;  $\text{H}_3'$  e  $\text{H}_5'$ ); 7,55 (dd;  $J = 9,04$  e  $2,4$  Hz; 1H;  $\text{H}_6$ ); 7,87 (br, d;  $J = 2,4$  Hz; 1H;  $\text{H}_8$ ); 8,21 (d;  $J = 9,04$  Hz; 1H;  $\text{H}_5$ ); 8,48 (d;  $J = 8,8$  Hz; 1H;  $\text{H}_3$ ); 8,54-8,59 (m; 2H;  $\text{H}_2'$  e  $\text{H}_6'$ ); 9,20 (dd;  $J = 8,8$  e  $0,63$  Hz; 1H;  $\text{H}_4$ ).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, metanol- $d_4$ )  $\delta$ : 56,9 ( $\text{OCH}_3$ ); 58,1 ( $\text{OCH}_3$ ); 101,6 ( $\text{C}_8$ ); 114,7 ( $\text{C}_3$ ); 117,2 ( $\text{C}_3'$  e  $\text{C}_5'$ ); 121,0 ( $\text{C}_{4a}$ ); 122,6 ( $\text{C}_{1'}$ ); 122,8 ( $\text{C}_6$ ); 133,1 ( $\text{C}_5$ ); 133,8 ( $\text{C}_2'$  e  $\text{C}_6'$ ); 155,2 ( $\text{C}_4$ ); 160,6 ( $\text{C}_{8a}$ ); 168,9 ( $\text{C}_{4'}$ ); 170,8 ( $\text{C}_7$ ); 174,2 ( $\text{C}_2$ ). As atribuições dos sinais de carbono foram baseadas nos deslocamentos químicos típicos e podem estar trocadas.

EM m/z (%): 268 ( $[\text{M}+1 - \text{Cl}]^+$ , 68); 267 ( $[\text{M} - \text{Cl}]^+$ , 100).

#### Cloreto de 4',7-dihidroxiavilão (10):



Rendimento: 76%.

FM:  $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{ClO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . MM: 292,71 g/mol.

Aspecto: Sólido avermelhado.

Solubilidade: Solúvel em metanol.

IV (ATR)  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 3417; 1499; 1454; 1333; 1225; 1148; 834; 670; 508.

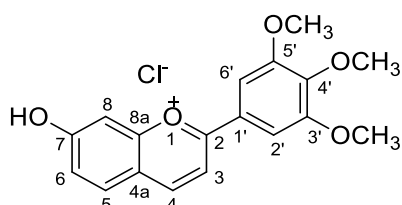
RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz, metanol- $d_4$ )  $\delta$ : 7,10 (d;  $J = 8,9$  Hz; 2H;  $\text{H}_3'$  e  $\text{H}_5'$ ); 7,40 (dd;  $J = 8,9$  e  $2,1$  Hz; 1H;  $\text{H}_6$ ); 7,49 (br, d;  $J = 2,1$  Hz; 1H;  $\text{H}_8$ ); 8,13 (d;  $J = 8,9$  Hz; 1H;  $\text{H}_5$ ); 8,30 (d;  $J = 8,8$  Hz; 1H;  $\text{H}_3$ ); 8,42 (d;  $J = 8,9$  Hz; 2H;  $\text{H}_2'$  e  $\text{H}_6'$ ); 9,04 (d;  $J = 8,8$  Hz; 1H;  $\text{H}_4$ ).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, metanol- $d_4$ )  $\delta$ : 103,7 ( $\text{C}_8$ ); 113,3 ( $\text{C}_3$ ); 118,6 ( $\text{C}_3'$  e  $\text{C}_5'$ ); 120,0 ( $\text{C}_{4a}$ ); 121,2 ( $\text{C}_{1'}$ ); 122,3 ( $\text{C}_6$ ); 133,8 ( $\text{C}_5$ ); 134,0 ( $\text{C}_2'$  e  $\text{C}_6'$ ); 154,3 ( $\text{C}_4$ ); 160,2 ( $\text{C}_{8a}$ ); 168,1 ( $\text{C}_{4'}$ );

170,1 (C7); 173,9 (C2). As atribuições dos sinais de carbono foram baseadas nos deslocamentos químicos típicos e podem estar trocadas.

EM  $m/z$  (%): 240 ( $[M+1 - Cl]^+$ , 4); 239 ( $[M - Cl]^+$ , 11); 238 (26); 210 (19); 60 (100).

### Cloreto de 7-hidróxi-3',4',5'-trimetoxiflavílio (11):



Rendimento: 87%.

FM: C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>ClO<sub>5</sub>. MM: 348,78 g/mol.

Aspecto: Sólido roxo avermelhado.

Solubilidade: Solúvel em metanol.

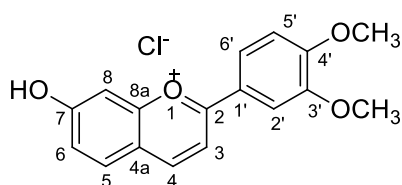
IV (ATR)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 3392; 3066; 2947; 2472; 1979; 1628; 1572; 1469; 1344; 1225; 1126; 983; 848; 746; 426.

RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, acetonitrila-*d*<sub>3</sub>/TFA)  $\delta$ : 3,96 (s; 3H; OCH<sub>3</sub>); 4,00 (s; 6H; 2xOCH<sub>3</sub>); 7,50 (dd;  $J = 9.0$  e 2,2 Hz; 1H; H6); 7,64 (s; 2H; H2' e H6'); 7,66 (dd;  $J = 2,2$  e 0,8 Hz; 1H; H8); 8,14 (d;  $J = 9.0$  Hz; 1H; H5); 8,32 (d;  $J = 8,7$  Hz; 1H; H3); 9,07 (dd;  $J = 8,7$  e 0,8 Hz; 1H; H4).

RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, acetonitrila-*d*<sub>3</sub>/TFA)  $\delta$ : 57,5 (2xOCH<sub>3</sub>); 61,7 (OCH<sub>3</sub>); 104,1 (C8); 108,4 (C2' e C6'); 114,8 (C3); 121,0 (C4a); 123,1 (C6); 124,7 (C1'); 134,0 (C5); 147,2 (C4); 155,2 (C3' e C5'); 155,4 (C4'); 160,6 (C8a); 169,7 (C7); 172,7 (C2). As atribuições dos sinais de carbono foram baseadas nos deslocamentos químicos típicos e podem estar trocadas.

EM  $m/z$  (%): 313 ( $[M+1 - Cl]^+$ , 27); 312 ( $[M - Cl]^+$ , 32); 52 (33); 50 (100).

**Cloreto de 7-hidróxi-3',4'-dimetoxiflavílio (12):**



Rendimento: 86%.

FM: C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>ClO<sub>4</sub>. MM: 318,07 g/mol.

Aspecto: Sólido avermelhado.

Solubilidade: Solúvel em metanol.

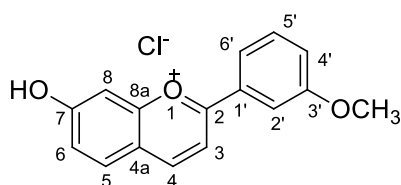
IV (ATR)  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 3369; 3047; 2453; 1998; 1626; 1493; 1321; 1140; 1003; 860; 445.

RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, acetonitrila-*d*<sub>3</sub>/TFA)  $\delta$ : 3,99 (s; 3H; OCH<sub>3</sub>); 4,00 (s; 3H; OCH<sub>3</sub>); 7,22 (d; *J* = 8,7 Hz; 1H; H5'); 7,42 (dd; *J* = 8,9 e 2,2 Hz; 1H; H6); 7,55 (d; *J* = 2,2 Hz; 1H; H8); 7,81 (d; *J* = 2,3 Hz; 1H; H2'); 8,08 (d; *J* = 8,9 Hz; 1H; H5); 8,12 (dd; *J* = 8,7 e 2,3 Hz; 1H; H6'); 8,21 (d; *J* = 8,8 Hz; 1H; H3); 8,96 (d; *J* = 8,8 Hz; 1H; H4).

RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, acetonitrila-*d*<sub>3</sub>/TFA)  $\delta$ : 55,8 (OCH<sub>3</sub>); 56,1 (OCH<sub>3</sub>); 102,9 (C8); 110,7 (C5'); 112,4 (C2'); 113,7 (C3); 119,1 (C4a); 121,1 (C1'); 121,2 (C6); 126,0 (C6'); 132,4 (C5); 150,3 (C3'); 153,3 (C4'); 157,5 (C4); 158,8 (C8a); 167,8 (C7); 172,3 (C2). As atribuições dos sinais de carbono foram baseadas nos deslocamentos químicos típicos e podem estar trocadas.

EM *m/z* (%): 284 ([M+1 - Cl]<sup>+</sup>, 50); 283 ([M - Cl]<sup>+</sup>, 65); 282 (100); 254 (39); 127 (17).

### Cloreto de 7-hidróxi-3'-metoxiflavílio (13)



Rendimento: 90%.

FM: C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>ClO<sub>3</sub>. MM: 288,73 g/mol.

Aspecto: Sólido alaranjado.

Solubilidade: Solúvel em metanol.

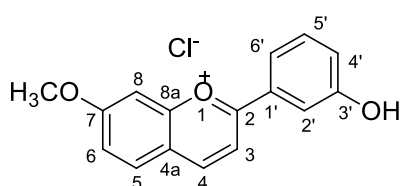
IV (ATR)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 3251; 2542; 1979; 1630; 1523; 1325; 1223; 1138; 854; 746; 442.

RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, acetonitrila-*d*<sub>3</sub>/TFA)  $\delta$ : 3,94 (s; 3H; OCH<sub>3</sub>); 7,40 (dd; *J* = 8,3 e 2,6 Hz; 1H; H4'); 7,54 (dd; *J* = 9,0 e 2,2 Hz; 1H; H6); 7,63 (d; *J* = 8,1 Hz; 1H; H6'); 7,66 (d; *J* = 2,2 Hz; 1H; H8); 7,88 (t; *J* = 2,2 Hz; 1H; H2'); 7,95-8,04 (m; 1H; H5'); 8,20 (d; *J* = 9,0 Hz; 1H; H5); 8,34 (d; *J* = 8,6 Hz; 1H; H3); 9,18 (d; *J* = 8,6 Hz; 1H; H4).

RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, acetonitrila-*d*<sub>3</sub>/TFA)  $\delta$ : 55,5 (OCH<sub>3</sub>); 102,9 (C8); 113,7 (C2'); 113,8 (C3); 120,6 (C4a); 121,7 (C4'); 122,1 (C6); 122,6 (C6'); 130,3 (C1'); 131,3 (C5'); 133,2 (C5); 155,5 (C4); 160,0 (C3'); 160,7 (C8a); 169,3 (C7); 172,0 (C2). As atribuições dos sinais de carbono foram baseadas nos deslocamentos químicos típicos e podem estar trocadas.

EM *m/z* (%): 254 ([M+1 - Cl]<sup>+</sup>, 53); 253 ([M - Cl]<sup>+</sup>, 69); 252 (100); 224 (75); 152 (23); 112 (21); 82 (15); 63 (17).

### Cloreto de 3'-hidróxi-7-metoxiflavílio (14)



Rendimento: 63%.

FM: C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>ClO<sub>3</sub>. MM: 288,73 g/mol.

Aspecto: Sólido vermelho escuro.

Solubilidade: Solúvel em metanol.

IV (ATR)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 3238; 3029; 2015; 1626; 1572; 1462; 1383; 1221; 856; 752; 536.

RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, acetonitrila-*d*<sub>3</sub>/TFA)  $\delta$ : 4,14 (s; 3H; OCH<sub>3</sub>); 7,33 (ddd; *J* = 8,2; 2,5 e 0,9 Hz; 1H; H4'); 7,49 – 7,68 (m; 2H; H6 e H6'); 7,79 (d; *J* = 2,4 Hz; 1H; H8); 7,83 (t; *J* = 2,2 Hz; 1H; H2'); 7,89 – 7,98 (m; 1H; H5'); 8,22 (d; *J* = 9,1 Hz; 1H; H5); 8,36 (d; *J* = 8,6 Hz; 1H; H3); 9,22 (d; *J* = 8,6 Hz; 1H; H4).

RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, acetonitrila-*d*<sub>3</sub>/TFA)  $\delta$ : 58,6 (OCH<sub>3</sub>); 101,5 (C8); 115,5 (C2'); 116,3 (C3); 121,9 (C4a); 122,2 (C4'); 123,9 (C6); 124,7 (C6'); 131,4 (C1'); 132,5 (C5'); 133,3 (C5); 156,7 (C4); 159,3 (C3'); 161,3 (C8a); 171,5 (C7); 173,5 (C2). As atribuições dos sinais de carbono foram baseadas nos deslocamentos químicos típicos e podem estar trocadas.

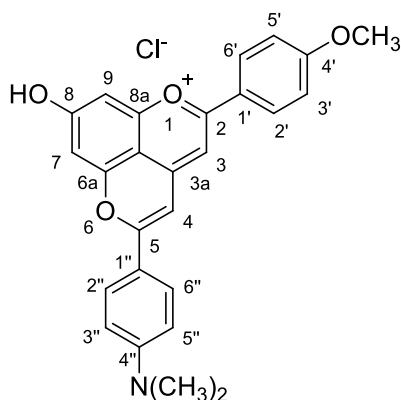
EM *m/z* (%): 255 ([M+2 – Cl]<sup>+</sup>, 14); 254 ([M+1 – Cl]<sup>+</sup>, 87); 253 ([M – Cl]<sup>+</sup>, 100); 210 (13); 161 (36); 127 (20); 50 (58).

## 2.6. SÍNTESE DOS SAIS DE PIRANOFLAVÍLIO

O aldeído aromático (2 mmol; 4 equiv.) foi adicionado a uma solução do cloreto de 5,7-dihidróxi-4-metil-4'-metoxiflavílio (0,5 mmol) em 100 mL de etanol (EtOH) contendo ácido trifluoroacético (TFA) na concentração de 1 mM. A mistura reacional foi aquecida sob refluxo sob atmosfera de N<sub>2</sub> por 2 h e, em seguida, o frasco reacional foi aberto para a atmosfera para iniciar a aromatização oxidativa do anel pirano. A reação foi monitorada por CCD (Hexano: AcOEt 5:4 ou 5:2). Após término da reação, que levou cerca de 24 h para ser completada, a mistura reacional foi resfriada a temperatura ambiente. O excesso de EtOH foi removido sob

vácuo utilizando evaporador rotatório e o resíduo resultante foi lavado com éter dietílico (Et<sub>2</sub>O) para remover o excesso do aldeído aromático. Em seguida, o material sólido foi lavado com solução aquosa resfriada e diluída de HCl (1 mM) para remover traços do flavílio **6** que pode ter restado na reação ou outros materiais que tenham reagido parcialmente. Após secagem do sólido obtido sob vácuo durante várias horas os produtos desejados forma obtidos com pureza elevada.

**Cloreto de 5-(4-(dimetilamino)fenil)-8-hidroxi-2-(4-metoxifenil)pirano[4,3,2-de]cromen-1-íleo (15):**



Rendimento: 89%.

FM: C<sub>26</sub>H<sub>22</sub>ClNO<sub>4</sub>. MM: 447,12 g/mol.

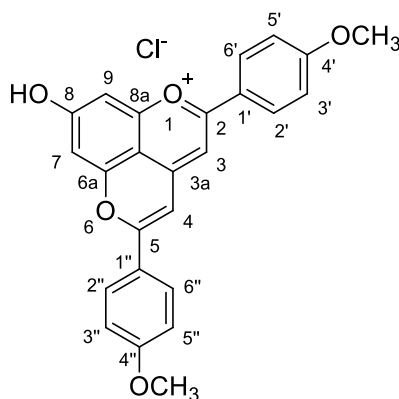
Aspecto: Sólido roxo.

Solubilidade: Baixa solubilidade em metanol e em acetonitrila.

RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, acetonitrila-*d*<sub>3</sub>) δ: 3,11 (s; 6H; N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 3,91 (s; 3H; OCH<sub>3</sub>); 7,06-7,09 (m; 4H; H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>3''</sub> e H<sub>5''</sub>); 7,11 – 7,13 (m; 2H; H<sub>3'</sub> e H<sub>5'</sub>); 7,15 (br,s; 2H; H<sub>7</sub> e H<sub>9</sub>); 7,94 – 7,96 (m; 2H, H<sub>2''</sub> e H<sub>6''</sub>); 8,02 – 8,04 (m; 2H; H<sub>2'</sub> e H<sub>6'</sub>). Os dados de RMN de <sup>1</sup>H estão de acordo com os dados da literatura (CHASSAING *et al.*, 2015).

EMAR (ESI-TOF) m/z: [M]<sup>+</sup> calculado para C<sub>26</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>4</sub><sup>+</sup> 412,1544; Encontrado 412,1537.

## Cloreto de 8-hidroxi-2,5-bis(4-metoxifenil)pirano[4,3,2-de]cromen-1-íleo (16):



Rendimento: 73%.

FM: C<sub>25</sub>H<sub>19</sub>ClO<sub>5</sub>. MM: 434,87 g/mol.

Aspecto: Sólido avermelhado.

Solubilidade: Baixa solubilidade em metanol e em acetonitrila.

RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, acetonitrila-*d*<sub>3</sub>) δ: 3,92 (s; 6H; 2xOCH<sub>3</sub>); 7,14 (s; 2H; H3 e H4); 7,14-7,17 (m; 4H; 3'; 5'; 3'' e 5''); 7,34 (s; 2H; H7 e H9); 8,10-8,13 (m; 4H; H2'; H6'; H2'' e H6'').

Os dados de RMN de <sup>1</sup>H estão de acordo com os dados da literatura (CHASSAING *et al.*, 2015).

EMAR (ESI-TOF) m/z: [M]<sup>+</sup> calculado para C<sub>25</sub>H<sub>19</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup> 399,1227; Encontrado 399,1220.

## 2.7. CÁLCULOS TEÓRICOS

Os cálculos das frequências de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C dos dois possíveis regioisômeros que poderiam ser formados pela condensação do 3-metoxifenol com a benzilacetona foram realizados como descrito nesse item.

### Busca conformacional

A distribuição de confôrmeros para todas as estruturas candidatas foi realizada usando o método de campo de força da mecânica molecular MMFF no software Spartan 14.

### **Cálculo dos valores de MAE**

Para os cálculos do erro absoluto médio (MAE, do inglês mean absolute error), as geometrias, frequências e tensores de blindagem da RMN para todos os confôrmeros foram calculados no software Gaussian 09, utilizando o nível de teoria B3LYP/6-311+G(2d,p)/M06-2X/6-31+G(d,p). Os fatores de ponderação de Boltzmann foram calculados das energias livres relativas obtidas a partir dos cálculos de frequência.

Os tensores ponderados foram obtidos a partir das frações molares aplicadas aos tensores de blindagem da RMN calculados para cada núcleo de cada confôrmero isolado. A ponderação de Boltzmann dos tensores de blindagem médios para cada estrutura candidata foram obtidos por adição dos tensores ponderados através de todos os confôrmeros.

Fatores de escala (inclinação =  $-1.0767$ , intercepto =  $31.9477$ ) foram aplicados aos tensores de blindagem da RMN de  $^1\text{H}$  para calcular os deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$ . Os tensores de blindagem de RMN calculados foram convertidos em deslocamentos químicos referenciados por meio de  $\delta = (\sigma - \text{intercepto}) / \text{inclinação}$ ; onde  $\delta$  é o deslocamento químico referenciado e  $\sigma$  é o tensor de blindagem de RMN calculado.

O MAE foi calculado fazendo a diferença entre o deslocamento químico calculado ( $\delta_{\text{calc}}$ ) e o experimental ( $\delta_{\text{exp}}$ ) médio de todos os núcleos, através da equação mostrada abaixo:

$$\text{MAE} = \frac{\sum |\delta_{\text{calc}} - \delta_{\text{exp}}|}{n}$$

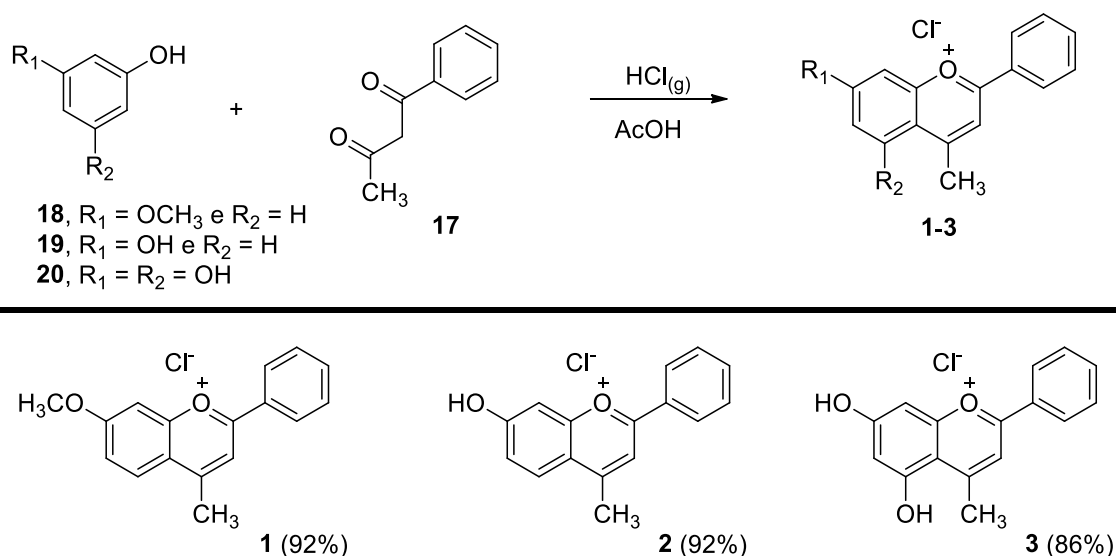
### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Neste tópico serão discutidas as sínteses dos sais de flavílio e piranoflavílio obtidos nesse trabalho, bem como a caracterização dos mesmos. Para uma melhor organização dos resultados optou-se por discutir inicialmente a metodologia sintética empregada para a síntese dos sais de 4-metil flavílio e a sua caracterização espectroscópica. Em seguida, fez-se uma discussão das modificações nas condições reacionais que levaram a melhores rendimentos para

a obtenção dos sais de flavílio sem substituintes na posição C4. Por fim, fez-se uma breve discussão a respeito da obtenção dos sais de piranoflavílios.

### 3.1. SÍNTESE DOS SAIS DE 4-METIL FLAVÍLIO

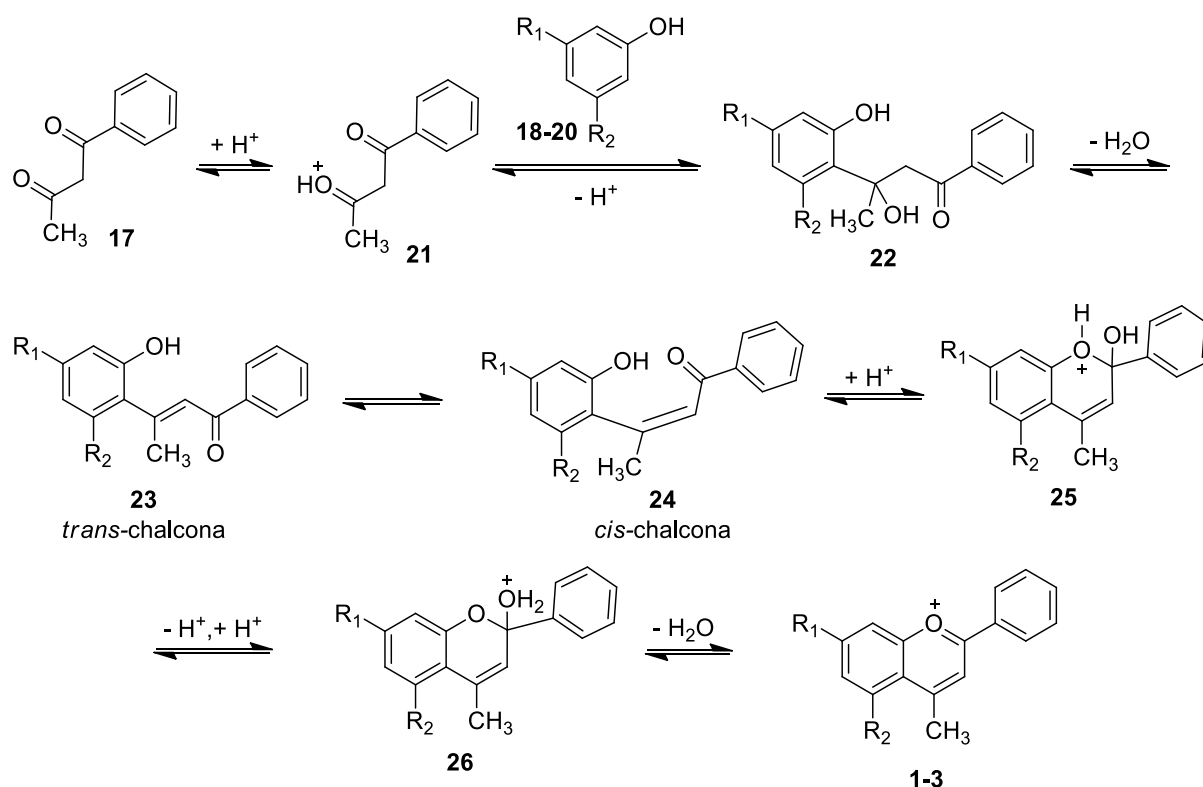
Os sais de 4-metil flavílio contendo substituinte metila na posição C4, foram preparados em ótimos rendimentos através de reações de condensação entre benzoilacetonas e fenóis (**Esquema 7**). A condensação entre a benzoilcetona (**17**) e o 3-metoxifenol (**18**) deu origem ao flavílio **1** com rendimento de 92%. A reação de **17** com o 3-hidroxifenol (**19**) levou ao flavílio **2** também em 92% de rendimento. Já o sal de flavílio **3** foi obtido com rendimento de 86% através da condensação entre **17** e o fluoroglucinol (**20**).



**Esquema 7.** Síntese dos sais de 4-metilflavílio **1-3**.

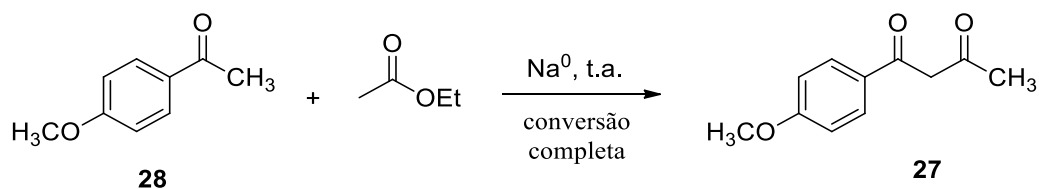
O **Esquema 8** ilustra o mecanismo proposto para a reação de condensação entre a benzoilacetona (**17**) e os fenóis **18-20**, levando aos sais de flavílio metilados na posição C4 (**1-3**). Em um primeiro momento, deve ocorrer a protonação de **17**, formando a benzoilacetona protonada **21**. Em seguida, **21** deve atuar como um eletrófilo para promover uma reação de substituição eletrofílica aromática no fenol (**18-20**), levando ao intermediário **22** pela substituição de um hidrogênio *orto* ao grupo hidroxila (preferencialmente aquele com o menor

impedimento estérico). O intermediário **22** pode sofrer eliminação de água catalisada por ácido, dando origem à *trans*-chalcona **23**. Após equilíbrio de isomerização, a *cis*-chalcona **24** formada no meio pode sofrer ciclização catalisada por ácido para produzir **25**. Este, por sua vez, pode levar ao intermediário **26** que, após subsequente perda de uma molécula de água, dará origem ao flavílio desejado (**1-3**).



**Esquema 8.** Mecanismo proposto para a obtenção dos sais de 4-metilflavílio **1-3**.

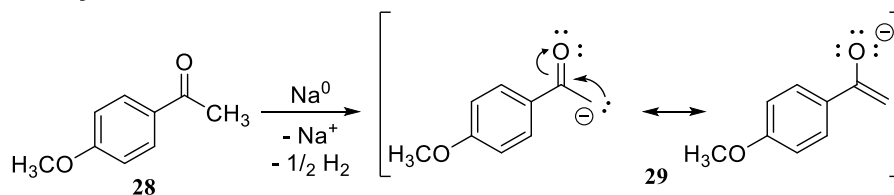
Para viabilizar as sínteses dos sais de 4-metilflavílio contendo um grupo metóxi na posição 4 do anel B foi necessária a preparação da 1-(4-metoxifenil)butan-1,3-diona (**27**) que, apesar de ser comercial, apresenta um custo bastante elevado. Assim, a 4-metoxiacetofenona (**28**) foi solubilizada em excesso de acetato de etila e tratada com sódio metálico (Na<sup>0</sup>), para promover uma reação de condensação de Claisen entre a acetofenona **28** e o acetato de etila, como mostrado no **Esquema 9**.



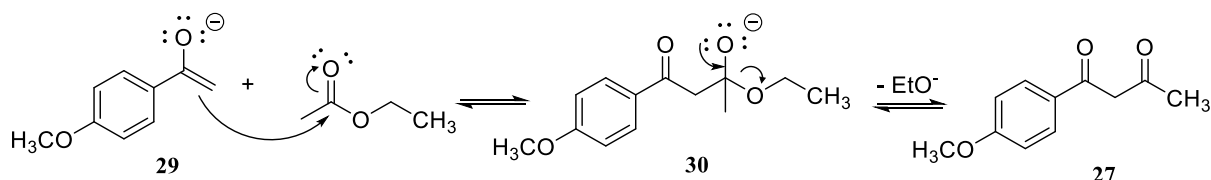
**Esquema 9.** Reação de formação da 1-(4-metoxifenil)butano-1,3-diona (**17**).

O mecanismo proposto para a transformação mostrada no **Esquema 9** foi ilustrado no **Esquema 10**. Inicialmente, o sódio metálico reage com a 4-metoxiacetofenona (**28**) por meio de reação de oxirredução para a formação do enolato **29**, estabilizado pela deslocalização de elétrons. Em seguida, o enolato **29** atua como um nucleófilo e adiciona-se ao carbono carbonílico do acetato de etila, formando o intermediário tetraédrico **30**. Este último, sofre eliminação do ânion etóxido para restituir a carbonila e liberar o produto desejado **27**. Além da elevada estabilidade conferida pela presença da nova carbonila formada, o produto **27** é estabilizado pela deslocalização de elétrons, como mostrado no **Esquema 10**, logo, a etapa de eliminação do ânion etóxido é bastante favorecida.

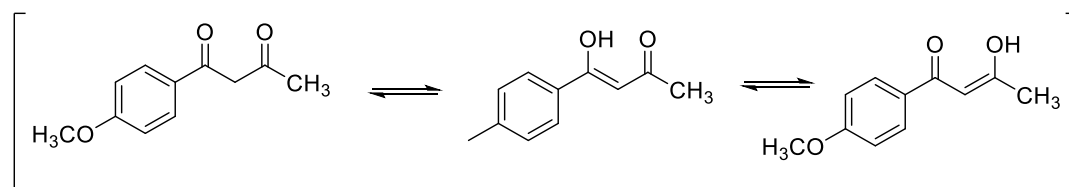
Formação do enolato:



Etapa de adição-eliminação



Estruturas de ressonância de **27**

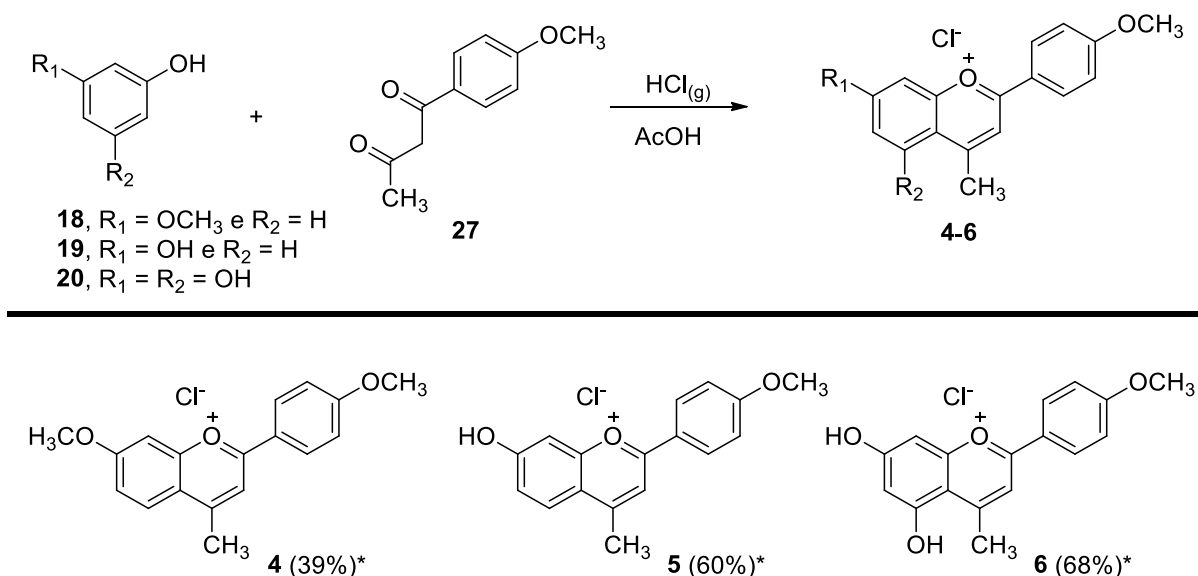


### Esquema 10. Proposta de mecanismo para a condensação de Claisen.

A 1-(4-metoxifenil)butano-1,3-diona (**27**) foi caracterizada por espectroscopia no IV (**Figura 17**, p. 76) e espectrometria de massas (**Figura 18**, p. 77). A comparação com os dados da literatura confirmaram a formação do produto desejado (MASSARI *et al.*, 2017; SADA; MATSUBARA, 2010; XU *et al.*, 2015).

Quando a 4-metoxibenzoilcetona (**27**) foi empregada como reagente nas reações de condensação com fenóis para dar origem aos sais de flavílio, os rendimentos obtidos foram ligeiramente menores, possivelmente devido a perdas durante a etapa de formação de **27** a partir da 4-metoxiacetofenona (**28**). Como a benzoilcetona **27** foi utilizada para a formação dos sais de flavílio sem purificação prévia, os rendimentos foram calculados partindo-se da massa inicial da 4-metoxiacetofenona (**28**), sendo assim, os rendimentos foram calculados para as duas etapas sequenciais. A sequência de duas etapas empregando o 3-metoxifenol (**18**) levou ao produto **4**

com rendimento de 39%. Quando o 3-hidroxifenol (**19**) foi condensado com **17** o produto **5** foi obtido em 60% de rendimento. Já o produto **6** foi isolado com rendimento de 68% a partir da reação com o fluoroglucinol (**20**). Os resultados obtidos foram sumarizados no **Esquema 11**.



**Esquema 11.** Síntese dos sais de 4-metilflavílio **4-6**. \*Os rendimentos foram calculados para uma sequência de duas etapas partindo da 4-metoxiacetofenona (**28**).

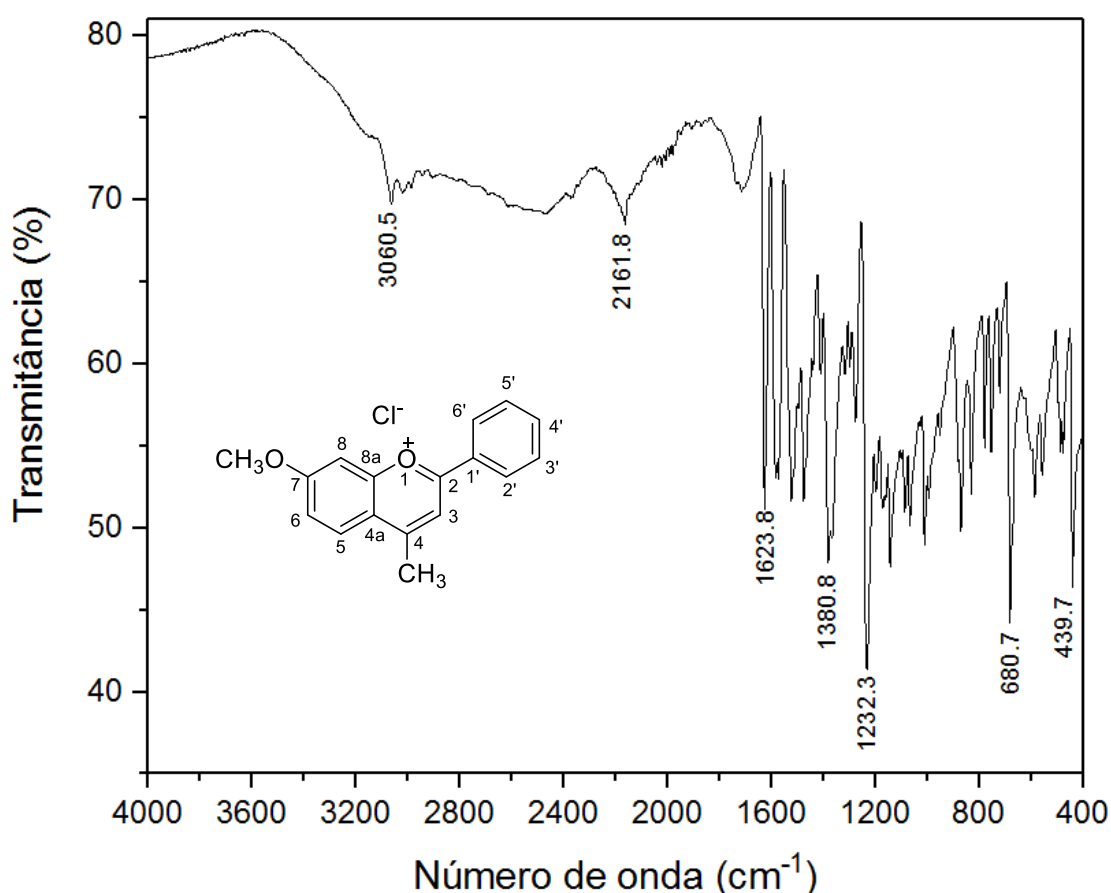
Todas as seis reações de condensação (mostradas nos **Esquemas 7 e 11**) foram conduzidas empregando ácido acético como solvente e cloreto de hidrogênio gasoso como catalisador. O cloreto de hidrogênio foi preparado em um frasco à parte e borbuhlado na mistura reacional por um período de duas horas. Após um período de repouso de aproximadamente de 24 h, os sais de flavílio **1-6** foram obtidos com altíssima pureza através de precipitação empregando tetraidrofurano, seguida de filtração e secagem do sólido isolado.

A identificação espectroscópica dos compostos foi realizada através das análises dos espectros de IV, RMN e EM e comparação com os dados da literatura para os casos dos compostos que não são inéditos (CHASSAING *et al.*, 2015; WERBOVETZ *et al.*, 2008).

Devido à grande semelhança entre os dados espectroscópicos e espectrométricos dos seis sais de 4-metilflavílio, optou-se por realizar a discussão dos dados obtidos para o cloreto

de 4-metil-7-metoxiflavílio (**1**). Os espectros de IV, RMN e massas dos demais compostos (**2-6**) foram apresentados em anexo.

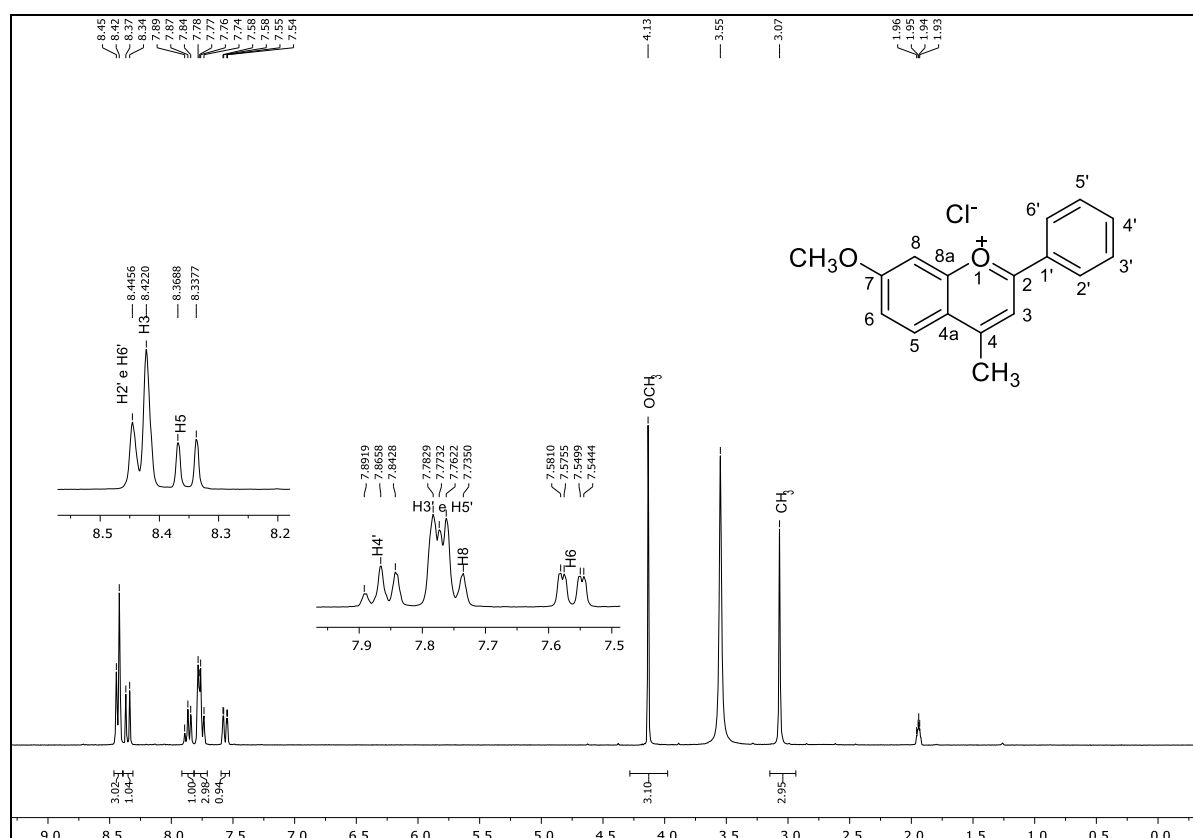
Através da análise do espectro de IV do cloreto de 4-metil-7-metoxiflavílio (**1**), mostrado na **Figura 4**, é possível observar bandas relativamente fortes entre 1600 e 1450  $\text{cm}^{-1}$  referentes ao estiramento das ligações C=C dos anéis aromáticos. A banda larga que aparece na região de 3100 a 2100  $\text{cm}^{-1}$  pode estar associada à presença de água de hidratação, visto que estes compostos são altamente higroscópicos.



**Figura 4.** Espectro de infravermelho (IV) do flavílio **1**.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do sal de flavílio **1** (**Figura 5**), realizado em acetonitrila- $d_3$ , observam-se os seguintes sinais: um simpleto em  $\delta$  3,07, integrado para três hidrogênios, referente aos hidrogênios da metila ligada à posição C4; um simpleto em  $\delta$  4,13, integrado para três hidrogênios, relativo ao grupo metoxila; o duplete duplo em  $\delta$  7,57 integrado para um

hidrogênio, referente ao H6, que apresentou uma constante de acoplamento *orto* de 9,3 Hz (valores típicos 6-10 Hz) e uma constante de acoplamento *meta* de 1,6 Hz (valores típicos 1-3 Hz); um simpleto largo em  $\delta$  7,74 atribuído ao H8; um multipletto em  $\delta$  7,74-7,78, integrado para dois hidrogênios, referente a H3' e H5'; um triplete largo em  $\delta$  7,87, cuja integração foi igual a um hidrogênios, atribuído a H4'; um dupletto em  $\delta$  8,36, com constante de acoplamento *orto* de 9,3 Hz e integração igual a uma unidade, relativo a H5; um simpleto em  $\delta$  8,42 atribuído ao hidrogênio ligado à posição H3; e, finalmente, um dupletto em  $\delta$  8,44, integrado para dois hidrogênios e com constante de acoplamento *orto* de 7,3 Hz, que corresponde a H2' e H6' (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

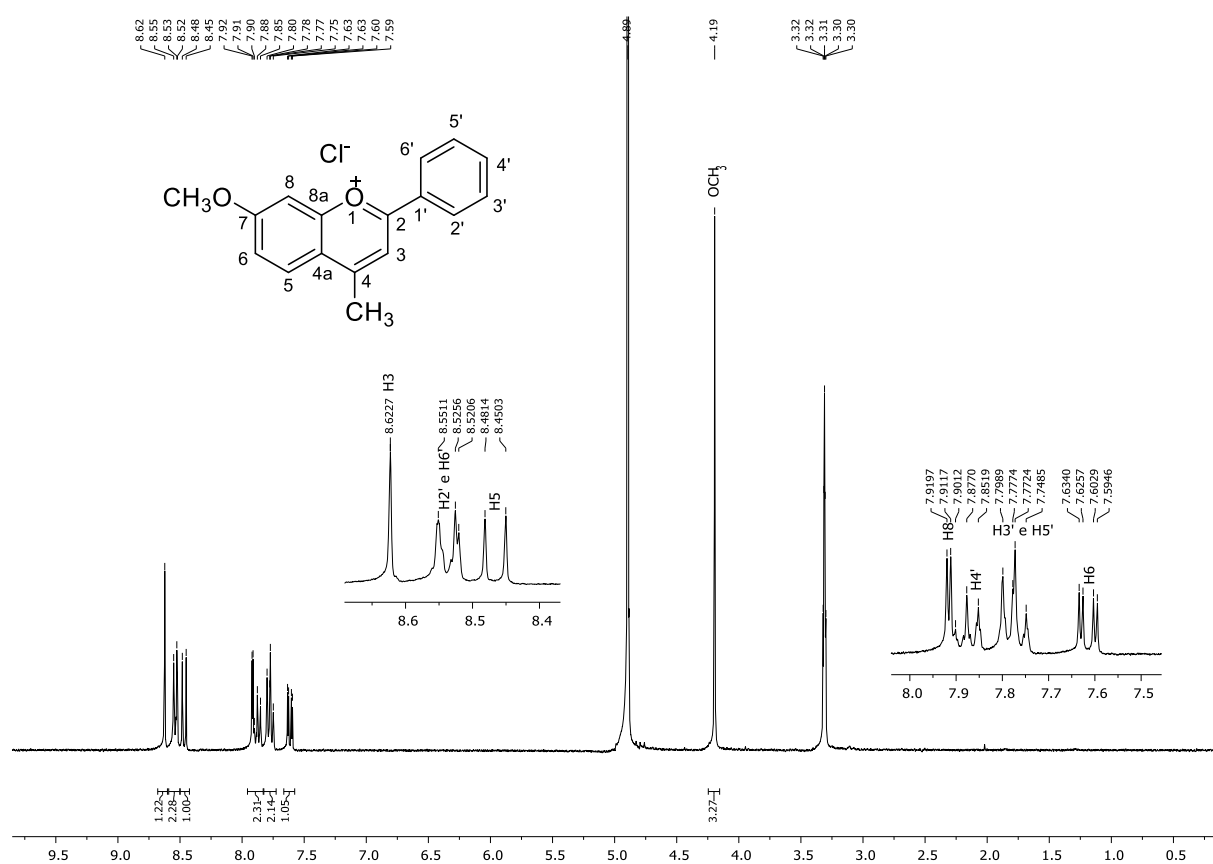


**Figura 5.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H do flavílio **1** (acetonitrila-*d*<sub>3</sub>, 300 MHz).

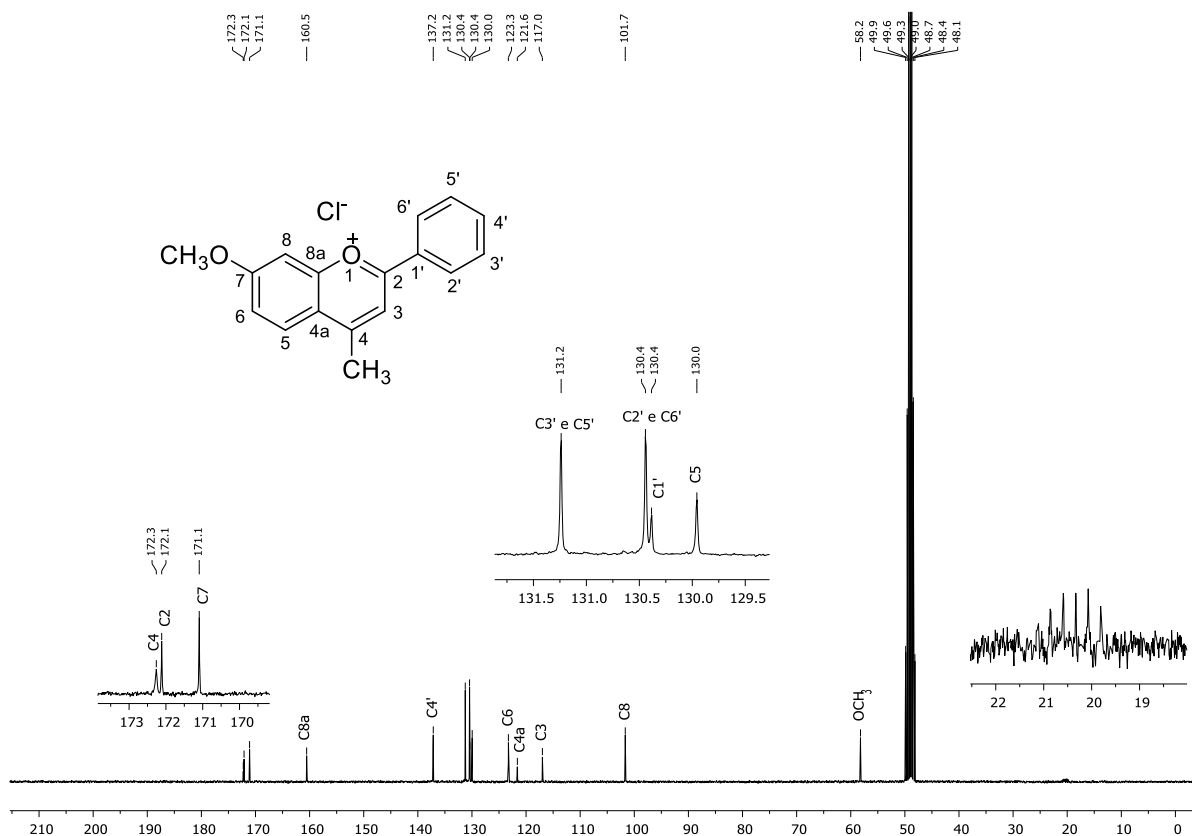
No espectro de RMN de <sup>13</sup>C de **1** (Figura 6), empregando acetonitrila-*d*<sub>3</sub>, destacam-se os seguintes sinais característicos: dois sinais em  $\delta$  21,4 e  $\delta$  58,5 relativos à metila em C4 e ao grupo metoxila, respectivamente; dois sinais intensos em  $\delta$  130,1 e  $\delta$  131,1, sendo o primeiro



em um trabalho prévio desenvolvido por Chen e colaboradores (CHEN *et al.*, 2008) demonstram a ausência dos sinais relativos ao grupo metila em C4. Acredita-se que este fenômeno seja causado pela troca dos hidrogênios do grupo metila por deutério proveniente do solvente, dando origem a um grupo CD<sub>3</sub>, uma vez que hidrogênios nesta posição da estrutura dos flavílios devem possuir elevada acidez. Devido à disponibilidade de solvente deuterado, empregou-se metanol-*d*<sub>4</sub> nas análises de RMN dos demais sais de 4-metilflavílio (**2-6**), apesar da não observância dos sinais relativos ao grupo metila.

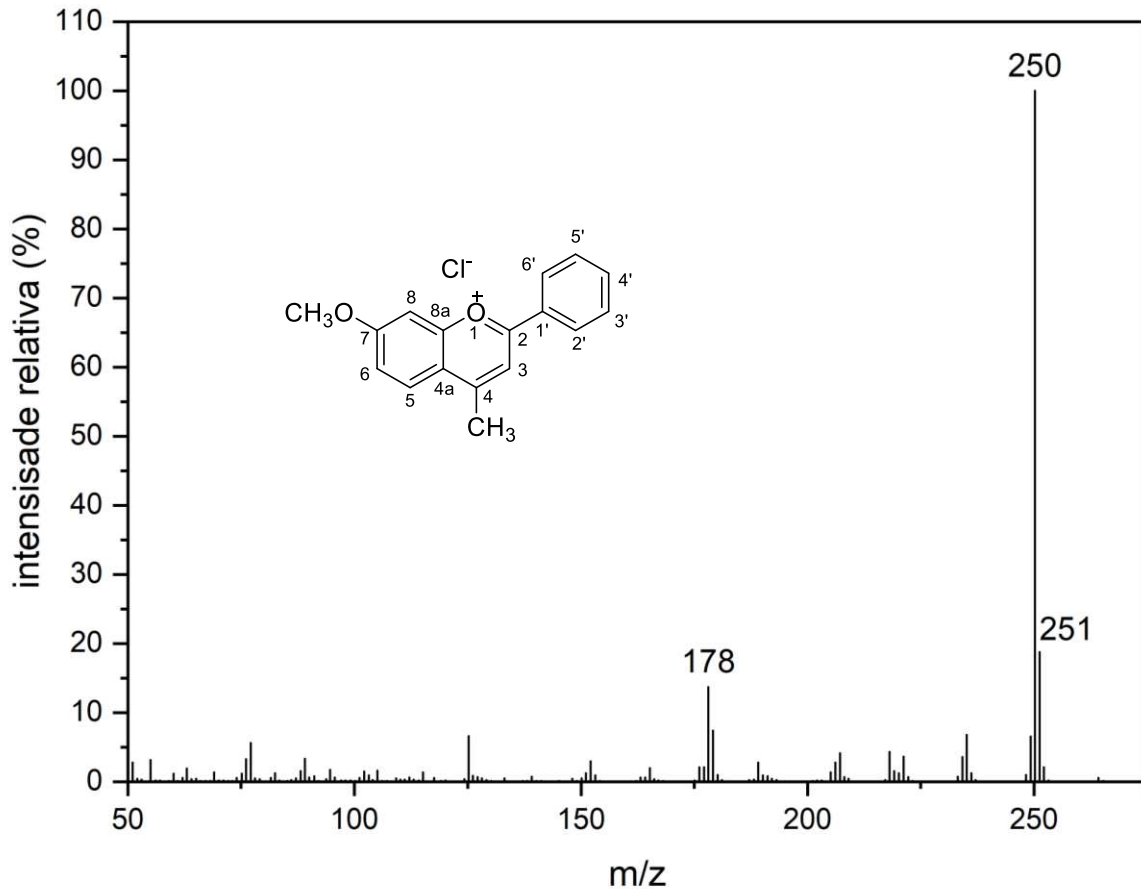


**Figura 7.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H do flavílio **1** (metanol-*d*<sub>4</sub>, 300 MHz).

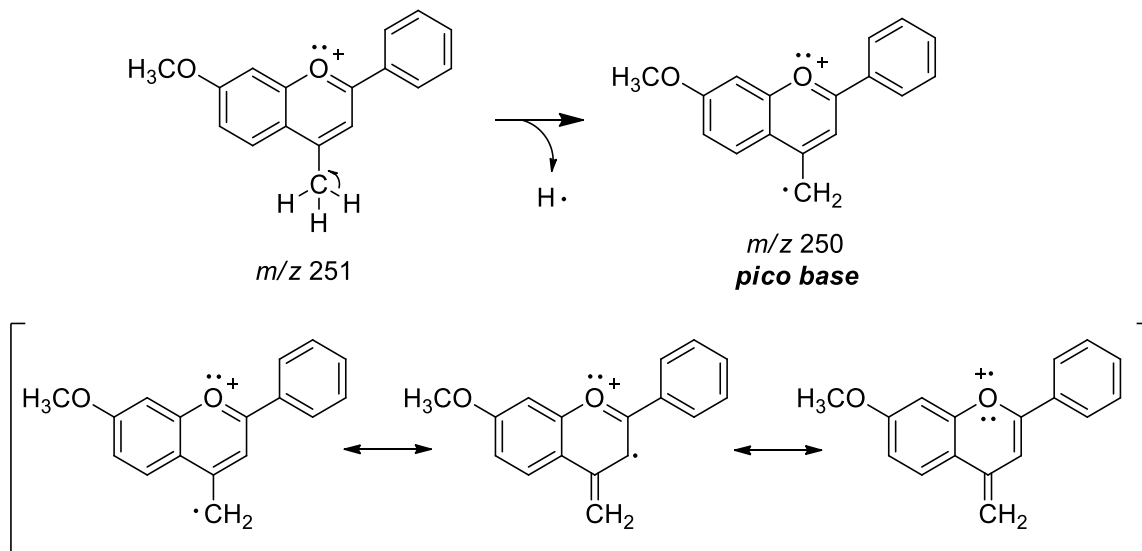


**Figura 8.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do flavílio **1** (metanol- $d_4$ , 75 MHz).

Através da análise do espectro de massa do composto **1** (**Figura 9**), podemos destacar o pico em  $m/z$  251, correspondente ao fragmento catiônico do sal de flavílio, e o pico base em  $m/z$  250, atribuído ao cátion radical formado após a perda de um átomo de hidrogênio. É importante ressaltar que por serem aromáticos, os cátions flavílio sofrem poucas fragmentações no espectrômetro de massas. Uma proposta para a fragmentação que leva a formação do pico base foi ilustrada na **Figura 10**.

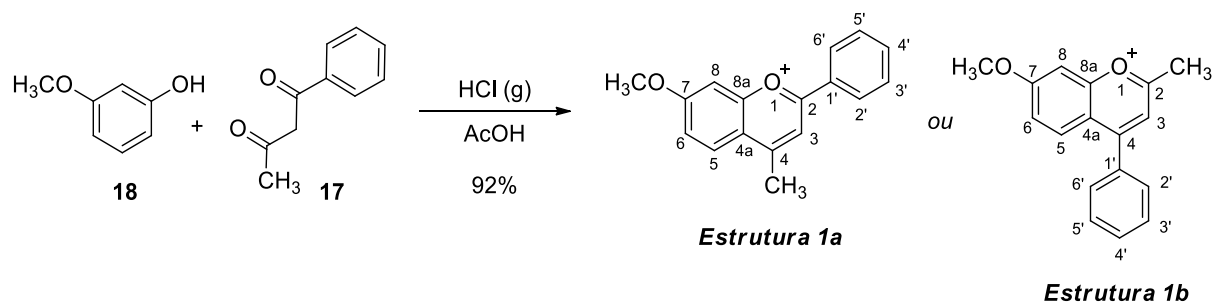


**Figura 9.** Espectro de massas do flavílio 1.



**Figura 10.** Fragmentação do cátion flavílio 1 para formação do fragmento que dá origem ao pico base.

Devido à escassez de trabalhos prévios que realizam a inequívoca atribuição dos sinais de RMN dos sais de flavílio e a baixa correlação entre os valores das frequências experimentais com os valores calculados através de programas clássicos de predição de espectros tais como o ChemDraw Ultra e o MestRenova, optou-se por realizar os cálculos das frequências de RMN através do método da Teoria do Funcional da Densidade (DFT, do inglês Density Functional Theory). Os cálculos foram realizados empregando inicialmente uma busca conformacional da estrutura **1** no software Spartan 14. Em seguida, as frequências de ressonância foram obtidas através do Gaussian 09, utilizando o nível de teoria B3LYP/6-311+G(2d,p), como descrito na parte de Materiais de Métodos. Para uma melhor comparação entre os valores calculados e experimentais, realizou-se o cálculo das frequências de RMN da estrutura mais provável **1a** e de seu regioisômero **1b**, cujas estruturas estão mostradas no **Esquema 12**.



**Esquema 12.** Estruturas candidatas para a condensação entre o 3-metoxifenol (**18**) e a benzoylacetona (**17**).

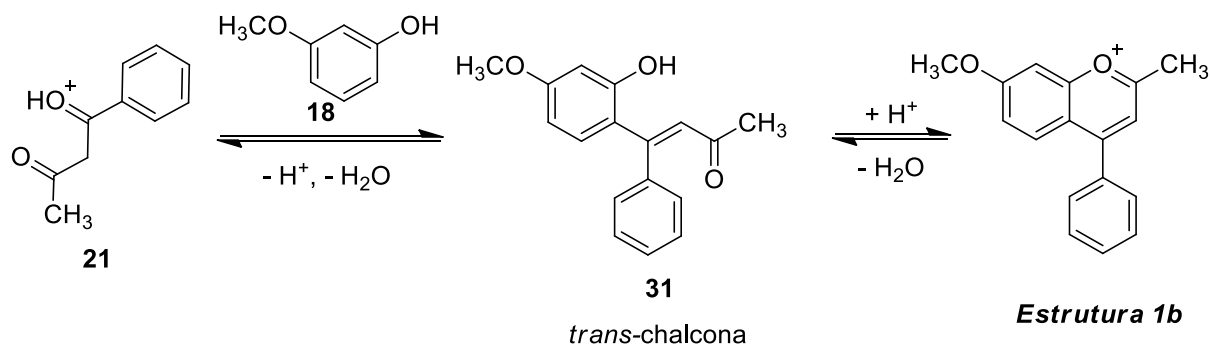
**Tabela 1.** Frequências de RMN experimentais e calculadas para as estruturas candidatas **1a** e **1b**.

Position	Expt. $\delta$		Calcd. $\delta$ ( <b>1a</b> )		Calcd. $\delta$ ( <b>1b</b> )		Abs. Err. ( <b>1a</b> )		Abs. Err. ( <b>1b</b> )	
	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$	$ \Delta\delta_H $	$ \Delta\delta_C $	$ \Delta\delta_H $	$ \Delta\delta_C $
1'		129.9		126.9		134.8		3.0		4.9
2		171.4		165.6		176.2		5.8		4.8
2' and 6'	8.44	130.1	8.39	127.5	7.27	124.3	0.05	2.6	1.17	5.8
3	8.42	117.1	8.00	112.0	7.36	115.7	0.42	5.1	1.06	1.4
3' and 5'	7.77	131.1	7.64	127.8	7.50	125.8	0.13	3.3	0.27	5.3
4		172.1		167.0		167.8		5.1		4.3
4'	7.87	137.1	7.78	134.7	7.55	127.1	0.09	2.4	0.32	10.0
4a		121.2		117.5		117.9		3.7		3.3
5	8.36	129.8	8.11	126.7	7.35	129.3	0.25	3.1	1.01	0.5
6	7.57	122.9	7.39	119.6	7.25	119.6	0.18	3.3	0.32	3.3
7		170.5		165.6		166.5		4.9		4.0
8	7.74	101.7	7.44	97.3	7.49	97.8	0.30	4.4	0.25	3.9
8a		160.0		153.9		155.8		6.1		4.2
Me	3.07	21.4	2.95	20.6	3.00	21.4	0.12	0.8	0.07	0.0
OMe	4.13	58.5	4.01	54.0	3.99	54.2	0.12	4.5	0.14	4.3
<b>MAE<sup>a,b</sup></b>							<b>0.18</b>	<b>3.9</b>	<b>0.51</b>	<b>4.0</b>

<sup>a</sup>MAE: erro absoluto médio.

<sup>b</sup>Os cálculos foram conduzidos no software Gaussian 09, utilizando o nível de teoria B3LYP/6-311+G(2d,p)/M06-2X/6-31+G(d,p).

Ao avaliar os valores dos erros absolutos médios (MAEs) mostrados na **Tabela 1**, podemos ver que estes são menores para a estrutura candidata **1a**, confirmando assim a sua formação em detrimento da formação do outro possível regioisômero **1b**. Ao avaliar o possível mecanismo que levaria à formação da estrutura **1b**, resumido no **Esquema 13**, podemos verificar a formação de uma *trans*-chalcona intermediária (**31**), provavelmente bem menos estável que a *trans*-chalcona intermediária (**23**) que leva à formação da estrutura **1a**, mostrada anteriormente no **Esquema 8** (p. 30). A diferença de estabilidade entre as duas *trans*-chalconas poderia ser explicada pela conjugação estendida presente na estrutura **23** (supostamente mais estável) e pela conjugação cruzada presente na estrutura **31** (supostamente menos estável).



**Esquema 13.** Mecanismo proposto para a formação da estrutura candidata 1b.

Além da utilização do cálculo teórico para a escolha entre estruturas candidatas, é importante destacar a ótima correlação dos valores experimentais com os valores calculados. Assim, estes resultados indicam que o emprego de cálculos teóricos pode ser uma ferramenta importante para auxiliar na atribuição inequívoca dos sinais de RMN dos sais de flavílio. Em especial para o caso do RMN de  $^{13}\text{C}$ , a atribuição de todos os sinais se torna uma tarefa muitas vezes difícil devido ao grande número de átomos de carbono não hidrogenados presentes nas estruturas.

### 3.2. OTIMIZAÇÃO E SÍNTESE DOS SAIS DE FLAVÍLIO SEM SUBSTITUENTES EM C4

Inicialmente, a produção de quatro sais de flavílio sem substituintes na posição C4 (compostos **7-10**) foi realizada através de reações de condensação entre 2-hidroxibenzaldeídos e acetofenonas, em ácido acético glacial e empregando cloreto de hidrogênio gasoso como catalisador ácido. Os resultados iniciais foram resumidos na **Tabela 2**. A condensação entre **32** e **34** levou ao sal de flavílio **7** em 41% de rendimento. O flavílio **8** foi obtido com 46% de rendimento a partir de **33** e **28**. A condensação entre **32** e **28** levou ao flavílio **9** em 59% de rendimento. Por último, o flavílio **10** foi obtido com rendimento de 38% a partir de **33** e **34**.

**Tabela 2.** Síntese dos sais de flavílios 7-10

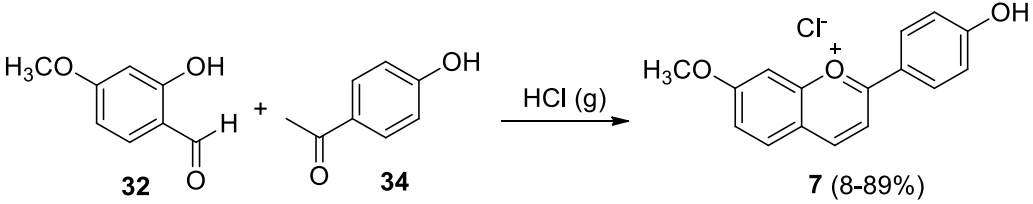
**7-10**

Entrada	Benzaldeído	Acetofenona	Sal de flavílio	Rendimento (%)
1	<b>32</b> , R <sub>1</sub> = OCH <sub>3</sub>	<b>34</b> , R <sub>2</sub> = OH	<b>7</b> , R <sub>1</sub> = OCH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> = OH	41
2	<b>33</b> , R <sub>1</sub> = OH	<b>28</b> , R <sub>2</sub> = OCH <sub>3</sub>	<b>8</b> , R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = OCH <sub>3</sub>	46
3	<b>32</b> , R <sub>1</sub> = OCH <sub>3</sub>	<b>28</b> , R <sub>2</sub> = OCH <sub>3</sub>	<b>9</b> , R <sub>1</sub> = R <sub>2</sub> = OCH <sub>3</sub>	59
4	<b>33</b> , R <sub>1</sub> = OH	<b>34</b> , R <sub>2</sub> = OH	<b>10</b> , R <sub>1</sub> = R <sub>2</sub> = OH	38

Apesar de terem sido alcançados bons a ótimos rendimentos nas sínteses da maior parte dos sais de 4-metilflavílio, os rendimentos alcançados no caso dos compostos sem substituinte em C4 foram consideravelmente baixos nas condições reacionais inicialmente empregadas. Assim, com o objetivo de melhorar os resultados obtidos para os compostos sem substituintes em C4, foi realizado um breve estudo de otimização das condições reacionais.

Visando a melhoria das condições reacionais para a preparação de sais de flavílio sem substituintes em C4, foi escolhida a reação de condensação entre o 2-hidróxi-4-metoxibenzaldeído (**32**) e a 4-hidroxiacetofenona (**34**). Em todas as condições reacionais testadas o catalisador ácido foi preparado pela reação entre ácido sulfúrico e cloreto de sódio em um recipiente à parte e borbulhado dentro da mistura reacional. Ao final de cada reação, o produto foi obtido por precipitação através da adição de tetrahydrofurano (entradas 1- 6) ou pelo resfriamento da mistura em congelador (entradas 7-10). Foram avaliados os efeitos do solvente e do tempo de borbulhamento do cloreto de hidrogênio, como mostrado na **Tabela 3**.

**Tabela 3.** Otimização das condições de síntese do sal de flavílio 7.



Entrada	Solvente <sup>a</sup>	Tempo de borbulhamento de HCl(g)	Rendimento (%)
1	AcOH	2 h	44
2	AcOH	4 h	58
3	AcOH/Ac <sub>2</sub> O 9:1	2 h	51
4	AcOH/Ac <sub>2</sub> O 9:1	4 h	66
5	AcOH/Ac <sub>2</sub> O 1:1	2 h	18
6	AcOH/Ac <sub>2</sub> O 1:1	4 h	8
7	AcOEt	2 h	81
8	AcOEt	4 h	89
9	AcOEt/Ac <sub>2</sub> O 9:1	2 h	57
10	AcOEt/Ac <sub>2</sub> O 9:1	4 h	71

<sup>a</sup>AcOH = ácido acético glacial, Ac<sub>2</sub>O = anidrido acético e AcOEt = acetato de etila.

De acordo com os resultados da **Tabela 3**, podemos observar que um maior tempo de borbulhamento de cloreto de hidrogênio gasoso levou, em geral, a um aumento do rendimento do produto. O mesmo efeito positivo foi verificado pela adição de 10% de anidrido acético ao ácido acético, provavelmente devido ao deslocamento do equilíbrio da reação de condensação, promovida pela reação entre o anidrido e a água formada no meio. Contudo, o excesso de anidrido causou uma redução significativa do rendimento da reação, provavelmente devido a reações de acetilação dos grupos hidroxila dos reagentes e intermediários, impedindo que a

reação ocorra como desejado. O emprego de acetato de etila como solvente forneceu os maiores rendimentos, mesmo com um menor tempo de borbulhamento do catalisador ácido. Finalmente, é interessante notar que a adição de 10% anidrido acético ao acetato de etila promoveu uma redução no rendimento das reações, sendo um efeito contrário ao observado para as reações em ácido acético.

Finalmente, a melhor condição reacional obtida para o preparo do flavílio **7**, empregando acetato de etila como solvente e borbulhamento de cloreto de hidrogênio por 4 h, foi utilizada também com grande sucesso nas sínteses dos flavílios **8-10** (Tabela 4).

**Tabela 4.** Síntese dos sais de flavílios **7-10**, empregando condições otimizadas.

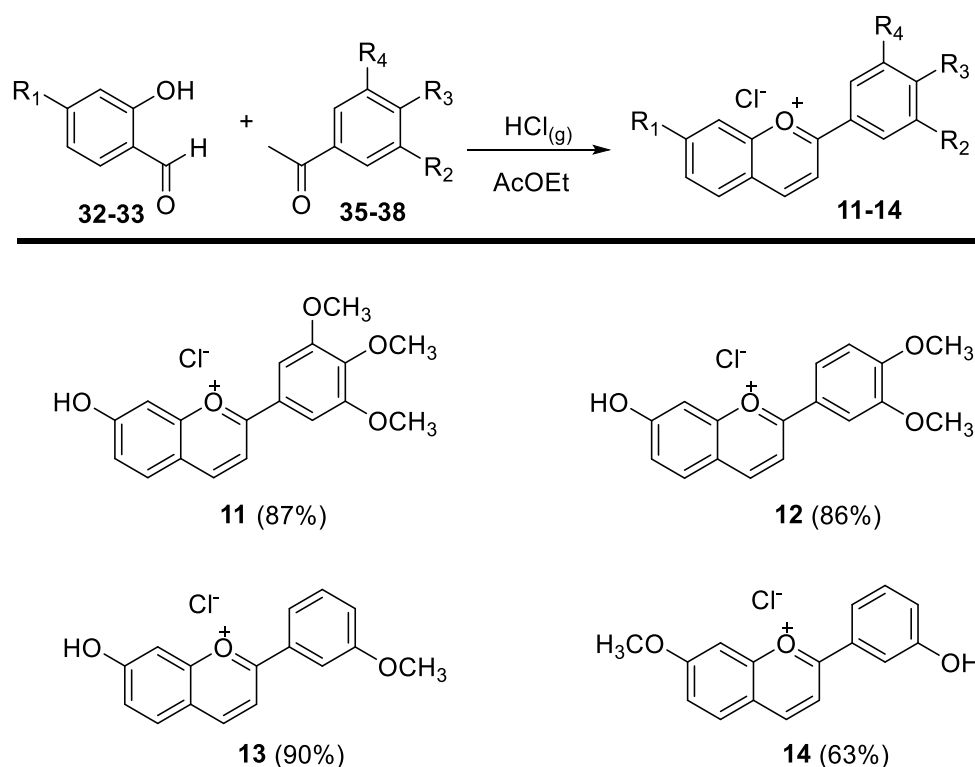
Entrada	Benzaldeído	Acetofenona	Sal de flavílio	Rendimento (%)
1 <sup>a</sup>	<b>32</b> , R <sub>1</sub> = OCH <sub>3</sub>	<b>34</b> , R <sub>1</sub> = OH	<b>7</b> , R <sub>1</sub> = OCH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> = OH	89
2	<b>33</b> , R <sub>1</sub> = OH	<b>28</b> , R <sub>1</sub> = OCH <sub>3</sub>	<b>8</b> , R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = OCH <sub>3</sub>	78
1	<b>32</b> , R <sub>1</sub> = OCH <sub>3</sub>	<b>34</b> , R <sub>1</sub> = OCH <sub>3</sub>	<b>9</b> , R <sub>1</sub> = R <sub>2</sub> = OCH <sub>3</sub>	82
4	<b>33</b> , R <sub>1</sub> = OH	<b>28</b> , R <sub>1</sub> = OH	<b>10</b> , R <sub>1</sub> = R <sub>2</sub> = OH	76

<sup>a</sup>Condição descrita na entrada 8 da Tabela 3 e incluída aqui para efeito de comparação.

Comparando-se os rendimentos apresentados na Tabela 2 (p. 43) com os valores obtidos após a otimização das condições reacionais (mostrados na Tabela 4), podemos observar um aumento significativo dos rendimentos dos produtos desejados ao substituir o ácido acético por acetato de etila e o aumento do tempo de borbulhamento do catalisador ácido de duas para quatro horas.

Com o intuito de aumentar o escopo da reação e produzir mais derivados, as condições reacionais otimizadas foram empregadas para a preparação dos sais de flavílio **11-14**, contendo

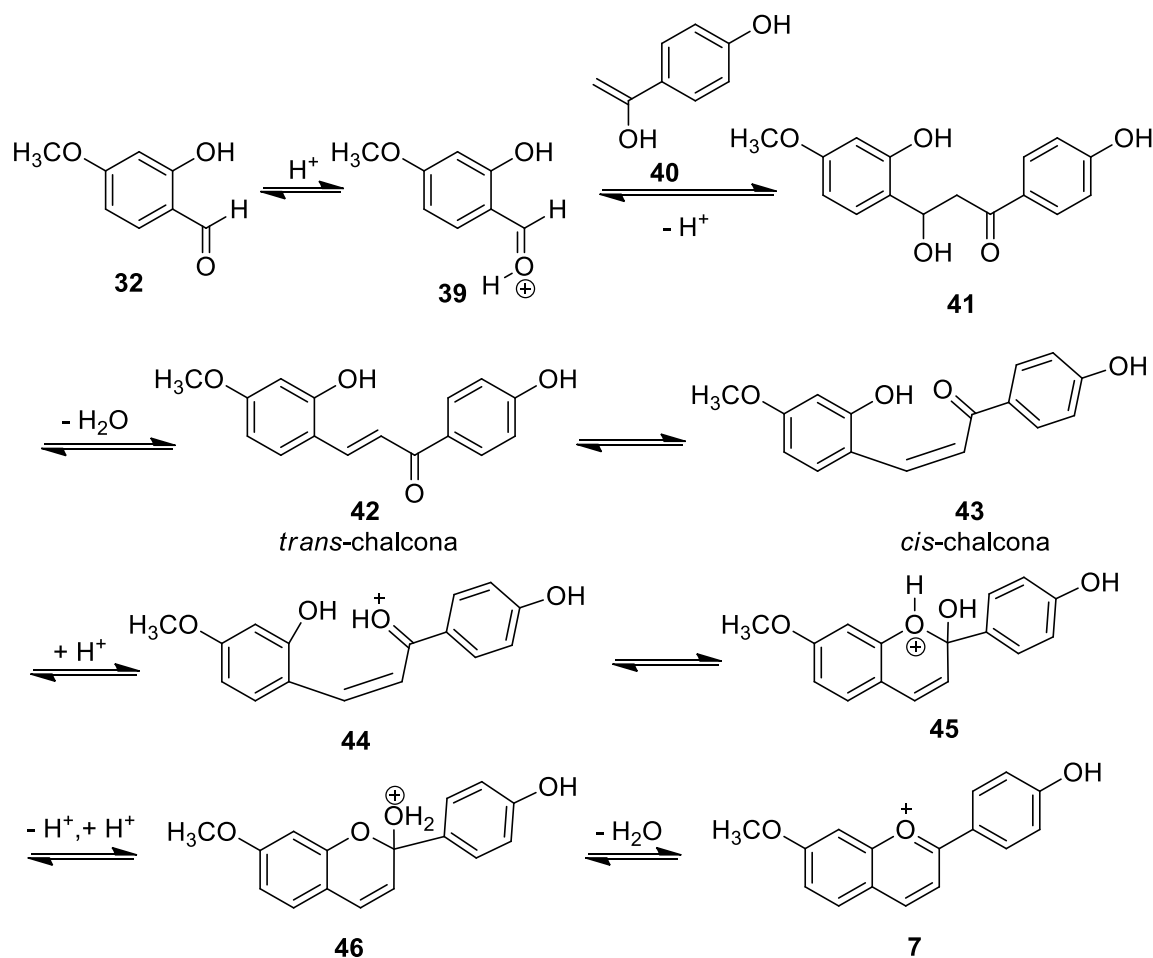
variados padrões de substituição no anel B (**Esquema 14**). Em todos os casos foram obtidos bons rendimentos, indicando que a condição reacional utilizada é adequada para o preparo dessa classe de compostos.



**Esquema 14.** Síntese dos sais de flavílio **11-14** empregando condições otimizadas.

Uma proposta para o mecanismo de formação dos sais de flavílio sem substituintes na posição C4 (**7-14**) foi ilustrada para a formação do composto **7** no **Esquema 15**. Após protonação do 2-hidroxibenzaldeído **32** para a formação da espécie protonada **39**, deve ocorrer uma reação de adição aldólica do enol **40** (formado a partir da acetofenona **34**), formando o intermediário  $\beta$ -hidroxilado **41**. Este último pode sofrer eliminação de água catalisada por ácido para formar a *trans*-chalcona **42**, que está em equilíbrio com a *cis*-chalcona **43**. A ciclização catalisada por ácido da *cis*-chalcona **43** leva ao cátion **45**, que por sua vez dá origem ao intermediário **46** através de etapas de desprotonação/protonação. Finalmente, o flavílio desejado é obtido a partir de **46** após a eliminação de uma molécula de água. Apesar da *trans*-chalcona apresentar maior estabilidade, ela está em equilíbrio com seu isômero *cis*. A chalcona

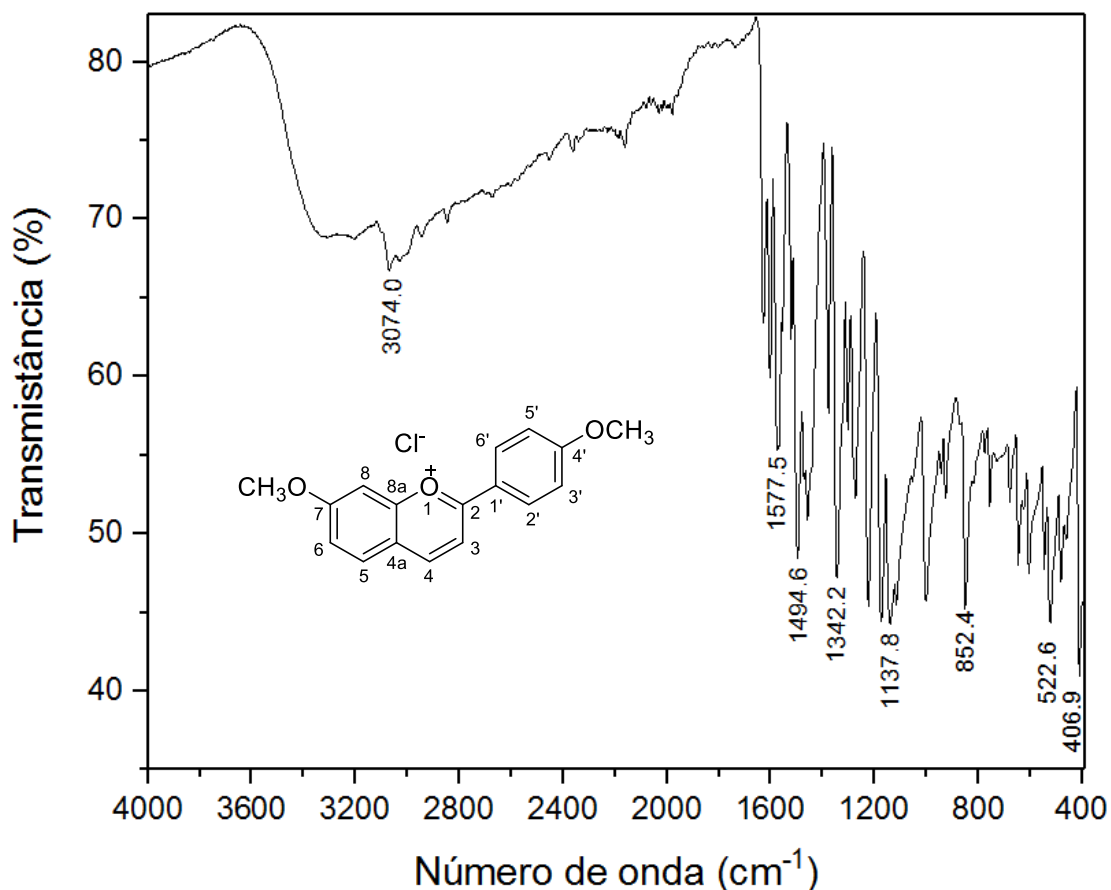
*cis* por sua vez pode sofrer ciclização *in situ* com subsequente perda de água para dar origem ao sal de flavílio.



**Esquema 15.** Mecanismo da reação de condensação para formação do sal de flavílio 7.

Devido à grande semelhança entre os dados espectroscópicos e espectrométricos dos sais de flavílio sem substituinte na posição C4, optou-se por discutir os dados do flavílio 9. Os espectros dos demais sais de flavílio podem ser encontrados em anexo.

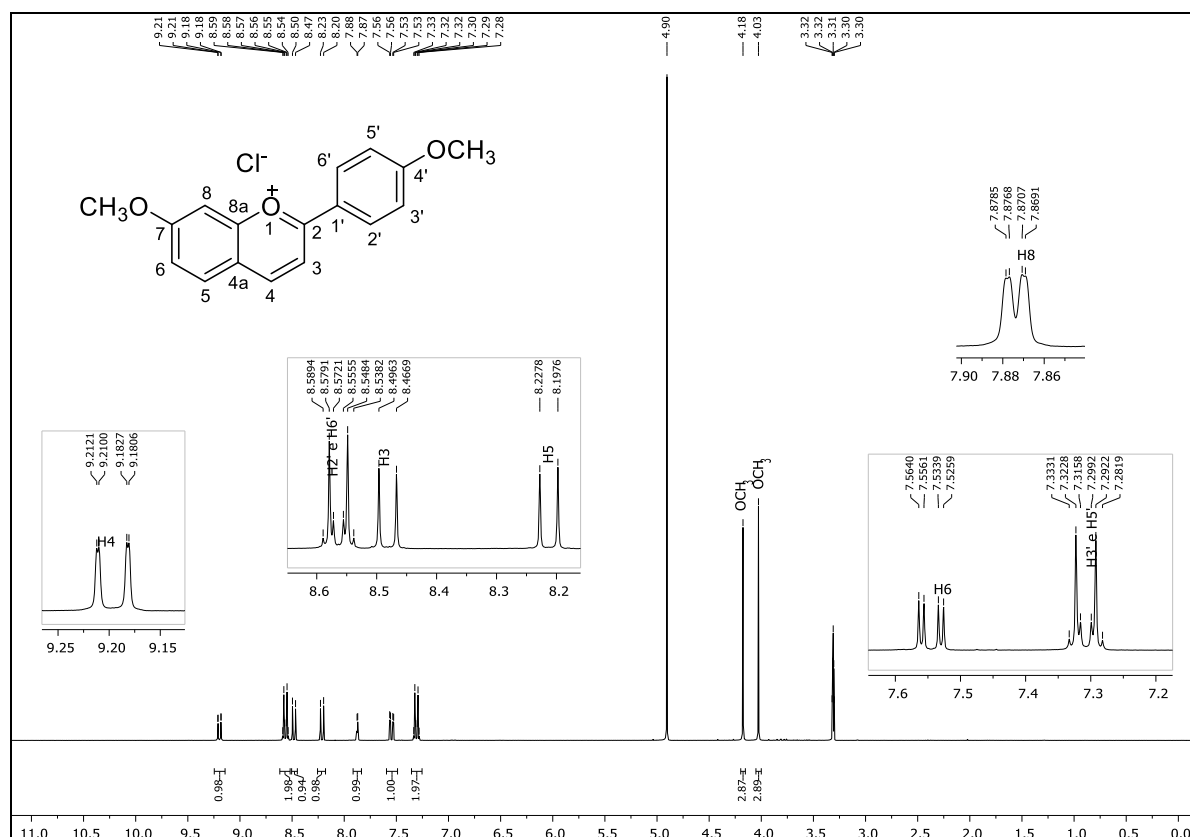
Pela análise do espectro de IV do sal de flavílio 9, mostrado na **Figura 11** é possível observar bandas relativamente fortes entre 1600 e 1450 cm<sup>-1</sup> referentes ao estiramento das ligações C=C dos anéis aromáticos.



**Figura 11.** Espectro de infravermelho (IV) do flavílio **9**.

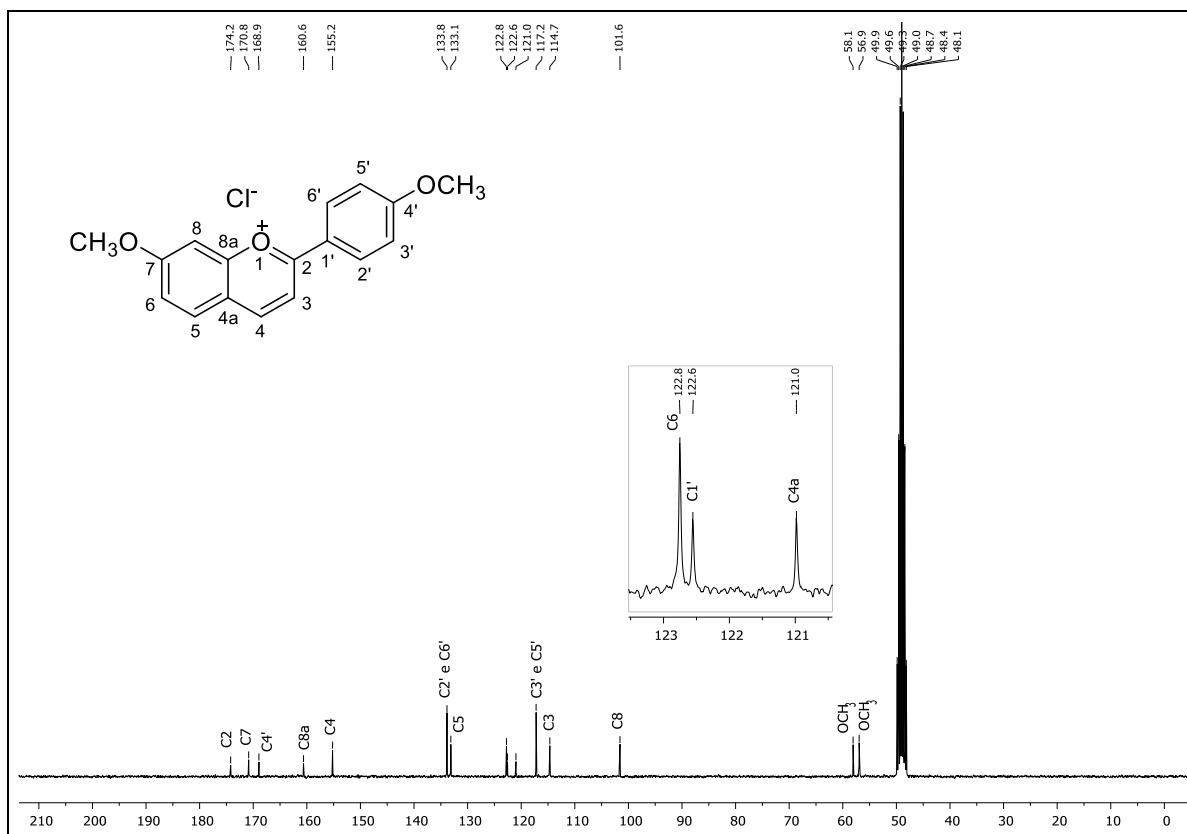
No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do sal de flavílio **9** (**Figura 12**), realizado em metanol- $d_4$ , observam-se os seguintes sinais: dois simples em  $\delta$  4,03 e  $\delta$  4,18, ambos integrados para três hidrogênios, referentes aos grupos metoxila; um duplete duplo em  $\delta$  7,55, integrado para um hidrogênio e com constante de acoplamento *orto* de 9,4 Hz e *meta* de 2,4 Hz, atribuído ao hidrogênio H6; um duplete largo em  $\delta$  7,87 ( $J_{meta} = 2,4$  Hz), integrado para um e referente ao H8; um duplete em  $\delta$  8,21, com constante de acoplamento *orto* de 9,04 Hz e integração igual a um, relativo ao H5; um duplete em  $\delta$  8,48, com constante de acoplamento de 8,8 Hz e integrado para um, atribuído ao H3; um duplete duplo integrado para um hidrogênio em  $\delta$  9,20 ( $J = 8,8$  e 0,63 Hz), relativo ao H4, cuja constante de acoplamento maior se refere ao acoplamento *orto* e a constante menor corresponde a um acoplamento de longa distância com o H8; por fim, os

multipletos em  $\delta$  7,28-7,33 e  $\delta$  8,54-8,59, ambos com integração igual a dois, correspondem aos hidrogênios H3' e H5' e aos hidrogênios H2' e H6', respectivamente.



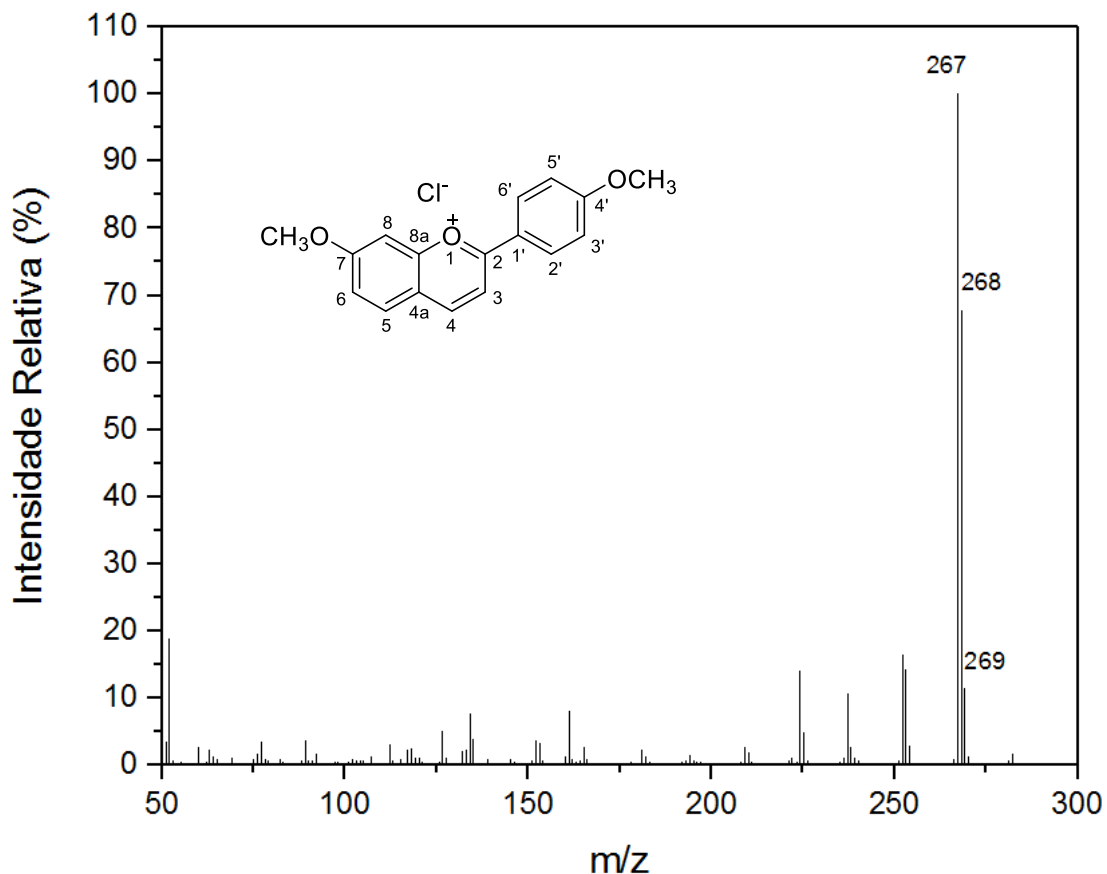
**Figura 12.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do flavílio **9** (metanol- $d_4$ , 300 MHz).

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **9** (Figura 13), empregando metanol- $d_4$ , destacam-se os seguintes sinais característicos: sinais em  $\delta$  56,9 e  $\delta$  58,1 relativos aos grupos metoxila; os sinais intensos em  $\delta$  117,2 e  $\delta$  133,8, sendo o primeiro atribuído aos carbonos C3' e C5' e o segundo aos carbonos C2' e C6'; cinco sinais de média intensidade referentes aos demais carbonos aromáticos hidrogenados [ $\delta$  101,6 (C8),  $\delta$  114,7 (C3),  $\delta$  122,8 (C6),  $\delta$  133,1 (C5) e  $\delta$  155,2 (C4)]; e, seis sinais relativos a carbonos aromáticos não hidrogenados [ $\delta$  121,0 (C4a),  $\delta$  122,6 (C1'),  $\delta$  160,6 (C8a),  $\delta$  168,9 (C4'),  $\delta$  170,8 (C7),  $\delta$  174,2 (C2)]. As atribuições dos sinais de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram feitas empregando dados da literatura e com o auxílio de programas de predição de espectros, assim, algumas atribuições podem estar trocadas.



**Figura 13.** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C do flavílio **9** (metanol-*d*<sub>4</sub>, 75 MHz).

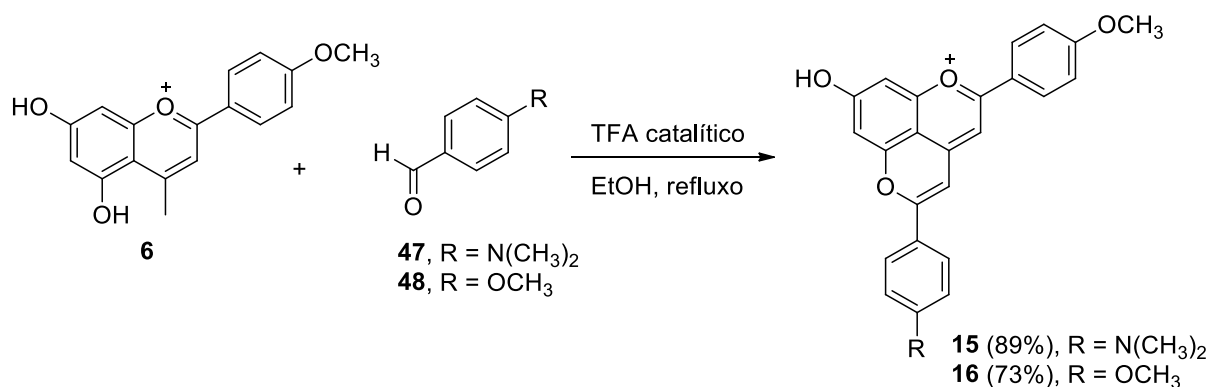
No espectro de massas do composto **9** (**Figura 14**) podemos observar em *m/z* 267 e *m/z* 268 os picos correspondentes ao íon molecular e ao pico M+1, respectivamente.



**Figura 14.** Espectro de massas do flavílio **9**.

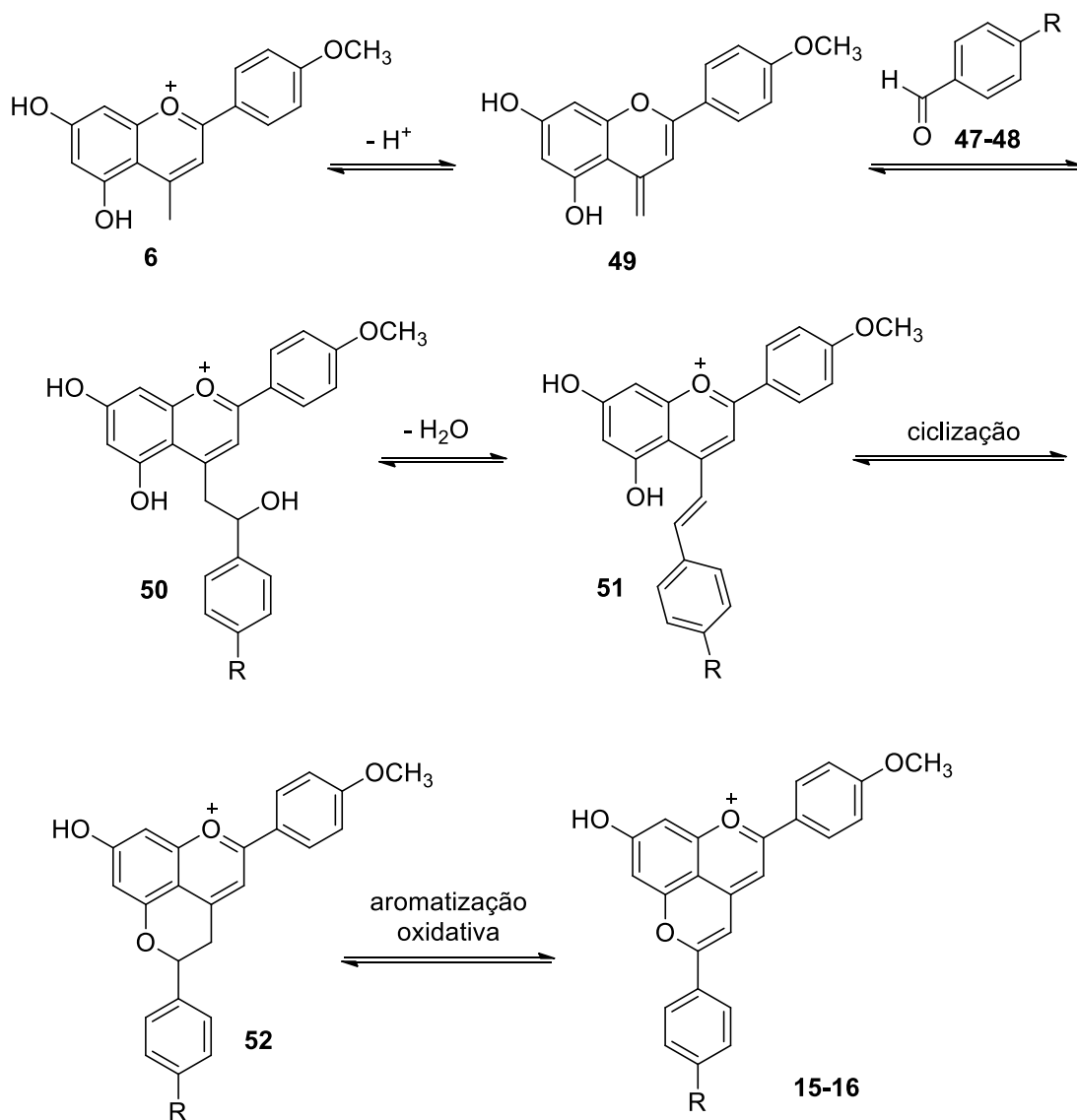
### 3.1. SÍNTESE DOS SAIS DE PIRANOFLAVÍLIO

Os sais de piranoflavílio são compostos produzidos em processos de maturação de vinho e que podem estar associados a diversas atividades biológicas (CHASSAING *et al.*, 2015; DA SILVA *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2019). Dessa maneira, esta parte do trabalho teve como objetivo a síntese de sais de piranoflavílios contendo substituintes no anel B, a partir do sal de flavílio **6**. A condição reacional empregada seguiu um procedimento previamente descrito para a preparação de sais de piranoflavílios sem substituintes no anel B (DA SILVA *et al.*, 2018). Como mostrado no **Esquema 16**, foram obtidos dois sais de piranoflavílio (**15** e **16**), com bons rendimentos, através da reação do flavílio **6** com 4-(dimetilamino)benzaldeído (**47**) e 4-metoxibenzaldeído (**48**).



**Esquema 16.** Síntese dos sais de piranoflavílio **15** e **16**.

O mecanismo proposto para a formação dos sais de piranoflavílio (**15** e **16**) está mostrado no **Esquema 17** e se baseou em propostas da literatura (DA SILVA *et al.*, 2018). Em um primeiro momento, acredita-se que ocorra a desprotonação do sal de flavílio **6** para a formação da base conjugada **49**. Em seguida, **49** deve atuar como um nucleófilo, promovendo uma reação de adição ao aldeído (**47-48**) presente na mistura reacional. O intermediário **50**, formado pela reação de adição nucleofílica à carbonila do aldeído, deve sofrer eliminação de uma molécula de água para formar o intermediário altamente conjugado **51**. Este último, pode sofrer uma reação de ciclização catalisada por ácido presente no meio, dando origem ao intermediário ciclizado **52**. Por fim, para que ocorra a aromatização oxidativa que leva à formação do produto desejado, é necessário a abertura do frasco de reação, permitindo o contato da mistura reacional com o ar atmosférico. Acredita-se que o ar presente na atmosfera promova a aromatização do intermediário **52** para a formação dos sais de piranoflavílio (**15-16**).



**Esquema 17.** Proposta de mecanismo para a síntese dos sais de piranoflavílio **15** e **16**.

A formação dos compostos **15** e **16** foi confirmada através da realização de RMN de  $^1H$  e comparação com os dados da literatura (CHASSAING *et al.*, 2015). Devido à baixa solubilidade destes compostos ainda não foi possível a realização dos espectros de RMN de  $^{13}C$ . No entanto, espectros de massas de alta resolução confirmaram a obtenção dos produtos desejados.

#### 4. CONCLUSÕES

Foram obtidos 14 sais de flavílio e 2 sais de piranoflavílio em bons rendimentos.

Reações de condensação entre fenóis e benzoilacetonas levaram à produção de 6 sais de flavílio contendo um substituinte metil na posição C4, sendo eles os compostos numerados nesse trabalho de **1-6**. Foram alcançados elevados rendimentos para a obtenção dos sais **1-3** empregando uma única etapa reacional. Os menores rendimentos observados para a obtenção dos sais **4-6** podem estar associados ao baixo rendimento do intermediário 4-metoxibenzoilacetona (**27**), uma vez que este não foi purificado e os rendimentos para a formação dos flavílios **4-6** foram calculados para as duas etapas reacionais, ou seja, partindo da 4-metoxiacetofenona (**28**). Durante a conversão de **28** em **27**, mesmo tendo sido observada a conversão completa do material de partida ao produto, pode haver perdas nas etapas de extração e isolamento do mesmo.

Um total de 8 sais de flavílio sem substituintes na posição C4 foram obtidos através da reação de 2-hidroxibenzaldeídos com acetofenonas, sendo eles os sais **7-14**. Otimização das condições reacionais foram necessárias, levando a ótimos rendimentos. Os melhores resultados foram alcançados empregando-se acetato de etila como solvente e tempo de borbulhamento do cloreto de hidrogênio igual a quatro horas.

O flavílio **6** foi utilizado para a produção de dois sais de piranoflavílio em rendimentos de 89% para a formação de **15** e de 73% para a formação de **16**.

## **CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS SAIS DE FLAVÍLIO**

### **1. INTRODUÇÃO**

A busca por novos fármacos anticâncer é um dos maiores desafios da química moderna, visto que, cerca de 18,1 milhões de novos casos, dos mais variados tipos de câncer, surgem no mundo, vindo a óbito 9,6 milhões de pessoas, anualmente ((IARC); (OMS), 2018). Na busca por novos princípios ativos, a natureza sempre foi uma excelente fonte de inspiração e, dentre seus produtos naturais podemos destacar as antocianinas e seus derivados sintéticos, os sais de flavílios. As atividades antitumorais das antocianinas e antocianidinas têm sido estudadas e vários trabalhos demonstraram que esses compostos podem inibir a proliferação de linhagens de células tumorais, bloqueando a progressão do ciclo celular e induzindo a morte apoptótica (BUNEA *et al.*, 2013; FENG *et al.*, 2007; HAKIMUDDIN; PALIYATH; MECKLING, 2004; KATSUBE *et al.*, 2003; SEERAM *et al.*, 2006; SHIH; YEH; YEN, 2005; SRIVASTAVA *et al.*, 2007; VEERIAH *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2017; WEIGUANG YI *et al.*, 2005; YEH; YEN, 2005; ZHANG; VAREED; NAIR, 2005). Entretanto, um estudo recente mostrou que os extratos de antocianidinas foram inibidores mais potentes da proliferação de células tumorais do que os extratos de antocianinas.(WANG *et al.*, 2017)

Derivados sintéticos de antocianidinas, denominados sais de flavílios, são frequentemente usados como modelo para estudos de estabilidade e propriedades fotoquímicas (FERNANDES *et al.*, 2004; FREITAS *et al.*, 2006; PAULO *et al.*, 2006; QUINA *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2016; VAUTIER-GIONGO *et al.*, 2002). No entanto, nos últimos anos, algumas atividades biológicas foram atribuídas a essa classe de compostos sintéticos, tais como: ação como ligantes para receptores cerebrais GABA-A (KUENY-STOTZ *et al.*, 2008), atividade antiparasitária contra amastigotas axênicos de *L. donovani* e formas sanguíneas de *T. b. brucei in vitro*

(WERBOVETZ *et al.*, 2008), atividade antioxidante em condições gástricas modelo (AL BITTAR *et al.*, 2014), e, atividade citotóxica contra linhagem celular de câncer de fígado (HepG2) (CHEN *et al.*, 2017). Além disso, novos complexos de sais de flavílio, Co (II), Ni (II) e Cu (II) foram avaliados em relação às suas atividades antimicrobianas (AL-OBAIDI, 2014).

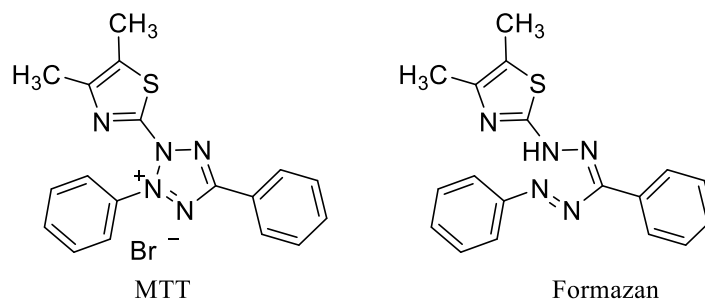
Como existem poucos estudos relacionados à compreensão das atividades biológicas dos sais de flavílio, este trabalho objetivou a avaliação citotóxica e determinação de propriedades moleculares de derivados sintéticos de antocianidinas. Desta forma, dez compostos, que foram sintetizados em elevados rendimentos como descrito no capítulo anterior, foram avaliados contra diferentes células cancerígenas. As propriedades moleculares de todos os compostos avaliados foram calculadas usando Teoria Funcional de Densidade (DFT) no nível de teoria B3LYP/6-31G \*.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA**

Os testes de atividade citotóxica dos sais de flavílio foram realizados pelo grupo do Prof. Gustavo Costa Bressan, no Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos da Universidade Federal de Viçosa. As linhagens celulares utilizadas nesse estudo foram o melanoma metastático murino (B16F10), o carcinoma hepatocelular humano (HepG2), o adenocarcinoma da mama humano (MDA-MB-231), o adenocarcinoma cervical humano (HeLa). As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute Medium* - Sigma) ou DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* - Gibco) em pH 7,2, suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS) (LGC Biotecnologia), 100 g/mL de estreptomicina e 100 unidades/mL de penicilina (Sigma) à 37 °C. As células foram crescidas em suspensão utilizando garrafas de 75, 150 e 300 cm<sup>3</sup>, mantidas em atmosfera com 95% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub>.

Para os ensaios citotóxicos, as células foram contadas em câmaras de *neubauer*, ressuspensas em meio RPMI 1640 (10% V/V SFB, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) e cada linhagem celular foi incubada em placas de 96 poços de fundo chato, na densidade 10<sup>4</sup> células por poço contendo 100 µL de meio completo e 100 µL de cada solução composta a 100 µM ou em uma faixa de diferentes concentrações (0 - 200 µM), em um período de incubação de 48 horas. Como veículo foi utilizado o solvente orgânico dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração 0,4% (v/v.) Para verificação do efeito citotóxico, adicionou-se a cada poço 10 µL da solução de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio, *Sigma*) (5 mg mL<sup>-1</sup> em PBS, *Sigma*) (**Figura 15**) e incubou-se novamente à 37°C por 4 horas. Em seguida, a solução de MTT foi removida, adicionou-se 100 µL de DMSO por poço a fim de solubilizar o formazan formado no meio e a leitura de absorbância no comprimento de onda de 545 nm foi realizada em leitora automática de microplacas (SpectraMax M5, Molecular Devices). As análises foram realizadas usando GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.). Os dados são apresentados como média ± desvio padrão de experimentos em triplicata.



**Figura 15.** Estrutura do MTT e dos Formazan

## 2.2. ESTUDOS COMPUTACIONAIS

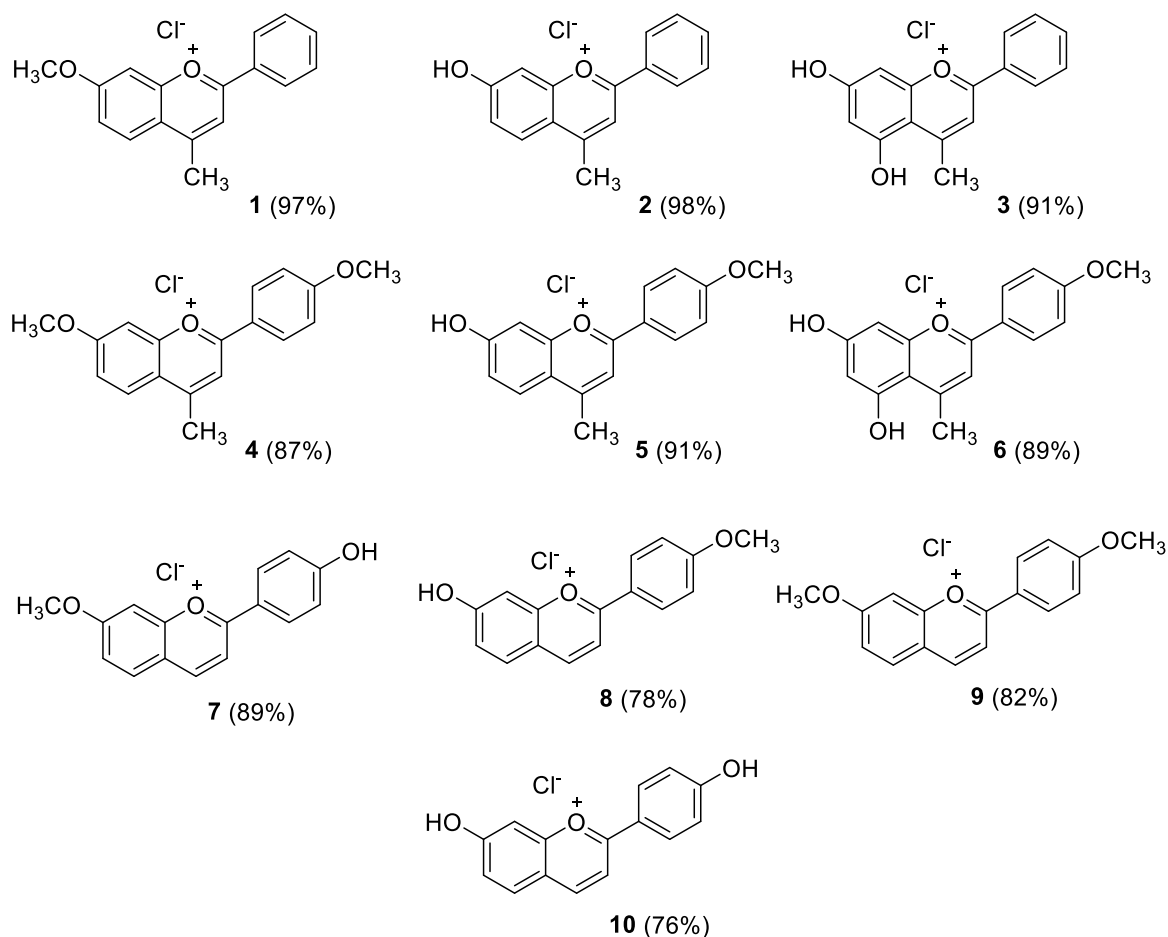
Cada um dos cátions flavílio (**1-10**) foi desenhado na área de trabalho do Spartan 14 (<https://www.wavefun.com/>) sem ânion cloreto. A geometria preliminar foi obtida clicando no botão “*Minimize*”. Em seguida, as geometrias de equilíbrio foram obtidas através do cálculo

empregando método DFT com o funcional B3LYP e base 6-31G\*, empregando água como solvente. A carga total foi definida para cátion e o cálculo foi realizado a partir da geometria preliminar (ALVARENGA *et al.*, 2019).

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1. ATIVIDADE CITOTÓXICA**

Os efeitos citotóxicos dos sais de flavílio **1-10**, mostrados no **Esquema 18**, sintetizados como descrito no Capítulo 1, foram avaliados contra melanoma metastático murino - B16F10, adenocarcinoma cervical humano - HeLa, carcinoma hepatocelular humano - HepG2, e adenocarcinoma de mama humano - MDA-MB-231. Para a avaliação da atividade citotóxica em questão empregou-se o método colorimétrico do MTT, como descrito no item Materiais e Métodos.



**Esquema 18.** Sais de flavílios **1-10** avaliados com relação ao seu efeito citotóxico.

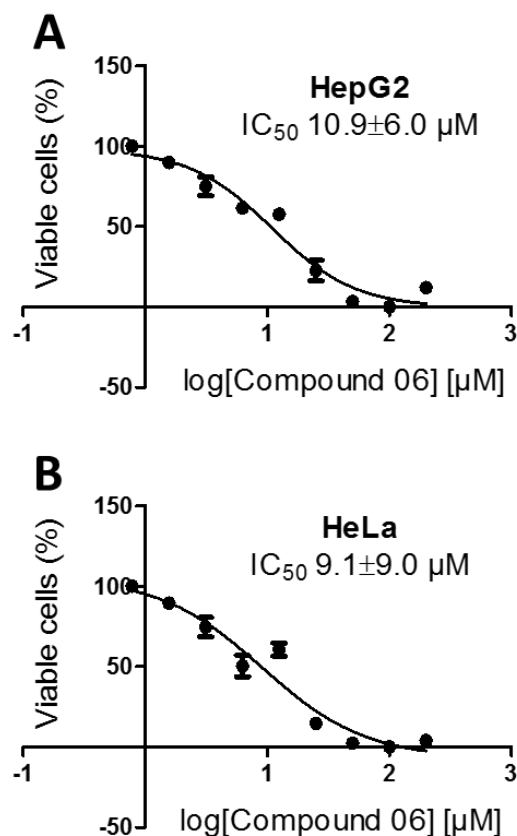
Os resultados resumidos na **Tabela 5** indicaram que alguns compostos apresentaram citotoxicidade contra as linhagens celulares tumorais testadas a 100  $\mu\text{M}$ . Após 48 horas de tratamento, os compostos **3**, **6**, **7**, **8** e **10** reduziram a viabilidade em mais de 50% de pelo menos três linhagens celulares. Além disso, o composto **6**, contendo dois grupos hidroxila no anel A e um grupo metoxila no anel B, foi o mais citotóxico contra todas as linhas celulares de câncer, mostrando 54,5% (B16F10), 20,1% (HeLa), 19,6% (HepG2) e 23,2% (MDA-MB-231) de viabilidade celular em comparação ao tratamento com controle de DMSO.

**Tabela 5.** Viabilidade de células cancerosas após 48 horas

Composto [100 $\mu$ M]	Linhagem celular (% de viabilidade celular)			
	B16F10 <sup>a</sup>	HeLa <sup>b</sup>	HepG2 <sup>c</sup>	MDA-MB-231 <sup>d</sup>
<b>01</b>	88.9 $\pm$ 6.9	90.9 $\pm$ 3.6	86.6 $\pm$ 0.8	99.3 $\pm$ 14.1
<b>02</b>	97.1 $\pm$ 7.2	95.9 $\pm$ 4.4	84.3 $\pm$ 4.7	97.4 $\pm$ 9.7
<b>03</b>	42.9 $\pm$ 0.5	24.5 $\pm$ 0.7	27.1 $\pm$ 1.5	53.8 $\pm$ 16.1
<b>04</b>	84.9 $\pm$ 6.6	54.1 $\pm$ 4.1	59.0 $\pm$ 3.0	83.1 $\pm$ 16.5
<b>05</b>	80.8 $\pm$ 3.8	48.8 $\pm$ 7.2	69.3 $\pm$ 8.7	49.9 $\pm$ 13.2
<b>06</b>	54.5 $\pm$ 3.6	20.1 $\pm$ 0.4	19.6 $\pm$ 0.8	23.2 $\pm$ 1.2
<b>07</b>	76.7 $\pm$ 5.9	30.9 $\pm$ 1.6	34.7 $\pm$ 1.7	23.5 $\pm$ 1.7
<b>08</b>	81.2 $\pm$ 7.6	56.7 $\pm$ 2.9	40.2 $\pm$ 6.2	44.0 $\pm$ 9.1
<b>09</b>	107.3 $\pm$ 17.8	67.4 $\pm$ 5.1	67.8 $\pm$ 0.9	58.3 $\pm$ 10.8
<b>10</b>	30.8 $\pm$ 3.6	60.1 $\pm$ 2.2	65.0 $\pm$ 0.7	38.4 $\pm$ 3.9

<sup>a</sup>B16F10: melanoma metastático murino; <sup>b</sup>HeLa: adenocarcinoma cervical humano; <sup>c</sup>HepG2: carcinoma hepatocelular humano; <sup>d</sup>MDA-MB-231: adenocarcinoma de mama humano.

A partir dos resultados obtidos, escolheu-se o composto mais citotóxico **6** para a determinação da sua concentração inibitória média (IC<sub>50</sub>) para as células de HepG2 e HeLa (**Figura 16**). Os resultados mostraram que o composto **6** apresenta valores de IC<sub>50</sub> próximos a 10  $\mu$ M contra ambas as linhagens celulares avaliadas, indicando uma promissora atividade anticancerígena.



**Figura 16.** Perfil de dose-resposta de células HepG2 (A) e HeLa (B) tratadas com concentrações crescentes (0-200 μM) do composto **6** por 48 h.

### 3.2. ESTUDOS COMPUTACIONAIS

Para explorar as relações estrutura-atividade citotóxica (SAR) dos derivados sintéticos de antocianidinas (**1-10**), os cálculos quânticos foram realizados com otimização de geometria empregando Spartan 14 (<https://www.wavefun.com/>). Empregou-se teoria do funcional da densidade (DFT) no nível de teoria B3LYP/6-31G\* e a água foi selecionada como solvente.

As propriedades calculadas para todos os sais de flavílio foram listadas na **Tabela 6**. Poucas correlações foram observadas entre as propriedades moleculares dos cátions flavílio (**1-10**) e suas atividades citotóxicas. No entanto, deve-se destacar que o composto mais citotóxico (**6**) possui o maior momento de dipolo e a maior área de superfície polar (PSA) dentre os compostos avaliados. Esses parâmetros, PSA (ERTL; ROHDE; SELZER, 2000) e momento de dipolo

(LIEN *et al.*, 1982), estão relacionados ao transporte molecular e permeabilidade celular, sugerindo que o composto **6** é o que apresenta maior permeabilidade celular e, portanto, maiores biodisponibilidade e atividade.

**Tabela 6.** Propriedades moleculares calculadas para todos os derivados avaliados de antocianidinas.<sup>a</sup>

Compd.	MM (g/mol)	<i>E</i> (kJ/mol)	<i>E</i> <sub>HOMO</sub> (kJ/mol)	<i>E</i> <sub>LUMO</sub> (kJ/mol)	$\Delta E_{\text{HOMO-LUMO}}$ (kJ/mol)	Dipolo (Db)	Área (Å <sup>2</sup> )	Volume (Å <sup>3</sup> )	PSA (Å <sup>2</sup> )	Ovalidade	Polarizabilidade	HBD	HBA
<b>1</b>	251.305	-2119148.64	-634.49	-296.79	-337.70	2.08	284.78	272.35	12.17	1.40	62.64	0	2
<b>2</b>	237.287	-2015959.60	-636.94	-298.62	-338.32	1.88	263.71	252.3	24.923	1.37	61.01	1	2
<b>3</b>	253.28	-2213436.59	-630.71	-298.90	-331.81	2.64	268.95	258.55	40.818	1.37	61.53	2	3
<b>4</b>	281.331	-2419844.25	-599.94	-286.45	-313.49	3.46	314.46	299.51	19.182	1.45	64.9	0	3
<b>5</b>	267.304	-2316655.36	-602.06	-287.65	-314.41	3.39	292.65	279.53	31.95	1.42	63.28	1	3
<b>6</b>	283.303	-2514132.40	-603.69	-288.05	-315.64	3.77	298.88	285.77	47.878	1.42	63.78	2	4
<b>7</b>	253.28	-2213420.01	-602.46	-291.62	-310.84	3.55	275.52	261.62	31.935	1.39	61.83	1	3
<b>8</b>	253.28	-2213418.14	-601.92	-292.75	-309.17	3.46	275.54	261.64	31.929	1.39	61.84	1	3
<b>9</b>	267.304	-2316606.97	-599.85	-291.67	-308.18	3.43	296.39	281.65	19.119	1.43	63.47	0	3
<b>10</b>	239.25	-2110231.10	-604.68	-292.69	-311.99	3.14	254.67	241.62	44.748	1.36	60.21	2	3

<sup>a</sup>MM = Massa molecular; *E* = Energia total; *E*<sub>HOMO</sub> = Energia do Orbital Molecular Ocupado de Mais Alta Energia; *E*<sub>LUMO</sub> = Energia do Orbital Molecular Desocupado de Mais Baixa Energia;  $\Delta E_{\text{HOMO-LUMO}}$  = Diferença de energia entre HOMO e LUMO; PSA = Área de superfície polar; HBD = Número de doadores de ligação de hidrogênio; HBA = Número de aceptores de ligação de hidrogênio.

As atividades antitumorais das antocianinas e antocianidinas têm sido relacionadas à sua capacidade de induzir a apoptose das células tumorais. (BUNEA *et al.*, 2013; FENG *et al.*, 2007; HAKIMUDDIN; PALIYATH; MECKLING, 2004; KATSUBE *et al.*, 2003; KONG *et al.*, 2003; SEERAM *et al.*, 2006; SHIH; YEH; YEN, 2005; SRIVASTAVA *et al.*, 2007; VEERIAH *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2017; WEIGUANG YI *et al.*, 2005; YEH; YEN, 2005; ZHANG; VAREED; NAIR, 2005) No entanto, o mecanismo e as vias de sinalização iniciadas por esses compostos na morte celular não são bem compreendidos. Um estudo anterior empregando cianidina-3-rutinosídeo mostrou que sua atividade citotóxica contra células leucêmicas era devida à indução de estresse oxidativo (FENG *et al.*, 2007). Assim, procurou-se relacionar as atividades observadas neste trabalho com as energias calculadas do Orbital Molecular Ocupado de Mais Alta Energia (HOMO, do inglês Highest Occupied Molecular Orbital) e do orbital molecular desocupado de mais baixa energia (LUMO, do inglês Lowest Unoccupied Molecular Orbital). Esta tentativa de correlação baseou-se no conhecimento da relação direta entre o potencial de ionização e as energias de HOMO e entre a afinidade eletrônica e as energias de LUMO (GUHA; WILLIGHAGEN, 2012; SULLIVAN; JONES; TANJI, 2000). Sendo assim, quanto mais alta a energia de HOMO menor é o potencial de ionização da molécula, sendo mais fácil a doação de elétrons, e, quanto mais baixo o nível energético de LUMO, maior é a sua afinidade eletrônica, sendo mais fácil a recepção de elétrons. Contudo, ao avaliar os resultados não foi possível correlacionar os dados de citotoxicidade e com as energias de HOMO ou LUMO.

#### 4. CONCLUSÕES

Nesta etapa do trabalho, dez derivados sintéticos de antocianidinas (**1-10**) foram avaliados com relação à sua potencial atividade citotóxica empregando quatro linhagens celulares tumorais.

Após 48 horas de tratamento, os compostos **3**, **6**, **7**, **8** e **10** reduziram a viabilidade em mais de 50% de pelo menos três linhagens celulares. No entanto, o sal de flavílio **6** aparenta ser o composto mais promissor, apresentando IC<sub>50</sub> para as células de HepG2 e HeLa de 10,9±6.0 µM e 9,1±9,0 µM, respectivamente.

Foram realizados cálculos das propriedades moleculares dos compostos. No entanto, apesar de terem sido encontradas poucas correlações entre as propriedades calculadas e a atividade citotóxica experimental, foi observado que o composto **6** possui maior momento de dipolo e a maior área de superfície polar (PSA), indicando que **6** deve apresentar uma maior permeabilidade celular.

## CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho foram sintetizados um total de 14 sais de flavílio (**1-14**), derivados não glicosilados das antocianidinas naturais, e dois sais de piranoflavílio (**15-16**).

Dentre os sais de flavílio obtidos sinteticamente, 6 compostos possuem um substituinte metil na posição C4 (**1-6**), sendo produzidos pela condensação entre fenóis e benzoilacetonas, e 8 compostos não possuem substituintes em C4 (**7-14**), sendo formados pela reação entre 2-hidroxibenzaldeídos e acetofenonas.

Os dez primeiros sais de flavílio (**1-10**) obtidos nesse trabalho foram submetidos a ensaios de avaliação citotóxica frente a quatro linhagens tumorais e os resultados indicaram que os compostos **3, 6, 7, 8 e 10** são capazes de reduzir a viabilidade celular de forma significativa. Dentre os compostos avaliados, o flavílio **6** mostrou-se o mais citotóxico. Tentativas de correlação da atividade como as propriedades moleculares indicaram que a maior atividade observada para **6** pode estar relacionada com uma maior permeabilidade celular.

Os sais de flavílio e piranoflavílio preparados nesse trabalho estão sendo submetidos a estudos de caracterização fotoquímica em colaboração com o grupo de Prof. Frank Herbert Quina do Instituto de Química da USP.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(IARC), I. A. FOR R. ON C.; (OMS), W. H. O. GLOBOCAN 2018: Latest global cancer data. Press release No 263. n. September, p. 13–15, 2018.

AL-OBAIDI, O. H. Synthesis , Characterization , Theoretical And Antimicrobial Evaluation Of New Co ( Ii ) , Ni ( Ii ) And Cu ( Ii ) Complexes Of Flavylum Salt. **International Research Journal of Applied and Basic Sciences**, v. 8, n. 1, p. 88–92, 2014.

AL BITTAR, S.; MORA, N.; LOONIS, M.; DANGLES, O. Chemically Synthesized Glycosides of Hydroxylated Flavylum Ions as Suitable Models of Anthocyanins: Binding to Iron Ions and Human Serum Albumin, Antioxidant Activity in Model Gastric Conditions. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 20709–20730, dez. 2014.

AL BITTAR, S.; MORA, N.; LOONIS, M.; DANGLES, O. A simple synthesis of 3-deoxyanthocyanidins and their O-glucosides. **Tetrahedron**, v. 72, n. 29, p. 4294–4302, 2016.

ALVARENGA, E. S.; CARNEIRO, V. M. T.; SILVA, S. A.; SIQUEIRA, R. P.; BRESSAN, G. C. Synthesis of novel amides, characterization by spectrometric methods, cytotoxic activity and theoretical calculations. **Journal of Molecular Structure**, v. 1191, p. 6–16, set. 2019.

BARCENA, H. S.; CHEN, P.; TUACHI, A. Synthetic anthocyanidins and their antioxidant properties. **SpringerPlus**, v. 4, n. 1, p. 4–8, 2015.

BRIDLE, P.; TIMBERLAKE, C. F. Anthocyanins as natural food colours - Selected aspects. **Food Chemistry**, v. 58, n. 1–2, p. 103–109, 1997.

BROUILLARD, R. Chemical Structure of Anthocyanins. In: **Anthocyanins As Food Colors**. [s.l.] Elsevier, 1982. p. 1–40.

BUNEA, A.; RUGINĂ, D.; SCONȚA, Z.; POP, R. M.; PINTEA, A.; SOCACIU, C.; TĂBĂRAN, F.; GROOTAERT, C.; STRUIJS, K.; VANCAMP, J. Anthocyanin determination in blueberry extracts from various cultivars and their antiproliferative and apoptotic properties in B16-F10 metastatic murine melanoma cells. **Phytochemistry**, v. 95, p. 436–444, 2013.

CASTAÑEDA-OVANDO, A.; PACHECO-HERNÁNDEZ, M. DE L.; PÁEZ-HERNÁNDEZ, M. E.; RODRÍGUEZ, J. A.; GALÁN-VIDAL, C. A. Chemical studies of anthocyanins: A review. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 859–871, abr. 2009.

CHASSAING, S.; ISOREZ-MAHLER, G.; KUENY-STOTZ, M.; BROUILLARD, R. Aged red wine pigments as a source of inspiration for organic synthesis - The cases of the color-stable pyranoflavylum and flavylum-(4→8)-flavan chromophores. **Tetrahedron**, v. 71, n. 20, p. 3066–3078, maio 2015.

CHEN, H.; XU, Y.; ZHANG, Y.; ZHENG, Z. A new approach to synthesize of 4-phenacylidene flavene derivatives and to evaluate their cytotoxic effects on hepg2 cell line. **Molecules**, v. 22, n. 8, 2017.

CHEN, J. R.; WONG, J. B.; KUO, P. Y.; YANG, D. Y. Synthesis and characterization of coumarin-based spiropyran photochromic colorants. **Organic Letters**, v. 10, n. 21, p. 4823–4826, 2008.

DA SILVA, C. P.; PIOLI, R. M.; LIU, L.; ZHENG, S.; ZHANG, M.; SILVA, G. T. DE M.; CARNEIRO, V. M. T.; QUINA, F. H. Improved Synthesis of Analogues of Red Wine Pyranoanthocyanin Pigments. **ACS Omega**, v. 3, n. 1, p. 954–960, 31 jan. 2018.

DAVIES, K. M.; SCHWINN, K. E.; GOULD, K. S. Anthocyanins. In: **Encyclopedia of Applied Plant Sciences**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 355–363.

DEKIĆ, M.; KOLAŠINAC, R.; RADULOVIĆ, N.; ŠMIT, B.; AMIĆ, D.; MOLČANOV, K.; MILENKOVIĆ, D.; MARKOVIĆ, Z. Synthesis and theoretical investigation of some new 4-substituted flavylum salts. **Food Chemistry**, v. 229, p. 688–694, 2017.

DELGADO, V.; LOPEZ, P.; JIMÉNEZ, A. R. Natural Pigments : Carotenoids , Anthocyanins , and Natural Pigments : Carotenoids , Anthocyanins , and Betalains — Characteristics , Biosynthesis , Processing , and Stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, n. 3, p. 37–41, 2012.

ERTL, P.; ROHDE, B.; SELZER, P. Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 20, p. 3714–3717, 2000.

FENG, R.; NI, H. M.; WANG, S. Y.; TOURKOVA, I. L.; SHURIN, M. R.; HARADA, H.; YIN, X. M. Cyanidin-3-rutinoside, a natural polyphenol antioxidant, selectively kills leukemic cells by induction of oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 18, p. 13468–13476, 2007.

FERNANDES, A. C.; ROMÃO, C. C.; ROSA, C. P.; VIEIRA, V. P.; LOPES, A.; SILVA, P. F.; MAÇANITA, A. L. One-step synthesis of novel flavylum salts containing alkyl side chains in their 3-, 4', 5- or 6-positions and their photophysical properties in micellar media. **European Journal of Organic Chemistry**, n. 23, p. 4877–4883, 2004.

FREITAS, A. A.; PAULO, L.; MAÇANITA, A. L.; QUINA, F. H. Acid-base equilibria and dynamics in sodium dodecyl sulfate micelles: Geminate recombination and effect of charge stabilization. **Langmuir**, 2006.

GLOVER, B. J.; MARTIN, C. Anthocyanins. **Current biology : CB**, v. 22, n. 5, p. R147-50, 6 mar. 2012.

GUHA, R.; WILLIGHAGEN, E. A Survey of Quantitative Descriptions of Molecular Structure. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 18, p. 1946–1956, 2012.

HAKIMUDDIN, F.; PALIYATH, G.; MECKLING, K. Selective cytotoxicity of a red grape wine flavonoid fraction against MCF-7 cells. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 85, n. 1, p. 65–79, 2004.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 481–504, 1 nov. 2000.

HARI, R. V. K.; PATEL, T. R.; MARTIN, A. M. An overview of pigment production in biological systems: Functions, biosynthesis, and applications in food industry. **Food Reviews**

**International**, v. 10, n. 1, p. 49–70, 1994.

HE, J.; GIUSTI, M. M. Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties.

**Annual Review of Food Science and Technology**, v. 1, n. 1, p. 163–187, abr. 2010.

ITO, F.; TANAKA, N.; KATSUKI, A.; KAKEHI, A.; FUJII, T. Synthesis and characterization of flavylum salts having three types color depending on recrystallization conditions. **Research on Chemical Intermediates**, v. 30, n. 3, p. 331–336, abr. 2004.

JACKMAN, R. L.; YADA, R. Y.; TUNG, M. A.; SPEERS, R. A. ANTHOCYANINS AS FOOD COLORANTS —A REVIEW. **Journal of Food Biochemistry**, 1987.

KATSUBE, N.; IWASHITA, K.; TSUSHIDA, T.; YAMAKI, K.; KOBORI, M. Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 1, p. 68–75, 2003.

KONG, J. M.; CHIA, L. S.; GOH, N. K.; CHIA, T. F.; BROUILLARD, R. **Analysis and biological activities of anthocyanins** **Phytochemistry**, 2003.

KUENY-STOTZ, M.; ISOREZ, G.; CHASSAING, S.; BROUILLARD, R. Straightforward Synthesis of Highly Hydroxylated Phloroglucinol-Type 3-Deoxyanthocyanidins. **Synlett**, v. 2007, n. 08, p. 1223–1226, abr. 2007.

KUENY-STOTZ, M.; CHASSAING, S.; BROUILLARD, R.; NIELSEN, M.; GOELDNER, M. Flavylium salts as in vitro precursors of potent ligands to brain GABA-A receptors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 17, p. 4864–4867, set. 2008.

LIEN, E. J.; GUO, Z.-R.; LI, R.-L.; SU, C.-T. Use of Dipole Moment as a Parameter in Drug–Receptor Interaction and Quantitative Structure–Activity Relationship Studies. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 71, n. 6, p. 641–655, 1 jun. 1982.

LIMA, J. C.; ABREU, I.; BROUILLARD, R.; MAÇANITA, A. L. Kinetics of ultra-fast excited state proton transfer from 7-hydroxy-4-methylflavylium chloride to water. **Chemical Physics Letters**, v. 298, n. 1–3, p. 189–195, 1998.

MASSARI, S.; DESANTIS, J.; NANNETTI, G.; SABATINI, S.; TORTORELLA, S.; GORACCI, L.; CECCHETTI, V.; LOREGIAN, A.; TABARRINI, O. Efficient and regioselective one-step synthesis of 7-aryl-5-methyl- and 5-aryl-7-methyl-2-amino-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidine derivatives. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 15, n. 37, p. 7944–7955, 2017.

MOGHADDAM, F.; FOROUSHANI, B.; GHONOUEI, N.; KALAHROODI, E. Microwave Assisted Preparation of Flavylium Salts with Perchloric Acid Impregnated on Silica Gel Under Solvent-free Conditions. **Letters in Organic Chemistry**, v. 11, n. 10, p. 713–718, 2014.

MORA-SOUMILLE, N.; AL BITTAR, S.; ROSA, M.; DANGLES, O. Analogs of anthocyanins with a 3',4'-dihydroxy substitution: Synthesis and investigation of their acid-base, hydration, metal binding and hydrogen-donating properties in aqueous solution. **Dyes and Pigments**, v. 96, n. 1, p. 7–15, 2013.

PAULO, L.; FREITAS, A. A.; DA SILVA, P. F.; SHIMIZU, K.; QUINA, F. H.; MAÇANITA, A. L. Novel ground- and excited-state prototropic reactivity of a hydroxycarboxyflavylium salt. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 110, n. 6, p. 2089–2096, 2006.

QUINA, F. H.; FREITAS, A. A.; MAÇANITA, A. L.; FERREIRA, P.; LIMA, J. C. the ( photo ) chemistry of anthocyanins. **The Spectrum**, v. 19, n. 3, 2006.

QUINA, F. H.; MOREIRA, P. F.; VAUTIER-GIONGO, C.; RETTORI, D.; RODRIGUES, R. F.; FREITAS, A. A.; SILVA, P. F.; MAÇANITA, A. L. Photochemistry of anthocyanins and their biological role in plant tissues. **Pure and Applied Chemistry**, v. 81, n. 9, p. 1687–1694, 19 ago. 2009.

RAMIREZ-TORTOSA, C.; ANDERSEN, Ø. M.; GARDNER, P. T.; MORRICE, P. C.; WOOD, S. G.; DUTHIE, S. J.; COLLINS, A. R.; DUTHIE, G. G. Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E-depleted rats. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 9, p. 1033–1037, 2001.

SADA, M.; MATSUBARA, S. A Tandem Reaction Initiated by 1,4-Addition of Bis(iodozincio)methane for 1,3-Diketone Formation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 2, p. 432–433, jan. 2010.

SANTOS, H.; TURNER, D. L.; LIMA, J. C.; FIGUEIREDO, P.; PINA, F. S.; MAÇANITA, A. L. Elucidation of the multiple equilibria of malvin in aqueous solution by One- and two-dimensional NMR. **Phytochemistry**, v. 33, n. 5, p. 1227–1232, 1993.

SEERAM, N. P.; ADAMS, L. S.; ZHANG, Y.; LEE, R.; SAND, D.; SCHEULLER, H. S.; HEBER, D. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 25, p. 9329–9339, 2006.

SHIH, P.-H.; YEH, C.-T.; YEN, G.-C. Effects of anthocyanidin on the inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human gastric adenocarcinoma cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 10, p. 1557–1566, 1 out. 2005.

SILVA, C. P.; SILVA, G. T. M.; COSTA, T. DE S.; CARNEIRO, V. M. T.; SIDDIQUE, F.; AQUINO, A. J. A.; FREITAS, A. A.; CLARK, J. A.; ESPINOZA, E. M.; VULLEV, V. I.; QUINA, F. H. Chromophores inspired by the colors of fruit, flowers and wine. **Pure and Applied Chemistry**, v. 0, n. 0, 2019.

SILVA, V. O.; FREITAS, A. A.; MAÇANITA, A. L.; QUINA, F. H. Chemistry and photochemistry of natural plant pigments: the anthocyanins. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v. 29, n. 11, p. 594–599, nov. 2016.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Spectrometric identification of organic compounds 7ed 2005 - Silverstein, Webster & Kiemle.pdf. In: **Spectrometric identification of organic compounds: 7th Edition**. [s.l: s.n.].

SRIVASTAVA, A.; AKOH, C. C.; FISCHER, J.; KREWER, G. Effect of anthocyanin fractions from selected cultivars of Georgia-grown blueberries on apoptosis and phase II enzymes.

**Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 8, p. 3180–3185, 2007.

SULLIVAN, J. J.; JONES, A. D.; TANJI, K. K. QSAR treatment of electronic substituent effects using frontier orbital theory and topological parameters. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 40, n. 5, p. 1113–1127, 2000.

TIMBERLAKE, C. F.; BRIDLE, P. Distribution of Anthocyanins in Food Plants. **Anthocyanins As Food Colors**, p. 125–162, 2014.

VAUTIER-GIONGO, C.; YIHWA, C.; MOREIRA, P. F.; LIMA, J. C.; FREITAS, A. A.; ALVES, M.; QUINA, F. H.; MAÇANITA, A. L. Manipulation of the reactivity of a synthetic anthocyanin analogue in aqueous micellar media. **Langmuir**, v. 18, n. 26, p. 10109–10115, 2002.

VEERIAH, S.; KAUTENBURGER, T.; HABERMANN, N.; SAUER, J.; DIETRICH, H.; WILL, F.; POOL-ZOBEL, B. L. Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics. **Molecular Carcinogenesis**, v. 45, n. 3, p. 164–174, 2006.

WANG, E.; LIU, Y.; XU, C.; LIU, J. Antiproliferative and proapoptotic activities of anthocyanin and anthocyanidin extracts from blueberry fruits on B16-F10 melanoma cells. **Food & Nutrition Research**, v. 61, n. 1, p. 1325308, 2017.

WEIGUANG YI, †; JOAN FISCHER, ‡; GERARD KREWER, # AND; CASIMIR C. AKOH\*, †. Phenolic Compounds from Blueberries Can Inhibit Colon Cancer Cell Proliferation and Induce Apoptosis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 18, p. 7320–7329, 2005.

WERBOVETZ, K.; GEORGE, T.; RICHARD, J.; BARSZCZ, T.; CAPERS, J. Flavylum Salts as Precursors of Biologically Active Chalcones. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 5, n. 1, p. 69–73, jan. 2008.

WILLIAMS, D. B. G.; LAWTON, M. Drying of organic solvents: Quantitative evaluation of

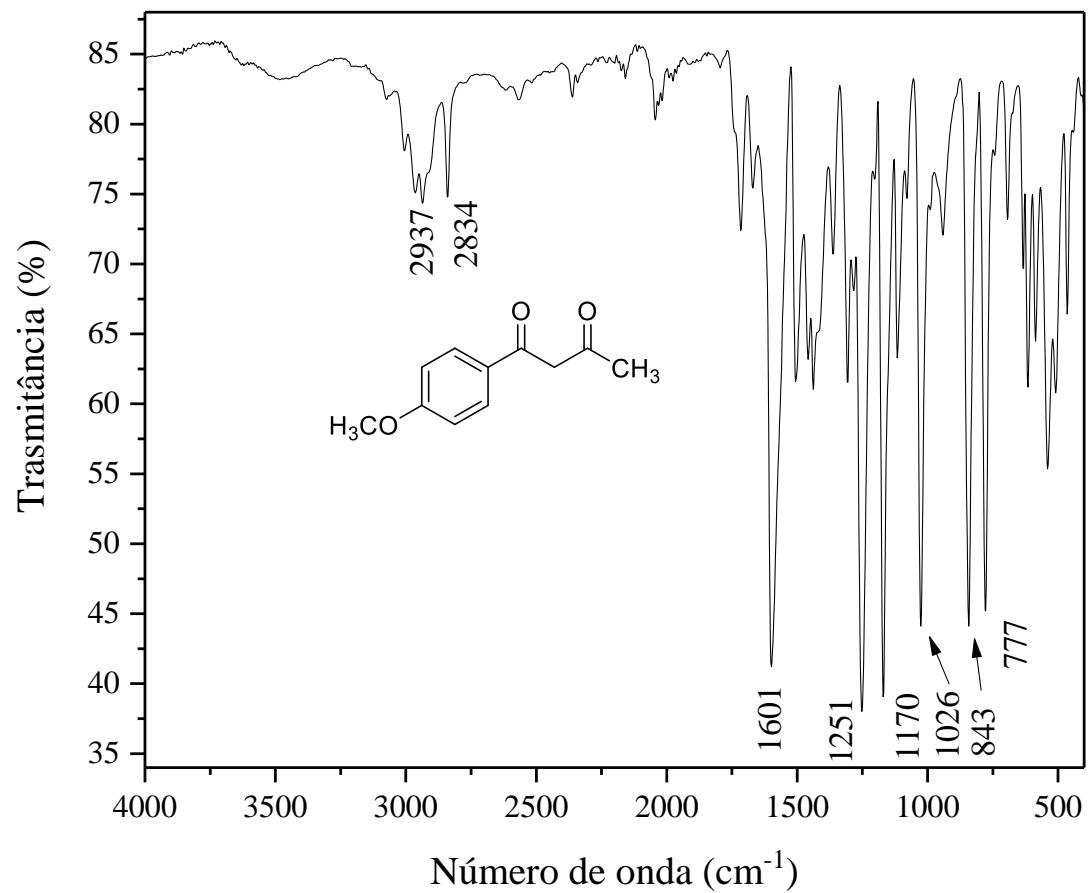
the efficiency of several desiccants. **Journal of Organic Chemistry**, 2010.

XU, Q.; QI, H.; SUN, M.; ZUO, D.; JIANG, X.; WEN, Z.; WANG, Z.; WU, Y.; ZHANG, W. Synthesis and biological evaluation of 3-alkyl-1,5-diaryl-1H-pyrazoles as rigid analogues of combretastatin A-4 with potent antiproliferative activity. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, 2015.

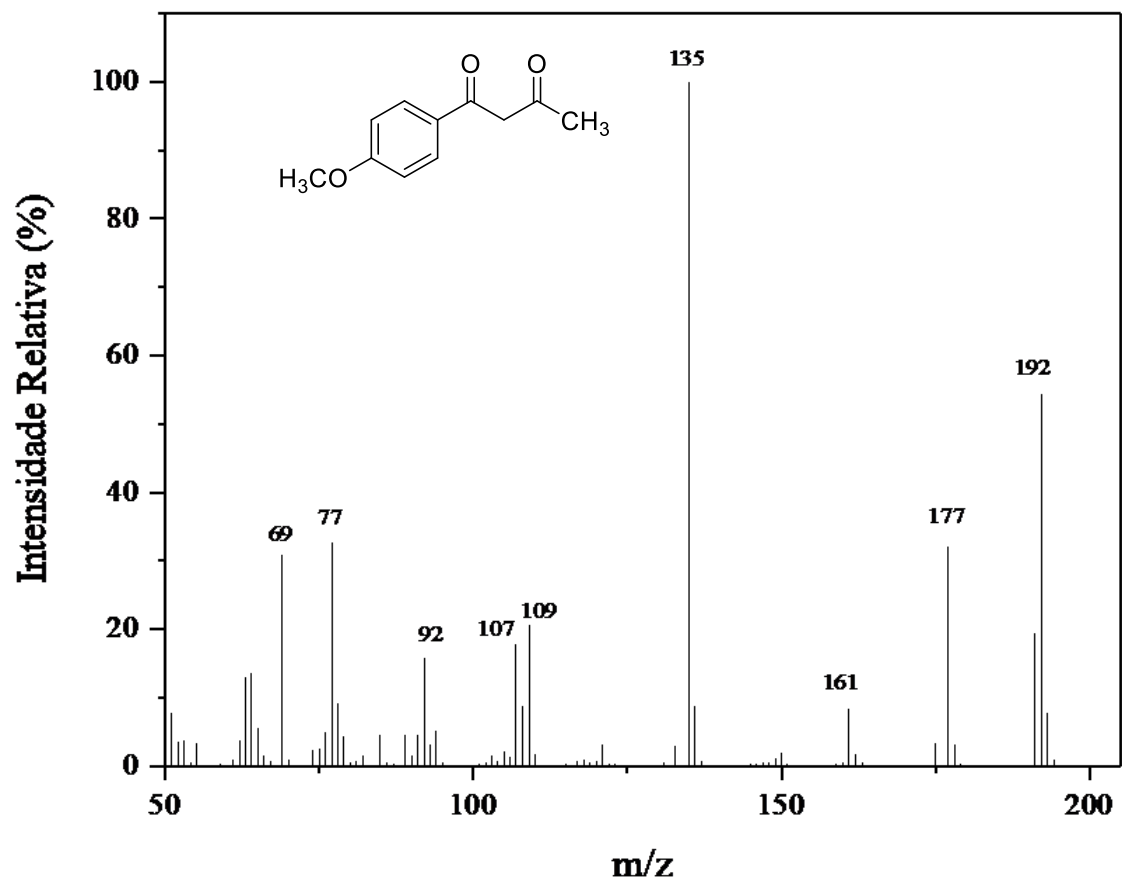
YEH, C. T.; YEN, G. C. Induction of apoptosis by the anthocyanidins through regulation of Bcl-2 gene and activation of c-Jun N-terminal kinase cascade in hepatoma cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1740–1749, 2005.

ZHANG, Y.; VAREED, S. K.; NAIR, M. G. Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables. **Life Sciences**, v. 76, n. 13, p. 1465–1472, 2005.

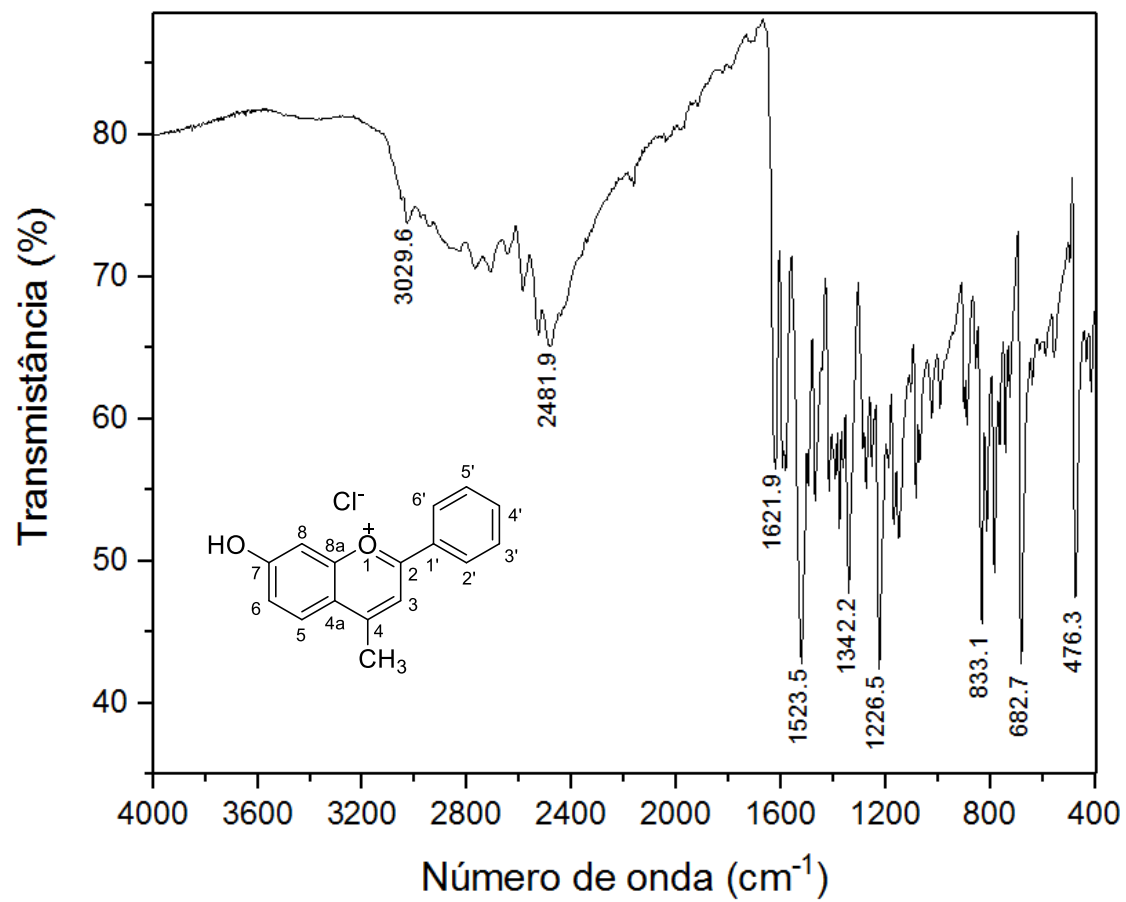
## **ANEXOS**



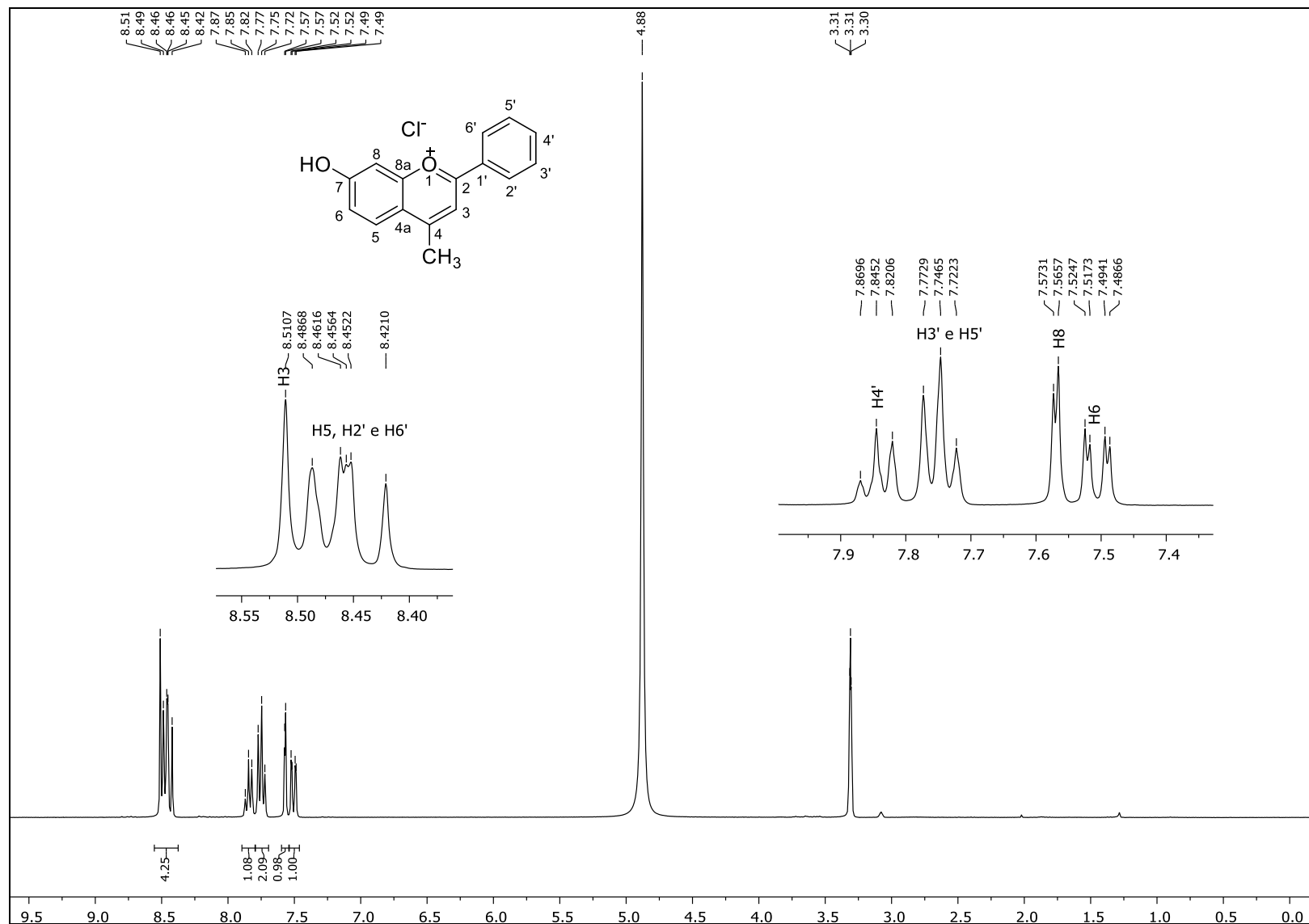
**Figura 17.** Espectro de infravermelho (IV) do composto 27.



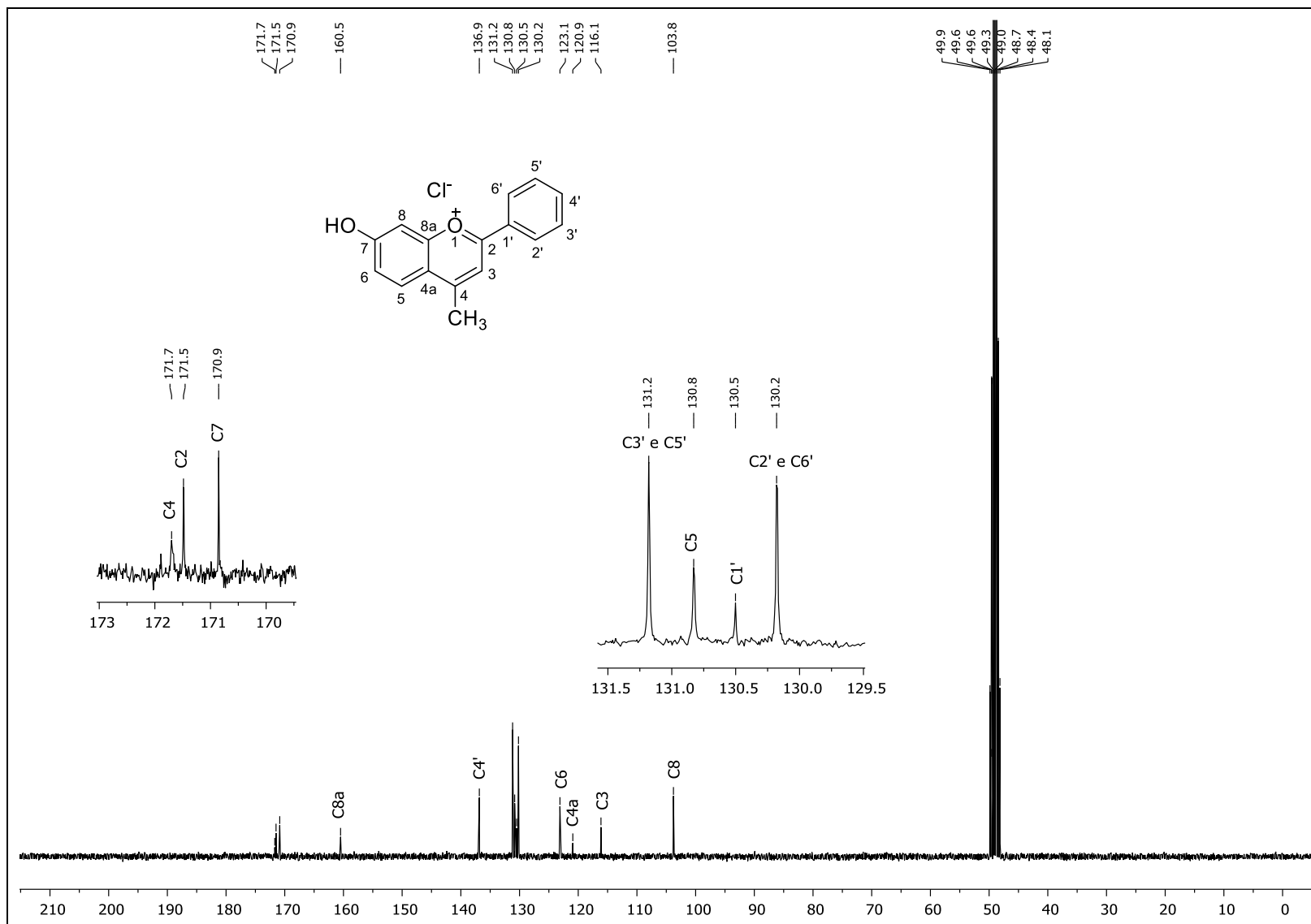
**Figura 18.** Espectro de massas do composto 27.



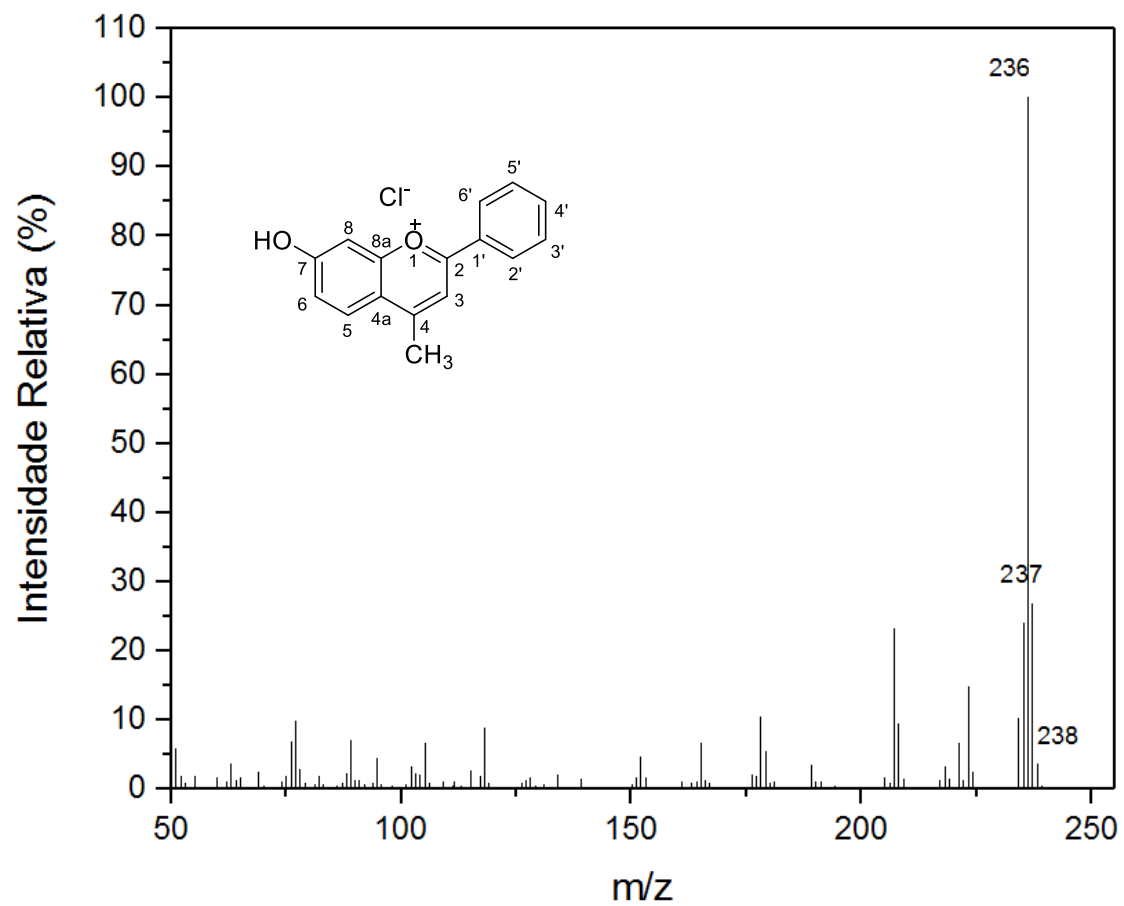
**Figura 19.** Espectro de infravermelho (IV) do flavílio 2.



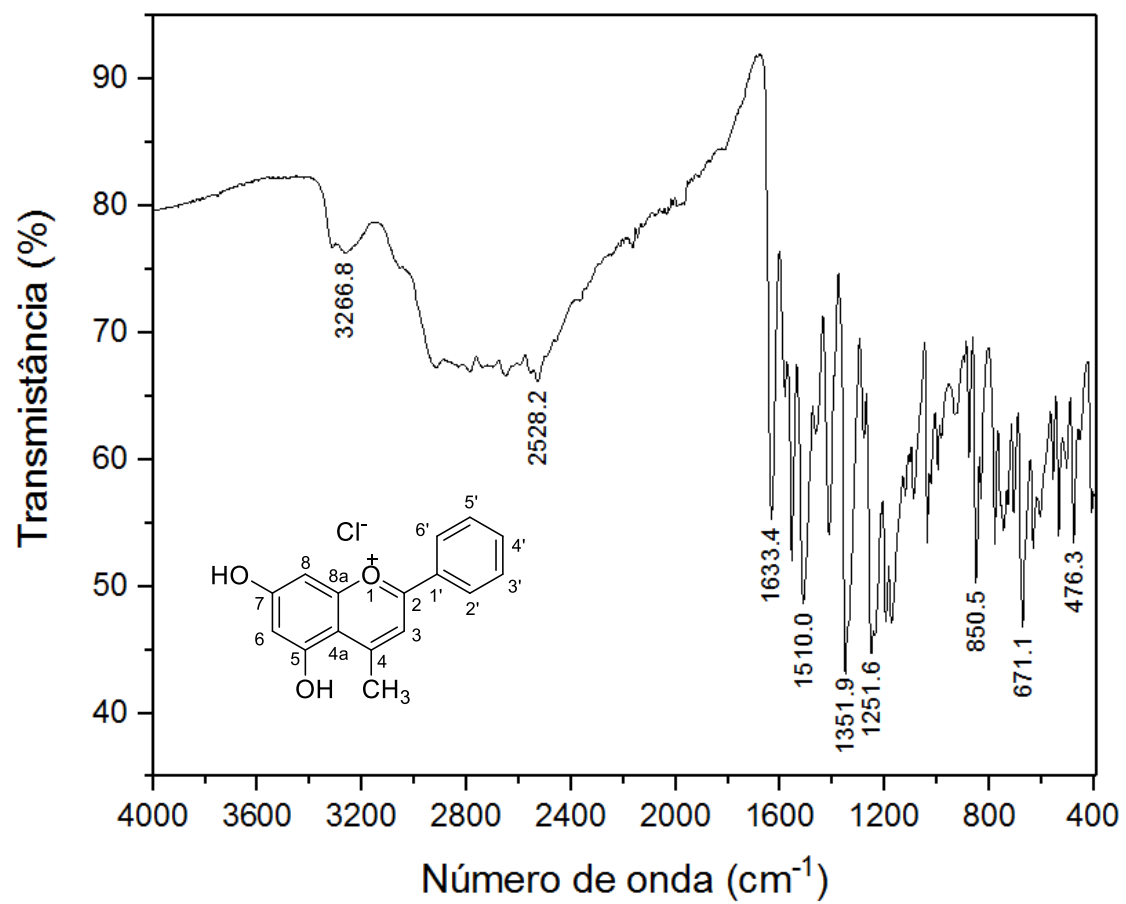
**Figura 20.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do flavílio **2** (metanol- $d_4$ , 300 MHz).



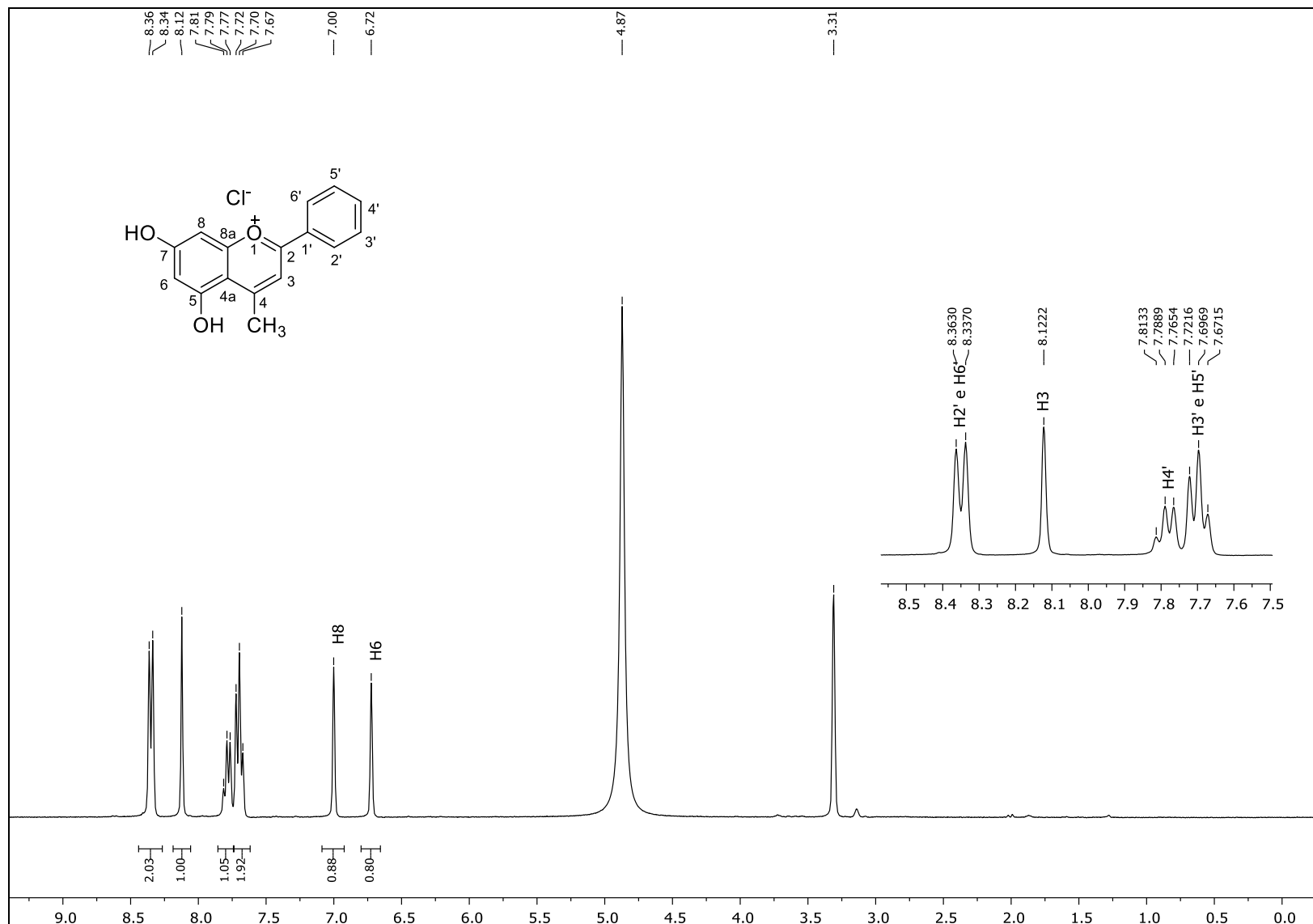
**Figura 21.** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C do flavílio 2 (metanol-*d*<sub>4</sub>, 75 MHz).



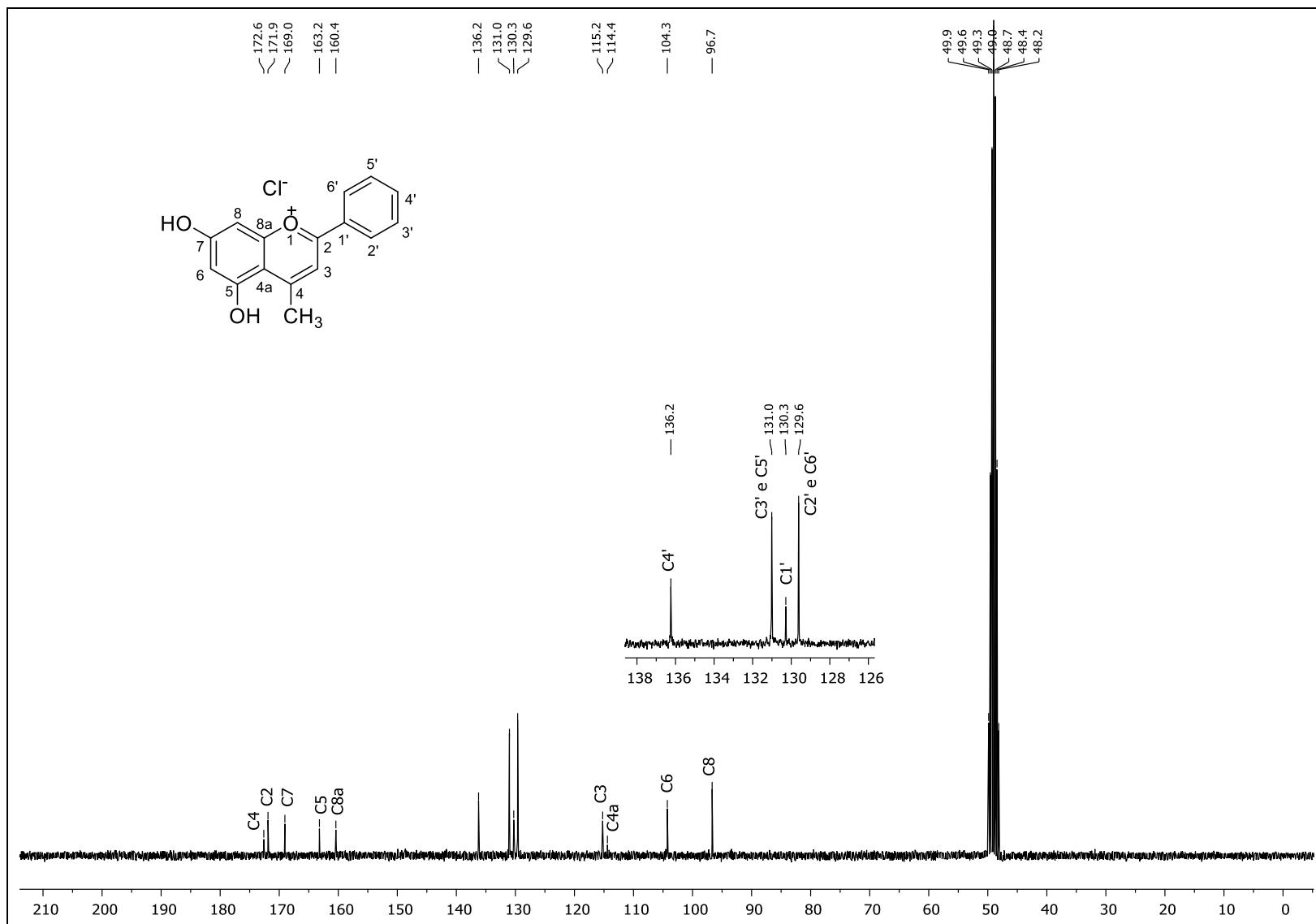
**Figura 22.** Espectro de massas do flavílio 2.



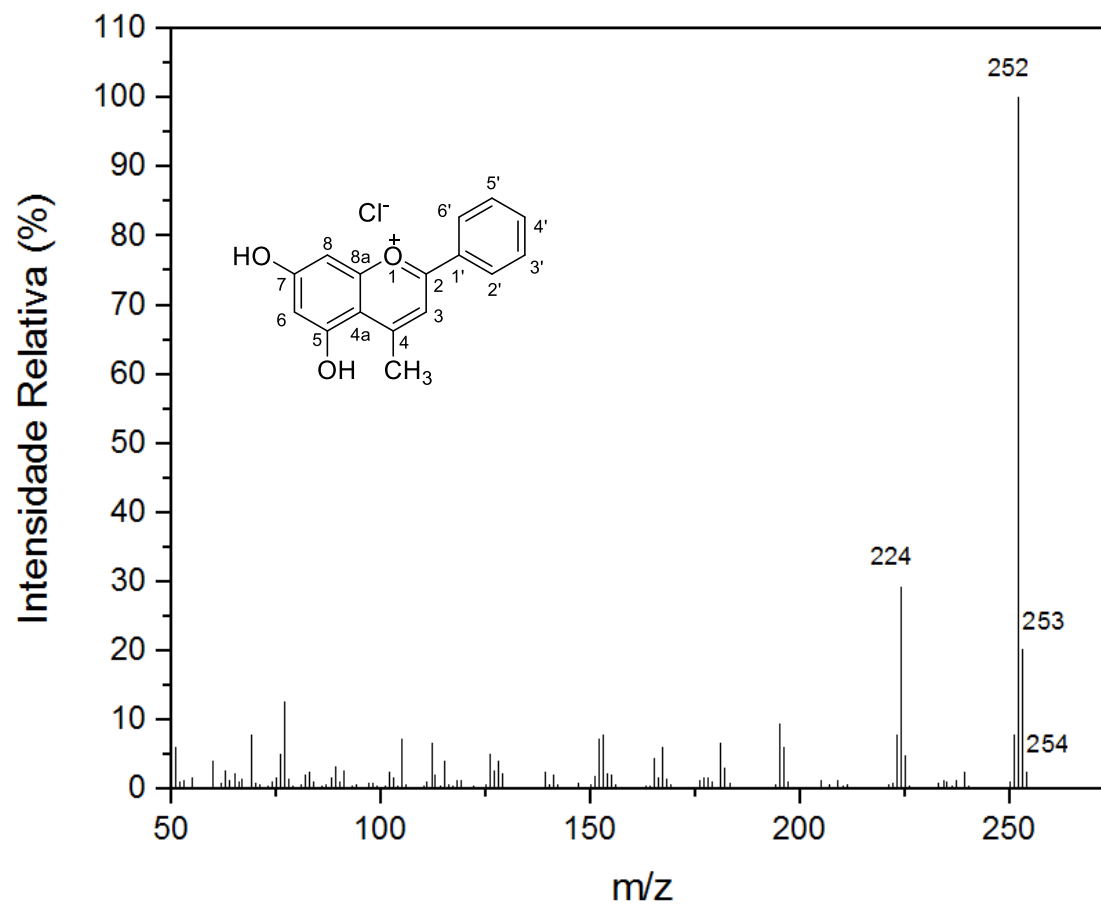
**Figura 23.** Espectro de infravermelho (IV) do flavílio 3.



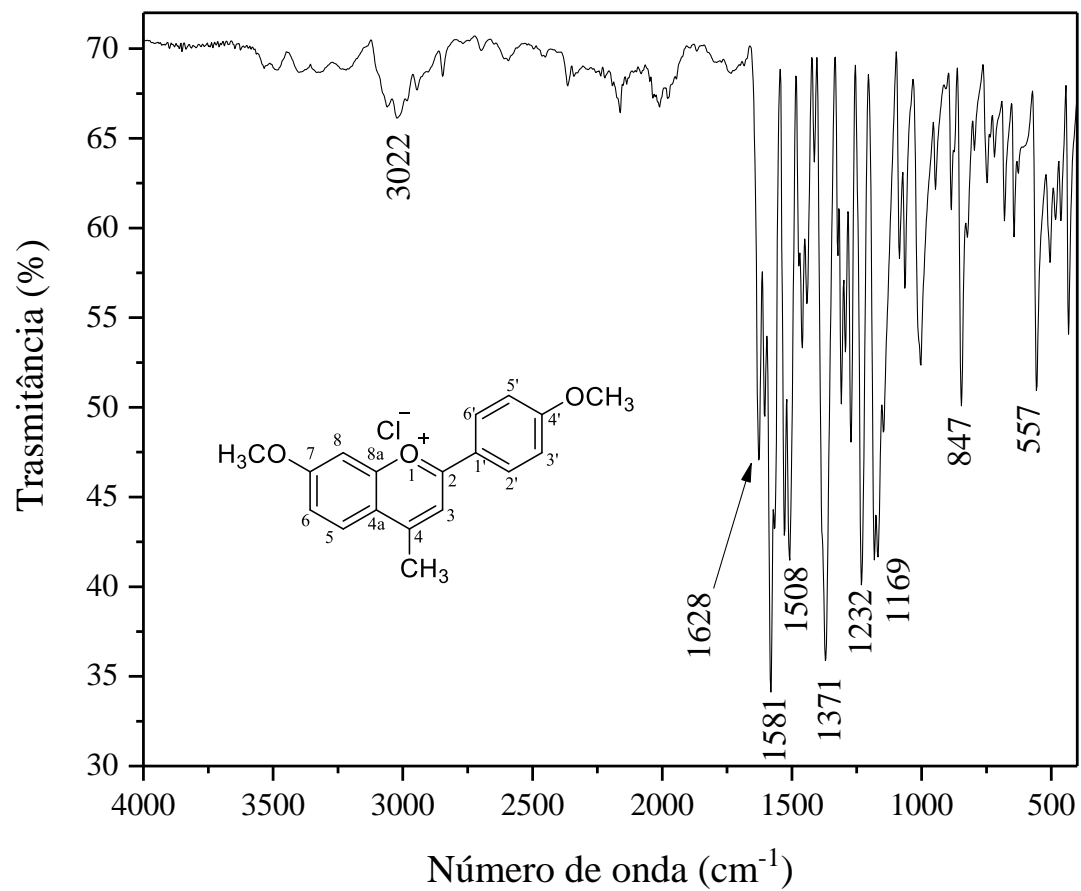
**Figura 24.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H do flavílio 3 (metanol-*d*<sub>4</sub>, 300 MHz).



**Figura 25.** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C do flavílio 3 (metanol-*d*<sub>4</sub>, 75 MHz).

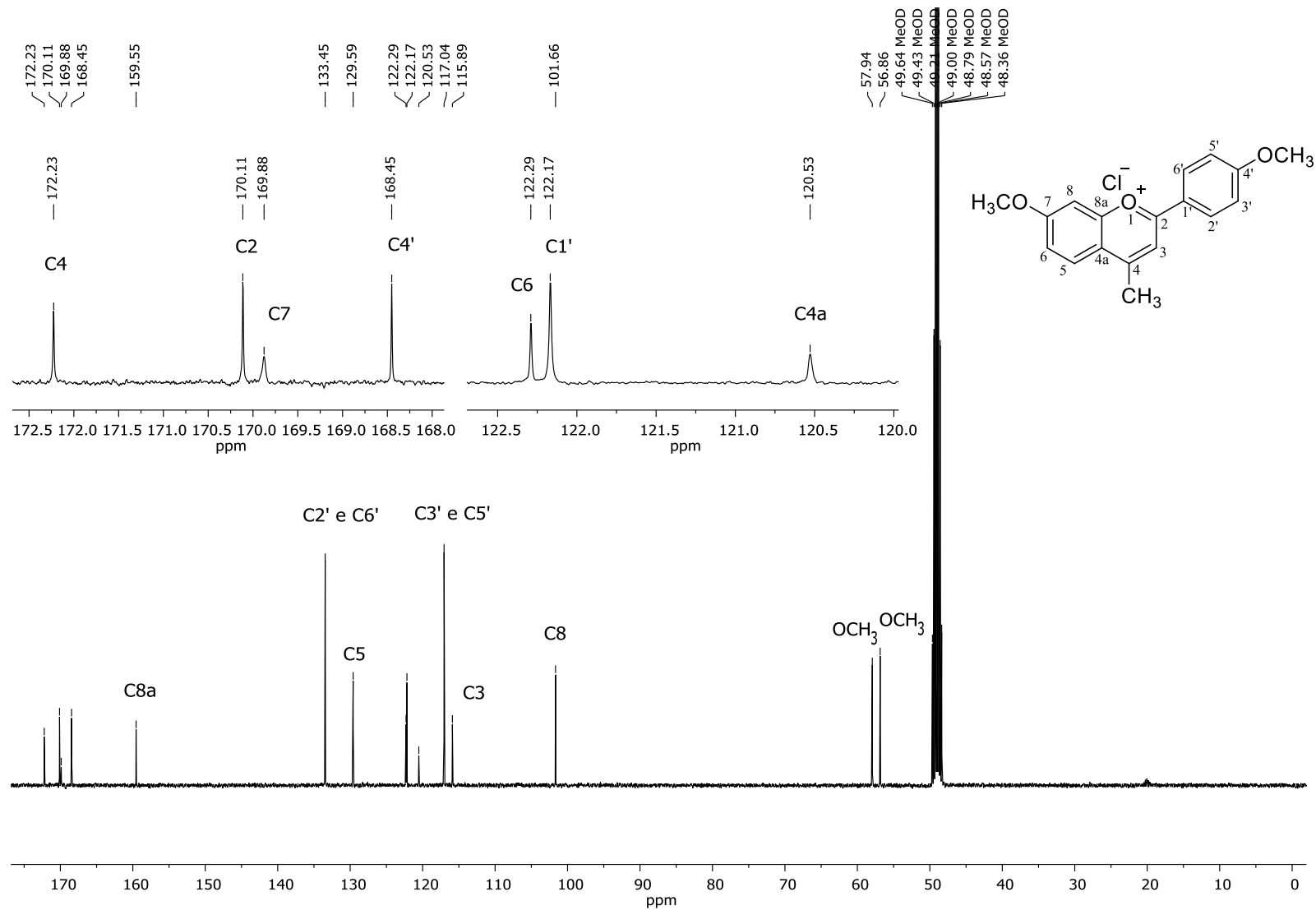


**Figura 26.** Espectro de massas do flavílio 3.

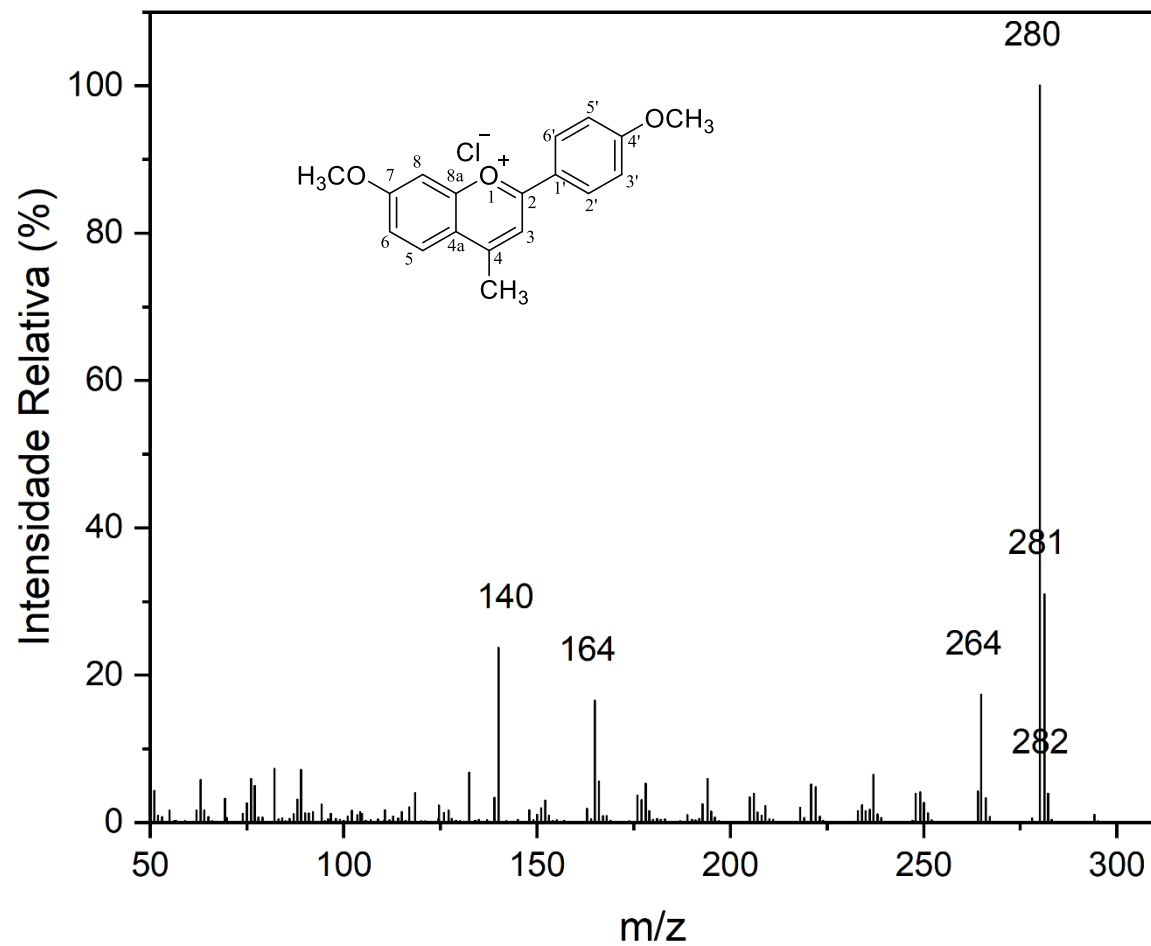


**Figura 27.** Espectro de infravermelho (IV) do flavílio 4.

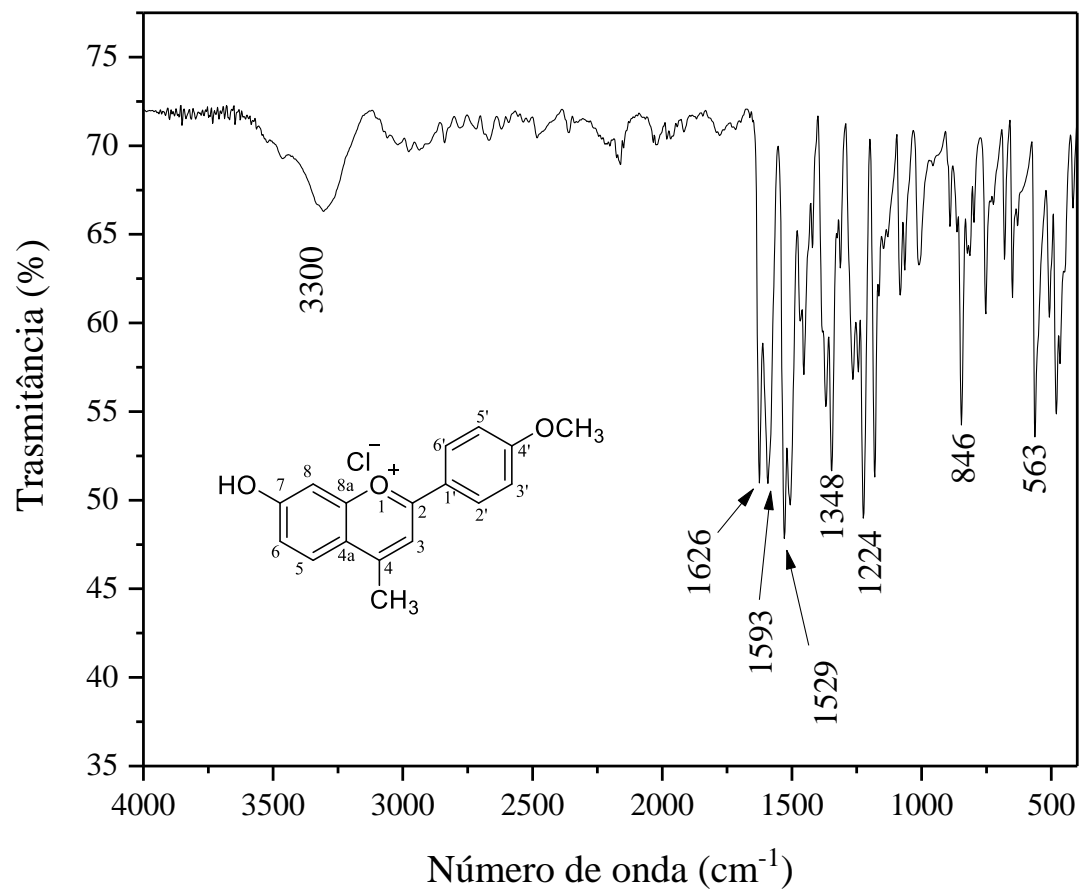




**Figura 29.** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C do flavílio 4 (metanol-*d*<sub>4</sub>, 100 MHz).



**Figura 30.** Espectro de massas do flavílio 4.



**Figura 31.** Espectro de infravermelho (IV) do flavílio 5.

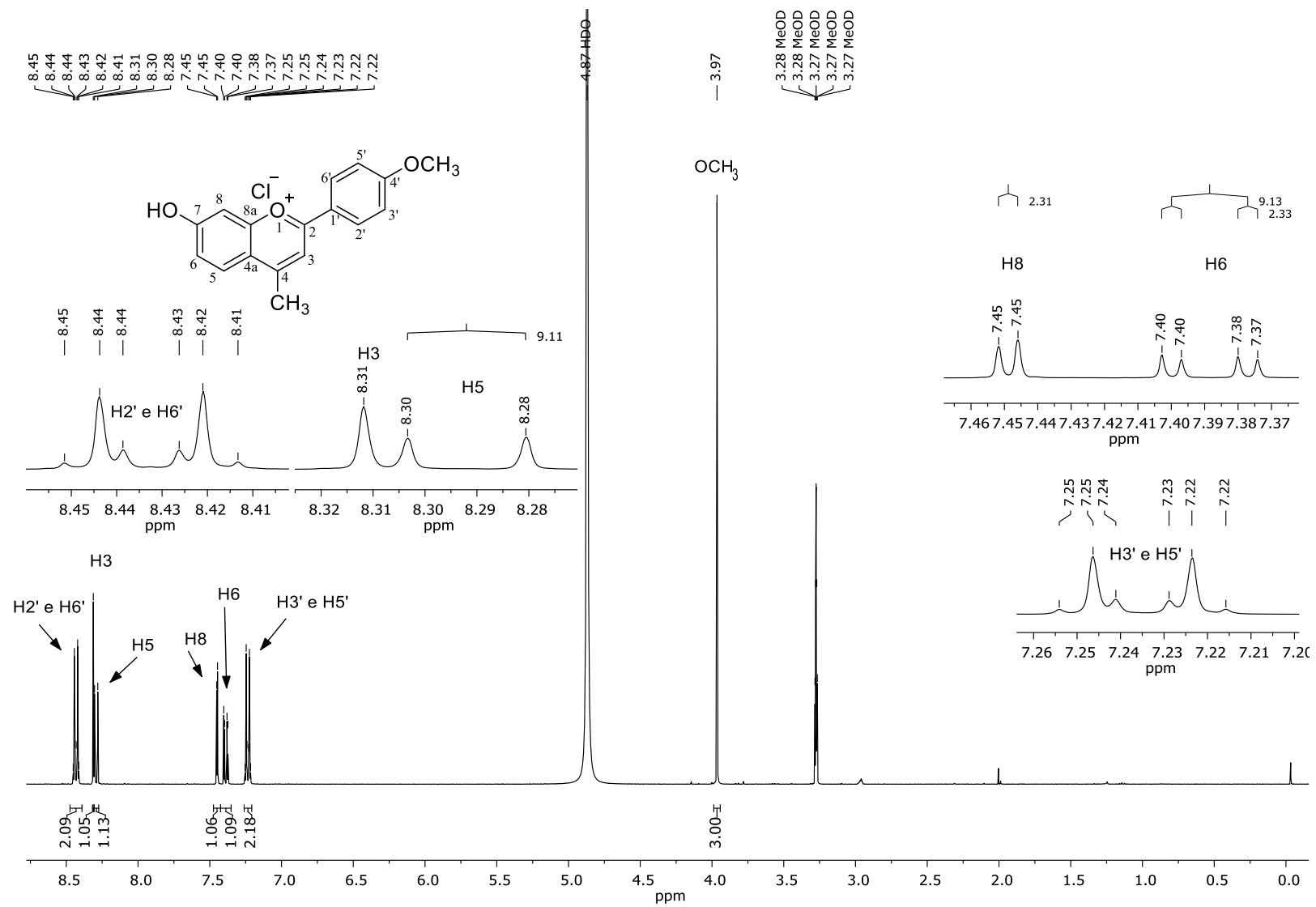
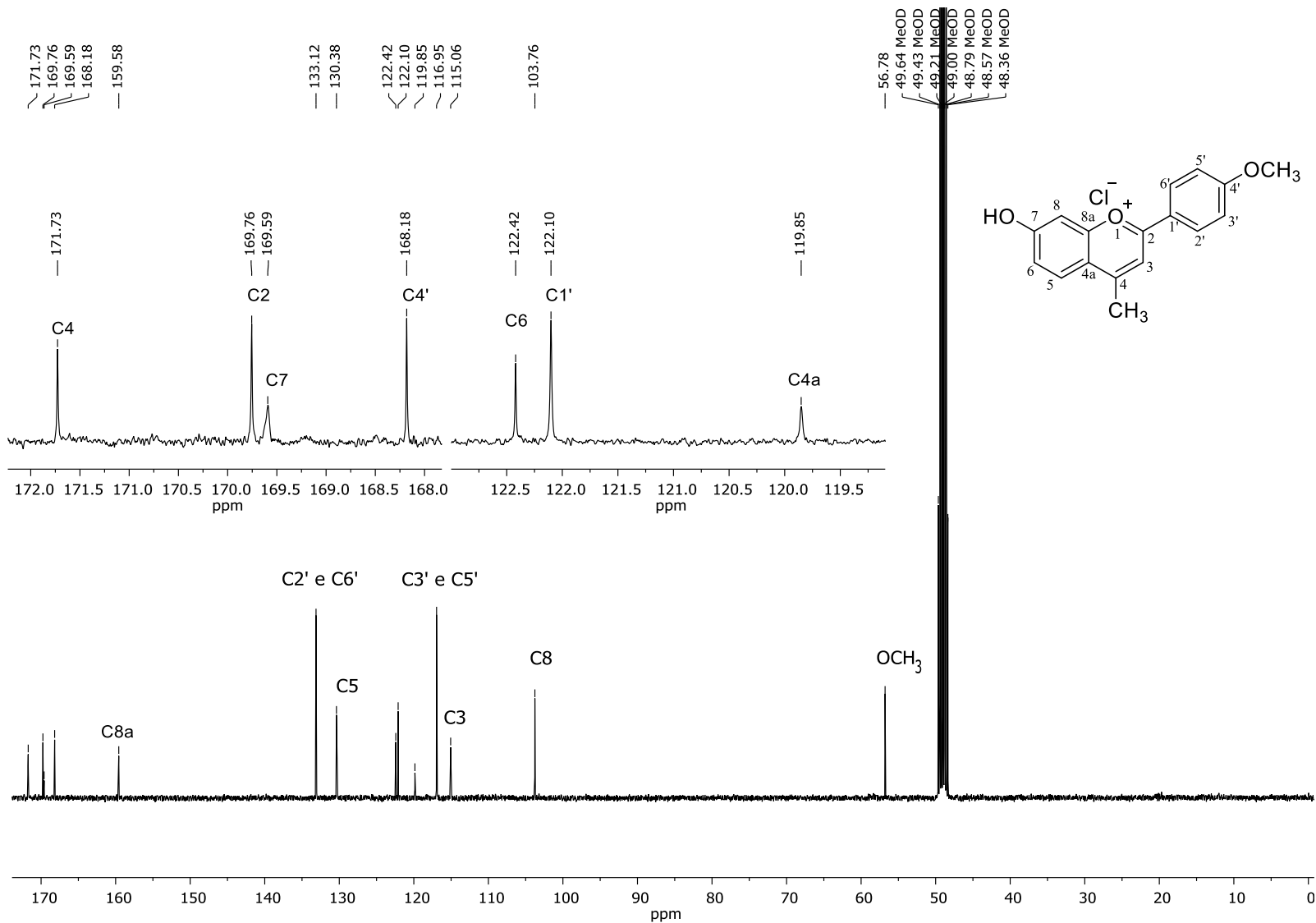
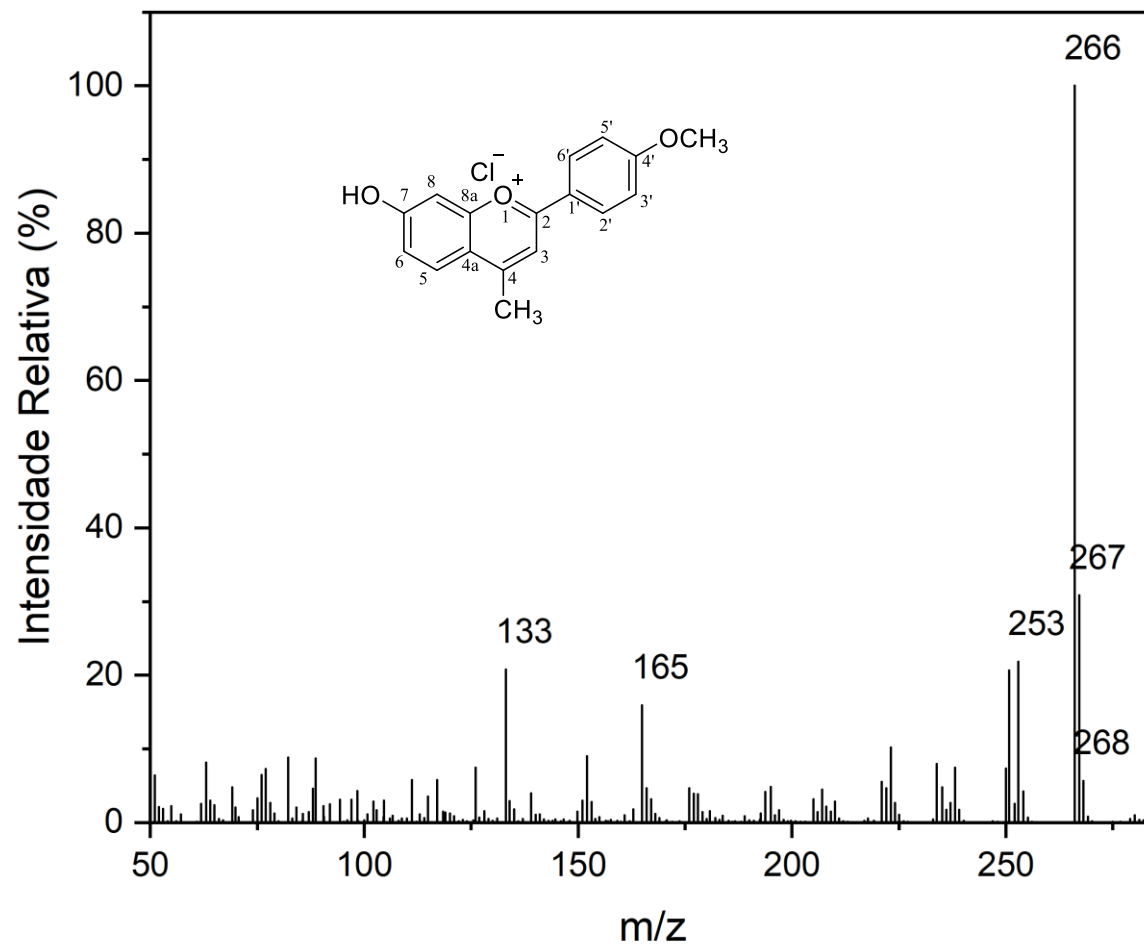


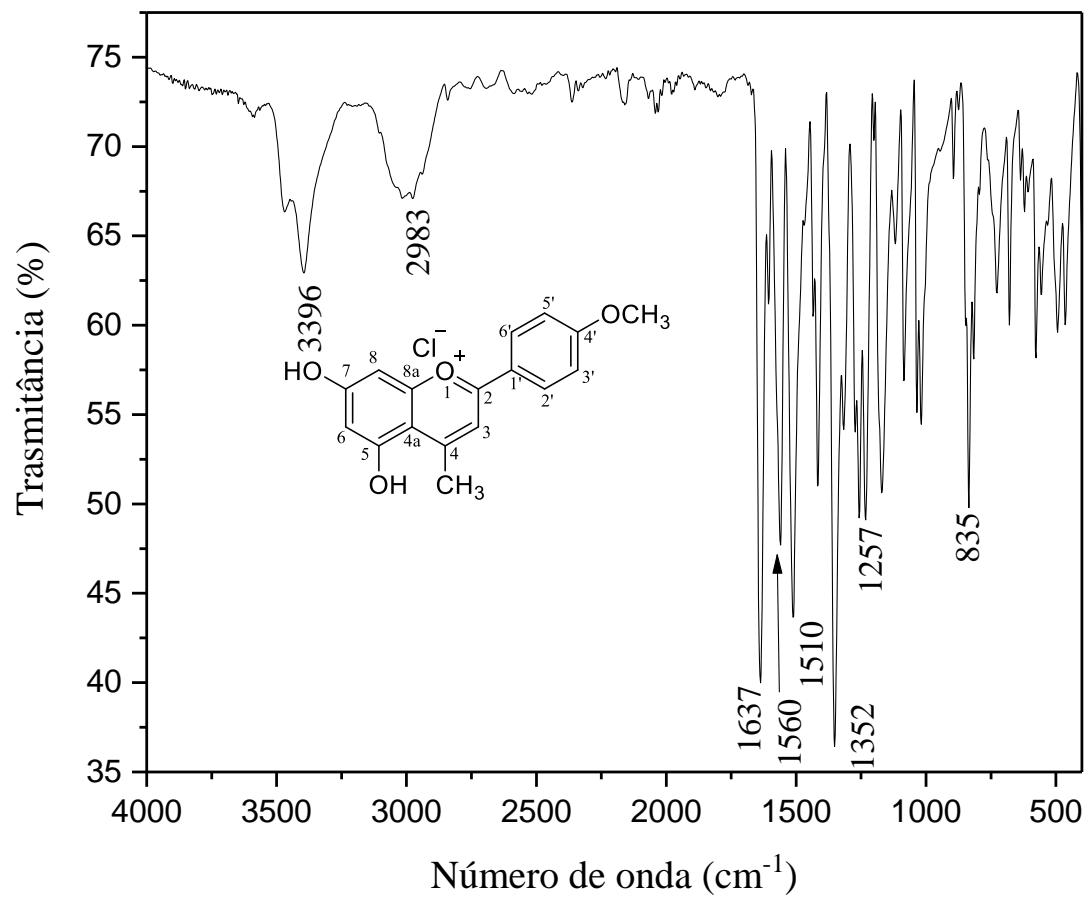
Figura 32. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H do flavílio 5 (metanol-*d*<sub>4</sub>, 400 MHz).



**Figura 33.** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C do flavílio 5 (metanol-*d*<sub>4</sub>, 100 MHz).



**Figura 34.** Espectro de massas do flavílio 5.



**Figura 35.** Espectro de infravermelho (IV) do flavílio 6.

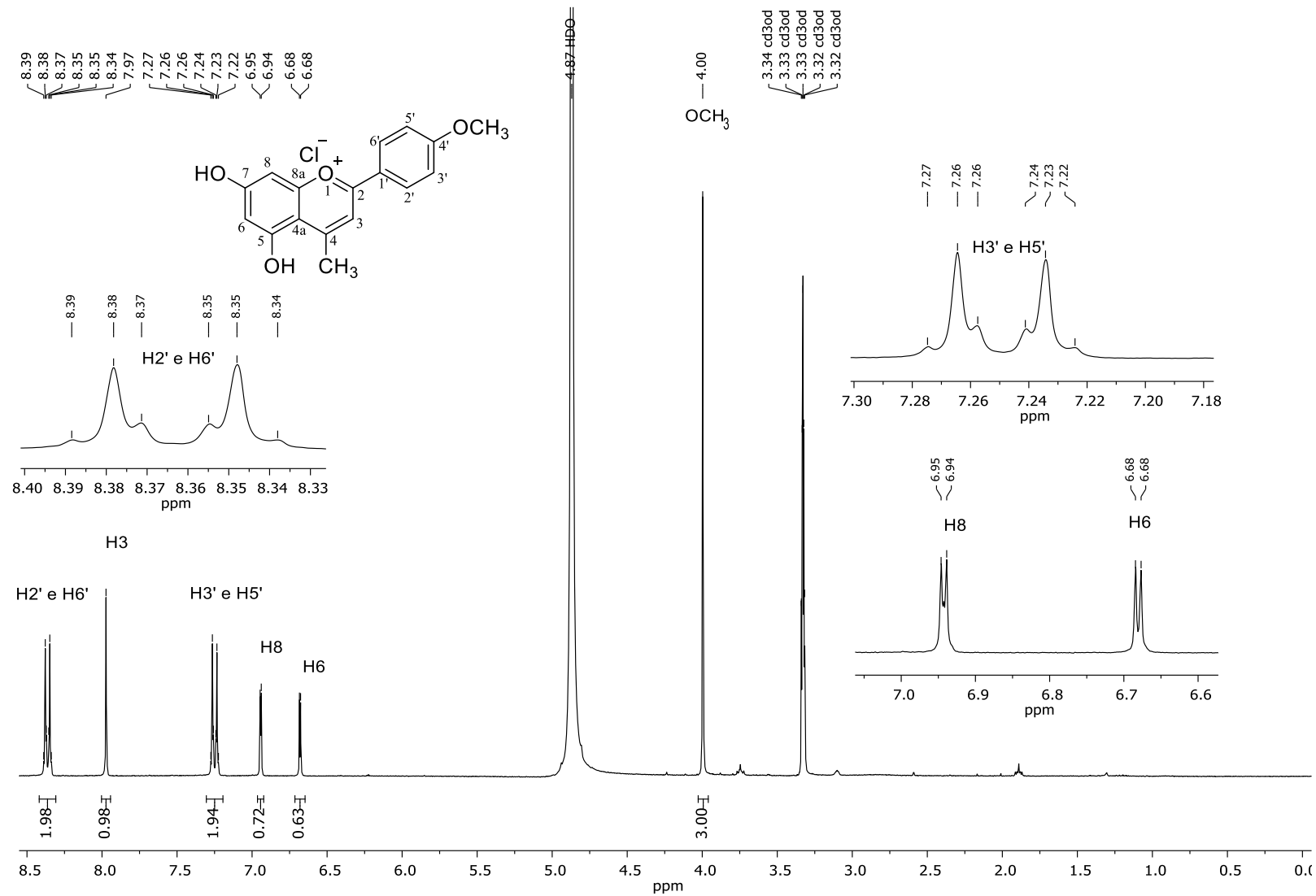


Figura 36. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H do flavílio 6 (metanol-*d*<sub>4</sub>, 400 MHz).

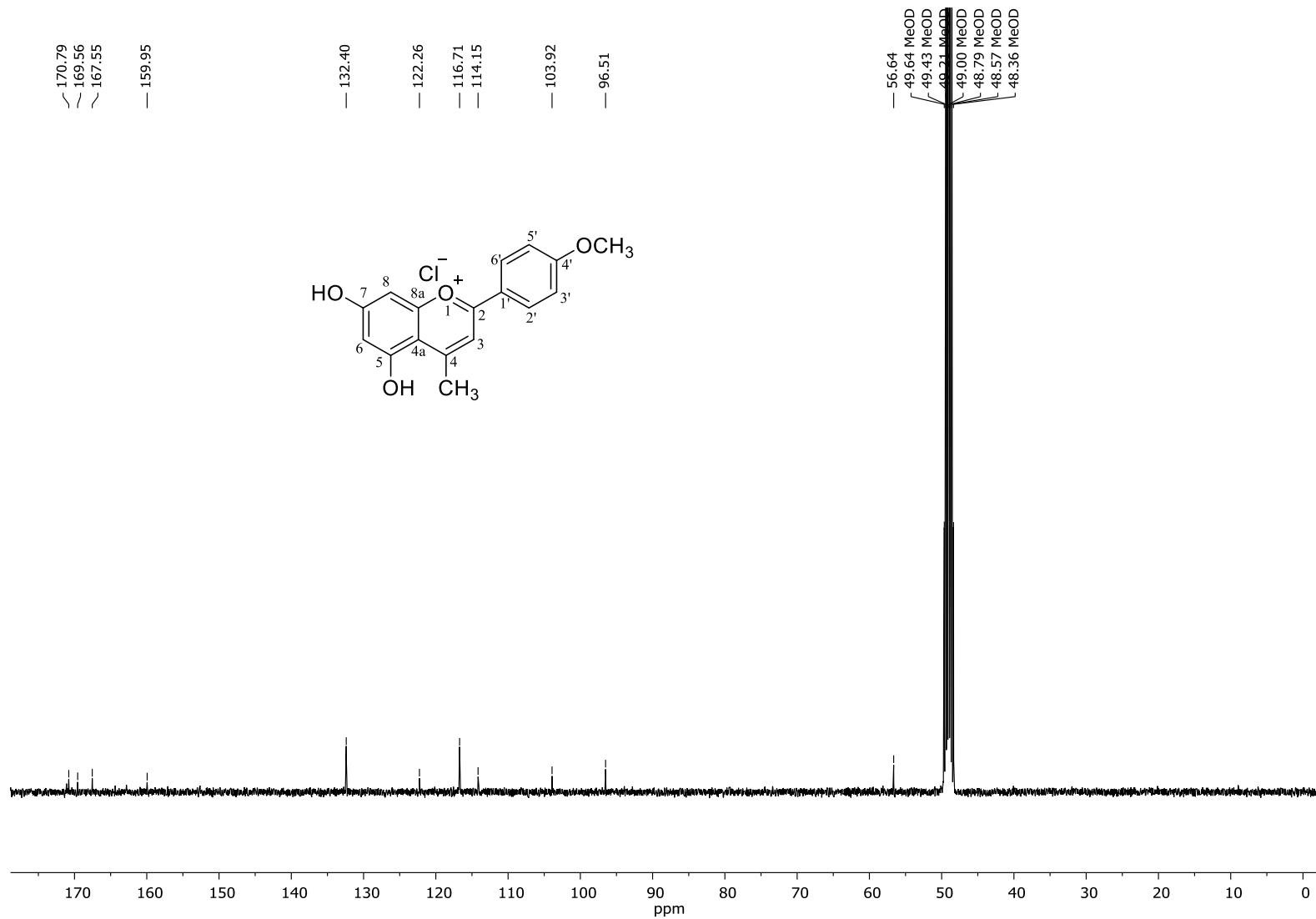
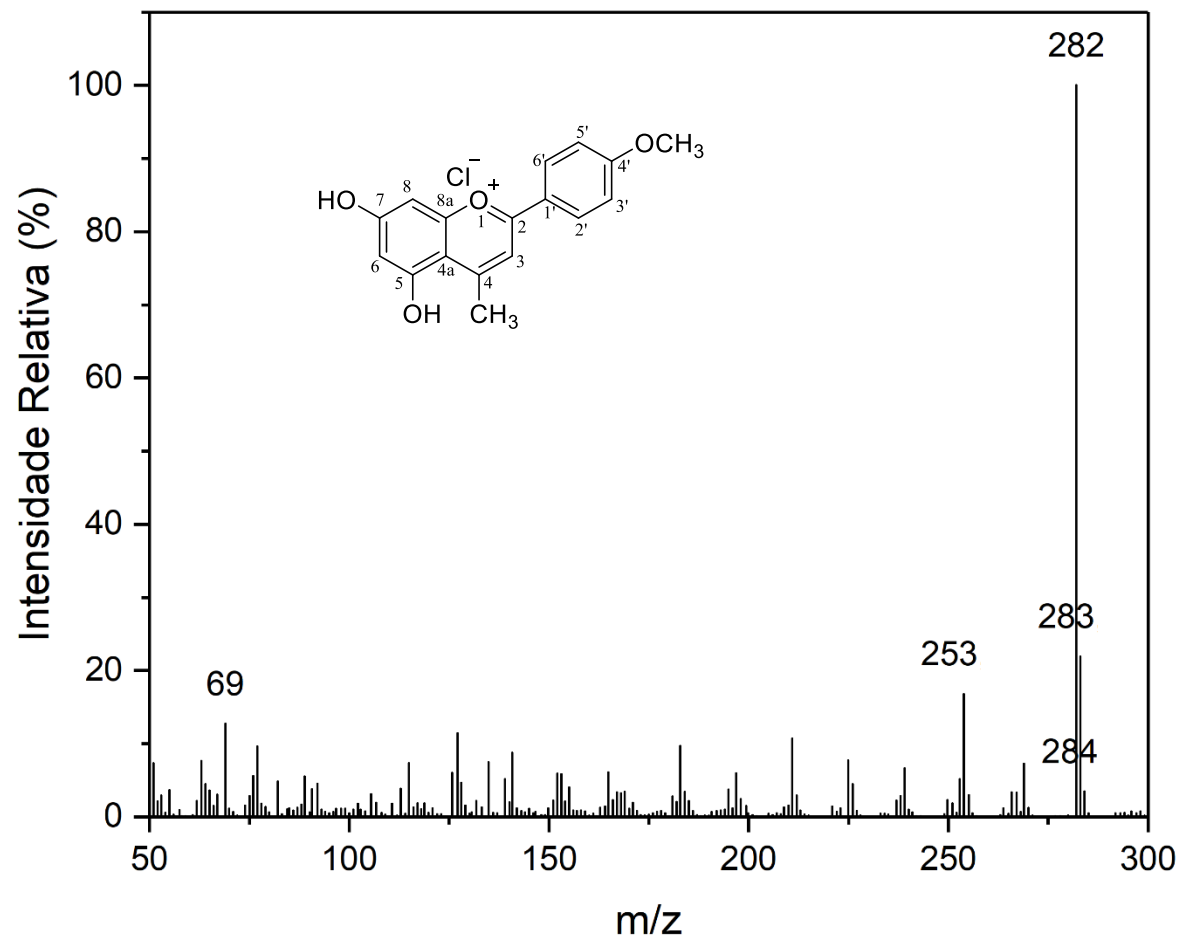
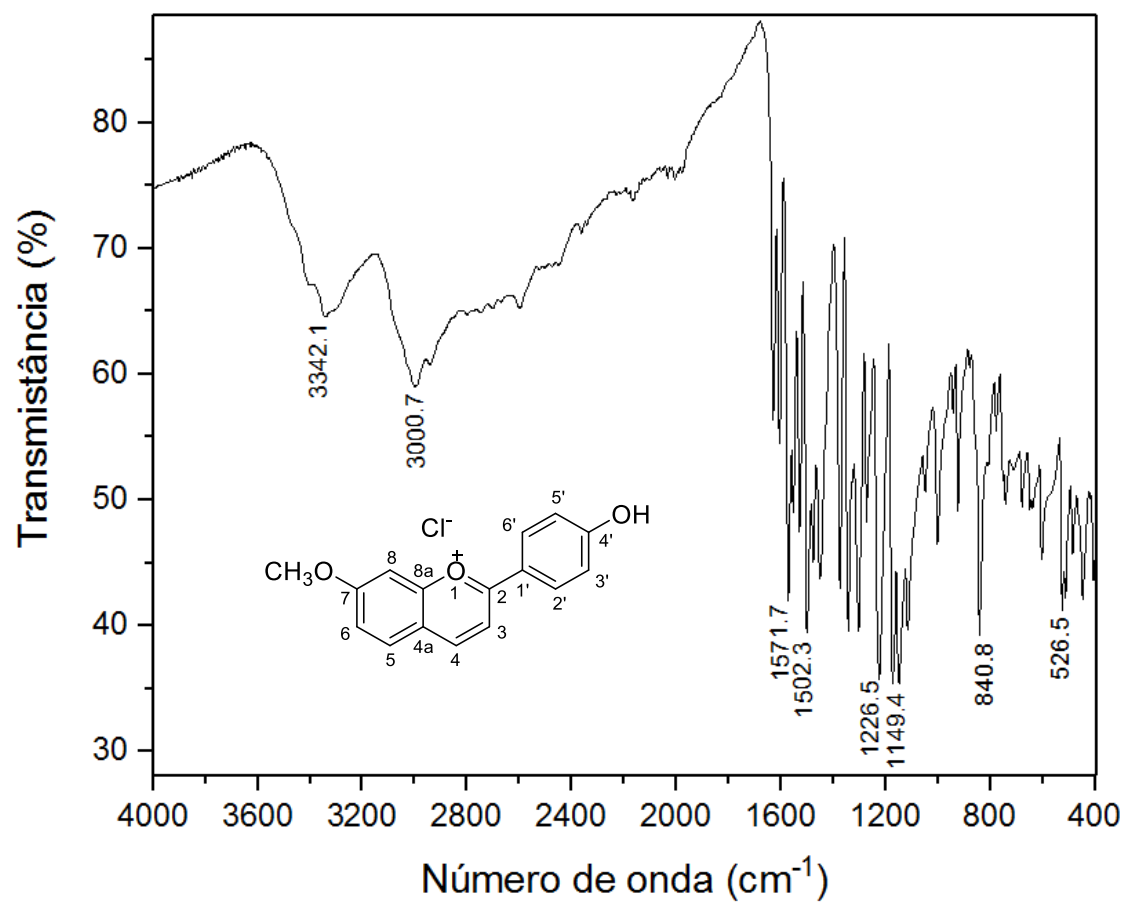


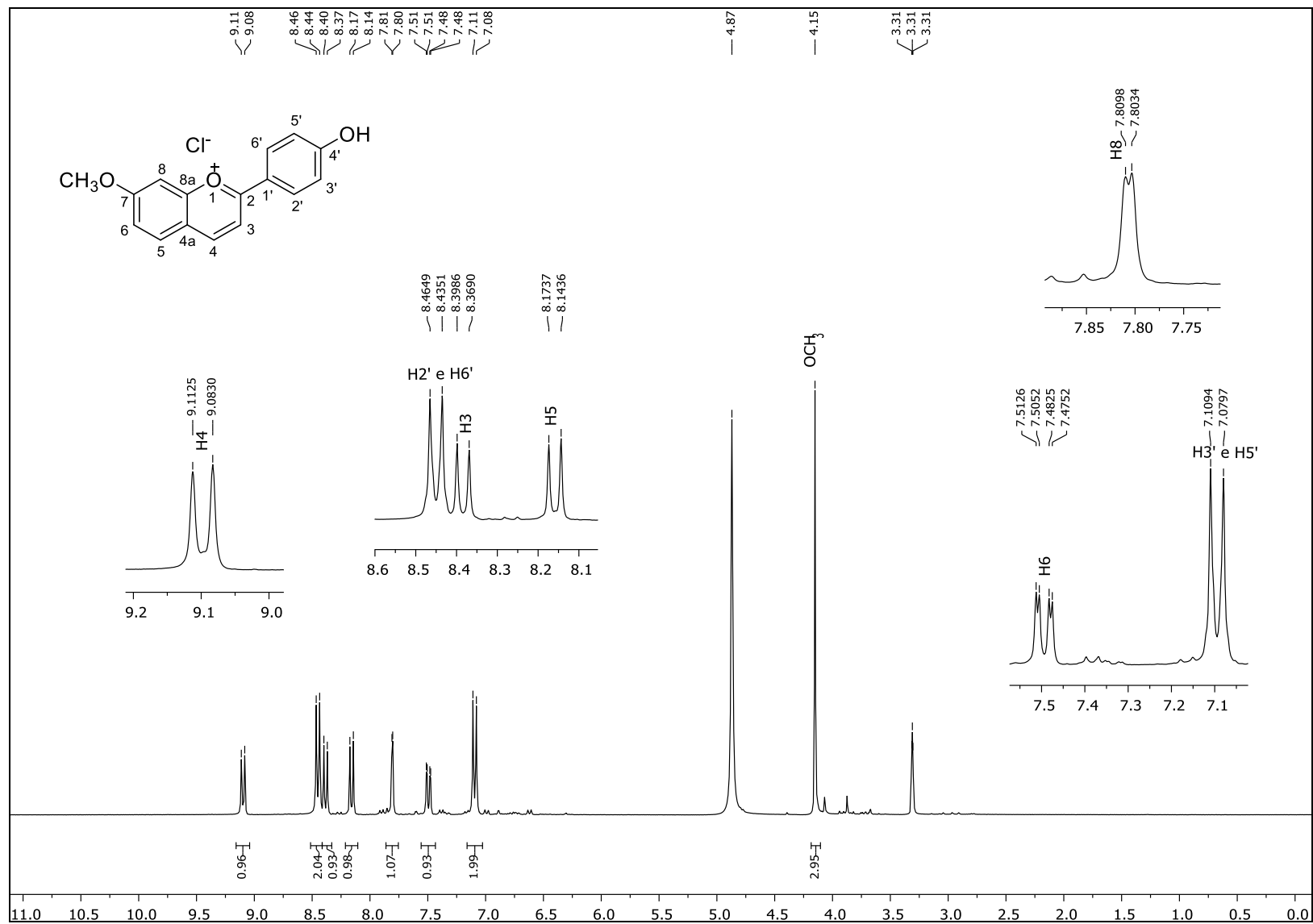
Figura 37. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C do flavílio 6 (metanol-*d*<sub>4</sub>, 100 MHz).



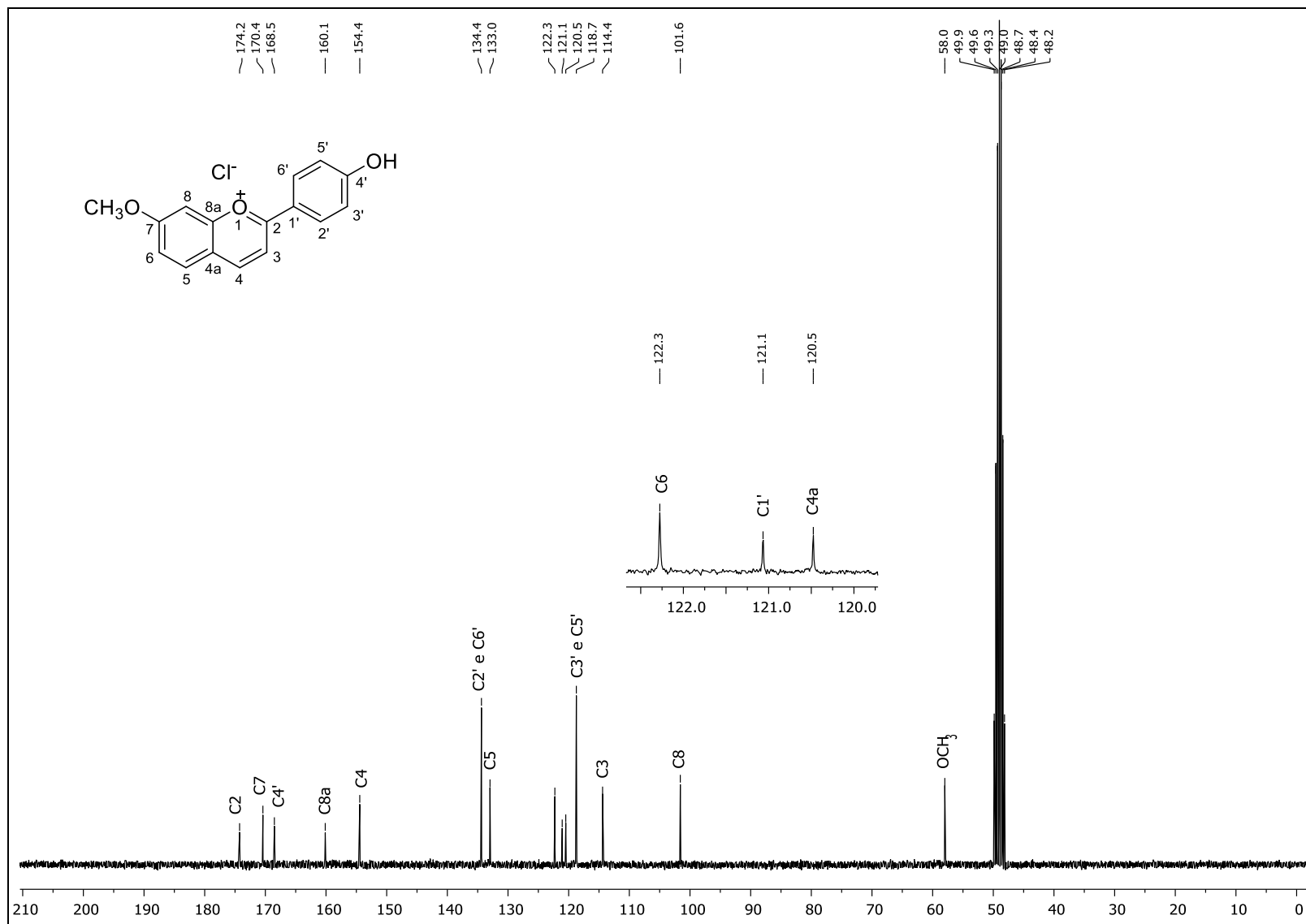
**Figura 38.** Espectro de massas do flavílio 6.



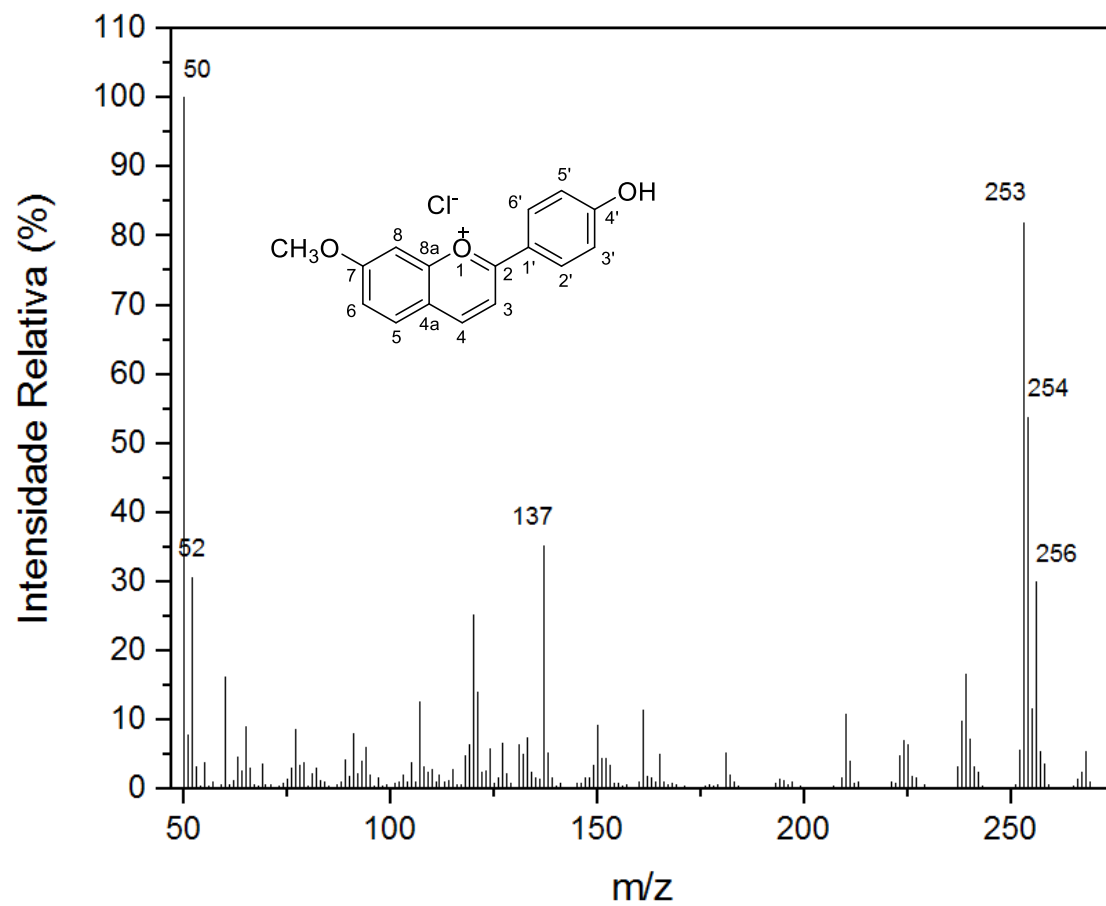
**Figura 39.** Espectro de infravermelho (IV) do flavílio 7.



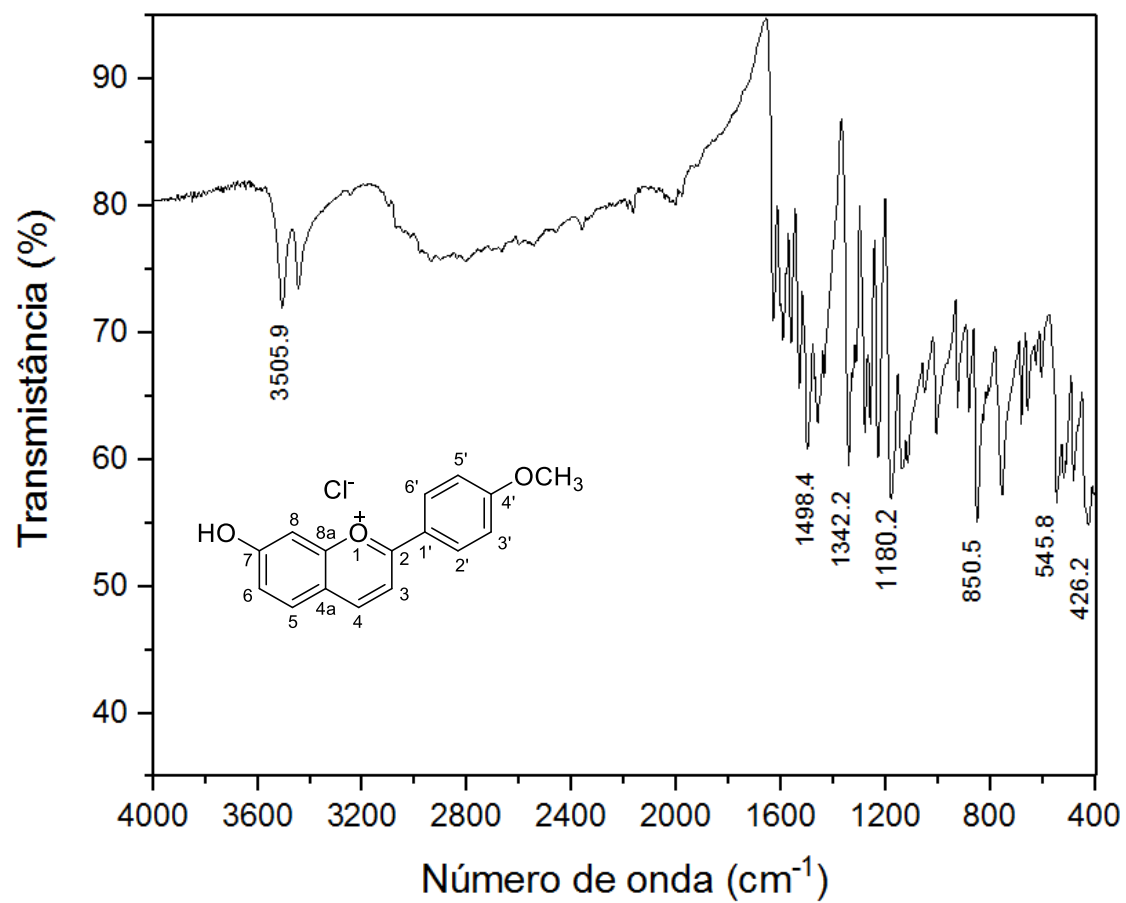
**Figura 40.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H do flavílio **7** (metanol-*d*<sub>4</sub>, 300 MHz).



**Figura 41.** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C do flavílio 7 (metanol-*d*<sub>4</sub>, 75 MHz).



**Figura 42.** Espectro de massas do flavílio 7.



**Figura 43.** Espectro de infravermelho (IV) do flavílio 8.

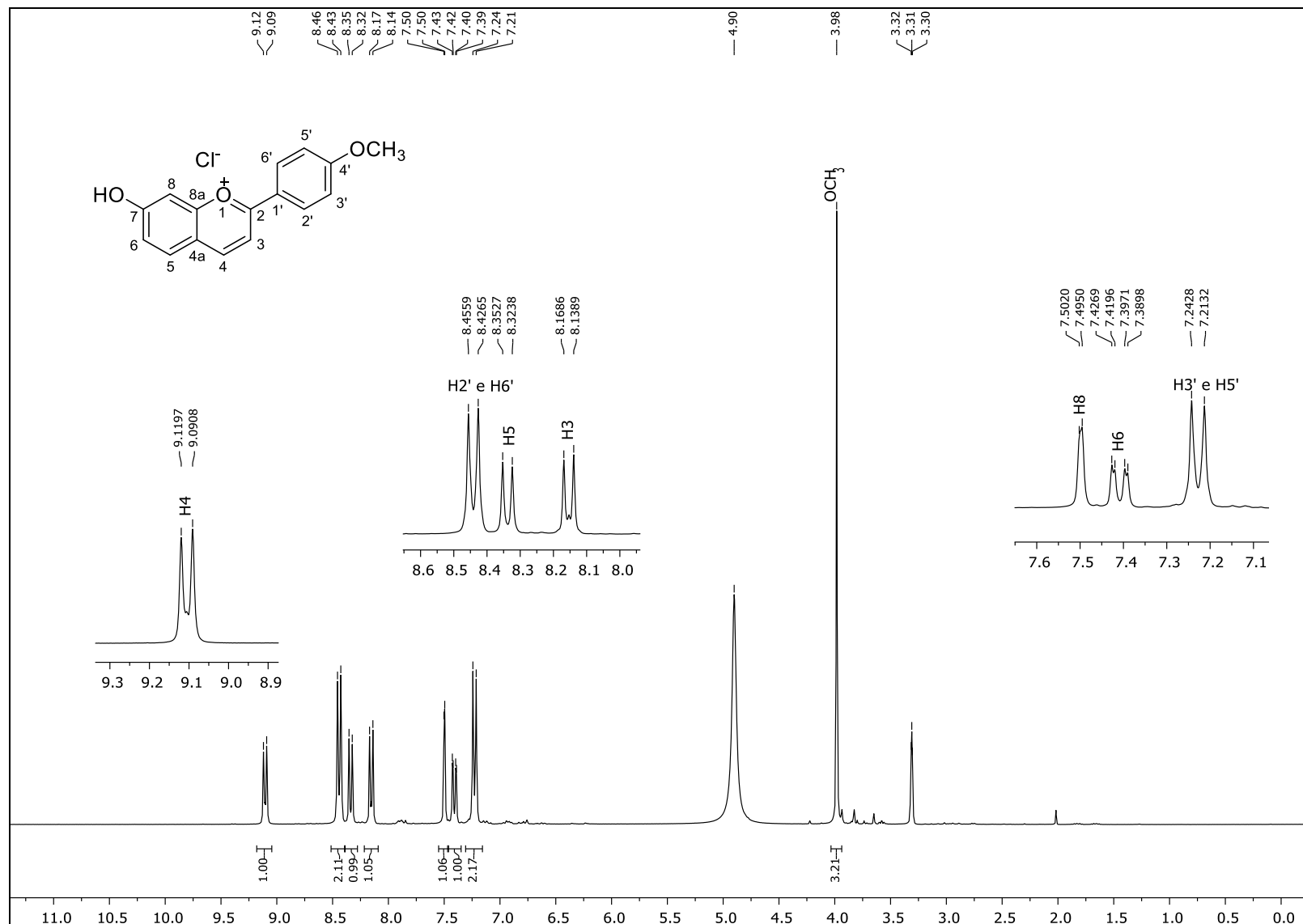
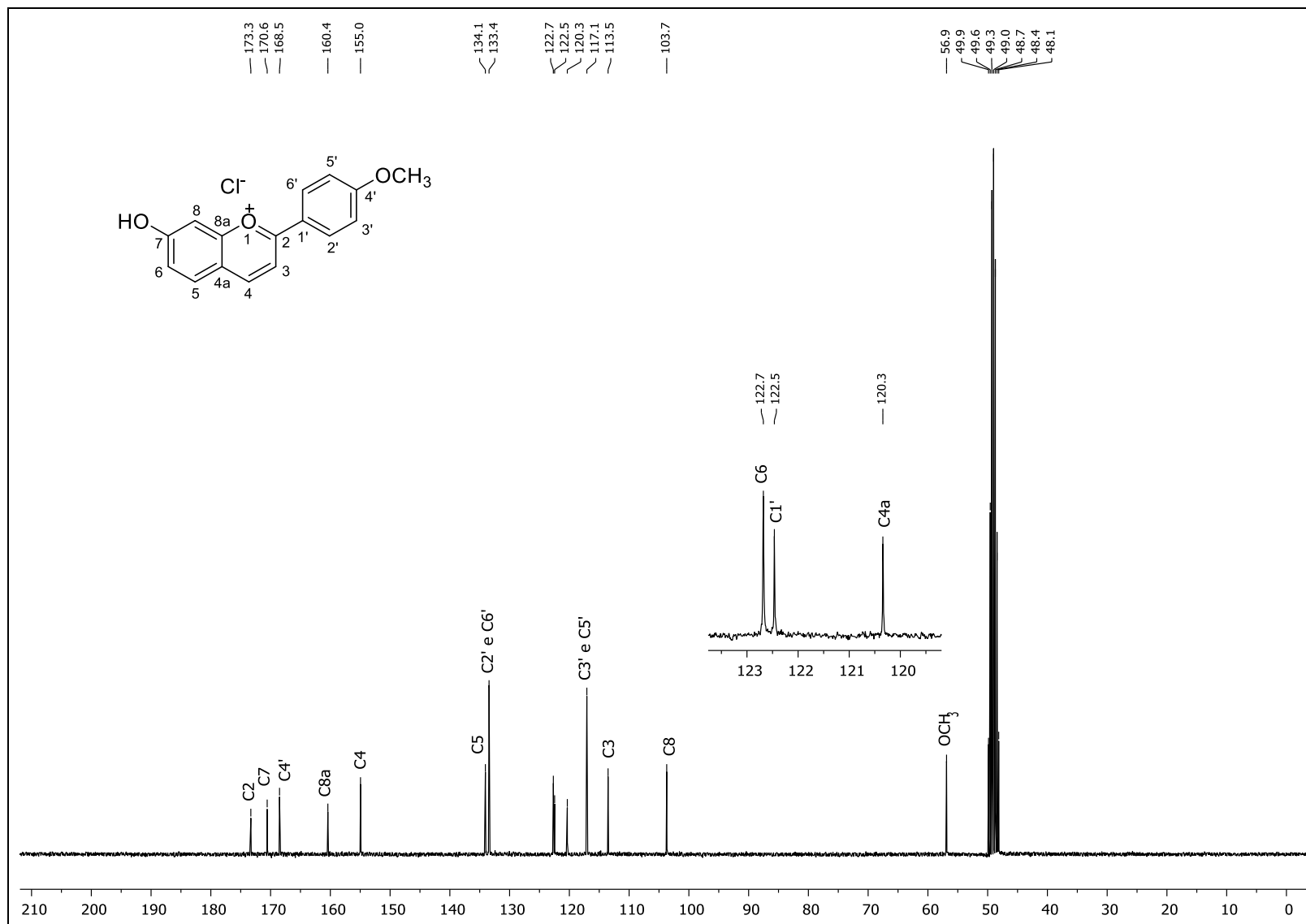
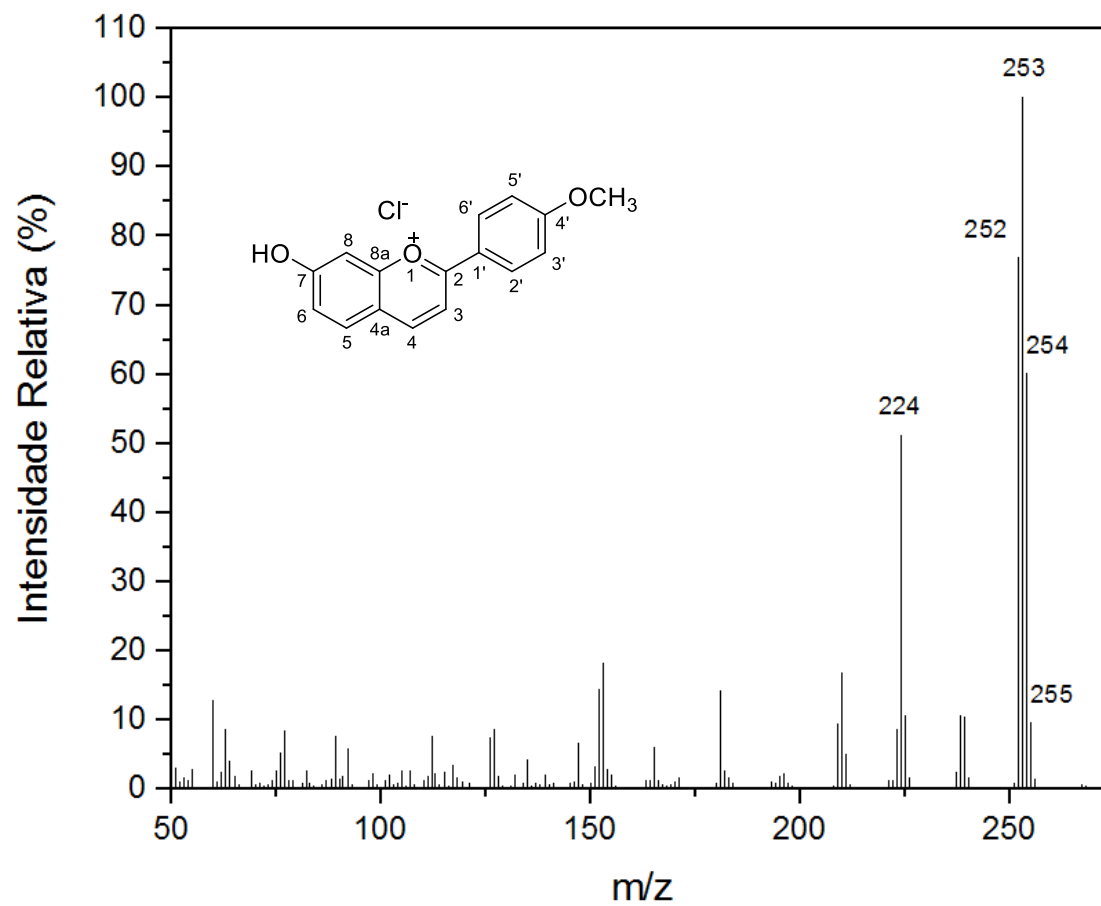


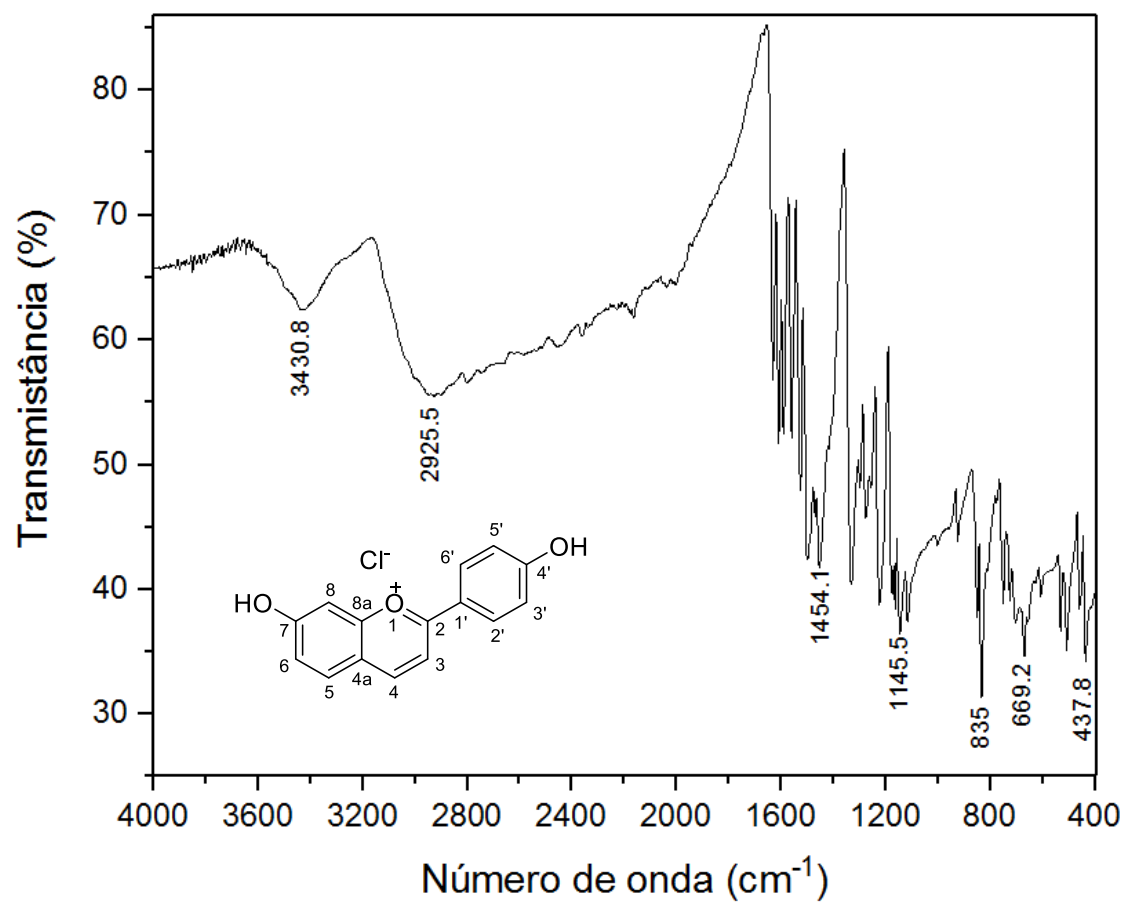
Figura 44. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do flavílio **8** (metanol- $d_4$ , 300 MHz).



**Figura 45.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do flavílio **8** (metanol- $d_4$ , 75 MHz).



**Figura 46.** Espectro de massas do flavílio 8.



**Figura 47.** Espectro de infravermelho (IV) do flavílio 10.

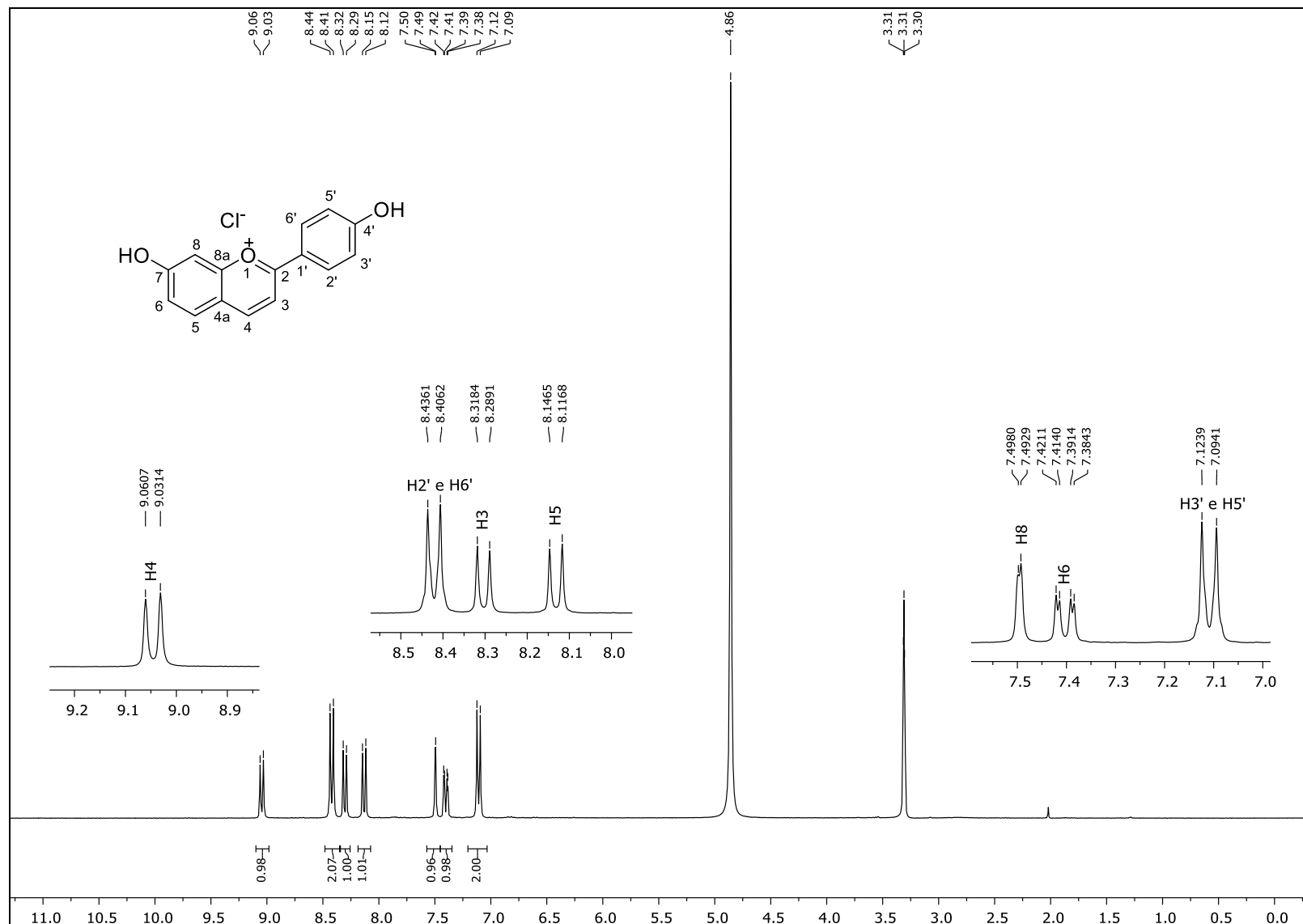


Figura 48. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do flavílio **10** (metanol- $d_4$ , 300 MHz).

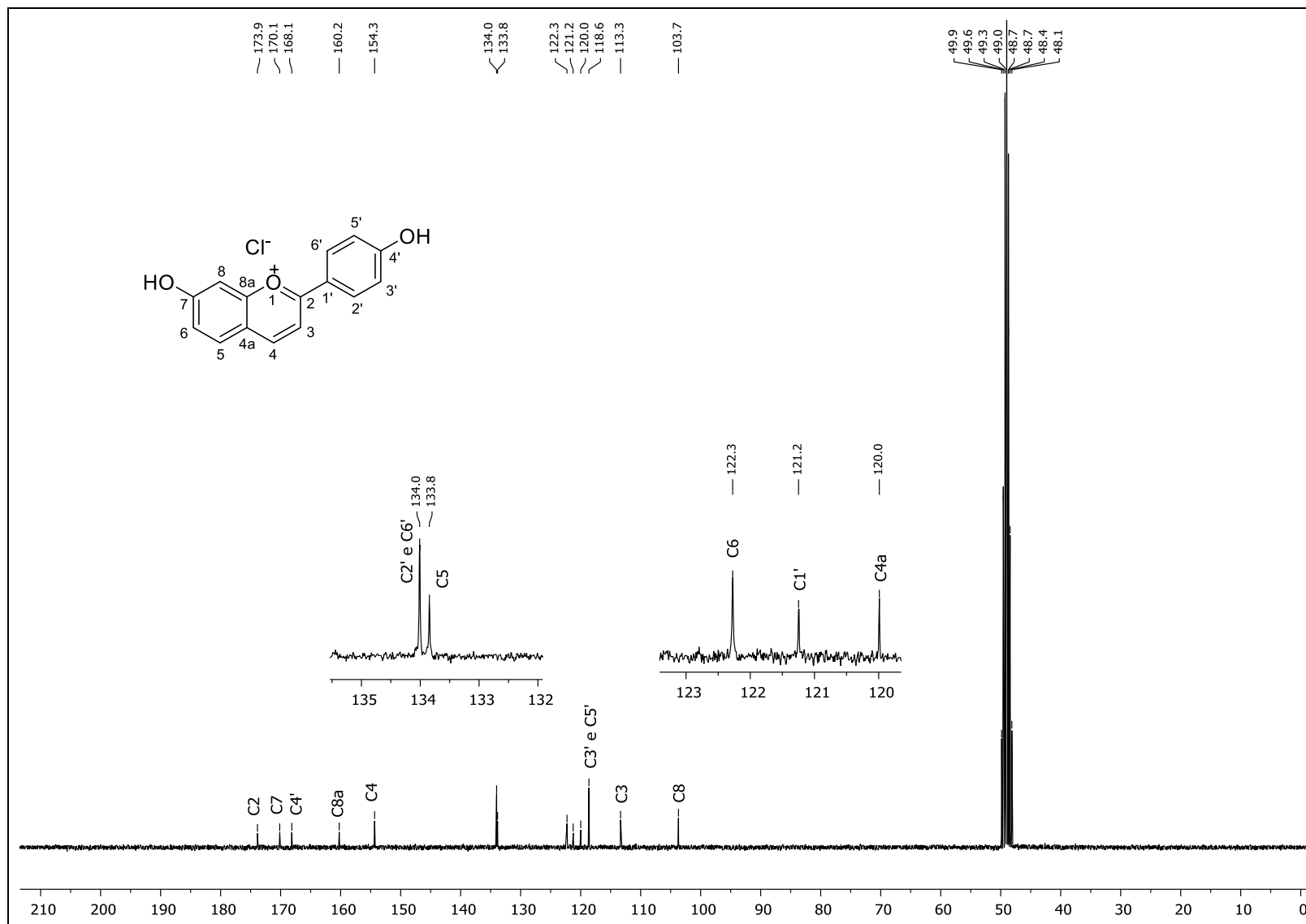
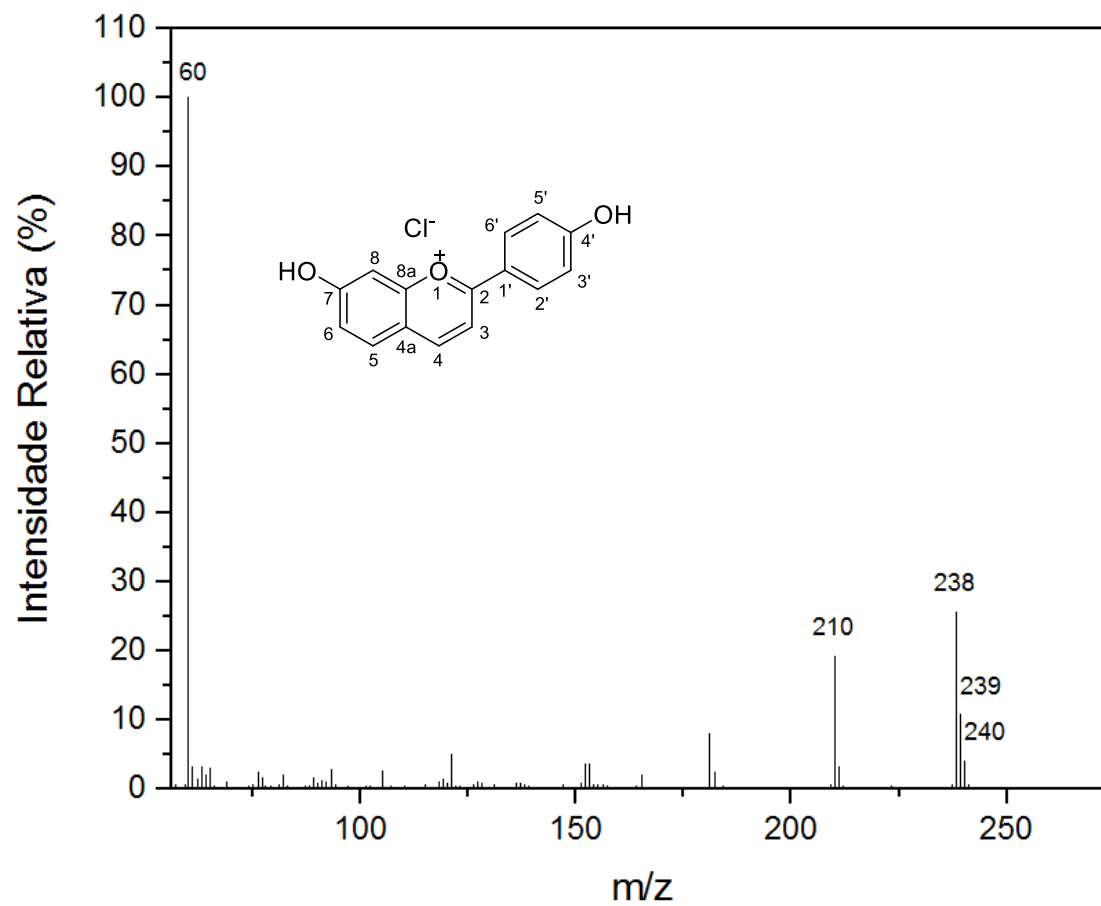


Figura 49. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C do flavílio **10** (metanol-*d*<sub>4</sub>, 75 MHz).



**Figura 50.** Espectro de massas do flavílio 10.

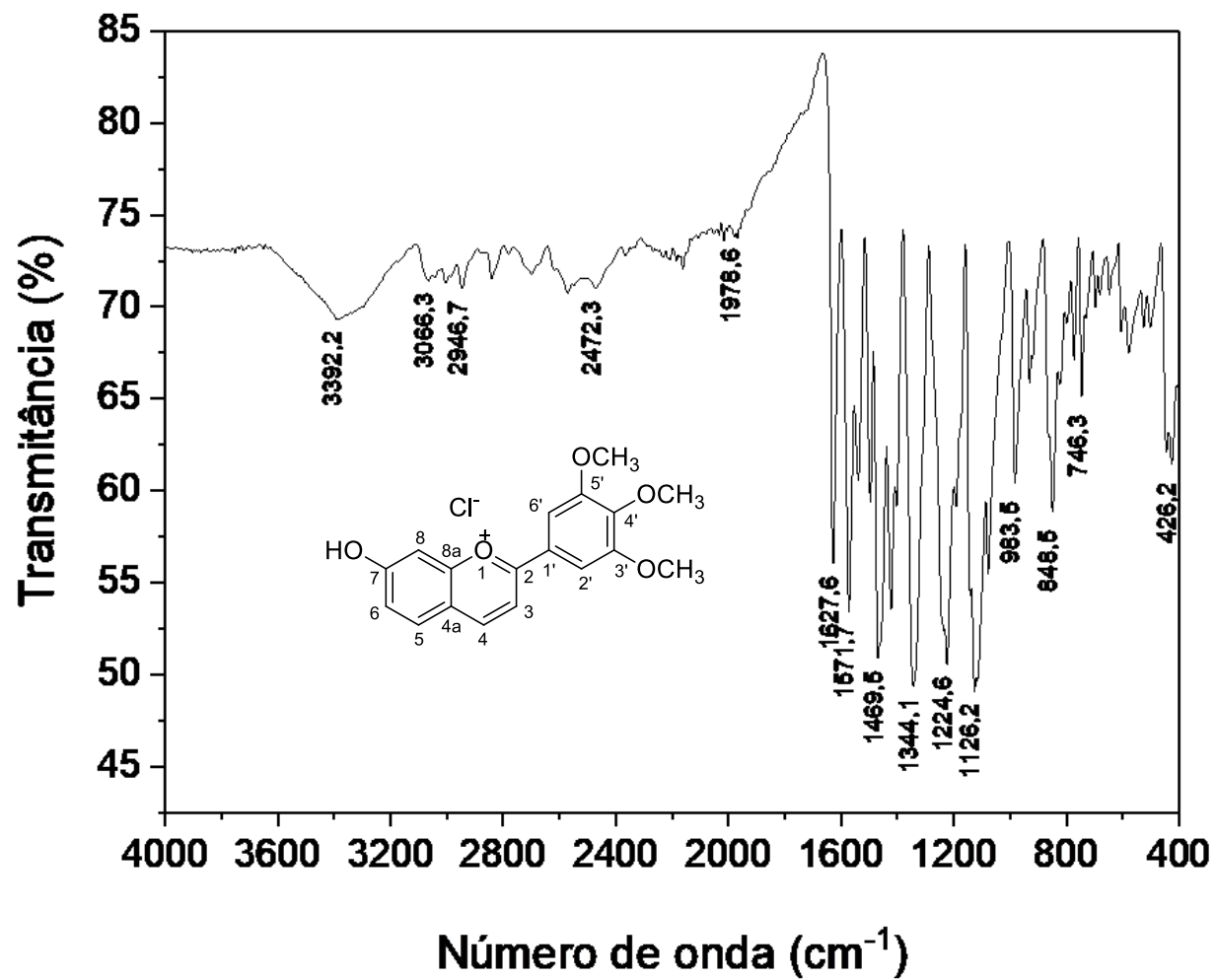
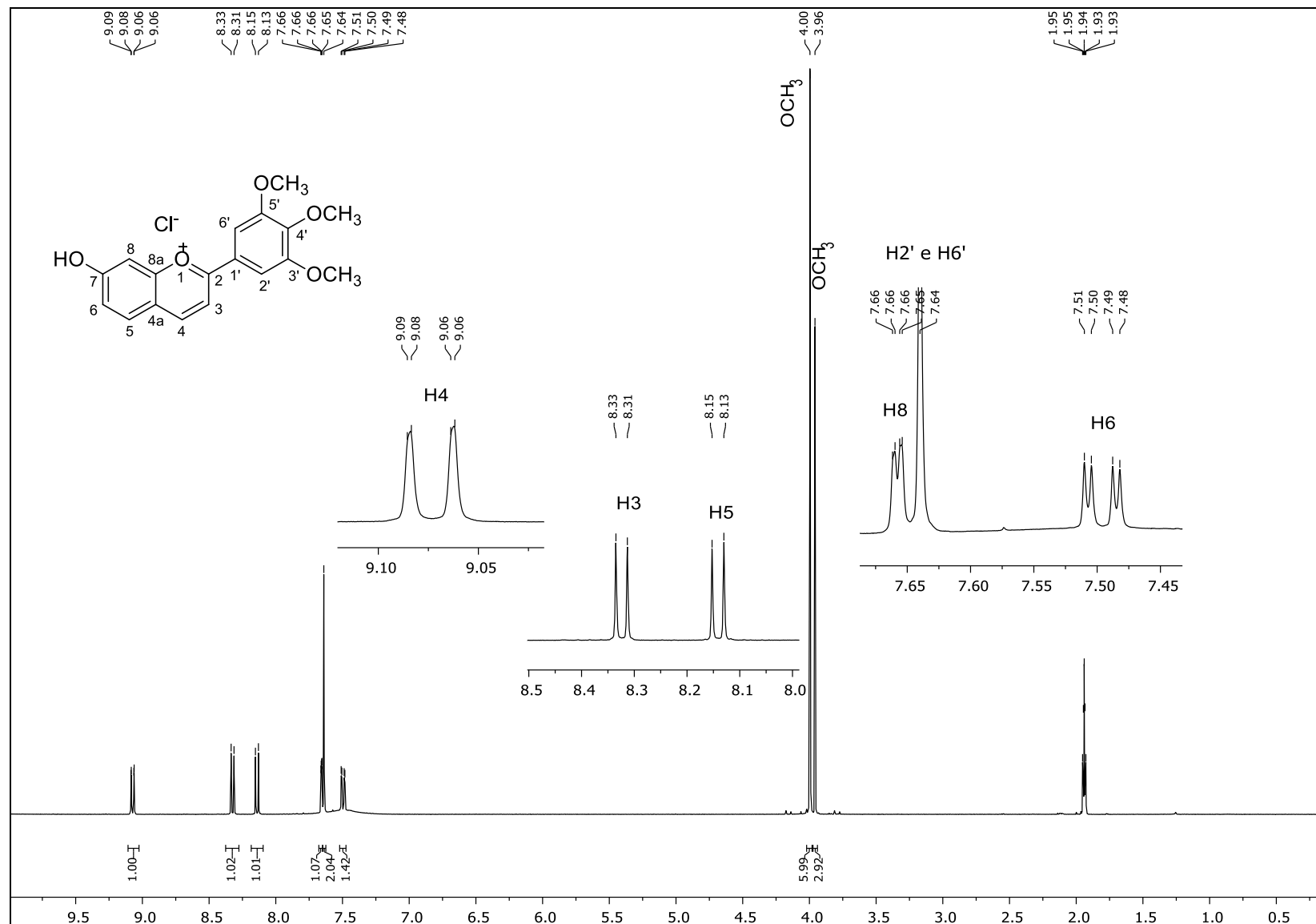
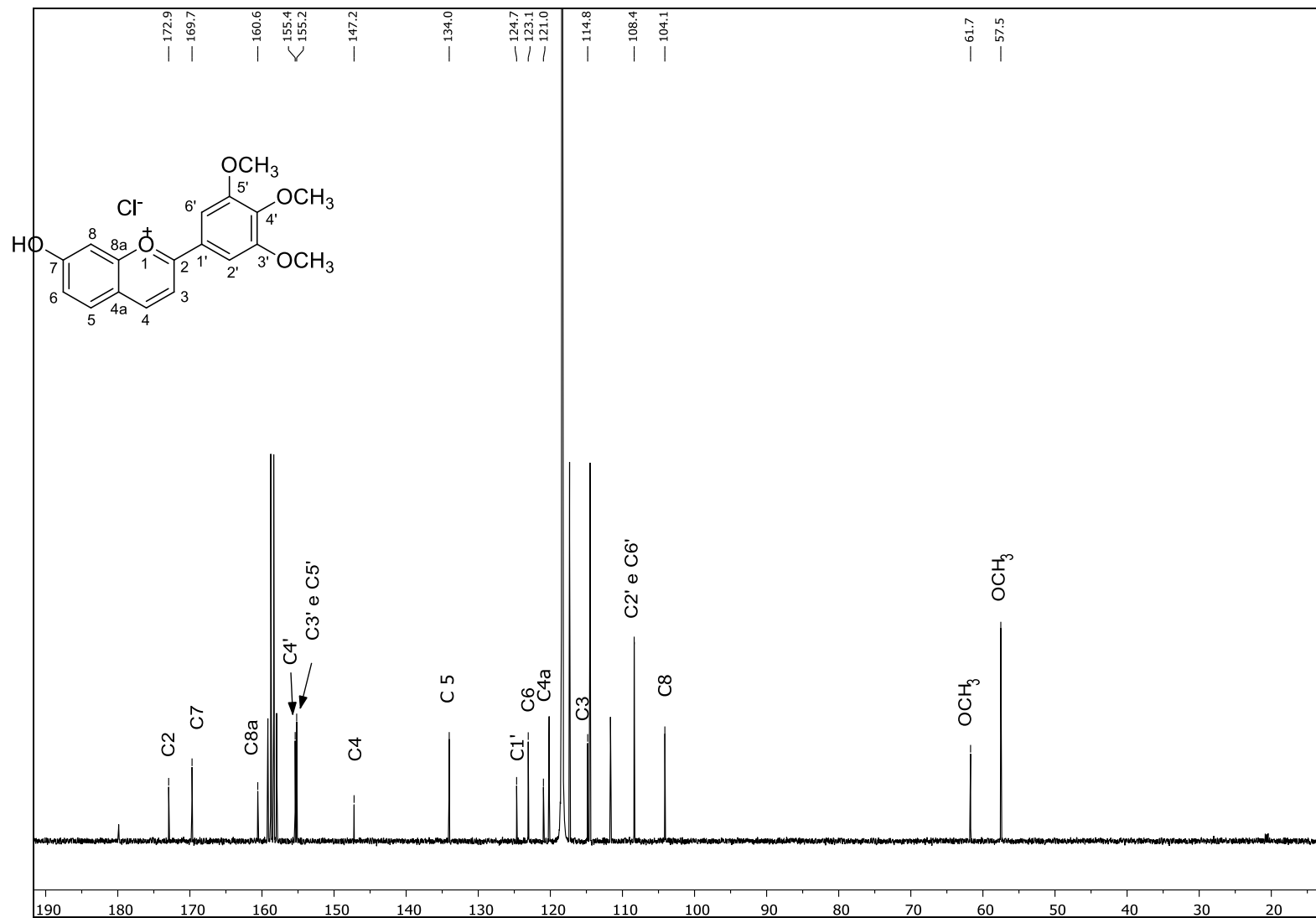


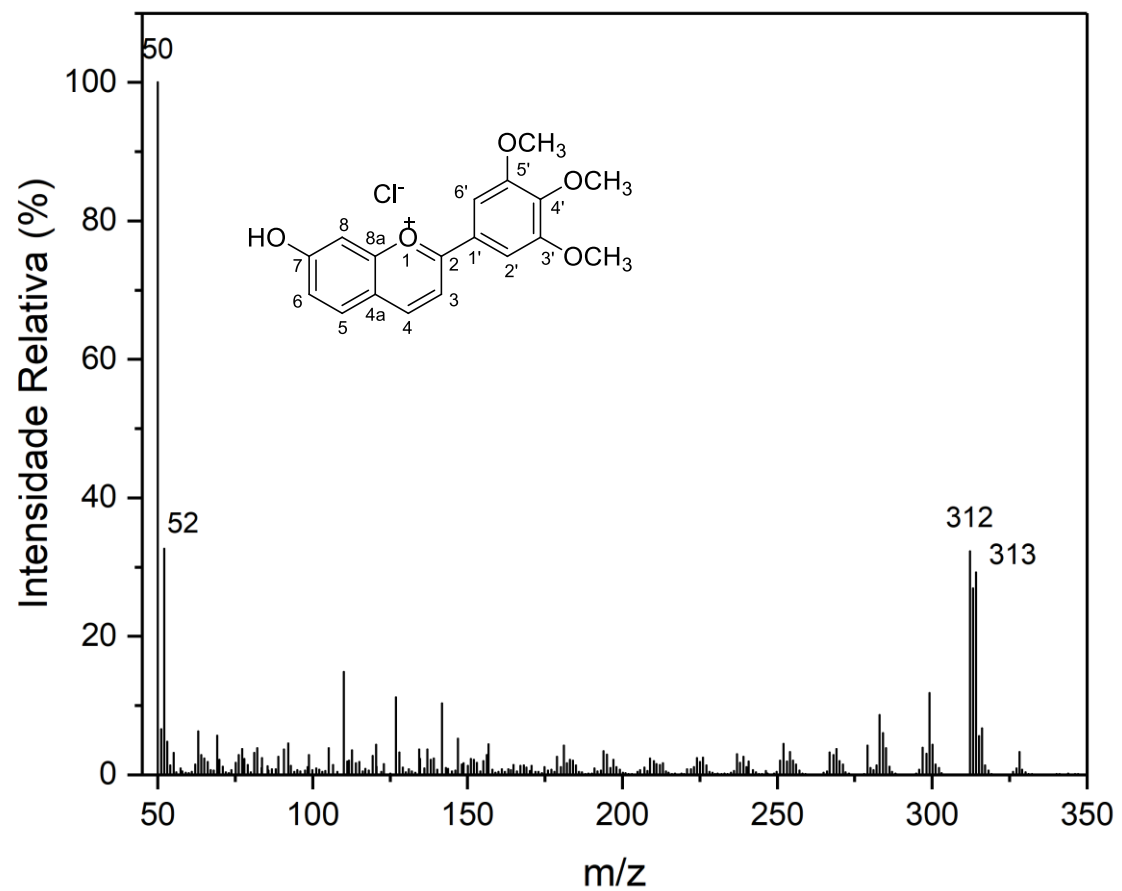
Figura 51. Espectro de infravermelho (IV) do flavílio 11.



**Figura 52.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do flavílio **11** (acetonitrila- $d_3$ /TFA, 400 MHz).



**Figura 53.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do flavílio **11** (acetonitrila- $d_3$ /TFA, 100 MHz).



**Figura 54.** Espectro de massas do flavílio 11.

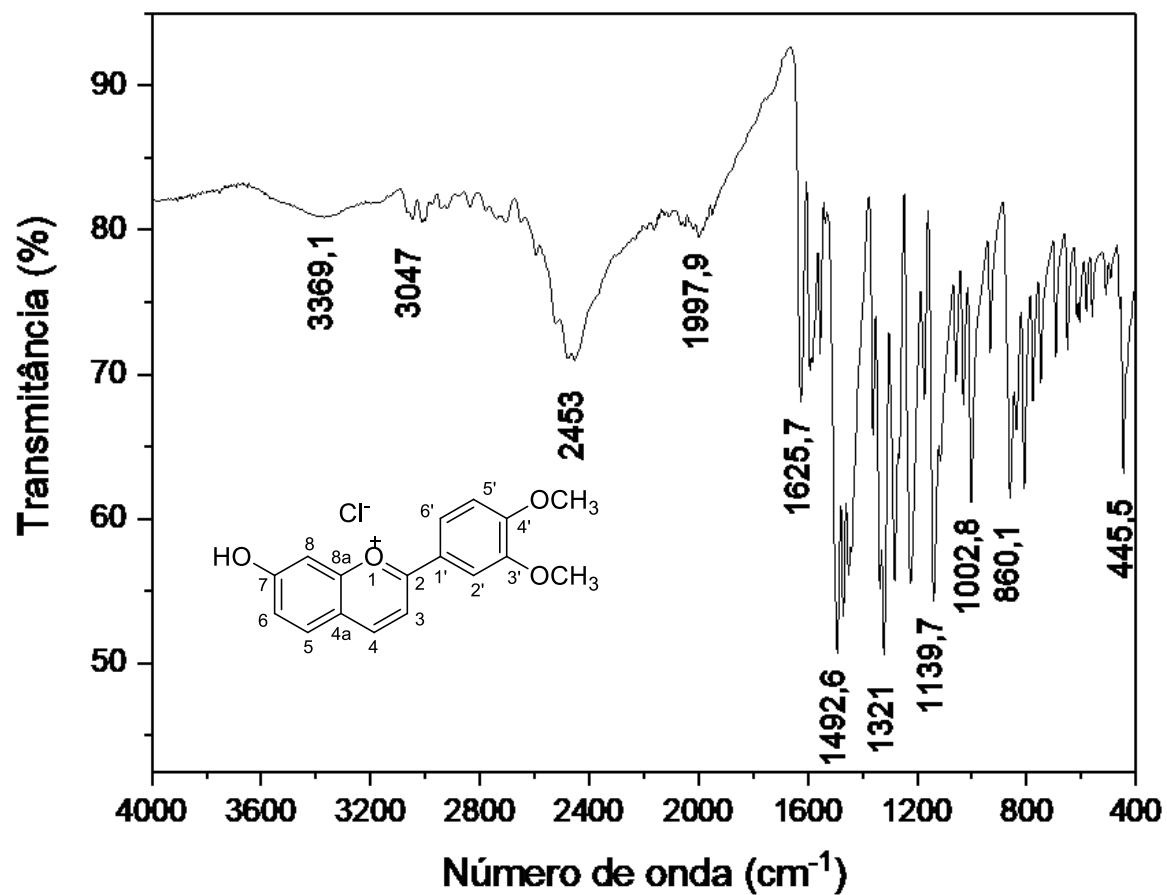


Figura 55. Espectro de infravermelho (IV) do flavílio 12.

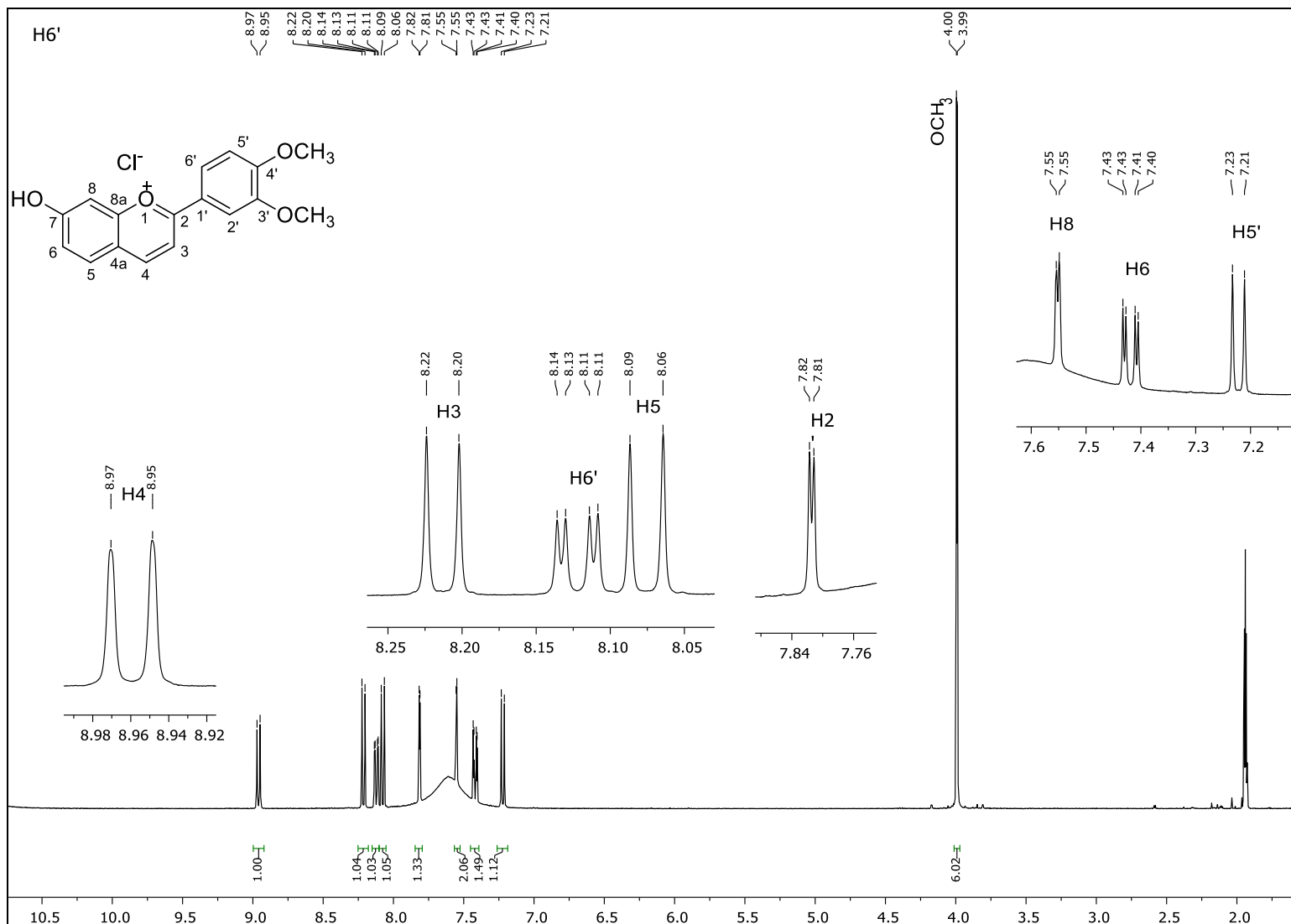
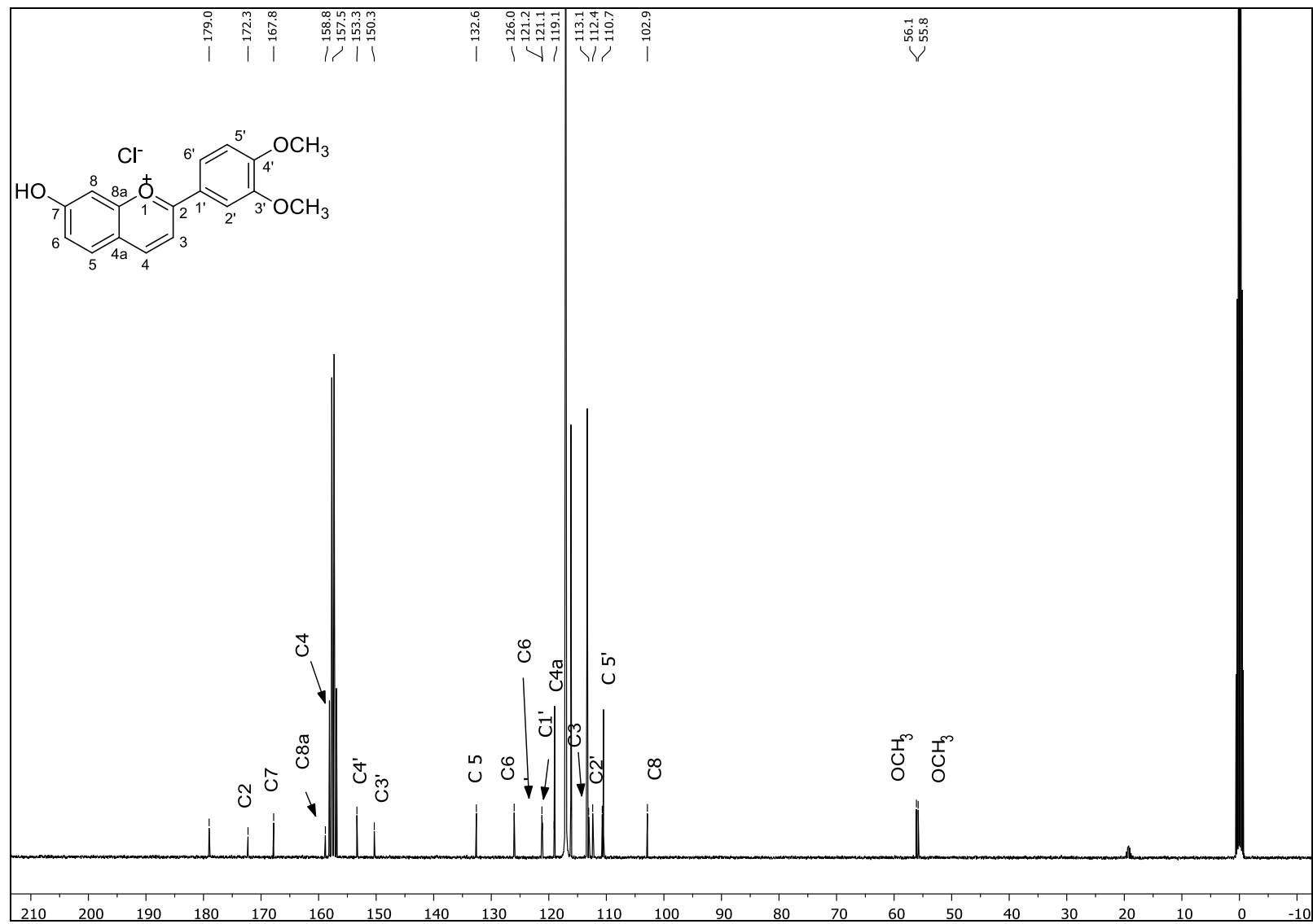
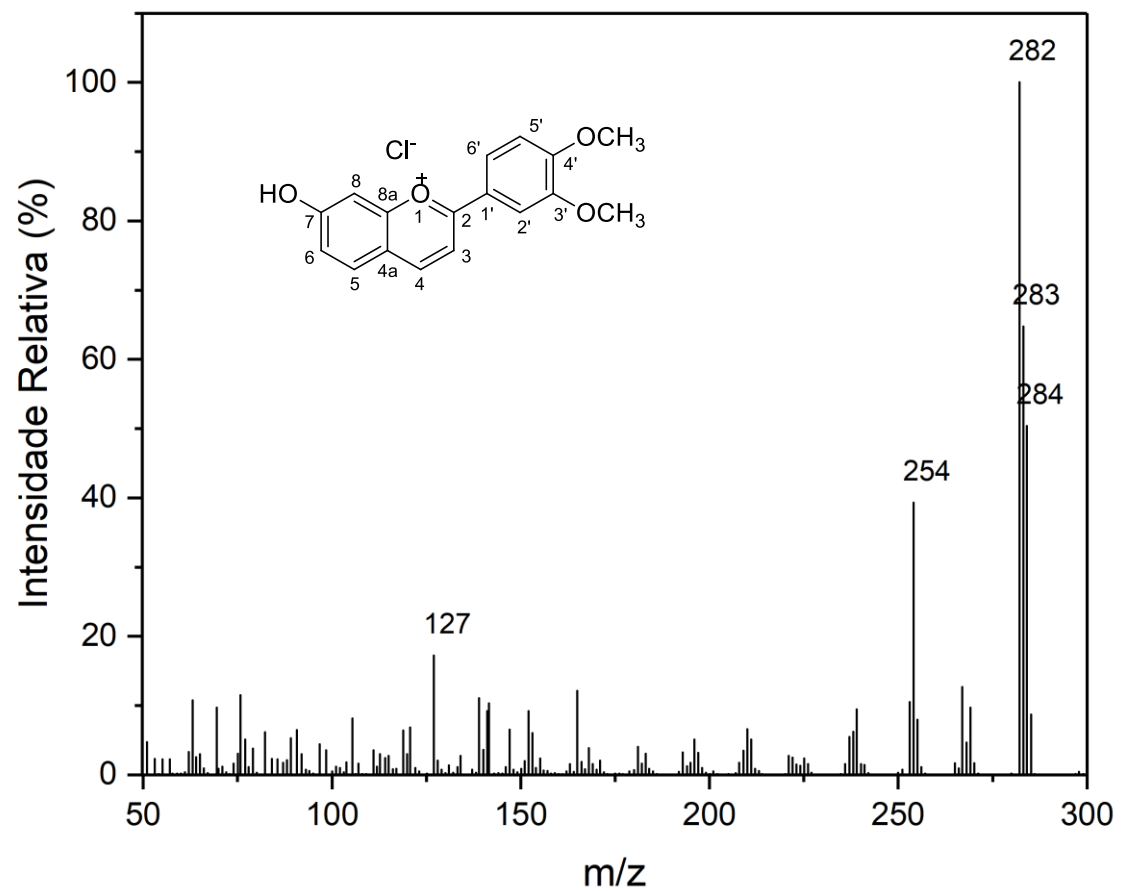


Figura 56. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do flavílio **12** (acetonitrila- $d_3$ /TFA, 400 MHz).



**Figura 57.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do flavílio **12** (acetonitrila- $d_3$ /TFA, 100 MHz).



**Figura 58.** Espectro de massas do flavílio 12.

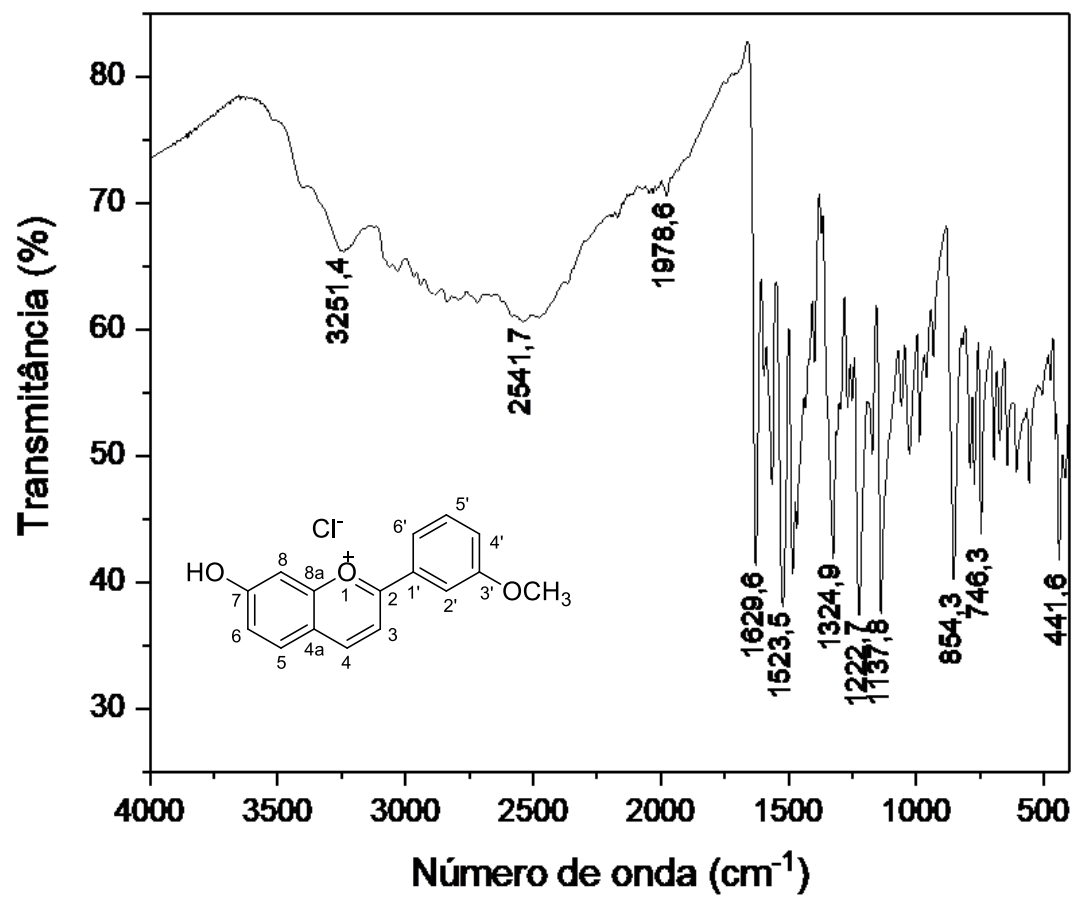
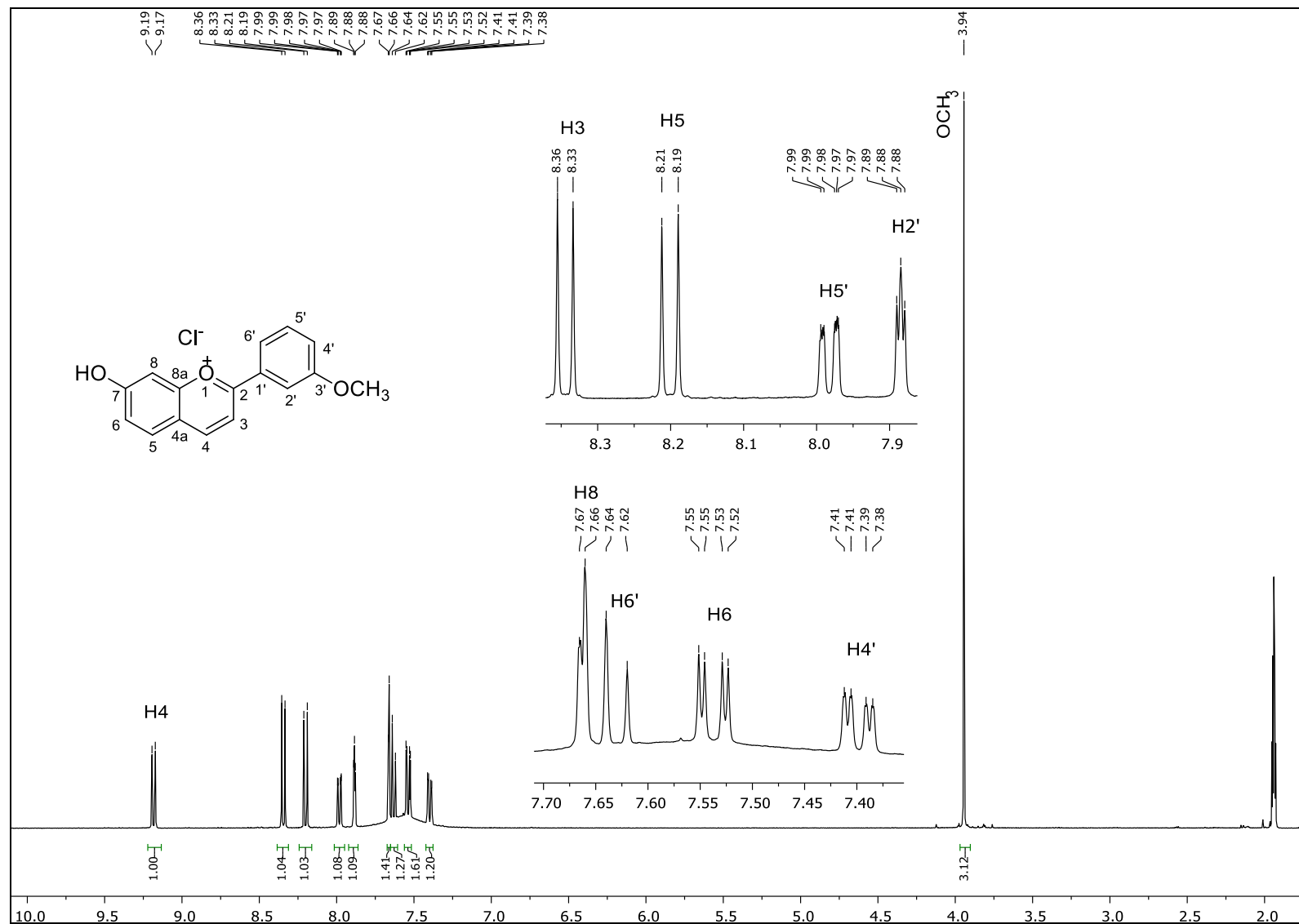
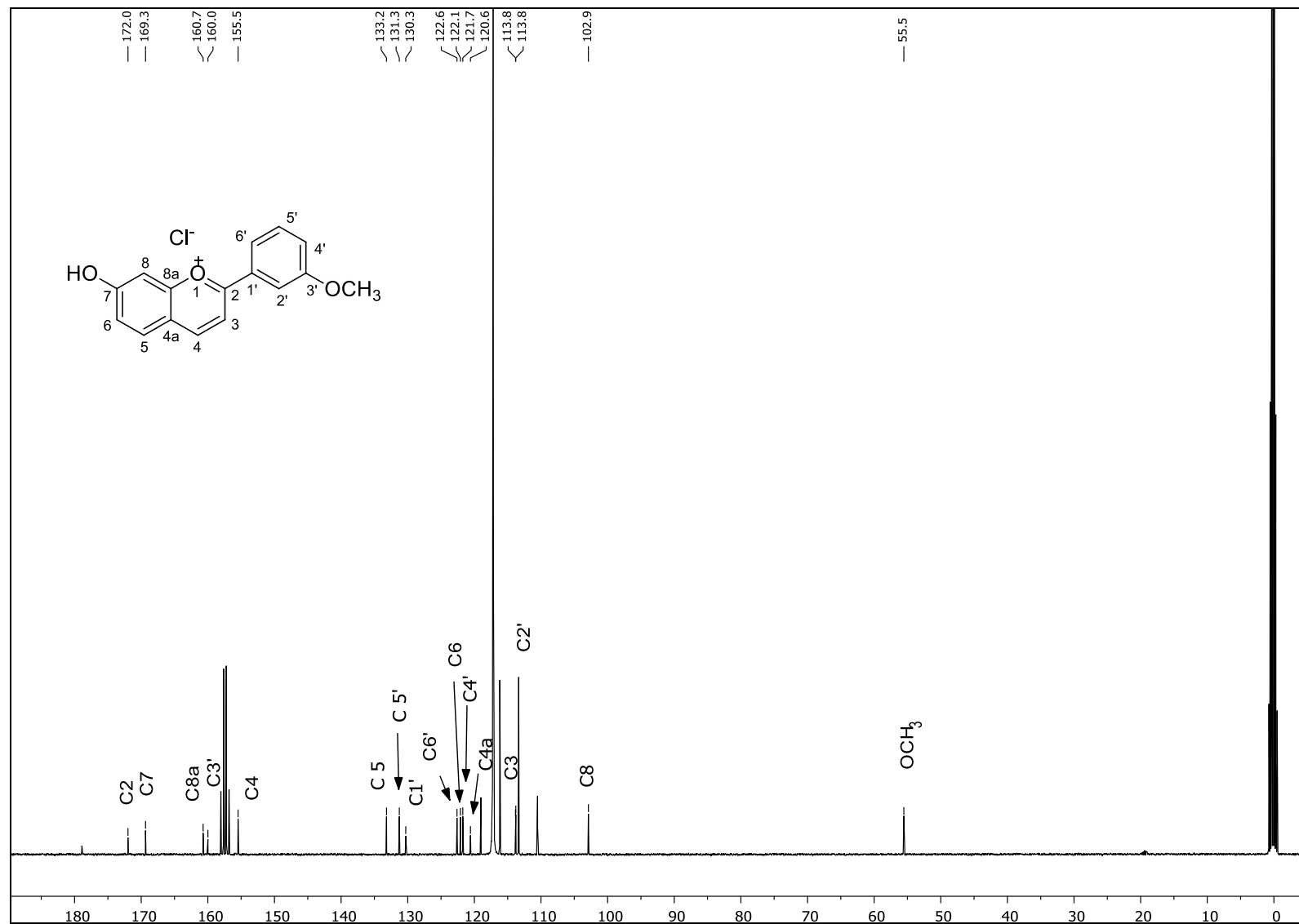


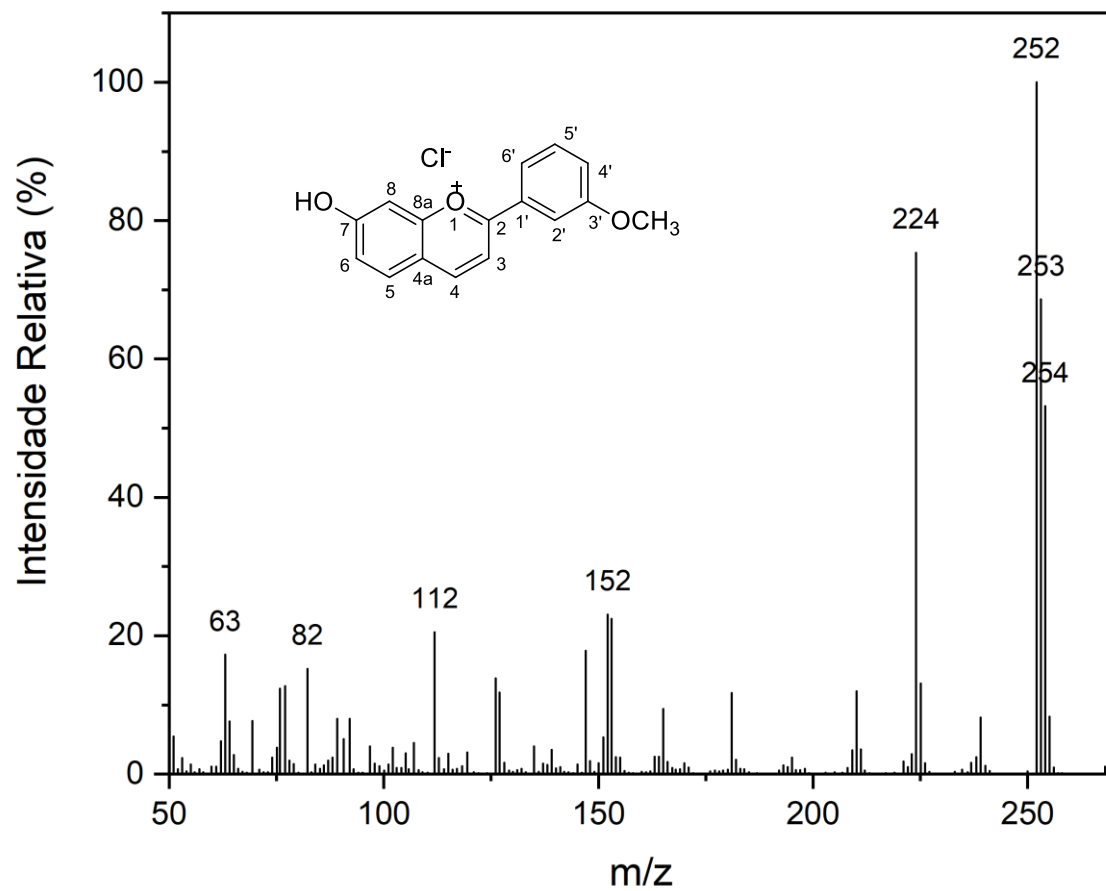
Figura 59. Espectro de infravermelho (IV) do flavílio 13.



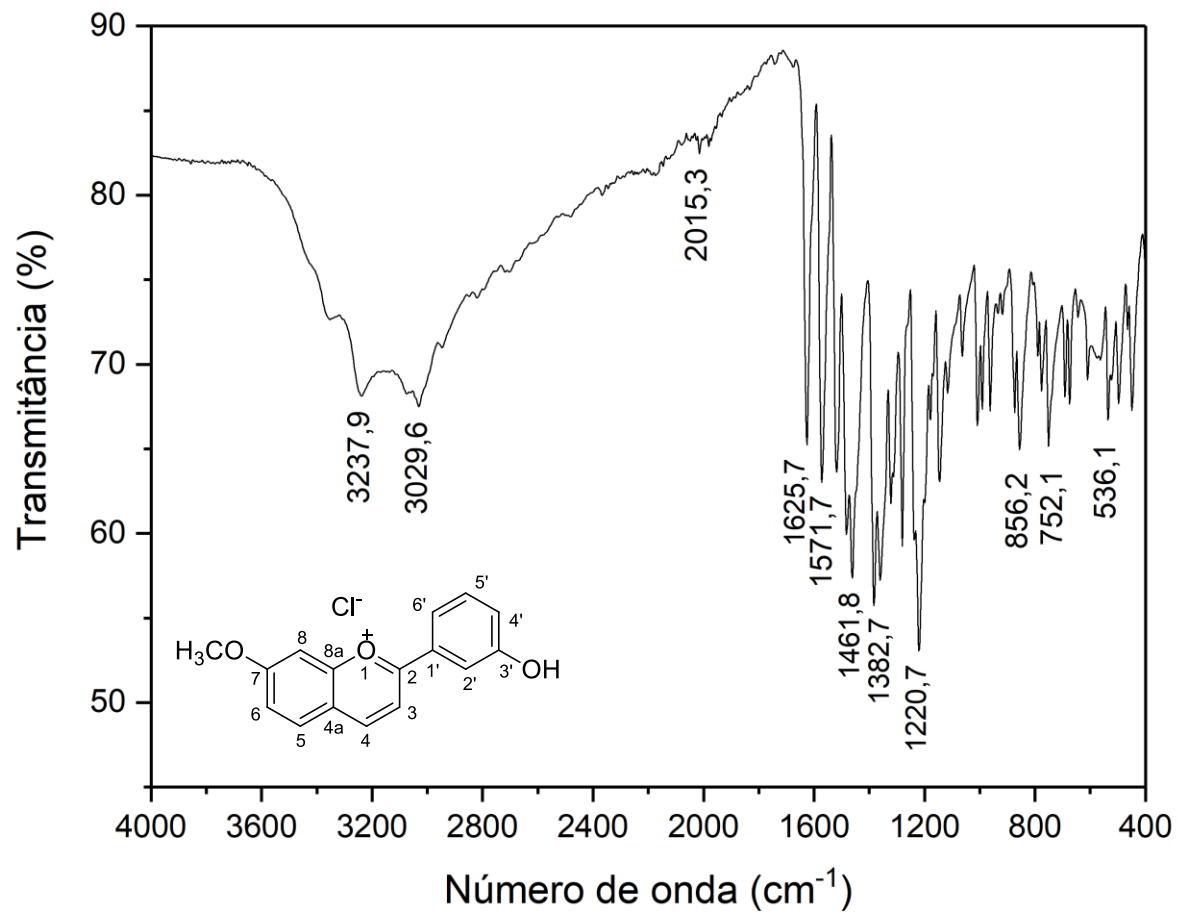
**Figura 60.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H do flavílio **13** (acetonitrila-*d*<sub>3</sub>/TFA, 400 MHz).



**Figura 61.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do flavílio **13** (acetoneitrila- $d_3$ /TFA, 100 MHz).



**Figura 62.** Espectro de massas do flavílio 13.



**Figura 63.** Espectro de infravermelho (IV) do flavílio **14**.

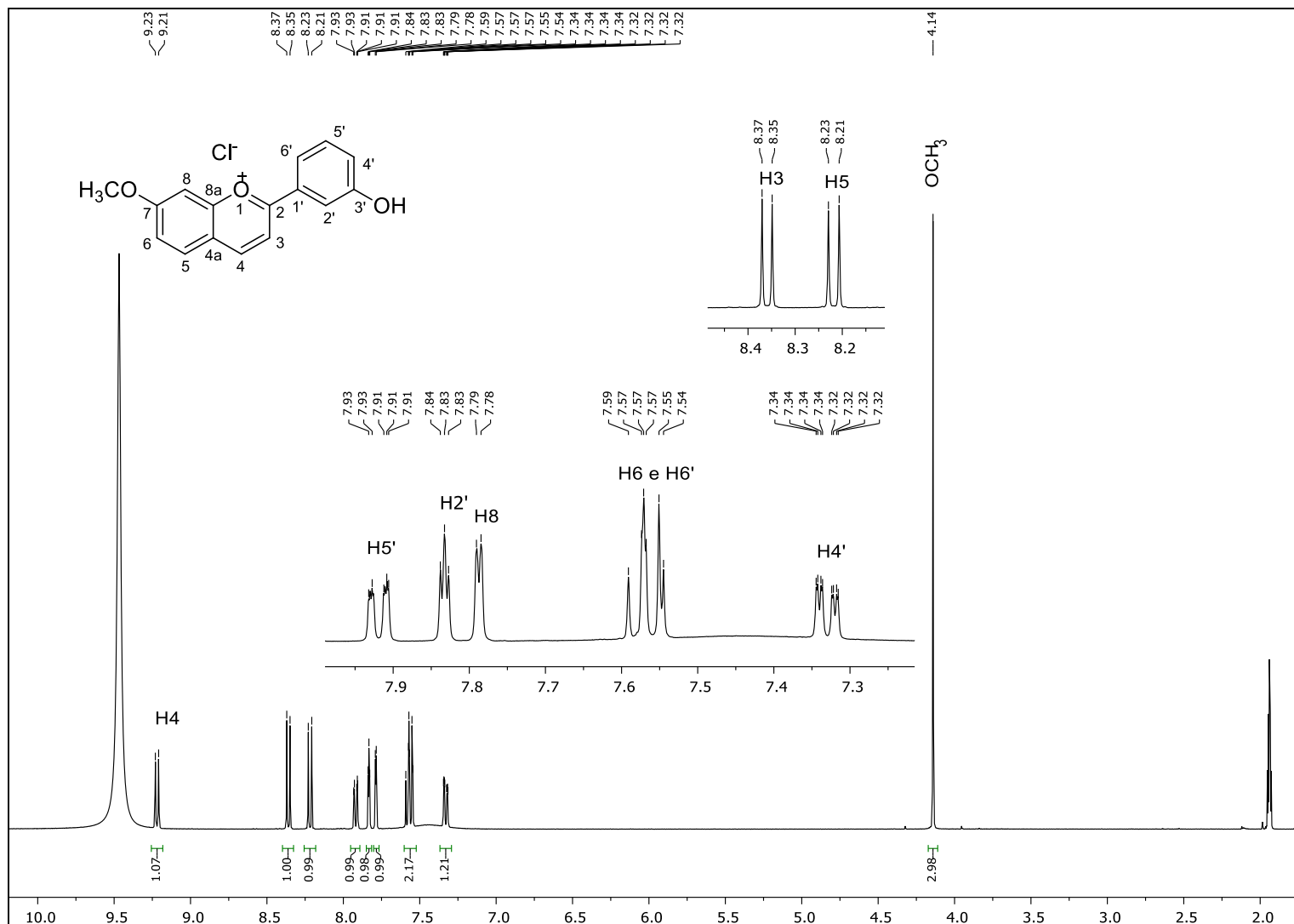
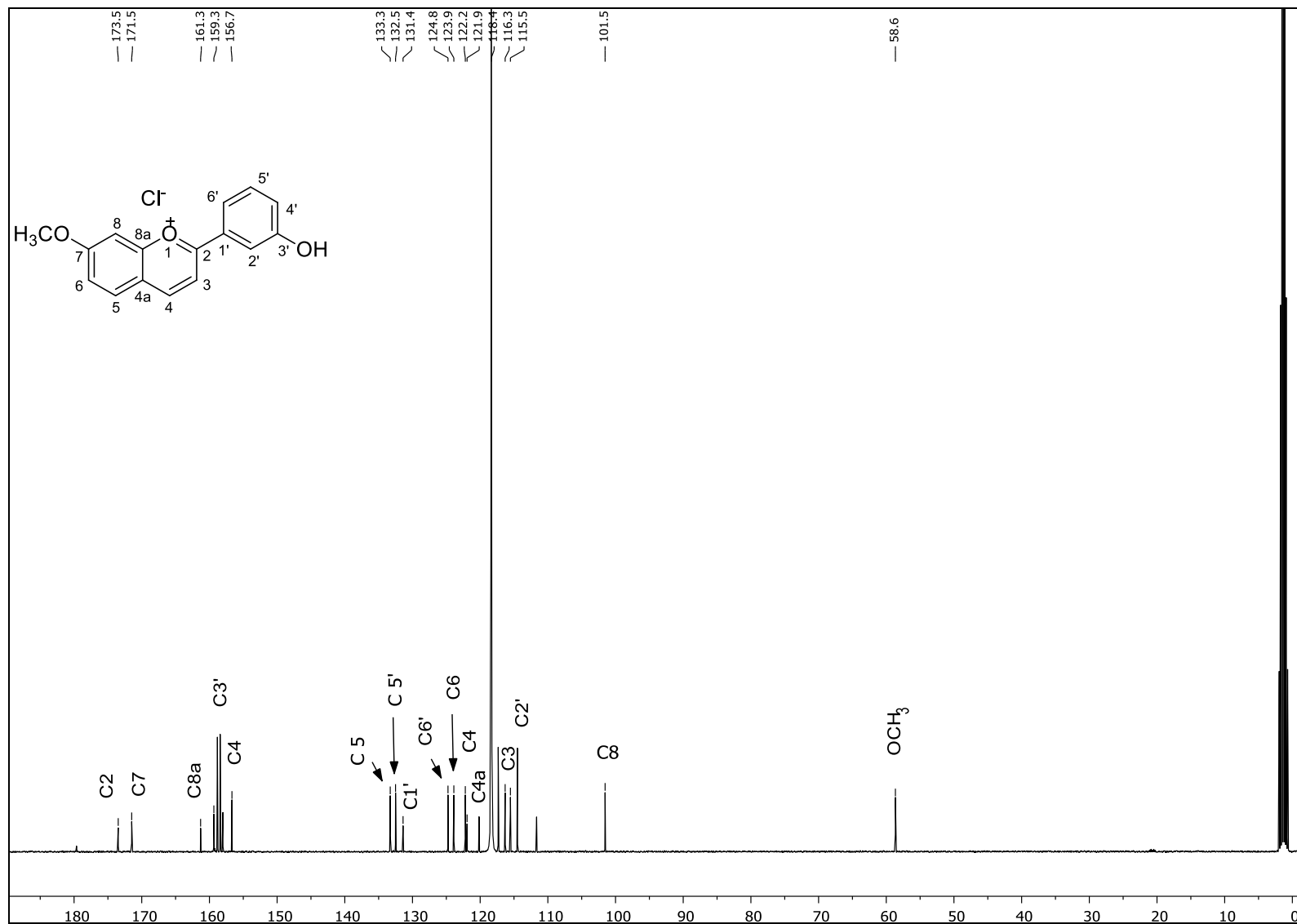
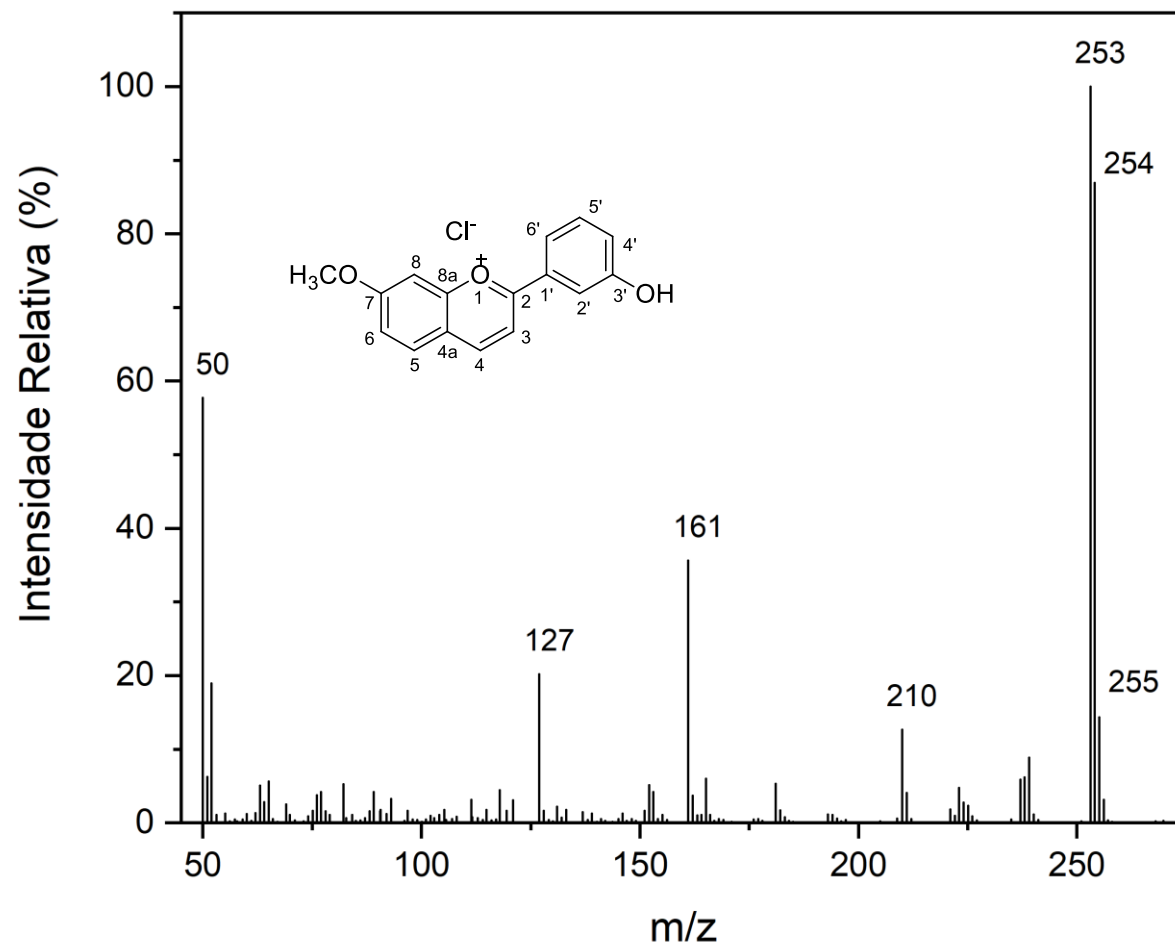


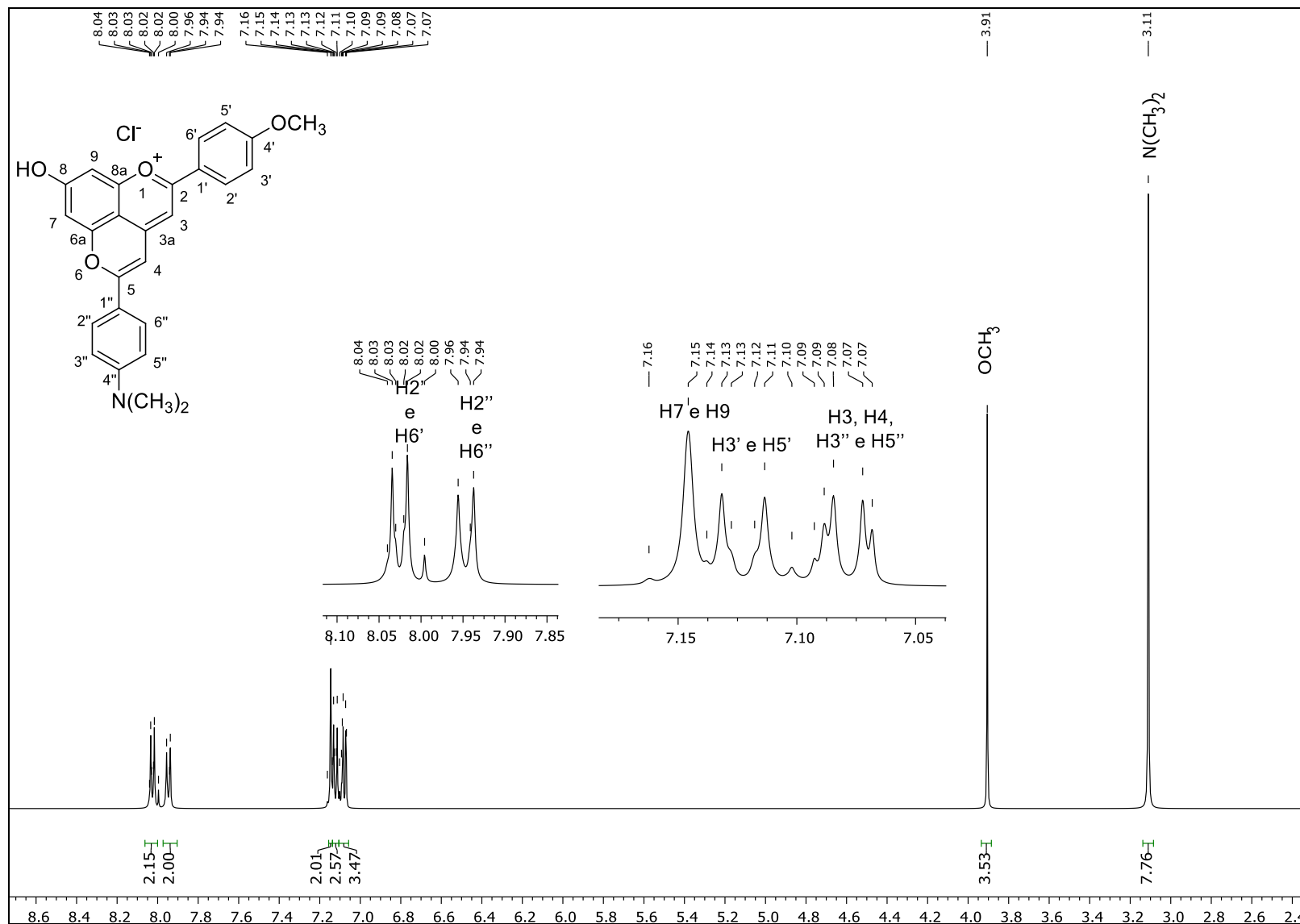
Figura 64. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do flavílio **14** (acetonitrila- $d_3$ /TFA, 400 MHz).



**Figura 65.** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C do flavílio **14** (acetonitrila-*d*<sub>3</sub>/TFA, 100 MHz).



**Figura 66.** Espectro de massas do flavílio 14.



**Figura 67.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do piranoflavílio **15** (acetonitrila- $d_3$ , 500 MHz).