



**EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT AND
ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES OF SYNTHETIC
2-STYRYLCHROMONES**

Ana Maria de Carvalhais Mendes Gomes

Porto, 2009

Ana Maria de Carvalhais Mendes Gomes

**Evaluation of the antioxidant and anti-inflammatory activities of
synthetic 2-styrylchromones**

Tese de candidatura ao grau de Doutor em Química Analítica apresentada à
Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Thesis for obtaining the PhD degree submitted to the Faculty of Pharmacy of the
University of Porto.

Orientadora

Professora Doutora Eduarda das Graças Rodrigues Fernandes (Professora Auxiliar
com Agregação da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto)

Co-Orientador

Professor Doutor José Luís Fontes da Costa Lima (Professor Catedrático da
Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto)

Esta tese foi financiada por uma bolsa de doutoramento (SFRH/BD/23299/2005)
da Fundação para a Ciência e Tecnologia

É autorizada a reprodução integral desta tese apenas para efeitos de investigação, mediante declaração escrita do interessado, que a tal se compromete.

"Só sei que nada sei"

Sócrates

Ao Filipe

Aos meus pais, Elisabete e José

À minha irmã, Teresa, e aos meus sobrinhos, Francisca e Eduardo

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Eduarda Fernandes agradeço, antes de mais, o convite para enveredar neste projecto, dando-me a oportunidade de realizar um sonho antigo que, em tempos, julguei inalcançável. Agradeço o apoio incondicional, os bons conselhos e a liberdade que sempre me deu para trabalhar, sem nunca descurar na atenção e ajuda. Na verdade, a Doutora Eduarda sempre se preocupou em dar-me as ferramentas necessárias para que eu pudesse adquirir uma crescente autonomia. Agradeço também pela confiança que sempre depositou em mim, sem nunca hesitar referi-lo, e pela capacidade que sempre teve de me levantar a moral nos momentos mais complicados. A sua capacidade de trabalho e empenho em tudo o que faz são características que muito admiro e não podia deixar de referir. Mais do que uma orientadora vejo na Doutora Eduarda uma amiga pois não encarou a sua função de uma forma trivial mas, em vez disso, assumiu este projecto com toda a dedicação. Por tudo isto os meus mais sinceros agradecimentos e estima.

Ao Professor Doutor José Luís Costa Lima agradeço o facto de me ter aceitado como aluna de doutoramento no departamento de Química-Física e também por ter aceitado ser meu co-orientador. Agradeço a prontidão com que sempre leu e corrigiu os meus artigos. Já tive a oportunidade de lho dizer pessoalmente mas nunca é demais repetir que as suas brilhantes aulas de mestrado me cativaram e acabaram por traçar o meu percurso no departamento que chefia. Admiro a forma como consegue gerir um departamento tão densamente populado e a forma como contagia os seus alunos com a constante boa disposição e energia que o caracterizam.

À Professora Doutora Beatriz Quinaz Garcia agradeço pela ajuda na realização dos estudos de voltametria cíclica.

Ao Professor Doutor Félix Carvalho agradeço as sugestões e esclarecimento de dúvidas frequentes. Agradeço também o facto de me ter proporcionado a oportunidade de utilizar equipamentos do departamento de Toxicologia, que foram indispensáveis para a execução de alguns trabalhos laboratoriais. Não posso deixar de o elogiar pela sua simpatia e humor inteligente, que tornou mais divertidas as aventuras por terras de Marrocos e da China.

Ao meu colega David Costa, que me acompanhou durante os primeiros tempos do doutoramento, agradeço a camaradagem, a prestabilidade e a amizade.

À minha querida colega e amiga Marisa agradeço, antes de mais, a disponibilidade constante para me ajudar e as discussões produtivas sobre resultados e estratégias e elogio a sua excelente capacidade de trabalhar em equipa. Agradeço a amizade verdadeira, o apoio, a boa companhia dentro e fora da faculdade. Queria demonstrar aqui a sorte que é ter como colega de trabalho uma pessoa tão prestável e fiável como a Marisa.

A todos os colegas do laboratório de Química-Física agradeço o bom ambiente de trabalho que proporcionam e os divertidos convívios fora do laboratório. É um prazer fazer parte de um grupo tão numeroso, barulhento e divertido. Agradeço, em particular, aos colegas que contribuíram para o meu trabalho cedendo-me um pouco do seu sangue: Hugo, Mafalda, Eunice, Joana Ribeiro e Diana (espero não me ter esquecido de ninguém). Agradeço também à Luísa pela ajuda prestada nos ensaios de voltametria cíclica.

À Dona, ou melhor, Engenheira Manuela agradeço a prestabilidade, a paciência e a simpatia constantes.

Ao Ricardo, do departamento de Toxicologia, agradeço a simpática ajuda com a técnica do fEMSA e as dicas sempre oportunas.

Ao João Capela, do departamento de Toxicologia, agradeço os ensinamentos preciosos relativos às culturas celulares.

Aos restantes membros do departamento de Toxicologia agradeço a amabilidade e simpatia. Gostaria de agradecer em particular à Helena Pontes, à Vera e à Renata pela ajuda em diversas ocasiões. Ao Professor Doutor Fernando Remião e à Professora Doutora Helena Carmo agradeço pela paciência com que consentiam as minhas constantes “invasões” ao laboratório.

Ao Filipe, meu marido, melhor amigo e confidente agradeço-lhe pelo incentivo constante. O Filipe é o meu melhor remédio para as quebras de auto-estima, os medos, as incertezas. Dá-me ânimo, segurança e auto-confiança. Para além disso o Filipe tem uma enorme capacidade de trabalho pelo que é também um exemplo para mim. Foi o meu grande apoio nestes quase quatro anos de trabalho. O verdadeiro companheiro.

Aos meus pais, a quem tudo devo, agradeço todas as oportunidades que me proporcionaram ao longo da vida e que me permitem estar hoje aqui. Agradeço o apoio em todas as minhas decisões, o amor, o carinho e a paciência para os meus maus humores. Para além disso agradeço o apoio diário que me tem ajudado, consideravelmente, a dedicar mais tempo ao trabalho.

À minha irmã agradeço o cuidado e paciência que sempre teve comigo. Agradeço-lhe as brilhantes explicações de química e matemática ao longo dos meus tempos de estudante. Não posso também deixar de agradecer pelos meus queridos sobrinhos, Francisca e Eduardo, que já me deu juntamente com o meu cunhado Pedro.

Aos meus avós maternos, Carmen e Alberto, agradeço a enorme participação na minha educação. A minha avó Carmen já não se encontra entre nós mas permanece no meu coração e sempre recordarei a sua doçura, carinho, bons conselhos e amor incondicional. Ao meu avô Alberto, para além de lhe agradecer todo o amor e carinho, destaco o papel que teve em despertar o meu gosto de aprender. Ensinou-me muita coisa, ainda antes de eu ir para a escola, tornando a aprendizagem em algo estimulante e agradável.

À memória da minha avó paterna, Auxiliadora (a “Dó”). Tenho pena de não a ter conhecido melhor mas sei que era uma avó muito carinhosa e amiga.

Por último agradeço a todos os meus familiares e amigos pela sua presença e bons momentos que me proporcionam. Não posso deixar de destacar o meu primo Zé Alberto que é como um irmão para mim.

A todos, obrigada por existirem.

PUBLICAÇÕES

Ao abrigo do nº 2 do artigo 8º do Decreto-Lei nº 388/70, declara-se que fazem parte integrante desta tese os trabalhos abaixo enumerados. Para esses trabalhos, o autor da tese contribuiu maioritariamente na concepção e execução do trabalho experimental, na interpretação dos resultados e na redacção dos manuscritos publicados ou submetidos para publicação.

Artigos publicados em revistas de circulação internacional com arbitragem científica incluídos nesta tese:

- I. **Gomes A**, Fernandes E, Silva AMS, Santos CMM, Pinto DCGA, Cavaleiro JAS, Lima JLFC. 2-Styrylchromones: Novel strong scavengers of reactive oxygen and nitrogen species. *Bioorg Med Chem* 2007; 15 (18): 6027-36.
- II. **Gomes A**, Fernandes E, Lima JLFC, Mira L, Corvo ML. Molecular Mechanisms of Anti-Inflammatory Activity Mediated by Flavonoids. *Curr Med Chem* 2008; 15 (16): 1586-605.
- III. **Gomes A**, Fernandes E, Garcia MBQ, Silva AMS, Pinto DCGA, Santos CMM, Cavaleiro JAS, Lima JLFC. Cyclic voltammetric analysis of 2-styrylchromones. Relationship with the antioxidant activity. *Bioorg Med Chem* 2008; 16 (17): 7939-43.
- IV. **Gomes A**, Fernandes E, Silva AMS, Santos CMM, Pinto DCGA, Cavaleiro JAS, Lima JLFC. Anti-inflammatory potential of 2-styrylchromones regarding their interference with arachidonic acid metabolic pathways. *Biochem Pharmacol* 2009; 78 (2): 171-7.
- V. **Gomes A**, Freitas M, Capela JP, Silva AMS, Pinto DCGA, Santos CMM, Cavaleiro JAS, Fernandes E, Lima JLFC. Inhibition of NF- κ B activation and cytokines production in THP-1 monocytes by 2-styrylchromones. 2009 (Submitted for publication).
- VI. **Gomes A**, Fernandes E, Lima JLFC. Biological activities of 2-styrylchromones. 2009 (Submitted for publication).

Resumos publicados em revistas de circulação internacional com arbitragem científica realizados no âmbito desta tese:

- I. **Gomes A**, Fernandes E, Silva AMS, Santos CMM, Pinto DCGA, Cavaleiro JAS, Lima JLFC. Singlet oxygen scavenging activity by 2-styrylchromones. *Free Radic Res* 2006; 40 (Suppl. 1): S23.
- II. **Gomes A**, Fernandes E, Silva AMS, Santos CMM, Pinto DCGA, Cavaleiro JAS, Lima JLFC. Interactions of 2-styrylchromones with pro-inflammatory enzymes and oxidative species. *Inflamm Res* 2007; 56 (Suppl. 3): S459.
- III. **Gomes A**, Fernandes E, Silva AMS, Santos CMM, Pinto DCGA, Cavaleiro JAS, Lima JLFC. Inhibition of leukotriene B₄ production in human neutrophils by 2-styrylchromones. *Free Radic Res* 2007; 41 (Suppl. 1): S30.

COMUNICAÇÕES

- I. **Gomes A**, Fernandes E, Lima JLFC. Evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activities of synthetic chromones. 4º Encontro do *REQUIMTE*, Fátima, 31 de Março e 1 de Abril 2006 (comunicação em painel).
- II. **Gomes A**, Fernandes E, Silva AMS, Santos CMM, Pinto DCGA, Cavaleiro JAS, Lima JLFC. Singlet oxygen scavenging activity by 2-styrylchromones. 13th Biennial Congress of the International Society for Free Radical Research, Davos, Suíça, 15-19 de Agosto de 2006 (comunicação em painel).
- III. **Gomes A**, Fernandes E, Lima JLFC. Scavenging activity of flavonoids against singlet oxygen. XX Encontro Nacional da Sociedade Portuguesa de Química, Campus da Caparica – FCT/UNL, 14-16 de Dezembro de 2006 (comunicação em painel).
- IV. **Gomes A**, Fernandes E, Lima JLFC. Metodologia de micro-análise para avaliação da actividade captadora de ácido hipocloroso. SPQ-ANALITICA'07, Lisboa, 29-30 de Março de 2007 (comunicação em painel).
- V. **Gomes A**, Fernandes E, Silva AMS, Santos CMM, Pinto DCGA, Cavaleiro JAS, Lima JLFC. Interactions of 2-styrylchromones with pro-inflammatory enzymes and oxidative species. 8th World Congress on Inflammation, 16-20 de Junho de 2007, Copenhaga, Dinamarca (comunicação em painel).
- VI. **Gomes A**, Fernandes E, Silva AMS, Santos CMM, Pinto DCGA, Cavaleiro JAS, Lima JLFC. Inhibition of leukotriene B₄ production in human neutrophils by 2-styrylchromones. SFRR Europe 2007 Meeting, 10-13 de Outubro de 2007, Vilamoura, Portugal (comunicação em painel).
- VII. **Gomes A**, Fernandes E, Garcia MBQ, Silva AMS, Santos CMM, Pinto DCGA, Cavaleiro JAS, Lima JLFC. The ROS and RNS scavenging activity of 2-styrylchromones are effectively reproduced by cyclic voltammetry analysis. AOAC Europe Section International Workshop – Enforcement of European Legislation on Food and Water: Analytical and Toxicological Aspects - e II

Encontro Nacional de Bromatologia, Hidrologia e Toxicologia, Lisboa, 17-18 de Abril de 2008 (comunicação em painel).

- VIII. **Gomes A**, Fernandes E, Garcia MBQ, Silva AMS, Pinto DCGA, Santos CMM, Cavaleiro JAS, Lima JLFC. Cyclic voltammetric analysis of 2-styrylchromones. XXI Encontro Nacional da Sociedade Portuguesa de Química, Porto 11-13 de Junho de 2008 (comunicação em painel).
- IX. **Gomes A**, Fernandes E, Silva AMS, Santos CMM, Pinto DCGA, Cavaleiro JAS, Lima JLFC. Anti-inflammatory potential of 2-styrylchromones regarding their interference with arachidonic acid metabolic pathways. 14th Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research International, Pequim 18-22 de Outubro de 2008 (comunicação em painel).
- X. **Gomes A**, Fernandes E, Silva AMS, Santos CMM, Pinto DCGA, Cavaleiro JAS, Lima JLFC. Novel 2-styrylchromones with high anti-inflammatory potential through prevention of LTB₄ production by human leukocytes, inhibition of COX-1 activity and scavenging of ROS and RNS. 1º Encontro Nacional de Química Terapêutica, Porto 13-15 de Novembro de 2008 (comunicação em painel).

ABSTRACT

Inflammation is the first response of the body to infection, irritation or other injuries. It is an essential process to neutralize aggressor agents and to repair damaged tissues, assuring, this way, the survival of the host. However, it is often uncontrolled in chronic inflammatory and autoimmune diseases, namely rheumatoid arthritis and Crohn's disease, and when it is linked to an allergic response like asthma and anaphylactic shock. Due to the permanent affliction, disability, and, many times, premature death of the millions of patients suffering from these diseases, chronic inflammation is associated with severe socio-economic problems. Unfortunately, the available anti-inflammatory treatments aren't always sufficiently effective and frequently present numerous and severe side effects especially in long-term use. Thus, there is an increasing interest in the search for new molecules with improved activities and better safety profiles.

2-Styrylchromones (2-SC) are chromone derivatives characterized by the attachment of a styryl group to the C2-position of the chromone structure. Although scarce in nature, with only three natural derivatives known, 2-SC have been demonstrated to bear important biological activities, most of them revealed in studies with synthesized derivatives. Indeed, compounds from this family exhibited antiallergic, antitumor, affinity and selectivity for A₃ adenosine receptors, antiviral, and antioxidant properties. Due to their structural similarity with flavones (2-phenylchromones), it is expected that 2-SC are also endowed with anti-inflammatory activity since a large number of studies show the effectiveness of flavones, as well as other flavonoids, in reducing inflammatory markers by interfering, through diverse mechanisms, in inflammatory processes. Thus, the general aim of this dissertation was to assess the anti-inflammatory potential of a series of 2-SC.

The first experimental approach in the scope of this dissertation was to evaluate the scavenging activity against reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) of 2-SC. There is a considerable possibility that anti-inflammatory agents act, in part, as antioxidants since there are many evidences that an overgeneration of ROS and RNS occurs during inflammatory processes, contributing to the tissue damage. Some of the studied compounds proved to be extremely efficient scavengers of the different ROS and RNS, showing, in some cases, IC₅₀s below 1 μM. The hydroxylation pattern of 2-SC, especially in the B-ring but also in the A-ring, modulates the activity of these compounds, the 3',4'-dihydroxy derivatives being the most effective scavengers. By comparing the potency of 2-SC with structural-similar flavonoids it became clear that the styryl pattern also contributes to the observed antioxidant activity. A second experimental approach was performed in order to understand the mechanism of the scavenging activity of 2-SC through

the study of their electrochemical behaviour by cyclic voltammetry. The obtained results could be correlated with those of the scavenging assays, that is, higher scavenging effects corresponded to lower values of oxidation potentials, with significant correlation coefficients. Thus, in this family of compounds, oxidation potentials obtained by cyclic voltammetry seem to be applicable as a general indicator of radical scavenging activity.

One of the most studied mechanisms in the anti-inflammatory therapeutics is the inhibition of arachidonic acid metabolism by the enzymes cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2. In addition, the 5-lipoxygenase (LOX) pathway of arachidonic acid metabolism is generating an increasing interest. Thus, the third experimental work included in this dissertation consisted in evaluating the COX-1 and COX-2 inhibitory capacity of 2-SC as well as the effect of these compounds on the leukotriene (LT)₄ production by stimulated human polymorphonuclear leukocytes (PMNL). Some of the tested 2-SC were able to inhibit both COX-1 activity and LTB₄ production, which makes them dual inhibitors of the COX and 5-LOX pathways. The most effective compounds in this study were those having structural moieties with proved antioxidant activity, such as 3',4'-dihydroxy and 4'-hydroxy substituents. The mechanism by which 2-SC inhibit the production of LTB₄ probably involves the inhibition of the enzyme 5-LOX, whereas the inhibition of COX-1 by these compounds is likely to consist in the scavenging of the radical intermediates involved in COX enzyme catalysis.

Nuclear factor kappa B (NF- κ B) is one of the most important inducible transcription factors whose modulation triggers a cascade of signaling events, some of which are potential key targets for intervention in the treatment of inflammatory conditions. Thus, the research of the anti-inflammatory potential of 2-SC was continued by the study of the inhibition of NF- κ B activation stimulated by lipopolysaccharide (LPS) in a monocytic cell line (THP-1). Three of the tested 2-SC were able to significantly inhibit NF- κ B activation. The effective compounds were then elected to be further evaluated on their inhibitory effects in the LPS-induced production of pro-inflammatory cytokines [tumour necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , IL-6, and IL-8] in THP-1 cells. All the three compounds were able to reduce the production of TNF- α and IL-6, two of them reduced the production of IL-1 β , and the most effective of all also reduced the production of IL-8.

In conclusion, the research developed in the scope of the present dissertation demonstrated the anti-inflammatory capacity of some of the tested 2-SC and allowed to establish important structure-activity relationships. The compound 3',4',5-trihydroxy-2-styrylchromone (**1C**) stood up as the most promising of the tested 2-SC due to its constant effectiveness in the different performed studies. We believe, therefore, that this compound is worthy be used in further pre-clinical experiments and clinical trials as a potential anti-inflammatory drug.

RESUMO

A inflamação é a primeira resposta do organismo à infecção, irritação e outras lesões. É um processo essencial para neutralizar os agentes agressores e para reparar os tecidos danificados, assegurando assim a sobrevivência do hospedeiro. No entanto, este processo torna-se, por vezes, descontrolado, como acontece em doenças inflamatórias e auto-imunes crónicas, nomeadamente a artrite reumatóide e a doença de Crohn, ou quando está associado a respostas alérgicas como na asma ou no choque anafilático. Devido ao sofrimento permanente, incapacidade e, muitas vezes, morte prematura de milhões de pacientes que sofrem destas doenças, a inflamação crónica está associada a graves problemas sócio-económicos. Infelizmente, os tratamentos anti-inflamatórios existentes nem sempre são suficientemente eficazes e muitas vezes apresentam efeitos secundários numerosos e graves especialmente quando utilizados a longo prazo. Assim, tem havido um crescente interesse na procura de novas moléculas com maior actividade e melhores perfis de segurança.

As 2-estirilcromonas (2-SC) são derivados de cromonas caracterizados pela existência de um grupo estiril ligado à posição C2 da estrutura cromona base. Embora raras na natureza, com apenas três derivados naturais conhecidos, as 2-SC têm demonstrado possuir importantes actividades biológicas, a maioria delas revelada em estudos efectuados com derivados de síntese. Na verdade, os compostos desta família já exibiram propriedades anti-alérgicas, anti-tumorais, de afinidade e selectividade para os receptores de adenosina A₃, antivirais e anti-oxidantes. Devido à sua semelhança estrutural com as flavonas (2-fenilcromonas), é esperado que as 2-SC sejam também capazes de exercer efeito anti-inflamatório dado que um vasto número de estudos demonstra a eficácia das flavonas, bem como de outros flavonóides, para reduzir marcadores da inflamação pela interferência, por diversos mecanismos, no processo inflamatório. Assim, o objectivo geral desta tese foi o de estudar o potencial anti-inflamatório de uma série de 2-SC.

A primeira abordagem experimental efectuada no âmbito desta tese foi avaliar a actividade captadora de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e espécies reactivas de azoto (RNS) por 2-SC. Existe uma possibilidade considerável de que os agentes anti-inflamatórios actuem, em parte, como antioxidantes, já que há várias evidências de que durante o processo inflamatório ocorre uma geração acentuada de ROS e RNS, contribuindo para os danos tecidulares. Alguns dos compostos estudados provaram ser captadores extremamente eficientes de diferentes ROS e RNS, demonstrando, nalguns casos, IC₅₀s abaixo de 1 µM. O padrão de hidroxilação das 2-SC, especialmente no anel B mas também no anel A, define a actividade destes compostos, sendo que os derivados

3',4'-di-hidroxi se apresentam como os captadores mais eficazes. Comparando a potência das 2-SC com flavonóides estruturalmente semelhantes tornou-se claro que o grupo estiril também contribui para a actividade antioxidante observada. Uma segunda abordagem experimental foi realizada de forma a perceber o mecanismo inerente à actividade captadora das 2-SC através do estudo das suas propriedades electroquímicas por voltametria cíclica. Os resultados obtidos neste estudo puderam ser correlacionados com os obtidos nos estudos de actividade captadora, isto é, elevados efeitos captadores corresponderam a baixos valores de potencial de oxidação, com coeficientes de correlação significativos. Assim, nesta família de compostos, os potenciais de oxidação obtidos por voltametria cíclica parecem ser aplicáveis como indicadores gerais da actividade captadora de radicais.

Um dos mais estudados mecanismos na terapêutica anti-inflamatória é o da inibição do metabolismo do ácido araquidónico pelas enzimas ciclo-oxigenase (COX)-1 e COX-2. Para além disso, o percurso metabólico do ácido araquidónico por acção da 5-lipoxigenase (5-LOX) tem gerado um interesse crescente. Assim, o terceiro trabalho experimental incluído nesta tese consistiu em avaliar a capacidade de inibição das enzimas COX-1 e COX-2 por 2-SC bem como o efeito deste compostos na produção de leucotrieno (LT)-B₄ por leucócitos polimorfonucleares humanos (PMNL). Alguns dos compostos testados foram capazes de inibir quer a actividade da COX-1, quer a produção de LTB₄, o que faz deles duplos inibidores dos percursos da COX e 5-LOX. Os compostos mais eficazes foram aqueles que possuem fracções estruturais com comprovada actividade anti-oxidante, tais como os substituintes 3',4'-di-hidroxi e 4'-hidroxi. O mecanismo pelo qual as 2-SC inibem a produção de LTB₄ envolve, provavelmente, a inibição da enzima 5-LOX, enquanto que a inibição da actividade da COX-1 por estes compostos consiste, presumivelmente, na capturação de intermediários radicalares envolvidos na catálise enzimática da COX.

O factor nuclear kapa B (NF-κB) é um dos mais importantes factores de transcrição indutíveis cuja modulação desencadeia trajectos de sinalização, sendo alguns deles potenciais elementos chave para intervenção no tratamento de doenças inflamatórias. Assim, a pesquisa do potencial anti-inflamatório das 2-SC continuou pelo estudo de inibição da activação do NF-κB estimulada por lipopolissacarídeo (LPS) numa linha celular monocítica (THP-1). Três das 2-SC testadas foram capazes de inibir significativamente a activação do NF-κB. Os compostos eficazes foram seguidamente eleitos para uma posterior avaliação dos efeitos inibidores da produção de citocinas pró-inflamatórias [factor de necrose tumoral (TNF)-α, interleucina (IL)-1β, IL-6 e IL-8] induzida por LPS em células THP-1. Os três compostos foram capazes de reduzir a produção de TNF-α e IL-6, dois deles reduziram a produção de IL-1β, e o mais eficaz reduziu também a produção de IL-8.

Em conclusão, a pesquisa desenvolvida no âmbito desta tese demonstrou a capacidade anti-inflamatória de algumas das 2-SC testadas e permitiu estabelecer relações estrutura-actividade importantes. O composto 3',4',5-tri-hidroxi-2-estirilcromona (1C) revelou-se como o mais promissor dos compostos testados devido à constante eficácia demonstrada nos diferentes estudos realizados. Acreditamos, assim, que este composto deverá ser testado em futuros ensaios pré-clínicos e clínicos como potencial fármaco anti-inflamatório.

INDEX

AGRADECIMENTOS	vii
PUBLICAÇÕES	x
COMUNICAÇÕES	xii
ABSTRACT	xiv
RESUMO	xvi
INDEX	xix
INDEX OF FIGURES	xxi
INDEX OF TABLES	xxv
ABBREVIATIONS LIST	xxvii
OUTLINE OF THE DISSERTATION	xxx

CHAPTER I. GENERAL INTRODUCTION

I.1. Theoretical background.....	1
I.1.1. 2-Styrylchromones: chemistry and biological activities	2
<i>I.1.1.1. Antiallergic activity</i>	3
<i>I.1.1.2. Antitumor activity</i>	4
<i>I.1.1.3. Affinity and selectivity for A₃ adenosine receptors</i>	7
<i>I.1.1.4. Antiviral activity</i>	8
<i>I.1.1.5. Antioxidant activity</i>	9
References	13
I.1.2. Molecular mechanisms of anti-inflammatory activity mediated by flavonoids ...	15
I.2. General and specific objectives of the dissertation	36

CHAPTER II. ORIGINAL RESEARCH

II.1. 2-Styrylchromones: Novel strong scavengers of reactive oxygen and nitrogen species	39
II.2. Cyclic voltammetric analysis of 2-styrylchromones. Relationship with the antioxidant activity	50
II.3. Anti-inflammatory potential of 2-styrylchromones regarding their interference with arachidonic acid metabolic pathways.....	56
II.4. Inhibition of NF- κ B activation and cytokines production in THP-1 monocytes by 2-styrylchromones	64

CHAPTER III. DISCUSSION AND CONCLUSIONS

III.1. Integrated discussion of the performed studies.....	85
III.2. Conclusions.....	94
References	95

INDEX OF FIGURES

Chapter I

I.1.1.

Figure 1: Molecular scaffold of 2-styrylchromones.....	2
Figure 2: Chemical structures of the 2-styrylchromone natural derivatives: hormothamnione (1), 6-desmethoxyhormothamnione (2), and 5-hydroxy-2-styrylchromone (3).	2
Figure 3: Chemical structures of 2-styrylchromones studied for antiallergic activity.	4
Figure 4: Chemical structures of 2-styrylchromones studied for antitumor activity.	5
Figure 5: Chemical structures of 2-styrylchromones studied for antitumor activity. (A) Analogues modified in the B-ring. (B) Analogues modified in the A-ring.....	6
Figure 6: Chemical structures of 2-styrylchromones studied for affinity and selectivity for A ₃ adenosine receptors.	8
Figure 7: Chemical structures of 2-styrylchromones studied for antiviral activity.	9
Figure 8: Chemical structures of 2-styrylchromones studied for antioxidant activity.	11

I.1.2

Figure 1: Chemical structure of 2-hydroxychalcone.	16
Figure 2: Flavones, flavonols and flavanones.	17
Figure 3: Isoflavones, flavan-3-ols and anthocyanidins.....	18
Figure 4: Neoflavonoids, prenylated flavonoids and biflavonoids.....	19
Figure 5: Possible metabolic routes for flavonoids after oral ingestion. Flv, flavonoid aglycones; Flv-gly, flavonid glycosides; Flv-sulf, flavonoid sulfates; Flv-glc, flavonoid glucuronates; Flv-me, flavonoid methylates; PhA, phenolic acids; LPH, lactase phloridzin hydrolase; BS β G, broad-specific β -glucosidase; SGLT1, sodium-dependent glucose transporter 1; MRP, multidrug resistance-associated proteins; UDP-GT, uridine diphosphate-glucuronosyltransferases; SULT, sulfotransferases; COMT, catechol-O-methyl transferases, CYP450, cytochrome P450.....	20

Figure 6: Structural features responsible for the effective free radical scavenging by flavonoids (in bold).....	24
Figure 7: Possible binding sites for trace metal ions (M^{n+}) to flavonoids (in bold).....	25
Figure 8: Flavonoids targets in the modulation of the inflammatory response. Inflammatory stimuli induce inflammation by different pathways. Arachidonic acid is released by PLA ₂ and further metabolized by the COX and LOX pathways in different eicosanoids some of which being responsible for inflammatory responses e.g., PGE ₂ , 5-HETE, LTB ₄ and LTC ₄ . On the other hand, protein kinases regulate transcription factors such as CREB, AP-1, NF- κ B, and C/EBP that modulate the expression of pro-inflammatory markers such as COX-2, iNOS, TNF- α , IL-1 β , and IL-6.	27

Chapter II

II.1.

Figure 1: Chemical structures of the studied 2-styrylchromones and flavonoids.	41
--	----

II.2.

Figure 1: Cyclic voltammograms of compounds 1B , 2A and 3A in pH 7.4 phosphate buffer. Scan rate 100 mV s ⁻¹	52
Figure 2: Cyclic voltammograms of compound 1A in pH 7.4 phosphate buffer: (—) scan inversion at 1.0 V versus Ag/AgCl; (- - -) scan inversion at 0.4 V versus Ag/AgCl. Scan rate 100 mV s ⁻¹	52
Figure 3: (a) Mechanism of oxidation of catechol-like compounds. (b) Proposed oxidation mechanism of 2-styrylchromones.....	53

II.3.

Figure 1: Metabolism of arachidonic acid by the cyclooxygenase and 5-lipoxygenase pathways. *5-Lipoxygenase-activating protein.....	58
Figure 2: Chemical structures of the tested 2-SC.....	59

Figure 3: Inhibition of human PMNL production of LTB₄ by 2-SC (25 μM) and NDGA (1 μM) determined by EIA. Each value represents mean±SEM of at least 4 experiments performed in duplicate. ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05, significantly different from control. 60

Figure 4: Inhibition of COX-1 activity by 2-SC, determined by EIA. Each value represents mean±SEM at least 4 experiments performed in duplicate. ***P<0.001, *P<0.05, significantly different from control..... 60

Figure 5: Reducing activity of 2-SC and ascorbic acid (AA). All the compounds were tested at the final concentration of 25 μM. Each value represents mean ± SEM of triplicate measurements. ***P<0.001, *P<0.05, significantly different from control. 60

Figure 6: UV-vis absorption spectrum of 10 μM of compounds 1A, 1B, 1C, and 1D in the presence of 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, and 16 μM of Fe(II), in 20 mM phosphate buffer, pH 7.2. The direction of the arrows indicates crescent amounts of Fe(II). Insets: titration curves..... 61

II.4.

Figure 1: Chemical structures of the tested 2-SC..... 72

Figure 2: Inhibition of LPS-induced NF-κB activation in THP-1 cells by 2-SC (**1A-1D**, **2A-2D**, **3A-3D**). Each bar represents the percentage of reduction of p-50-dependent chemiluminescence signal relatively to control. The compounds were tested at the concentration of 50 μM, except where otherwise indicated. The control represents LPS-stimulated cells with DMSO. Each value represents mean±SEM of four experiments. ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05, significantly different from control..... 73

Figure 3: Inhibition of LPS-induced production of TNF-α, IL-1β, IL-6, and IL-8 in THP-1 cells by 2-SC (**1C**, **2C**, and **2D**). Each bar represents the percentage of reduction of the respective cytokine/chemokine-dependent absorption at 450 nm relatively to control. The compounds were tested at the concentration of 50 μM. The control represents LPS-stimulated cells with DMSO. Each value represents mean±SEM of three experiments. ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05, significantly different from control..... 74

Figure 4: LPS-induced NF-κB activation. The interaction of TLR4 with Nox4 and the subsequent production of ROS are key steps in the NF-κB activation. The possible role of another Nox enzyme is indicated. The NF-κB activation mediated by TLR4 follows the classical pathway: IKK-dependent IκBα phosphorylation (P) on Ser32 and Ser36, which induces ubiquitination (ub) and degradation of the inhibitory protein by the proteasome,

thus allowing NF- κ B to migrate into the nucleus and transactivate inflammatory genes.
 NEMO, NF- κ B essential modulator (also called IKK γ). Adapted from [33]. 75

Chapter III

Figure 1: ROS and RNS produced in the event of inflammatory processes (those which were shown to be scavenged by **1C** are detached in blue). For details about the generation of ROS and RNS during inflammatory processes please consult Section II.1.. O₂^{•-}, superoxide radical; H₂O₂, hydrogen peroxide; SOD, superoxide dismutase; HO[•], hydroxyl radical; HOCl, hypochlorous acid; ¹O₂, singlet oxygen; MPO, myeloperoxidase; R[•], carbon radical; RO[•], alkoxyl radical; ROO[•], peroxy radical; ROOH, hydroperoxide; iNOS, inducible nitric oxide synthases; •NO, nitric oxide; ONOO⁻, peroxynitrite; •NO₂, nitrogen dioxide radical; ONOOCO₂⁻, nitrosoperoxy carbonate anion; CO₃^{•-}, carbonate radical. Adapted from [48]. 91

Figure 2: Arachidonic acid metabolism by the COX and 5-LOX pathways (the blue arrows point to the molecules affected by compound **1C**). For details about the arachidonic acid metabolic pathway please consult Section II.3.. PLA₂, phospholipase A₂; FLAP, 5-lipoxygenase-activating protein; 5-HPETE, 5(S)-hydroperoxy-6,8,11,14-eicosa-tetraenoic acid; 5-HETE, 5(S)-hydroxy-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid; 5-oxo-HETE, 5-oxo-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid. 92

Figure 3: Classical pathway of NF- κ B activation (the blue arrows point to the molecules affected by compound **1C**). For details about the NF- κ B activation please consult Section II.4.. NEMO, NF- κ B essential modulator (also called IKK γ); IKK, I κ B kinase; p, phosphate; ub, ubiquitin. Adapted from [49]. 93

INDEX OF TABLES

Chapter I

I.1.1

Table 1: Summary of the most effective 2-styrylchromones in the studied biological activities. ¹When several compounds were active only the most potent are referred..... 12

I.1.2

Table 1: Prevailing flavonoids in food. 20

Table 2: Summary of in vivo anti-inflammatory effects of flavonoids. 32

Chapter II

II.1

Table 1: O₂⁻, H₂O₂, HOCl and ¹O₂ scavenging activities (IC₅₀, mean ± SE) of the studied 2-styrylchromones, flavonoids and positive controls. 42

Table 2: ROO[•] scavenging activity of the tested 2-styrylchromones and flavonoids expressed as ORAC values (mean±SE). 43

Table 3: •NO and ONOO⁻ (with and without 25 mM NaHCO₃) scavenging activities (IC₅₀, mean ± SE) of the studied 2-styrylchromones, flavonoids and positive controls. 44

II.2

Table 1: Chemical structures and oxidation potentials of the tested 2-styrylchromones and flavonoids. 52

Table 2: ROS and RNS scavenging activity by 2-SC¹⁰. 53

Table 3: Correlations between the Ep_{ox} and the scavenging activity against ROS and RNS of the tested 2-SC¹⁰. 54

II.3

Table 1: Pearson correlations between the inhibition of LTB₄ production and the reducing activity and between the LTB₄ production and the scavenging activity against ¹O₂ (IC₃₀) and ONOO⁻ (with and without bicarbonate) (IC₅₀) [24] of the tested 2-SC.

*significant at p < 0.05; **significant at p < 0.01. a) without bicarbonate; b) with bicarbonate.62

ABBREVIATIONS LIST

AAPH, α,α' -azodiisobutyramidine dihydrochloride
ANOVA, one-way analysis of variance
AP-1, activator protein-1
AUC, area under the curve
BDE, bond dissociation energy
 $\text{CO}_3^{\cdot-}$, carbonate radical
COX, cyclooxygenase
COXIB, COX-2 selective inhibitor
DAF-2, 4,5-diaminofluorescein
DAF-2T, triazolofluorescein
DHR, dihydrorhodamine 123
DMSO, dimethyl sulfoxide
DTPA, diethylenetriamine pentaacetic acid
EDTA, ethylenediamine tetraacetic acid
EGTA, ethylene glycol tetraacetic acid
EIA, enzyme immunoassay
ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay
 $E_{p_{ox}}$, oxidation potential
FBS, fetal bovine serum
FLAP, 5-lipoxygenase activating protein
GSH, reduced glutathione
GSSG, oxidized glutathione
 H_2O_2 , hydrogen peroxide
HBSS, Hanks' balanced salt solution
5-HETE, 5(S)-hydroxy-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid
 HO^{\cdot} , hydroxyl radical
HOCl, hypochlorous acid
5-HPETE, 5(S)-hydroperoxy-6,8,11,14-eicosa-tetraenoic acid
HRV, human rhinovirus
 IC_{50} , half maximal inhibitory concentration
 $\text{I}\kappa\text{B}$, inhibitor of NF- κB
IKK, $\text{I}\kappa\text{B}$ kinase
IL, interleukin
 I_p , peak current
IP, ionization potential

LHD, lactate dehydrogenase
LDL, low density lipoproteins
LOX, lipoxygenase
LPS, lipopolysaccharide
LT, leukotriene
MPO, myeloperoxidase
NADH, β -nicotinamide adenine dinucleotide (reduced form)
NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form)
NBT, nitroblue tetrazolium chloride
NDGA, nordihydroguaiaretic acid
NDPO₂, disodium 3,3'-(1,4-naphthalene)bispropionate
NF- κ B, nuclear factor kappa B
 \cdot NO, nitric oxide
 \cdot NO₂, nitrogen dioxide radical
NOC-5, 3-(aminopropyl)-1-hydroxy-3-isopropyl-2-oxo-1-triazene
NOS, nitric oxide synthases
Nox, NADPH oxidase
NSAID, non-steroidal anti-inflammatory drug
¹O₂, singlet oxygen
O₂^{•-}, superoxide radical
ONOO⁻, peroxy nitrite anion
ONOOCO₂⁻, nitrosoperoxycarbonate anion
ORAC, oxygen radical absorbance capacity
5-oxo-EETE, 5-oxo-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid
PG, prostaglandin
PMNL, polymorphonuclear leukocytes
PMS, phenazine methosulfate
RNS, reactive nitrogen species
ROO[•], peroxy radical
ROS, reactive oxygen species
RPMI, Roswell Park Memorial Institute
2-SC, 2-styrylchromones
SOD, superoxide dismutase
t-BHP, *tert*-butylhydroperoxide
TLR, toll-like receptor
TNF, tumor necrosis factor
TXA₂, thromboxane A₂

XO, xanthine oxidase

OUTLINE OF THE DISSERTATION

The present dissertation is structured in three main chapters:

Chapter I – General introduction

This chapter is divided in two sections:

I.1. Theoretical background

This section is divided in two subsections. The first subsection (I.1.1) consists in a summary of the biological activities of 2-SC known before the original research performed in the ambit of the present dissertation, with reference to the most relevant chemical structures. The second subsection (I.1.2) is a review article about flavonoids and their anti-inflammatory properties, *in vitro* and *in vivo*. Although the original research performed in the scope of this dissertation was not directed to flavonoids, this group of compounds presents significant structural similarities with 2-SC. Thus, we believe that the compilation of the existent knowledge about the role of flavonoids in inflammation helped to choose the most appropriate approach to follow in the study of 2-SC's anti-inflammatory potential and to interpret the results obtained. In this article, an overview about the inflammatory process is also given.

I.2. General and specific objectives of the dissertation

The general and specific objectives of the dissertation are provided in this section.

Chapter II – Original research

This chapter is divided in four sections corresponding to published (II.1., II.2., II.3.) and submitted (II.4.) original manuscripts, which resulted from experimental studies designed to answer the questions that derived from the general and specific objectives of this thesis.

Chapter III – Discussion and Conclusions

This chapter is divided in two sections, the first consisting in an integrated discussion of the performed studies and the second in the general conclusions of the dissertation.