

Resumo

Os flavonoides constituem um vasto grupo de compostos de origem natural com uma diversidade de formas estruturais, possuindo diferentes padrões de substituição, nomeadamente a prenilação. Estes produtos naturais, bem como os seus derivados prenilados têm vindo a atrair a atenção da comunidade científica devido à sua ampla variedade de propriedades biológicas, destacando-se entre estas a atividade antitumoral. Com o objetivo de melhorar a atividade antitumoral e de estudar qual a influência da prenilação do núcleo flavonoide sobre esta atividade, propusemo-nos obter flavonoides prenilados com atividade antitumoral. Nesta tese é descrita a síntese de vinte derivados prenilados (oito flavonas, seis flavonóis e seis calconas) de três flavonoides naturais: baicaleína, 3,7-di-hidroxiflavona e 2'-hidroxi-3,4,4',5,6'-pentametoxicalcona. Com base no nosso conhecimento atual dezassete destes vinte flavonoides prenilados são descritos pela primeira vez.

A síntese de flavonoides oxiprenilados foi realizada fazendo reagir os blocos construtores com brometo de 3,3-dimetilalilo ou geranilo, em meio alcalino, utilizando para esse fim duas metodologias: uma baseada no aquecimento convencional (metodologia clássica) e outra por síntese orgânica assistida por micro-ondas. As flavonas e os flavonóis mono-oxiprenilados foram seguidamente usados como precursores na síntese de di-hidrofurano e di-hidropirano flavonoides. Os di-hidropirano flavonoides foram também sintetizados directamente a partir das hidroxiflavonas e flavonóis, na presença de Montmorillonite K10 *clay* como catalisador e de radiação micro-ondas. A comparação destas metodologias não clássicas com o aquecimento convencional permitiu confirmar que, para esta família de compostos, a síntese orgânica assistida por micro-ondas permite aumentar tanto os rendimentos como a seletividade em períodos de tempo reacional mais reduzidos. Finalmente, as calconas C-preniladas foram preparadas por modificação molecular de 2'-hidroxiacetofenonas disponíveis comercialmente, seguida de uma reacção de condensação aldólica catalisada por base na presença de 3,4,5-trimetoxibenzaldeído.

Neste trabalho é ainda descrita a síntese paralela em fase sólida de uma pequena biblioteca de 2'-hidroxicalconas estruturalmente relacionadas. Assim, foi preparada uma série de trinta e uma calconas e duas flavanonas usando como blocos construtores três acetofenonas e doze benzaldeídos. Com base no nosso conhecimento atual, dos trinta e três compostos sintetizados vinte e três são inéditos e, para os compostos cuja estrutura não é inédita, não está descrita a atividade em linhas celulares tumorais humanas.

A elucidação estrutural dos compostos sintetizados foi estabelecida com base em técnicas de espectrofotometria de infravermelho, espectrometria de massa de alta resolução e ressonância magnética nuclear. A estrutura do derivado monoprenilado da baicaleína foi ainda determinada por cristalografia de raios X.

Os flavonoides prenilados sintetizados e também os seus precursores e algumas das calconas e flavanonas obtidas por síntese em fase sólida, foram avaliados relativamente à sua capacidade em inibir o crescimento de três linhas celulares tumorais humanas, MCF-7 (adenocarcinoma da mama), NCI-H460 (cancro de células não pequenas do pulmão) e A375-C5 (melanoma). Este efeito foi avaliado de acordo com a técnica que utiliza o corante de proteínas celulares, sulforrodamina B, para determinar o crescimento celular. Os resultados da triagem *in vitro* revelaram que vários compostos foram capazes de provocar um potente efeito inibidor do crescimento celular dependente da dose. Com o objetivo de estudar alguns dos mecanismos celulares subjacentes ao efeito inibidor do crescimento, para os compostos mais ativos foi avaliado o seu efeito no perfil do ciclo celular e na indução da apoptose, nas linhas celulares de NCI-H460 ou MCF-7. Para alguns dos compostos mais ativos foi ainda estudado o seu efeito na atividade das proteínas humanas caspases-3, -7 e p53, utilizando a levedura como modelo celular. O derivado monoprenilado da baicaleína foi também estudado quanto às suas propriedades antiestrogénicas em tumores da mama dependentes de recetores de estrogénio. Os resultados revelaram que a maioria dos flavonoides testados alterava o perfil do ciclo celular, verificando-se um aumento da percentagem de células apoptóticas para alguns dos compostos testados. Relativamente aos ensaios de caspases e p53 em leveduras, foi possível verificar que os derivados monoprenilados da baicaleína e da 3,7-dihydroxiflavona eram ativadores das proteínas caspase-3 ou -7 e que a 3,4,4',5,6'-pentametoxi-2'-(3'',3''-dimetilalil)calcona inibia a interação p53-MDM2. No que se refere às propriedades antiestrogénicas do derivado monoprenilado da baicaleína, os resultados revelaram que este composto foi capaz de aumentar a atividade antiestrogénica de antagonistas e reduzir o efeito proliferativo de agonistas estrogénicos. Em suma, os resultados apresentados nesta tese permitiram evidenciar o papel relevante da prenilação/alquilação do núcleo flavonoide na atividade inibidora do crescimento de células tumorais.

Palavras-chave: Flavonoides, Prenilação, Síntese em fase sólida, Antitumorais, Apoptose.

Abstract

Flavonoids represent an outstanding class of naturally occurring compounds that occur in a variety of structural forms with different substitution patterns, including prenylation. Moreover, flavonoids and their prenylated derivatives have been attracting attention of the scientific community mainly because of their myriad of biological properties, being the antitumor activity one of the most exhaustively studied.

In order to improve the antitumor effects and to study the influence of prenylation of the flavonoid scaffolds on this activity, we have proposed to develop prenylated flavonoids with enhanced antitumor activity. Accordingly, in this work we described the synthesis of twenty prenylated derivatives (eight flavones, six flavonols and six chalcones) of three natural flavonoids: baicalein, 3,7-dihydroxyflavone and 2'-hydroxy-3,4,4',5,6'-pentamethoxychalcone. On the basis of our current state of knowledge seventeen from these twenty prenylated flavonoids are being described for the first time.

The synthesis of oxyprenylated flavonoids was carried out by reacting the building blocks with 3,3-dimethylallyl (3,3-DMA) or geranyl bromide, in alkaline medium using two methodologies: one based on conventional heating (classic methodology) and other by microwave-assisted organic synthesis (MAOS). The monoprenylated flavones and flavonols were then used as precursors for the synthesis of dihydrofurano- and dihydropyranoflavonoids. Dihydropyranoflavonoids were also obtained by one-pot synthesis, using Montmorillonite K10 clay as catalyst combined with microwave irradiation. Comparing these non-classic methodologies with conventional heating, the results confirmed that for this family of compounds MAOS improved yields and selectivity in shorter reaction times. Finally, the C-prenylated chalcones were prepared by molecular modification of commercially available 2'-hydroxyacetophenones followed by base-catalyzed aldol condensation with 3,4,5-trimethoxybenzaldehyde.

In this work is also described the parallel solid-phase synthesis of a small library of structural related 2'-hydroxychalcones, namely alkylated derivatives. A series of thirty-one chalcones and two flavanones was prepared using three acetophenones and twelve benzaldehydes as building blocks. To our best knowledge twenty-three of the thirty-three synthesized compounds are being described for the first time and as far as we know no antitumor studies have yet been undertaken for the known compounds.

The structure elucidation of the synthesized compounds was established on the basis of IR, MS, HRMS and NMR techniques. The structure of the monoprenylated derivative of baicalein was also determined by X-ray crystallography.

The synthesized prenylated flavonoids and their precursors as well as some of the chalcones and the two flavanones obtained by parallel solid-phase synthesis were evaluated for their ability to inhibit the *in vitro* growth of three human tumor cell lines, MCF-7 (breast adenocarcinoma), NCI-H460 (non small cell lung cancer) and A375-C5 (melanoma). This effect was evaluated according to the procedure that uses the protein-binding dye sulforhodamine B (SRB) to assess cell growth. *In vitro* screening results revealed that several compounds were able to cause a pronounced dose-dependent growth inhibitory effect. To broaden the insights on the cellular mechanism of action, the most active flavonoids were further studied regarding their effect on cell cycle profile and induction of apoptosis on NCI-H460 or MCF-7 cell lines. The effect of some of the most active flavonoids on human caspases-3 and -7 and p53 activity was also analysed using yeast-based assays. Moreover, the monoprenylated derivative of baicalein was also studied regarding its ability to produce estrogen antagonist effects in ER (+)-dependent breast tumors. Results showed that almost all the tested flavonoids interfered with the normal cell cycle distribution. Additionally, some of them caused an increase in the percentage of apoptotic cells. Regarding caspase and p53 yeast assays, the results revealed that monoprenylated derivatives of baicalein and 3,7-dihydroxyflavone behaved as caspases-3 or -7 activators, while 3,4,4',5,6'-pentamethoxy-2'-(3'',3''-dimethylallyl) chalcone was found to inhibit p53-MDM2 interaction. Regarding the antiestrogenic properties, the results revealed that the monoprenylated derivative of baicalein increased the antiestrogenic properties of estrogen antagonists and reduce the estrogenic properties of an estrogen agonist. Overall the results point to the relevant role of prenylation/alkylation of flavonoid scaffold in the growth inhibitory activity of tumor cells.

Keywords: Flavonoids, Prenylation, Solid-phase synthesis, Antitumor, Apoptosis.