

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**Atuação de flavonóides sintéticos na redução da viabilidade e  
proliferação de células de glioma**

Cíntia Janine Kiekow

Porto Alegre, novembro de 2011.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

## **Atuação de flavonóides sintéticos na redução da viabilidade e proliferação de células de glioma**

Cíntia Janine Kiekow

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de Farmacêutico, pelo curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Profa. Dra. Grace Gosmann

Co-orientador: Farm. Fabrício Figueiró

Porto Alegre, novembro de 2011.

Este artigo foi elaborado segundo as normas da revista “Investigational New Drugs”  
apresentadas no anexo I.

## **Atuação de flavonóides sintéticos na redução da viabilidade e proliferação de células de glioma**

Cíntia J. Kiekow<sup>1</sup>, Fabrício Figueiró<sup>2</sup>, Luciana D. Vechia<sup>1</sup>, Ana Maria O. Battastini<sup>2</sup>,  
Grace Gosmann<sup>1</sup>

*<sup>1</sup>Departamento de Produção de Matérias-Primas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Ipiranga, 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.*

*<sup>2</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Ramiro Barcelos, 2600, anexo, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil.*

Autor Correspondente: Grace Gosmann, Av. Ipiranga, 2752, CEP 90 610-000, Porto Alegre, RS, Brasil. Telefone: +55 (51) 3308.5516. E-mail: [grace.gosmann@ufrgs.br](mailto:grace.gosmann@ufrgs.br)

## Resumo

Gliomas malignos são os tumores primários mais comuns do sistema nervoso central (SNC) em adultos, sendo o glioblastoma multiforme (GBM), o foco do nosso estudo, o mais agressivo e o mais freqüente. O grande potencial dos compostos polifenólicos flavonóides para atividade anticâncer desperta nosso interesse em estudar essa classe de moléculas perante células de glioma, cuja sobrevida média dos pacientes é de aproximadamente 1 ano. Inicialmente, foi planejada e realizada a síntese de duas chalconas (**4** e **5**) visando estudar sua atividade em células de glioma e, assim, contribuir na análise entre sua estrutura química e a atividade biológica (REA). Em seguida, quatro chalconas (**6** - **9**), uma flavanona (**10**) e uma flavona (**11**) com diferentes graus de substituição de grupamentos hidroxila e metoxila, sintetizados pelo nosso grupo de pesquisa, juntamente com o flavonol morina (**12**), foram avaliados para a viabilidade de células de glioma, usando MTT como método analítico. A molécula mais ativa na redução da viabilidade celular foi a chalcona polimetoxilada **7**, que foi significativamente ativa ( $p \leq 0,01$ ) na concentração de 25  $\mu\text{M}$ . As chalconas **6** e **7** foram submetidos a ensaio de contagem celular, onde seus efeitos em morte celular foram confirmados nas três concentrações utilizadas (25, 50 e 100  $\mu\text{M}$ ). Assim, foi possível obter resultados preliminares sobre a importância dos substituintes nos esqueletos químicos dos flavonóides sintetizados e ensaiados.

**Palavras-chave:** câncer, chalcona, flavonóides e glioma.



## **Introdução**

Gliomas malignos são os tumores primários mais comuns do sistema nervoso central (SNC) em adultos, sendo o glioblastoma multiforme (GBM), o foco do nosso estudo, o mais agressivo e o mais freqüente. Na classificação da organização mundial da saúde (OMS), a histopatologia deste tumor é classificada como sendo de grau IV, o mais maligno tumor cerebral com sobrevida média de aproximadamente 1 ano [1-3]. Estes tumores são altamente invasivos, vascularizados, de proliferação rápida e resistentes a quimioterapia [3] e, embora sejam raras as metástases, a infiltração em regiões do cérebro da origem a alta recorrência tumoral [4,5]. Além disso, a localização destes tumores é desfavorável ao tratamento, devido a resistência a multidrogas (RMD) que está intimamente relacionada com a transposição dos fármacos quimioterápicos pela barreira hemato-encefálica [6]. Apesar dos avanços nos tratamentos convencionais, a incidência e mortalidade para glioma pouco mudou nos últimos dez anos, fazendo-se necessária a busca por novos medicamentos que aumentem a sobrevida dos pacientes [7].

As substâncias de origem natural são importantes na busca de protótipos químicos para novos fármacos. Dentre essas substâncias, flavonóides são compostos polifenólicos de origem natural que estão presentes em uma variedade de frutas, legumes, cereais, chás e vinho, sendo os mais abundantes antioxidantes utilizados na dieta humana [3]. Além da atividade antioxidante, a literatura relata para os flavonóides atividades anti-inflamatória, gastroprotetora, cardioprotetora, antibiótica, antiprotozoária, inseticida, antileishmania, anticolinérgica, quimiopreventiva e anticâncer [8-10]. Os principais subgrupos de flavonóides são: chalconas, flavonas, flavonóis, flavanonas, antocianinas e isoflavonóides [9].

Há muitos estudos que evidenciam o grande potencial desta classe de moléculas como anticâncer, relatando a capacidade das mesmas de inibirem proliferação e angiogênese, induzirem apoptose, reduzirem migração, invasão e aderência, além de suprimirem processos inflamatórios que estão relacionados às neoplasias [8,9], entretanto, é difícil correlacionar os vários estudos dos flavonóides em relação ao câncer, devido às várias linhagens celulares e ensaios utilizados. Outros estudos observaram que flavonóides conseguem atravessar a barreira hemato-encefálica, devido quer seja a sua natureza lipofílica ou suas interações com específicos transportadores de

efluxo expressos nas células epiteliais que compõem a barreira hemato-encefálica [11,12]. Estes dados contribuem ainda mais para o interesse em estudar essa classe de moléculas.

Poucos são os estudos de flavonóides de ocorrência natural e sintética contra células de glioma, mas sugere-se que na linhagem GL15 de glioblastoma, a quantidade de grupamentos hidroxila e metila seja essencial para atividade antitumoral [3]. Grupamentos metoxila também vêm se destacando em ensaios com células de glioblastoma [4,13] e, de modo geral, muitos são os estudos avaliando a influência das hidroxilas e metoxilas em diferentes linhagens celulares de tumor [9].

A partir do esqueleto molecular dos flavonóides escolhemos os subgrupos flavonol, flavona, flavanona e chalconas para serem testados (Esquema 1). Esta estratégia permitirá inferir qual a estrutura molecular mais adequada para a atividade em células de glioma e qual a importância da flexibilidade da molécula, uma vez que chalconas são mais flexíveis que os demais compostos cíclicos. Dessa forma, foram avaliadas: quatro chalconas (**6 – 9**), uma flavanona (**10**), uma flavona (**11**) e o flavonol Morina (**12**) (Figura 1), que permitirão a avaliação do grau de substituição dos compostos, bem como a importância dos grupamentos hidroxila e metoxila para sua atividade em células de glioma.

Além dos ensaios com as diferentes moléculas citadas, o presente trabalho buscou a síntese dos compostos **4** e **5** (Figura 2) para futuras análises em células de glioma.

Sendo assim, este estudo tem por objetivo avaliar a proliferação e a viabilidade de células de glioma de rato (C6) submetidas a tratamentos com flavonóides poli-hidroxilados e poli-metoxilados sintetizados pelo nosso grupo e sintetizar duas chalconas, cujas atividades em células de glioma contribuirão para avaliação de uma futura relação estrutura-atividade (REA).



## 1. Materiais e métodos

### *Reagentes*

Para a síntese dos compostos **4** e **5** foram utilizados 3,4-diidro-2-pirano (DHP), *p*-tolueno sulfonato de piridínio, iodeto de metila, 4-hidróxi-benzaldeído, 3,5-diidróxibenzaldeído e 2,4-diidróxi-acetofenonas adquiridos da Sigma (St. Louis, EUA) e carbonato de potássio anidro adquirido da Casa da Química (São Paulo, BR). Os compostos **6-11** foram sintetizados pelo nosso grupo de pesquisa [10] e a morina (**12**) foi adquirida da Sigma (St. Louis, EUA). O meio modificado Dulbecco's Eagle's (DMEM), o soro fetal bovino (SFB), a Fungizone<sup>®</sup>, a penicilina/estreptomicina e a solução 0,05% tripsina/EDTA foram obtidos da Gibco (Gibco BRL, Carlsbad, CA, EUA). Gentamicina foi obtida da Schering do Brasil (Rio de Janeiro, BR). Dimetil sulfóxido (DMSO) e ([bromidrato de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazodiuim]) (MTT) foram obtidos da Sigma (St. Louis, EUA).

### *Procedimentos gerais para a síntese dos compostos 4 e 5*

As chalconas foram sintetizadas através de uma reação conhecida como condensação de Claisen Schmitt [14], utilizando-se acetofenonas e benzaldeídos como materiais de partida. Para obtenção de chalconas com grupamentos hidroxila e metoxilas livres, foram realizadas reações prévias de proteção das hidroxilas dos materiais de partida com os protetores 2,3-diidro-2-pirano (DHP) [15,16] e iodeto de metila (MeI) [14] (Esquema 2). As hidroxilas previamente protegidas com DHP foram desprotegidas por hidrólise ácida após condensação para obtenção dos compostos hidroxilados.

Todos os solventes utilizados possuíam grau analítico e foram destilados com pressão positiva de nitrogênio. Todas as reações que exigiam atmosfera inerte foram realizadas em aparato previamente seco e sob atmosfera de nitrogênio. As reações foram monitoradas através de cromatografia em camada delgada (CCD), as quais foram realizadas em placas de gel de sílica 60 F<sub>254</sub> Merck. A visualização foi obtida através de uma lâmpada de luz ultravioleta no comprimento de onda de 254nm.

## *Síntese*

### ***Síntese de 2,4-bis(tetrahidropiran-2-ilóxi)-acetofenona (1). Procedimento Geral A***

**Proteção com DHP:** A uma solução de 2,4-diidróxi-acetofenona (0,33 mmol) e *p*-toluenossulfonato de piridínio (PPTS) (8 mg; 0,032 mmol) em diclorometano (5 mL) foi adicionado 3,4-diidro-2-pirano (DHP) (171  $\mu$ L, 1,87 mmol) em 0,5 mL de diclorometano. A mistura reacional foi mantida sob agitação à temperatura ambiente durante 4 horas e depois foi lavada com uma solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M (2 x 5 mL), seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e evaporada sob pressão reduzida. O resíduo bruto foi identificado como 2,4-bis(tetrahidropiran-2-ilóxi)-acetofenona (**1**) (100 mg; 95%).

### ***Síntese de 4-(tetrahidropiran-2-ilóxi)-benzaldeído (2)***

Este composto foi sintetizado de acordo com o procedimento geral A utilizando 4-hidróxi-benzaldeído (0,33 mmol) como material de partida. O resíduo bruto foi identificado como 4-(tetrahidropiran-2-ilóxi)-benzaldeído (**2**) (60 mg; 83%).

### ***Síntese de 3,5-dimetóxi-benzaldeído (3).***

**Proteção com MeI:** A uma mistura de 3,5-diidróxi-benzaldeído (100 mg; 0,72 mmol) e K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anidro (5 g) em acetona seca (10 mL) sob agitação, foi adicionado 1 mL (16 mmol) de iodometano. A mistura foi mantida sob refluxo durante 2 horas e posteriormente foi arrefecida, filtrada e evaporada sob pressão reduzida. O resíduo obtido foi dissolvido em diclorometano (10 mL), lavado com água (2 x 5 mL), seco com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e concentrado sob pressão reduzida. O resíduo bruto forneceu 3,5-dimetóxi-benzaldeído (**3**) como um sólido levemente amarelado (106,4 mg, 89% rendimento).

### ***Síntese de 4,2',4'-triidróxi-chalcona (4). Procedimento Geral B***

**Condensação:** A uma solução de 2,4-bis(tetrahidropiran-2-ilóxi)-acetofenona (**1**) (100 mg) e 4-(tetrahidropiran-2-ilóxi)-benzaldeído (**2**) (60 mg) em 5mL de metanol foi adicionada uma solução de NaOH (40%) em água (0,5 mL). Depois foi adicionado BaOH (100 mg). A mistura reacional foi mantida sob agitação durante 24 horas.

**Desproteção:** Transcorridas as 24 horas, a mistura reacional foi neutralizada com HCl 4M e acrescida de HCl 4M (2 mL). A mistura reacional foi mantida sob agitação durante 2 horas a temperatura ambiente. O metanol foi evaporado sob pressão reduzida. O resíduo foi diluído em água (5 mL) e a solução aquosa foi então extraída com acetato

de etila (3 x 10 mL). As fases orgânicas combinadas foram secas com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e concentradas sob pressão reduzida.

#### *Síntese de 3,5-dimetóxi-2',4'-diidróxi-chalcona (5)*

Este composto foi sintetizado de acordo com o procedimento geral B (condensação seguida de desproteção) utilizando 2,4-bis(tetraidropiran-2-ilóxi)-acetofenona (**1**) (100 mg) e 3,5-dimetóxi-benzaldeído (**3**) (42 µl; 0,35 mmol) como materiais de partida.

#### *Manutenção da linhagem celular*

A linhagem celular C6 de glioma de rato foi obtida da American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, Maryland, EUA). Células de 5 a 15 passagens foram cultivadas e mantidas em meio modificado Dulbecco's Eagle's (DMEM), contendo 0,5 U/mL de antibióticos penicilina/estreptomicina e suplementado com 5% (v/v) de soro fetal bovino (SFB). As células foram mantidas em incubadora a temperatura de 37°C, com mínimo de umidade relativa de 95% e em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> no ar. Todos os experimentos ao longo deste estudo foram realizados em DMEM suplementado com soro.

#### *Tratamento das células*

Os produtos testados foram dissolvidos em dimetil sulfóxido 1% (DMSO). As células de glioma foram semeadas de acordo com cada experimento e depois de atingirem a semi-confluência, foram expostas por 24 horas aos compostos **6**, **7**, **8**, **9**, **10**, **11** e **12** (10, 25, 50, 100 ou 200 µM) para o ensaio de viabilidade celular (MTT) e compostos **6** e **7** (25, 50 e 100 µM) para o ensaio de contagem celular. Os controles celulares foram tratados com o maior volume usado do veículo DMSO (1% v:v).

#### *Avaliação da viabilidade em células de glioma*

Células de glioma foram semeadas em placas de 96 poços com 10<sup>3</sup> células por poço e, depois de atingirem a semi-confluência, as células foram tratadas como descrito acima. Depois de 24 horas de tratamento, seu meio de cultura contendo o composto testado foi removido e as células foram lavadas duas vezes com 100 µL de solução

tampão salina fosfatada (PBS) (pH 7,4). Após a remoção do PBS, 90  $\mu\text{L}$  de meio de cultura e 10  $\mu\text{L}$  de MTT (5 mg/mL) foram adicionadas a cada poço. As células foram incubadas por 2 horas e a solução foi então removida do precipitado. Um total de 100  $\mu\text{L}$  de DMSO foi adicionado aos poços e a absorbância foi lida em 490nm. Essa absorbância é linearmente proporcional ao número de células vivas com mitocôndria ativa. A viabilidade celular foi calculada usando Eq. (1):

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = (\text{Abs}_s / \text{Abs}_{\text{controle}}) 100 \quad (1)$$

Onde  $\text{Abs}_s$  é a absorbância das células tratadas com os diferentes compostos, nas diferentes concentrações e  $\text{Abs}_{\text{controle}}$  é a absorbância do controle celular (tratados com 1% de DMSO (v:v)).

#### *Contagem celular*

Células de glioma de rato (C6) foram semeadas em placas de 24 poços, onde foram introduzidas  $5 \times 10^3$  células por poço em DMEM com 5% de SFB. Permitido o crescimento até atingir a semi-confluência, as células foram tratadas com os compostos nas concentrações como descrito, por 24 horas. No final do tratamento, o meio foi removido. As células foram lavadas duas vezes com 200  $\mu\text{L}$  de PBS e depois foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de uma solução 0,05% tripsina/ EDTA para desprender as células, que foram imediatamente contadas em hemocitômetro com adição de azul de trypan, para exclusão das células inviáveis.

#### *Análise Estatística*

Os dados foram expressos em médias  $\pm$  S.D. e analisados estatisticamente por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida por análise de comparações múltiplas (teste Tukey). Diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando  $p \leq 0,05$ .

## 2. Resultados

### *Síntese*

Neste trabalho a síntese de dois compostos (**4** e **5**) foi planejada visando estudar sua atividade em células de glioma e, assim, contribuir na análise da REA.

Analisando a CCD da síntese do composto **4** podemos observar pelo Rf a existência de uma banda amarela, característica de chalconas, bem como a presença de 2,4-diidróxi-acetofenona e 4-hidróxi-benzaldeído, produtos de partida que não reagiram durante a condensação, mas que sofreram a desproteção após a adição de HCl. Analisando a CCD da síntese do composto **5**, podemos observar pelo Rf a existência de uma banda amarela característica de chalconas, bem como a presença de 2,4-diidróxi-acetofenona e 3,5-dimetóxi-benzaldeído, produtos que não reagiram durante a condensação. A elucidação dos compostos **4** e **5** está em andamento.

Os compostos **6** – **11** tinham sido previamente sintetizados na dissertação de Luciana Dalla Vechia [10].

### *Avaliação dos flavonóides na redução da viabilidade das células de glioma*

O ensaio de MTT foi usado para investigar os efeitos dos flavonóides propostos na viabilidade das células. O MTT fornece uma medida quantitativa da atividade metabólica da mitocôndria que é baseada na redução mitocondrial do sal brometo de tetrazólio em um produto cromóforo, o formazan. Culturas de células foram tratadas com as concentrações descritas nos materiais e métodos. A análise do ensaio de MTT mostrou que a maioria dos compostos testados reduziu significativamente a viabilidade das células comparadas ao controle. Os compostos cíclicos, flavanona **10** (Fig. 4 A) e flavona **11** (Fig. 4 B), causaram significativa redução na viabilidade das células na maior concentração testada (200  $\mu$ M), ao passo que o flavonol morina (**12**) (Fig. 4 C) não apresentou atividade significativa nas mesmas concentrações. A chalcona **8** (Fig. 3 C) reduziu significativamente a viabilidade das células nas concentrações de 50 e 100  $\mu$ M ( $p \leq 0,05$ ). A chalcona **6** (Fig. 3 A) reduziu significativamente a viabilidade das células nas concentrações de 100  $\mu$ M ( $p \leq 0,05$ ) e 200  $\mu$ M ( $p \leq 0,01$ ), apresentando um comportamento aparentemente linear de redução da viabilidade com o aumento da concentração de 10 a 100  $\mu$ M. A chalcona **7** (Fig. 3 B) reduziu significativamente a

viabilidade celular a partir da concentração de 25  $\mu\text{M}$ , entretanto, seu comportamento não foi dose dependente. A chalcona **9** (Fig. 3 D) não apresentou atividade significativa na viabilidade celular, nas concentrações testadas.

#### *Avaliação dos flavonóides na redução da proliferação das células de glioma*

Para aprofundar o estudo dos compostos **6** e **7** no crescimento celular, foi avaliado o efeito dos mesmos na proliferação da linhagem celular de glioma C6. O tratamento das células de glioma com os compostos **6** e **7** nas concentrações de 25, 50 e 100  $\mu\text{M}$ , como descrito nos materiais e métodos, por 24 horas, resultou na redução significativa do número de células quando comparadas ao controle DMSO (Fig. 5 A e B).

### **3. Discussão**

A atividade anticâncer dos flavonóides é bastante estudada [9]. Na busca pelo mecanismo de ação dessa atividade, a literatura procura relacionar a atividade anticâncer com as atividades anti-inflamatórias e antioxidantes dos flavonóides [9].

No contexto da atividade anti-inflamatória, estudos verificaram o efeito dos flavonóides sobre o fator nuclear- $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ), que é um fator que induz a expressão de mais de 400 genes que atuam para suprimir apoptose e induzir transformação celular, proliferação, invasão, metástase, quimioresistência, radioresistência e inflamação. Desta forma, os flavonóides têm sido estudados na supressão da via de sinalização do NF- $\kappa\text{B}$  agindo, por exemplo, na diminuição da inflamação por suprimir o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), uma citocina pró-inflamatória encontrada no microambiente do tumor de vários cânceres humanos, sendo assim, promissora tanto na quimioprevenção como no quimiotratamento do glioma [9,17,18]. A inibição do NF- $\kappa\text{B}$  é uma abordagem interessante para a ruptura do ciclo vicioso da proliferação de células tumorais, uma vez que o aumento da sua expressão vem sendo associado com o aumento da sobrevivência de células tumorais e a maioria dos agentes quimioterápicos tradicionais induzem NF- $\kappa\text{B}$ , causando resistência dos tumores aos fármacos [9].

No contexto da atividade antioxidante, flavonóides são estudados por atuarem inibindo espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS)

que podem levar a danos oxidativos e nitração das bases de DNA, aumentando o risco de mutações no DNA e levando ao câncer. A literatura relata que canferol, um flavonol poliidroxilado, é um inibidor de migração celular em células de glioblastoma de forma ROS-dependente [9].

Outra via de sinalização pela qual os flavonóides exercem sua atividade anticâncer é a angiogênese, que consiste no desenvolvimento de novos vasos sanguíneos a partir dos existentes e é considerado um passo fundamental no crescimento tumoral. Neste âmbito, há relatos de que alguns flavonóides atuam nesta via por regularem a expressão de vários fatores, entre eles: VEGF e metaloproteinases de matriz (MMP) [8].

Analisando a estrutura molecular dos flavonóides estudados na literatura, podemos observar que as chalconas reduziram a viabilidade das células de glioma em concentrações mais baixas quando comparadas aos compostos cíclicos (Fig 3 e 4). Com essa avaliação podemos inferir que a flexibilidade das chalconas contribui para sua atividade. A diminuição da atividade no sentido chalcona > flavanona > flavona, também foi observado em estudo *in vitro*, realizado com células de carcinoma renal, adenocarcinoma mamário e adenocarcinoma de cólon [19].

Um mecanismo proposto para atividade das chalconas como supressora da via de NF- $\kappa$ B e possível motivo pelo qual as chalconas possuem atividade mais pronunciada que os demais compostos cíclicos está no seu potencial em inibir diretamente a cinase I kappa B 2 (IKK $\beta$ ), uma cinase envolvida na ativação de NF- $\kappa$ B, por modificações covalentes em IKK $\beta$  devido a presença de  $\alpha$ - $\beta$  insaturação na sua estrutura [17].

Estudos com rutina, um flavonol poliidroxilado na forma heterosídica, relatam seu efeito antiproliferativo, pró-apoptótico e morfogênico em células de glioma humano GL-15, nas concentrações de 50 a 100  $\mu$ M e sua aglicona quercetina apresenta efeitos inibidores em células de glioma humano U138MG e de rato C6 [11], entretanto, em nosso estudo, o flavonol poliidroxilado morina (**12**), não apresentou atividade significativa na viabilidade celular de glioma de rato C6. Assim, podemos inferir que a posição das hidroxilas seja de fundamental importância para atividade anti-proliferativa, bem como, suas formas: heterosídica ou aglicona.

Os compostos polimetoxilado **7** e **8** reduziram a viabilidade celular de modo significativo quando comparados com controle DMSO, além de reduzir o número de

células (composto **7**). Mais estudos se fazem necessários, entretanto, chalconas polimetoxiladas apresentam atividade anti-inflamatória pronunciada [20], podendo vir a complementar a possível relação entre as atividades anti-inflamatórias e anticâncer dos flavonóides. Além disso, a literatura relata a potencial atividade de flavonóides polimetoxilados em células de glioblastoma, vindo a complementar os resultados obtidos neste trabalho. Entre os trabalhos relatados usando células de glioblastoma, flavanonas polimetoxiladas tangeretina e nobiletina inibiram secreção de MMP, migração, invasão e aderência, com IC<sub>50</sub> de 4 µg/mL [4]; uma chalcona com metoxilas como substituintes nos anéis inibiu a proliferação celular ao bloquear o ciclo celular na fase M na concentração de 10 µM [13]; e outra chalcona polimetoxilada reduziu a viabilidade celular com IC<sub>50</sub> de 0,5 µM [21]. Estes resultados sugerem que as metoxilas são importantes para a atividade antitumoral e que compostos cíclicos, dependendo de seus substituintes, podem apresentar atividade antitumoral pronunciada.

Fazendo-se uma relação entre os resultados de viabilidade das chalconas **7** e **8** (Fig. 3 B e C) que são poli-metoxiladas e possuem os mesmos substituintes no anel B, podemos observar que a troca dos substituintes do anel A de 3',5'-dimetoxilado para 2',4'-dimetoxilado acarretou numa diminuição na viabilidade das células. Seguindo o mesmo raciocínio, relacionando os resultados das chalconas **8** e **9** (Fig 3 C e D), a troca dos substituintes do anel B de 3,5-dimetoxilado para 2,3,4-trimetoxilado acarretou a perda de atividade na viabilidade celular da chalcona **9**. Estes resultados ressaltam que, além do substituinte metoxila, o grau de substituição e a posição dos substituintes sejam de extrema importância para a atividade na viabilidade celular.

As chalconas **6** e **7**, apesar de apresentarem diferenças nos substituintes, na posição e no grau de substituição, apresentaram resultados significativos tanto na viabilidade (Fig. 3 A e B) quanto na contagem celular (Fig. 5 A e B) em células de glioma. Como os substituintes em moléculas são importantes para sua ligação a sítios de ação, podemos supor que o mecanismo de ação dos mesmos possa não ser o mesmo. Os resultados da chalcona **6** evidenciam que a hidroxila da posição 2', que é considerada como sendo necessária para atividade antitumoral [19,22], também possa ser importante para atividade em células de glioma.

A busca pela síntese do composto **5** visa auxiliar na futura análise da REA, relacionando seus resultados com os dos compostos **6** e **7**, bem como avaliando a importância da hidroxila na posição 2' em células de glioma. Com os resultados na



viabilidade e contagem celular da chalcona **5** que combina o anel A da chalcona **6** e o anel B da chalcona **7** poderemos inferir qual o padrão de substituição mais apropriado para os anéis A (3',5'-dimetoxilado da chalcona **7** ou 2',4'-diidroxilado da chalcona **5**) e B (3,5-dimetoxilado da chalcona **6** ou 4-metoxilado da chalcona **5**), e se a atividade se mantém com esse composto hidroxilado.

O composto **4** (isoliquiritigenina), que é uma chalcona poliidroxilada, pode ser extraído de plantas como *Glycyrrhiza* e *Dalbergia* spp. [8] ou sintetizado, utilizando por exemplo, cloreto de metoximetila (MOMCl) como grupamento protetor, via reação Horner-Wadsworth-Emmons ou via condensação Claisen-Schmidt, com rendimentos de 81 e 98%, respectivamente [23]. Estudos feitos com células de glioma humano evidenciaram que a isoliquiritigenina (Fig. 2 Chalcona **4**) é pró- apoptótica com IC<sub>50</sub> de 68 µM [24]. Sua similaridade estrutural com resveratrol (Fig. 6), uma chalcona triidroxilada capaz de reduzir a viabilidade de células de glioma (C6) com IC<sub>50</sub> de 39,61 µM [25], desperta o interesse na síntese deste composto e nos incentiva a buscar alternativas para síntese de chalconas, uma vez que a síntese de chalconas poli-oxigenadas ainda é um desafio em síntese orgânica devido aos baixos rendimentos alcançados [10,26].

As chalconas **4** (isoliquiritigenina) e **5** foram sintetizadas, mas aguardam sua caracterização estrutural. Suas caracterizações estão sendo realizadas através de ponto de fusão, espectrometria de massas, espectroscopia de infravermelho, espectroscopia de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C. Tanto o reagente 3,4-diidro-2-pirano (DHP) quanto o iodeto de metila se mostraram eficazes como grupamentos protetores das hidroxilas dos produtos de partida.

Assim, foi possível obter resultados preliminares para a importância dos substituintes nos esqueletos químicos dos flavonóides sintetizados e ensaiados. Pelos resultados apresentados e pelo grande potencial dessa classe de compostos como agentes anticâncer, os estudos devem continuar tanto com compostos poliidroxilados quanto polimetoxilados, visando os mecanismos de ação dos mesmos para contribuir com os avanços terapêuticos.

## Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelas agências brasileiras: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Os autores também são gratos ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/UFRGS (Brasil).

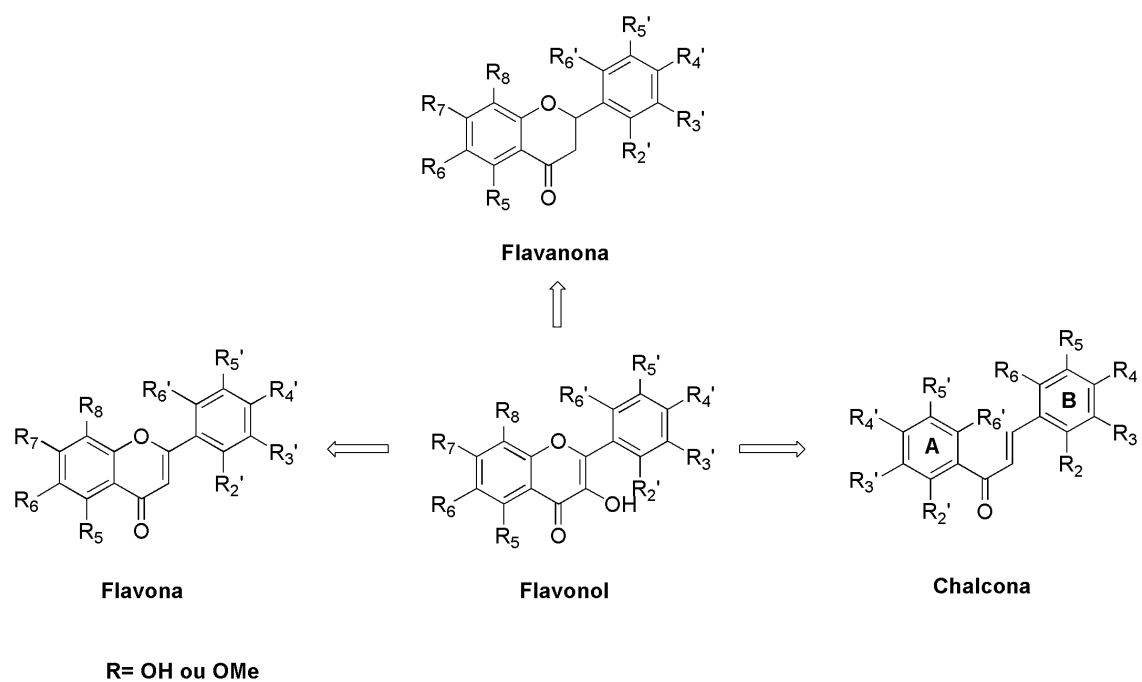
## Referências

1. Sathornsumetee S, Reardon DA, Desjardins A, Quinn JA, Vredenburgh JJ, Rich J (2007) Molecularly targeted therapy for malignant glioma. *Câncer* 110:13-24 DOI 10.1002/cncr.22741
2. Robins HI, Lassman AB, Khuntia D (2009) Therapeutics advances in malignant glioma: Current status and future prospects. *Neuroimag Clin N Am* 19:647-656 DOI 10.1016/j.nic.2009.08.015
3. Nones J, Stipursky J, Costa SL, Gomes FCA (2010) Flavonoids and astrocytes crosstalking: Implications for brain development and pathology. *Neurochem Res* 35:955-966 DOI 10.1007/s11064-010-0144-0
4. Rooprai HK, Kandaneeratchi A, Maidment SL, Christidou M, Trillo-Pazos G, Dexter DT, Rucklidge GJ, Widmer W, Pilkington GJ (2001) Evaluation of the effects of swainsonine, captopril, tangeretin and nobiletin on the biological behaviour of brain tumor cells *in vitro*. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 27:29-39
5. Lacroix M, Abi-Said D, Fourney DR, Gokaslan Z, Shi W, De Monte F, Lang FF, McCutcheon IE, Hassenbusch SJ, Holland E, Hess K, Michael C, Miller D, Sawaya R (2001) A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg* 95:190-198
6. Youdim KA, Qaiser MZ, Begley DJ, Rice-Evans CA, Abbott NJ (2004) Flavonoid permeability across an *in situ* model of the blood-brain barrier. *Free Rad Bio Med* 36:592-604 DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2003.11.023
7. Jianfei J, Keith LB, John SY (2010) Glioma stem cell research for the development of immunotherapy. *Neurosurg Clin N Am* 21:159-166 DOI 10.1016/j.nec.2009.08.006
8. Mojzis J, Varinska L, Mojzisova G, Kostova I, Mirossay L (2008) Antiangiogenic effects of flavonoids and chalcones. *Pharm Res* 57:259-265 DOI 10.1016/j.phrs.2008.02.005
9. Prasad S, Phrommoi K, Yadav VR, Chaturvedi MM, Aggarwal BB (2010) Targeting inflammatory pathways by flavonoids for prevention and treatment of cancer. *Planta Med* 76:1044-1063 DOI 10.1055/s-0030-1250111
10. Vechia LD. Dissertação de mestrado: Planejamento e síntese de flavonóides com potencial atividade anticoagulante. Porto Alegre: UFRGS, 2010.- xi, 89 p.: il.
11. Santos BL, Silva AR, Pitanga BPS, Sousa CS, Grangeiro MS, Fragomeni BO, Coelho PLC, Oliveira MN, Menezes-Filho NJ, Costa MFD, El-Bachá RS, Vellozo ES, Sampaio GP, Freire SM, Tardy M, Costa SL (2011) Antiproliferative, proapoptotic and morphogenic effects of the flavonoid rutin on human glioblastoma cells. *Food Chem* 127:404-411 DOI 10.1016/j.foodchem.2012.12.131

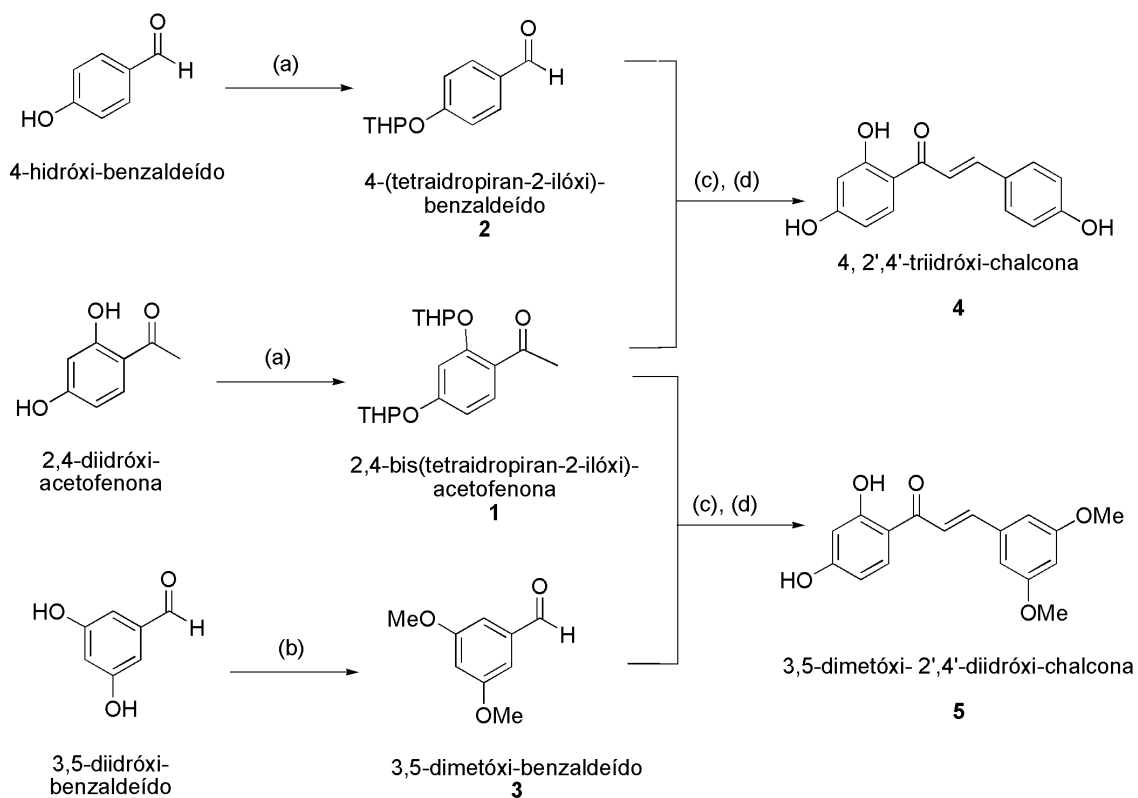
12. Ku BM, Ryu HW, Lee YK, Ryu J, Jeong JY, Choi J, Cho HJ, Park KH, Kang SS (2010) 4'-Ace oamido-4-hydroxychalcone, a chalcone derivative, inhibits glioma growth and invasion through regulation of the tropomyosin 1 gene. *Biochem Biophys Res Com* 402:525-530 DOI 10.1016/j.bbrc.2010.10.068
13. Boumendjel A, Mc-Leer-Florin A, Champelovier P, Allegro D, Muhammad D, Souard F, Derouazi M, Peyrot V, Toussaint B, Boutonnat J (2009) A novel chalcone derivative which acts as a microtubule depolymerising agents and an inhibitor of P-gp and BCRP in-vitro an in-vivo glioblastoma models. *BMC Cancer* 9:242-252 DOI 10.1186/1471-2407-9-242
14. Khatib S, Nerya O, Musa R, Shmuel M, Tamir S, Vaya J (2005) Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: the importance of a 2,4-substituted resorcinol moiety. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 13:433-441 DOI 10.1016/j.bmc.2004.10.010
15. Miyashta M, Yoshikoshi A, Grieco PA (1977) Pyridinium *p*-toluenesulfonate. A mild and efficient catalyst for the tetrahydropyranylation of alcohols. *Journal of Organic Chemistry* 42:3772-3774 DOI 10.1021/jo00443a038
16. Liu M, Wilairat P, Go M-L (2001) Antimalarial alkoxyated and hydroxylated chalcones: structure-activity relationship analysis. *Journal of Medicinal Chemistry* 44:4443-4452 DOI 10.1021/jm0101747
17. Srinivasan B, Johnson TE, Lad R, Xing C (2009) Structure-activity relationship studies of chalcone leading to 3-hydroxy-4,3',4',5'-tetramethoxychalcone and its analogues as potent nuclear factor  $\kappa$ B inhibitors and their anticancer activities. *J Med Chem* 52:7228-7235 DOI 10.1021/jm901278z
18. Bandgar B, Gawande SS, Bodade RG, Totre JV, Khobragade CN (2010) Synthesis and biological evaluation of simple methoxylated chalcones as anticancer, anti-inflammatory and antioxidant agents. *Bioorg Med Chem* 18:1364-1370 DOI 10.1016/j.bmc.2009.11.066
19. Cabrera M, Simoens M, Falchi G, Lavaggi ML, Piro OE, Castellano EE, Vidal A, Azqueta A, Monge A, López de Ceráin A, Sagrera G, Seoane G, Cerecetto H, González M (2007) Synthetic chalcones, flavanones, and flavones as antitumoral biological evaluation and structure-activity relationships. *Bioorg Med Chem* 15:3356-3367 DOI 10.1016/j.bmc.2007.03.031
20. Sawle P, Moulton BE, Jarzykowska M, Green CJ, Foresti R, Fairlamb IJS, Motterlini R (2008) Structure-activity relationships of methoxychalcones as inducers of Heme oxygenase-1. *Chem Res Toxicol* 21:1484-1494 DOI 10.1021/tx800115g
21. Zoldakova M, Kornyei Z, Brown A, Biersack B, Madarász E, Schobert R (2010) Effects of a combretastatin A4 analogous chalcone and its PT- complex on cancer cells: A comparative study of uptake, cell cycle and damage to cellular compartments. *Biochem Pharmacol* 80:1487-1496 DOI 10.1016/j.bcp.2010.07.046
22. Echeverria C, Santibañez JF, Donoso- Tauda O, Escobar CA, Ramirez-Tagle R (2009) Structural antitumoral activity relationships of synthetic chalcones. *Int J Mol Sci* 10:221-231 DOI 10.3390/ijms10010221
23. Sano S, Okubo Y, Handa A, Nakao M, Kitaike S, Nagao Y, Kakegawa H (2011) Reinvestigation of the synthesis of isoliquiritigenin: Application of Horner-Wadsworth-Emmons reaction and Claisen-Schmidt condensation. *Chem Pharm Bull* 59:885-888
24. Bruyère C, Genovese S, Lallemand B, Ionescu-Motatu A, Curini M, Kiss R, Epifano F (2011) Growth inhibitory activities of oxyprenylated and non-prenylated naturally occurring phenylpropanoids in cancer cell lines. *Bioorg Med Chem Lett* 21:4174-4179 DOI 10.1016/j.bmcl.2011.05.089

25. WHO <http://hdl.handle.net/10183/26815>
26. Vechia LD, Gnoatto SCB, Gosmann G (2009) Derivados oleananos e ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante. *Química Nova* 32:1245-1252

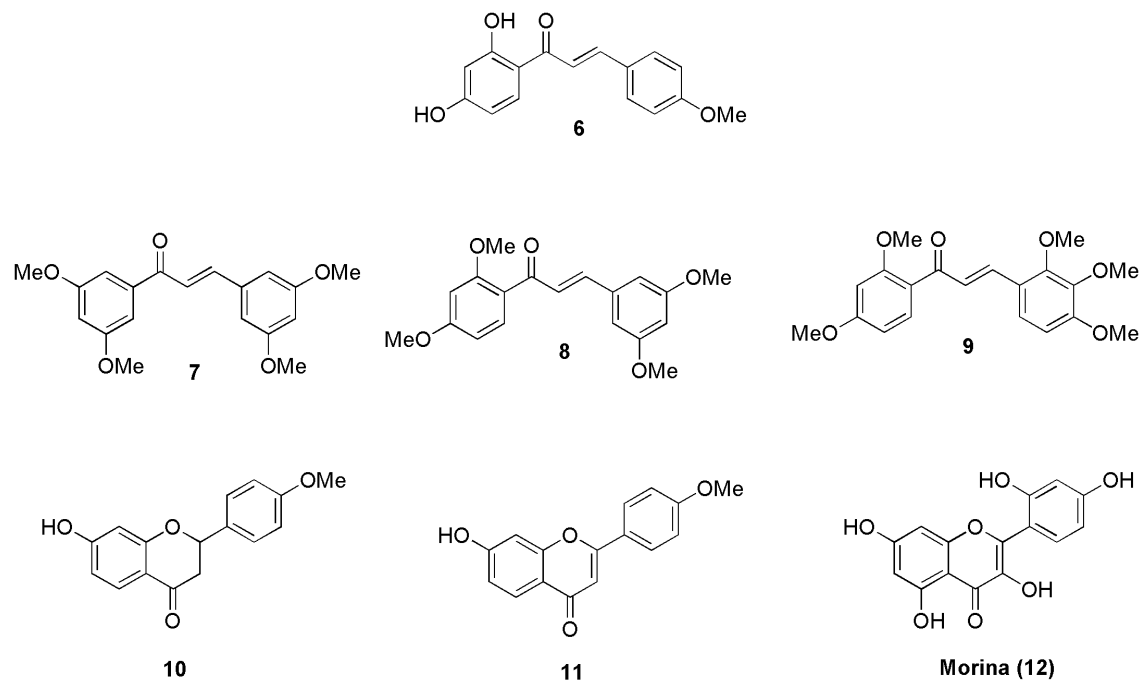
## Figuras e legendas



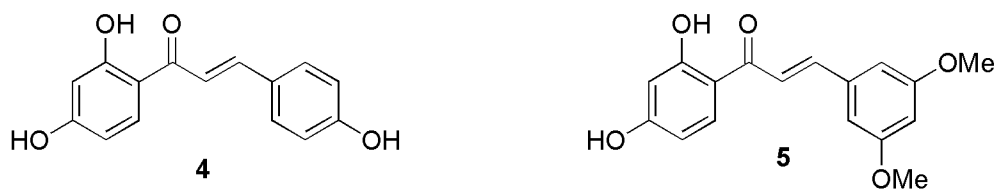
Esquema 1: Estratégia de simplificação estrutural.



*Esquema 2: Síntese das chalconas 4 e 5. Reagentes e condições: **Proteção dos produtos de partida:** (a) diidro-2-pirano (DHP), PPTS, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, ta; (b) MeI, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, refluxo; **Condensação e desproteção:** (c) NaOH 40%, MeOH; (d) HCl 4M.*



*Figura 1: Flavonóides testados*



*Figura 2: Estruturas prováveis das chalconas sintetizadas*



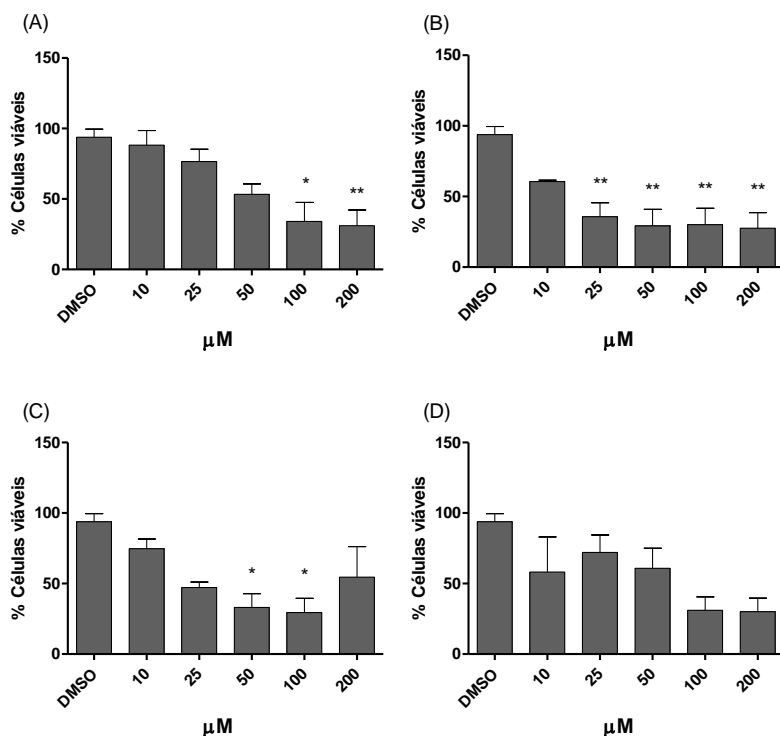


Figura 3: Efeito das chalconas na viabilidade de linhagem celular de glioma de ratos C6.

Células de glioma C6 foram tratadas com as chalconas **6** (A), **7** (B), **8** (C) e **9** (D) e o controle foi tratado com DMSO. Após 24 horas de tratamento, a viabilidade celular foi avaliada por teste de MTT, como descrito nos materiais e métodos. A viabilidade celular foi representada em relação ao controle DMSO. Os valores são representados como médias  $\pm$  SD de três experimentos independentes realizados em triplicata. Dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida por análise de comparações (Tukey). \* Diferença significativa em relação ao DMSO ( $p \leq 0,05$ ). \*\* Diferença significativa em relação ao DMSO ( $p \leq 0,01$ ). \*\*\* Diferença significativa em relação ao DMSO ( $p \leq 0,001$ ).

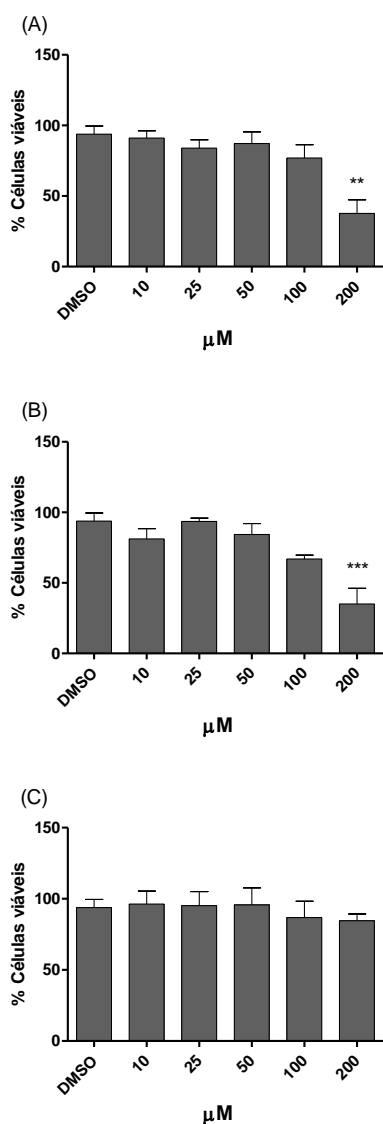
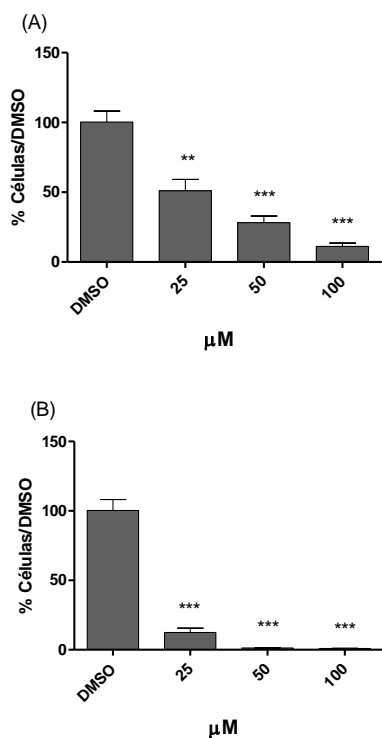


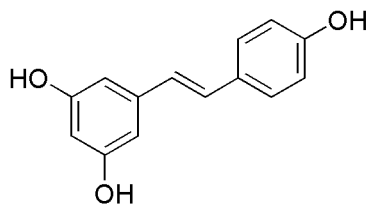
Figura 4: Efeito dos flavonóides cíclicos na viabilidade de linhagem celular de glioma de ratos C6.

Células de glioma C6 foram tratadas com a flavanona **10** (A), flavona **11** (B) e flavonol **Morina-12** (C) e o controle foi tratado com DMSO. Após 24 horas de tratamento, a viabilidade celular foi avaliada por teste de MTT como descrito nos materiais e métodos. A viabilidade celular foi representada em relação ao controle DMSO. Os valores são representados como médias  $\pm$  SD de três experimentos independentes realizados em triplicata. Dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida por análise de comparações (Tukey). \* Diferença significativa em relação ao DMSO ( $p \leq 0,05$ ). \*\* Diferença significativa em relação ao DMSO ( $p \leq 0,01$ ). \*\*\* Diferença significativa em relação ao DMSO ( $p \leq 0,001$ ).



*Figura 5: Efeito das chalconas 6 e 7 na proliferação das células de glioma*

Culturas semi-confluentes de células de glioma foram tratadas por 24 horas, como descrito nos materiais e métodos. O controle foi tratado com DMSO. Depois de 24 horas de tratamento, as células foram desprendidas com solução 0,05% tripsina/ EDTA e contadas em hemocítômetro. Os valores estão representados como médias  $\pm$  SD de três experimentos independentes em duplicata. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida por análise de comparações múltiplas (Tukey). \*\*Diferença significativa em relação ao DMSO ( $p \leq 0,01$ ). \*\*\* Diferença significativa em relação ao DMSO ( $p \leq 0,001$ ).



*Figura 6: Chalcona Resveratrol.*

## **ANEXO I**

## Investigational New Drugs

Medicina - Oncology & Hematology | Investigational New Drugs

## Investigational New Drugs

The Journal of New Anticancer Agents

Editor-in-Chief: Eric K. Rowinsky ISSN: 0167-6997 (print version) ISSN: 1573-0646  
(electronic version) Journal no. 10637

Instructions for Authors

Instructions for Authors

### TYPES OF PAPERS

preclinical studies, phase I studies, phase II studies, phase III studies, short reports, reviews, Letters to the Editor, and clinical trial methodologies (special case only, author request).

### LETTERS TO THE EDITOR

Text is limited to 750 words, with no abstract. There may be 1 figure, up to 3 references, and no more than 3 authors, with author affiliations only including main institution, place name and (state plus) country (i.e. no departments, etc.).

### MANUSCRIPT SUBMISSION

#### Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

#### Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

#### Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

## TITLE PAGE

### Title Page

The title page should include:

The name(s) of the author(s) • A concise and informative title • The affiliation(s) and address(es) of the author(s) • The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author •

### Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

### Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

## TEXT

### Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text. Use italics for emphasis. Use the automatic page numbering function to number the pages. Do not use field functions. Use tab stops or other commands for indents, not the space bar. Use the table function, not spreadsheets, to make tables. Use the equation editor or MathType for equations. Note: If you use Word 2007, do not create the equations with the default equation editor but use the Microsoft equation editor or MathType instead. Save your file in doc format. Do not submit docx files.

Word template (zip, 154 kB) Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

LaTeX macro package (zip, 182 kB)

### Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

### Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

### Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables. Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols. Always use footnotes instead of endnotes.

#### Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

#### SCIENTIFIC STYLE

Genus and species names should be in italics.

#### REFERENCES

##### Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples: 1. Negotiation research spans many disciplines [3]. 2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5]. 3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

##### Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

Journal article Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8 Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted: Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329 Article by DOI Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086 Book South J, Blass B (2001) The future of modern



genomics. Blackwell, London Book chapter Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) The rise of modern genomics, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257 Online document Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007 Dissertation Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

[www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php](http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php)

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

EndNote style (zip, 2 kB)

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file `spbasic.bst` which is included in Springer's LaTeX macro package.

## TABLES

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

## ARTWORK

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

### Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically. Indicate what graphics program was used to create the artwork. For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable. Vector graphics containing fonts must have

the fonts embedded in the files. Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

#### Line Art

Definition: Black and white graphic with no shading. Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size. All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi. Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

#### Halftone Art

Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc. • If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves. Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi. • •

#### Combination Art

Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc. Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi. • •

#### Color Art

Color art is free of charge for online publication. •

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent. If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions. •

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel). • •

#### Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts). Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label. Avoid effects such as shading, outline letters, etc. Do not include titles or captions within your illustrations.

#### Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals. • Figures should always be cited in text in consecutive numerical order. • Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.). • If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately. •

#### Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file. Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type. No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption. Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs. Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

#### Figure Placement and Size

When preparing your figures, size figures to fit in the column width. • For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm. For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm. • •

#### Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

#### Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware) Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (color-blind users would then be able to distinguish the visual elements) Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1 •••

#### ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

#### Submission

Supply all supplementary material in standard file formats. • Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author. To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading. ••

#### Audio, Video, and Animations

Always use MPEG-1 (.mpg) format. •

#### Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability. • A collection of figures may also be combined in a PDF file. •

#### Spreadsheets

Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended. • If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel). •

#### Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), .vrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

•

#### Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file. •

#### Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables. Refer to the supplementary

files as “Online Resource”, e.g., “... as shown in the animation (Online Resource 3)”, “... additional data are given in Online Resource 4”. Name the files consecutively, e.g. “ESM\_3.mpg”, “ESM\_4.pdf”. •••

#### Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file. •

#### Processing of supplementary files

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

•

#### Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material • Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk) •

#### INTEGRITY OF RESEARCH AND REPORTING

##### Ethical standards

Manuscripts submitted for publication must contain a declaration that the experiments comply with the current laws of the country in which they were performed. Please include this note in a separate section before the reference list.

##### Conflict of interest

Authors must indicate whether or not they have a financial relationship with the organization that sponsored the research. This note should be added in a separate section before the reference list. If no conflict exists, authors should state: The authors declare that they have no conflict of interest.

#### AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer’s web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color. Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

#### Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for published articles.

#### Springer Open Choice

##### Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws. Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, they agree to the Springer Open Choice Licence.

##### Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

##### Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

##### Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

##### Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.