



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

GIOVANA MARTINEZ

Síntese e Potencial anti - Chagas de
Chalconas *O*-Geraniladas

São José do Rio Preto - SP

2022

Giovana Martinez

**Síntese e Potencial anti – Chagas de
Chalconas *O*-Geraniladas**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto

Orientador: Prof. Dr. Luis Octávio Regasini

Coorientador: Dr. Miguel Divino da Rocha

São José do Rio Preto - SP

2022

Martinez, Giovana.

Síntese e Potencial anti-Chagas de chalconas O-geraniladas/ Giovana Martinez -- São José do Rio Preto, 2022

Orientador: Luis Octavio Regasini

Coorientador: Miguel Divino da Rocha

Tese (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

1. chalconas preniladas. 2. doença de Chagas. 3. *Trypanosoma cruzi*.

I. Síntese e Potencial anti-Chagas de chalconas O-geraniladas.

CDU –

São José do Rio Preto - SP

2022

Giovana Martinez

**Síntese e Potencial anti - Chagas de
Chalconas *O*-Geraniladas**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto

Orientador: Prof. Dr. Luis Octávio Regasini

Coorientador: Dr. Miguel Divino da Rocha

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Luis Octávio Regasini (Orientador)

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

Prof. Dr. André Gustavo Tempone Cardoso (ICB-USP)

Universidade de São Paulo

Prof. Dr. João Paulo dos Santos Fernandes (ICAQF)

Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas

07 de fevereiro de 2022

São José do Rio Preto - SP

2022

*“E ainda se vier noites traiçoeiras
Se a cruz pesada for, Cristo estará contigo
O mundo pode até fazer você chorar
Mas Deus te quer sorrindo”*

*Música: Noites traiçoeiras
Padre Marcelo Rossi*

*Dedico este trabalho principalmente a
Deus, à minha família, especialmente, aos
meus pais, Isa Meire Lopes Cabelo e
Adriano Martínez, ao meu irmão, Pedro
Lucas Viana Martínez e aos meus amados
avós, Zeni Irene Lopes Cabelo, Urbano
Cabelo, Antônio Franco Martínez e meu
anjo da guarda Darcí Pirassolo Martine*

São José do Rio Preto - SP

2022

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar junto comigo durante toda a minha caminhada, principalmente, aos empecilhos e tempestades da vida. Sem ELE, nada seria possível, muito obrigado Senhor!

Aos meus pais, Isa Meire Lopes Cabelo e Adriano Martinez, e ao meu irmão, Pedro Lucas Vieira Martinez, pelo amor, pelo carinho, por apoiarem as minhas decisões por mais loucas e difíceis, pelos ensinamentos sobre a vida e principalmente pelo apoio financeiro. Sei o quanto foi difícil me manter nos estudos, desde o ensino fundamental, a graduação e a pós-graduação, para que eu tivesse uma educação de qualidade. Ao meu namorado Lucas Lemes da Costa por todo apoio emocional. Aos meus avós, Zeni Irene Lopes Cabelo, Urbano Cabelo, Antônio Franco Martinez e meu anjo Darci Pirassolo Martinez que sempre apoiaram financeiramente também meus estudos, por todo o carinho e intercessão nas orações. Aos meus tios Flavio Martinez e Iara Martinez, por todo carinho e apoio financeiro nas minhas idas a eventos, em especial o que ocorreu durante a pós-graduação, o BrazMedChem (2019) realizado em Pirenópolis - GO. Obrigado por tudo!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luis Octavio Regasini, por todos os ensinamentos, broncas necessárias para meu crescimento como pessoa e profissional e principalmente empatia. Por todo o tempo da graduação em que foi um professor exemplar e pela pós-graduação, por todas as experiências vividas no decorrer anos e principalmente pela amizade. Admiro muito sua história de vida e tudo que conquistou! Muito obrigado professor, orientador e amigo Luis!

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Miguel Divino da Rocha. Sempre atencioso e prestativo. Agradeço por todo auxílio durante a execução da tese, qualificação e aos tempos dentro do laboratório. Agradeço por sua amizade, “Miguelito”.

Aos amigos, que estiveram juntos no Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos (LAQ), agradeço imensamente por todo suporte, por toda amizade, pelos ensinamentos, à Me. Julyanna Nascentes, a Me. Lígia Rodrigues, Me. Maria Beatriz Silva da Costa aos futuros mestres Reinaldo Theodoro, Gracielle e ao Dinis Caina Kanjaba (angolano que tivemos o prazer de conhecer, sua cultura, sua vida e seus ensinamentos), aos meus orientandos Amábilla, Murilo e Maria Isabel, por me auxiliarem durante meus

experimentos e por me deixarem os auxiliarem também e em especial, à Me. Letícia Ribeiro de Assis, pela amizade, apoio emocional, discussões científicas, auxílio na execução dos experimentos e, principalmente, por tornarem esses 3 anos mais amenos. Vocês são profissionais que desejo todo o sucesso!

Ao Prof. Dr. André Gustavo Tempone Cardoso, pesquisador científico VI do Instituto Adolfo Lutz – São Paulo, pela colaboração nos estudos contra o protozoário *Trypanosoma cruzi*. A sua discente Erica por todos os ensaios realizados com o protozoário.

Ao Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP/São José do Rio Preto (FAPESP – Processo nº 2009/53989-4), especialmente, ao Dr. Fábio Moraes, pela realização dos experimentos de Ressonância Magnética Nuclear. Ao Laboratório-II de Ressonância Magnética Nuclear, Instituto de Química, UNESP/Araraquara, especialmente, ao Dr. Nivaldo Boralle, também pela realização dos experimentos de Ressonância Magnética Nuclear.

Às agências de fomento, CAPES, FAPESP e CNPq, pelo auxílio financeiro ao laboratório.

Aos meus amigos, Siomara Miranda dos Santos Alves Correa, Estefani Bergamini de Freitas, Lana Buosi Martinez, Bruna Luzia e Luan Viana. Obrigado por serem minha válvula de escape, me ajudando em todos os momentos.

A todos que de alguma forma contribuíram e estão próximos a mim, fazendo com que a vida vale a pena.

RESUMO

Doenças negligenciadas são enfermidades que prevalecem em condições de pobreza e que contribuem para a desigualdade social. A doença de Chagas (DC) é um exemplo de doença negligenciada que afeta milhões de pessoas, ocasionando números elevados de mortes. Sendo assim, as doenças infecciosas apresentam elevada necessidade de serem investigadas pela Química Medicinal, visando o planejamento e descoberta de fármacos antichagásicos inovadores. A 4-*O*-geranilisoliquiritigenina apresentou atividade contra *Plasmodium falciparum*, um protozoário causador da malária, mas não foi avaliada contra *T. cruzi*. Além disso, várias chalconas preniladas têm mostrado potencial antichagásico. O objetivo geral dessa dissertação consiste na síntese e avaliação atividade contra *Trypanosoma cruzi*, da 4-*O*-geranilisoliquiritigenina e seus análogos. Neste contexto, para alcançar os objetivos delineados, foram sintetizadas a 4-*O*-geranilisoliquiritigenina e 9 análogos chalcônicos, a partir de reações de proteção de acetofenonas, reação de condensação aldólica de Claisen-Schmidt e reações de desproteção. As substâncias foram purificadas por técnicas de recristalização, cromatografia em coluna de gel de sílica, cromatografia em coluna de permeabilização em gel (Sephadex® LH 20). As estruturas das substâncias foram confirmadas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C. A 4'-hidroxi-4-*O*-geranilchalcona (G3) exibiu atividade contra as formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* com valores de CE₅₀ de 2,14 μM e 12,28 μM, respectivamente. Os ensaios de toxicidade indicaram um CC₅₀ de 39,10 μM contra fibroblastos NCTC clone 929, bem como uma hemólise ausente na maior concentração testada (200 μM). A substância G3 foi submetida a uma avaliação *in silico*, utilizando a ferramenta SwissADME, a qual indicou adequadas propriedades farmacocinéticas e *druglikeness*, como ser moderavelmente solúvel em água, possuir alta absorção gastrointestinal, permeabilidade por via oral e teve valores ideais de flexibilidade, lipofilicidade, tamanho, polaridade, solubilidade e saturação. Além disso, a substância G3 é inédita na literatura, sendo um possível fármaco promissor.

Palavras – chaves: chalconas preniladas; doença de Chagas; *Trypanosoma cruzi*;

ABSTRACT

Neglected diseases prevalent in conditions of poverty and contribute to social inequality. Chagas disease (CD) is an example of a neglected disease that affects millions of people, causing high numbers of deaths. Therefore, infectious diseases have a high need to be investigated by Medicinal Chemistry, aiming at the planning and discovery of innovative antichagasic drugs. 4-*O*-geranilisoliquiritigenin showed activity against *Plasmodium falciparum*, a protozoan that causes malaria, but was not evaluated against *T. cruzi*. In addition, several prenylated chalcones have shown antichagasic potential. The general objective of this dissertation is the synthesis and evaluation activity against *Trypanosoma cruzi* of 4-*O*-geranilisoliquiritigenin and its analogues. In this context, to achieve the outlined objectives, 4-*O*-geranilisoliquiritigenin and 9 chalconic analogues were synthesized from acetophenone protection reactions, Claisen-Schmidt aldol condensation reaction and deprotection reactions. The substances were purified by recrystallization techniques, silica gel column chromatography, gel permeabilization column chromatography (Sephadex ® LH 20). The structures of the substances were confirmed by ¹H and ¹³C Nuclear Magnetic Resonance (NMR). 4'-hydroxy-4-*O*-geranilchalcone (G3) exhibited activity against trypomastigote and amastigote forms of *T. cruzi* with EC₅₀ values of 2.14 μM and 12.28 μM, respectively. Toxicity assays indicated a CC₅₀ of 39.10 μM against NCTC clone 929 fibroblasts, as well as absent hemolysis at the highest concentration tested (200 μM). Substance G3 was submitted the avaluation in silico using the SwissADME tool, which indicated adequate pharmacokinetic and *druglikeness* properties, such as being sparingly soluble in water, have high gastrointestinal absorption, oral permeability, having ideal values of flexibility, lipophilicity, size, polarity, solubility, and saturation. In addition, substance G3 is unprecedented in the literature, being a possible promising drug.

keywords: prenylated chalcones, chagas disease, *Trypanosoma cruzi*

LISTA DE ABREVIATÖES

ADME	Absorção, Distribuição, Metabolismo e Eliminação
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Bnz	benznidazol
CCC	cardiopatia chagásica crônica
CC ₅₀	concentração citotóxica de 50%
CCD	cromatografia de camada delgada
CC-FN	cromatografia de coluna de fase normal
DC	doença de Chagas
DCA	doença de Chagas em fase aguda
CE ₅₀	concentração efetiva 50 %
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-DAD	detecção de arranjo de fotodiodos
DMSO	dimetilsulfóxido
DTNs	doenças tropicais negligenciadas
G1 até G10	códigos da 4- <i>O</i> -geranilisoliquiritigenina e análogos
HAT	tripanossomíase africana
IC ₅₀	concentração inibitória de 50%
IF	índice de infecção
IS	índice de seletividade
<i>J</i>	constante de acoplamento
MSF	médico sem fronteiras
MOMCl	cloreto de metoximetila
MOI	multiplicidade de infecção
Nfx	nifurtimox
OES	óleos essenciais
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
OMS	Organização mundial da saúde
PAIN	compostos de interferência de pan-ensaio
PTSA	ácido <i>para</i> -toluenossulfônico
P & D	pesquisa e desenvolvimento
Rf	fator de retenção

RMN	Ressonância Magnética Nuclear
S	Sinpleto
SFB	Soro fetal bovino
SIM	Sistema de informação sobre mortalidade

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição global da doença de Chagas.	16
Figura 2. Número de óbitos devido às principais doenças infecciosas e parasitárias no Brasil, entre os anos de 2007 e 2017	17
Figura 3. Formas evolutivas do <i>Trypanosoma cruzi</i> . (A) Epimastigota extracelular, replicativa no intestino médio do inseto-vetor; (B) Tripomastigota; (C) Amastigota intracelular, replicativa no hospedeiro vertebrado.	22
Figura 4. Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	23
Figura 5. Fármacos utilizados no tratamento da doença de Chagas.....	23
Figura 6. Mecanismo de ação dos fármacos antichagásicos Nfx e Bzn.....	25
Figura 7. Flavonoides com atividade contra <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
Figura 8. Estrutura do núcleo chalcônico	27
Figura 9. Grupos terpenóias	27
Figura 10. Chalconas preniladas com atividade contra <i>Trypanosoma cruzi</i>	28
Figura 11. <i>Lonchocarpus xuul</i>	29
Figura 12. Chalconas isoladas das raízes de <i>Lonchocarpus xuul</i> Lundell.....	29
Figura 13. Estrutura da 4- <i>O</i> -geranilisoliquitigenina.....	30
Figura 14. Estrutura da 4- <i>O</i> -isoprenilisoliquitigenina.....	30
Figura 15. Radar de Biodisponibilidade (SwissADME) para a 4'-hidroxi-4- <i>O</i> -geranilchalcona.....	60
Figura 16. Efeitos citotóxicos em células controles e nas células incubadas com benznidazol.....	65
Figura 17. Citotoxicidade de G3 em fibroblastos de tecido conjuntivo de camundongo (NCTC clone 929). Microscopia de contraste de fase (aumento 20×), morfologia das células na presença de diferentes concentrações do composto G3 . Barra: 50 μM.....	66
Figura 18. Análise visual da atividade hemolítica.....	68

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Planejamento dos análogos de 4- <i>O</i> -geranilsoliquiritigenina (G1).....	32
Esquema 2. Esquema geral de síntese para a 4- <i>O</i> -geranilsoliquiritigenina	34
Esquema 3. Esquema geral de síntese para os análogos da série I.....	35
Esquema 4. Esquema geral de síntese para o análogo G10 da série II	36
Esquema 5. Esquema geral de síntese para os análogos G8 e G9 da série II	36
Esquema 6. Mecanismo de reação da proteção da 2,4-dihidroxiacetofenona com cloreto de metoximetila (MOMCl).....	45
Esquema 7. Mecanismo de condensação aldólica de Claisen- Schmidt	47
Esquema 8. Mecanismo de desproteção	48
Esquema 9. Mecanismo de Desgeranilação/Desisoprenilação (forma um melhor grupo abandonador que a reação de desproteção).....	49

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Espectro de RMN de ^1H da 2,4 -bis(metoximetoxi)acetofenona (DMSO- d_6 , 600 MHz).....	78
Anexo 2. Espectro de RMN de ^{13}C da 2,4 -bis(metoximetoxi)acetofenona DMSO- d_6 ; 150 MHz).....	78
Anexo 3. Espectro de RMN de ^1H da 2 -hidroxi 4-metoximetoxiacetofenona (DMSO- d_6 ,600MHz)	79
Anexo 4. Espectro de RMN de ^{13}C da 2-hidroxi-4-metoximetoxiacetofenona (DMSO- d_6 ; 150 MHz)	79
Anexo 5. Espectro de RMN de ^1H do 4- <i>O</i> -geranilbenzaldeído (CDCl ₃ , 600 MHz).....	80
Anexo 6. Espectro de RMN de ^{13}C do 4- <i>O</i> -geranilbenzaldeído (CDCl ₃ , 150 MHz).....	80
Anexo 7. Espectro de RMN de ^1H praticamente puro da substância 21 (DMSO- d_6 , 600 MHz).....	81
Anexo 8. Espectro de RMN de ^1H da 4- <i>O</i> -geranilisoliquiritigenina impura com 2-hidroxi-4-metoximetoxiacetofenona (DMSO- d_6 , 600 MHz)	81
Anexo 9. Espectro de RMN de ^{13}C da 4- <i>O</i> -geranilisoliquiritigenina impura com 2-hidroxi-4-metoximetoxiacetofenona (DMSO- d_6 , 150 MHz)	82
Anexo 10. Espectro de RMN de ^1H do 4- <i>O</i> -prenilbenzaldeído (DMSO- d_6 , 600 MHz) 82	
Anexo 11. Espectro de RMN de ^1H da substância 31 (DMSO- d_6 , 600 MHz).....	83
Anexo 12. Espectro de RMN de ^{13}C da substância 31 (DMSO- d_6 , 150 MHz).....	83
Anexo 13. Espectro de RMN de ^1H da isoliquiritigenina (DMSO- d_6 ,600MHz)	84
Anexo 14. Espectro de RMN de ^1H da substância G5 (DMSO- d_6 ,600MHz).....	84
Anexo 15. Espectro de RMN de ^1H da 2',4'-dihidroxichalcona (DMSO- d_6 , 600 MHz)85	
Anexo 16. Espectro de RMN de ^1H da substância G2 (DMSO- d_6 , 600 MHz).....	85
Anexo 17. Espectro de RMN de ^{13}C da substância G2 (DMSO- d_6 , 600 MHz).....	86
Anexo 18. Espectro de RMN de ^1H da substância G3 (DMSO- d_6 , 600 MHz)	86
Anexo 19. Espectro de RMN de ^{13}C da G3 (DMSO- d_6 , 600 MHz)	87
Anexo 20. Espectro de RMN ^1H da substância G4 impura (DMSO- d_6 , 600 MHz)	87
Anexo 21. Espectro de RMN ^{13}C da substância G4 impura (DMSO- d_6 , 150 MHz	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades físico-químicas previstas da 4'-hidroxi-4- <i>O</i> -geranilchalcona usando a ferramenta SwissADME.....	59
Tabela 2. Predição das propriedades farmacocinéticas e <i>drug-likeness</i> da 4'-hidroxi-4- <i>O</i> -geranilchalcona utilizando a ferramenta SwissADME.	61
Tabela 3. Atividade contra <i>Trypanosoma cruzi</i> e citotoxicidade de G3	63
Tabela 4. Avaliação da toxicidade de G3 contra células NCTC.	65
Tabela 5. Número ou código das estruturas e estruturas características.	89

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Cromatograma de 4'-hidroxi-4- <i>O</i> -geranilchalcona. Metanol: Água (3:1)..	50
Gráfico 2. Absorbância versus concentração da substância G3 comparada com benznidazol.....	67
Gráfico 3. Porcentagem de viabilidade celular versus concentração da substância G3 comparada com benznidazol.	68
Gráfico 4. Absorbância versus concentração comparando substância G3 , controle e controle positivo.	69
Gráfico 5. Porcentagem da atividade hemolítica versus concentração da substância G3 , controle e controle positivo.	69

1. SUMÁRIO	
1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Doença de Chagas.....	15
1.2. Doença de chagas e Covid-19	20
1.3 <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
1.4 Tratamento da Doença de Chagas	23
1.5 Chalconas.....	26
1.6 4- <i>O</i> -geranilisoliquiritigenina e 4- <i>O</i> -isoprenilisoliquiritigenina.....	29
2 OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo geral	30
2.2 Objetivos Específicos	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 Planejamento dos análogos de 4- <i>O</i> -geranilisoliquiritigenina.....	31
3.2 Reagentes e solventes	32
3.3 Métodos cromatográficos	32
3.3.1 Cromatografia em Camada Delgada.....	32
3.3.2 Cromatografia em Coluna de Fase Normal	33
3.3.3 Cromatografia de permeação em gel	33
3.4 Ressonância Magnética Nuclear – RMN ¹ H e ¹³ C e determinação da Lipofilicidade (Log Po/w)	33
3.5 Síntese da 4- <i>O</i> -geranilisoliquiritigenina e de seus análogos.....	34
3.5.1 Reação de proteção da 2',4'-dihidroxicetofenona.....	37
3.5.2 Síntese do 4- <i>O</i> -geranilbenzaldeído.....	37
3.5.3 Reação de condensação aldólica de Claisen-Schmid	37
3.5.4 Reação de desproteção do intermediário <i>O</i> -geranilado 20.....	37
3.5.5 Síntese dos análogos da série I	38
3.5.5.1 Síntese de 2'-hidroxi-4- <i>O</i> -geranilchalcona	38
3.5.5.2 Síntese de 4'-hidroxi-4- <i>O</i> -geranilchalcona	39
3.5.5.3 Síntese de 3'-hidroxi-4- <i>O</i> -geranilchalcona	39
3.5.5.4 Síntese de 4- <i>O</i> -geranilchalcona.....	40
3.5.5.5. Síntese de 2,4'-dimetoxi-4- <i>O</i> -geranilchalcona e 2'-hidroxi-4'-metoxi-4- <i>O</i> -geranilchalcona.....	40
3.5.6 Síntese dos análogos da série II.....	40
3.5.6.1 Síntese das substâncias G8 e G9	40
3.5.6.2 Síntese de 4- <i>O</i> -isoprenil-isoliquiritigenina.....	41
3.5.6.2.1 Síntese do 4- <i>O</i> -isoprenilbenzaldeído.....	41
3.5.6.2.2 Condensação aldólica de Claisen-Schmidt para obtenção do intermediário isoprenilado	41

3.5.6.2.3	Reação de desproteção.....	42
3.6	Estudo <i>in silico</i> utilizando a ferramenta SwissADME	42
3.7	Ensaio biológico	42
3.7.1	Animais em experimentação	42
3.7.2	Atividade contra as formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	43
3.7.3	Atividade contra as formas amastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	43
3.7.4	Análises Estatísticas	44
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	45
4.1	4- <i>O</i> - geranilisoliquiritigenina	45
4.2	Análogos da série I	49
4.3	Análogos da série II	50
4.4	Caracterização da 4- <i>O</i> -geranilisoliquiritigenina, reagentes e análogos.....	51
4.4.1	2,4-bismetoximetoxiacetofenona.....	51
4.4.2	2-hidroxi-4-metoximetoxilacetofenona.....	52
4.4.3	4- <i>O</i> -geranilbenzaldeído	52
4.4.4	(E)-1-(2,4-bismetoximetoxifenil)-3-(<i>O</i> geranilfenilprop-2-em-1-ona)	53
4.4.5	4- <i>O</i> -geranilisoliquiritigenina impura.....	53
4.4.6	4- <i>O</i> -prenilbenzaldeído	54
4.4.7	Intermediário isoprenilado.....	54
4.4.8	3'-hidroxi-4- <i>O</i> -geranilchalcona.....	55
4.4.9	2'-hidroxi-4- <i>O</i> -geranilchalcona.....	56
4.4.10	4'-hidroxi-4- <i>O</i> -geranilchalcona.....	56
4.4.11	4- <i>O</i> -geranilchalcona impura	57
4.4.12	2'4'-dihidroxichalcona	58
4.4.13	Isoliquiritigenina.....	58
4.5	Estudos <i>in silico</i> para a 4'-hidroxi-4- <i>O</i> -geranilchalcona e fármacos de referência utilizando SwissADME®	59
4.6	Atividade biológica.....	62
4.6.1.	Determinação de Concentrações Efetivas (EC ₅₀) contra as formas tripomastigotas e amastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	62
4.6.2	Avaliação da toxicidade contra células NCTC.....	64
4.6.3.	Avaliação da atividade hemolítica.....	68
5	CONCLUSÕES.....	69
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
7.	ANEXOS	78
7.1	ANEXOS.....	89

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) são doenças endêmicas que afetam principalmente as populações em vulnerabilidade e que vivem em condições precárias. A pobreza, falta de saneamento básico e água não tratada são fatores associados a estas enfermidades. As DTNs ocorrem em regiões tropicais e subtropicais do mundo totalizando aproximadamente 149 países, afetando mais de um bilhão de pessoas e acarretando severos problemas de saúde, possuindo um amplo impacto socioeconômico (ANDREWS; FISHER; SKINNER-ADAMS, 2014; OMS, 2018).

Essas doenças são consideradas negligenciadas devido à falta de assistência e investimento por parte de entidades particulares, sociais, de saúde e por não constituírem um mercado farmacêutico lucrativo (DE SOUZA, 2010). Vanlerberghe; Verdonck (2013) relatam que as DTN's atingem as várias etapas de desenvolvimento do indivíduo, como por exemplo, na fase da infância, afetando o rendimento escolar, e na fase adulta, prejudica o exercício de suas rotinas causando uma grande perda econômica para a região.

Entre janeiro de 2012 e setembro de 2018, 256 novos fármacos foram descobertos, mas apenas oito, ou 3,1%, tinham como alvo, as doenças negligenciadas. Para a doença de Chagas apenas o fexinidazol, sendo um reposicionamento de fármaco, mas avançando em pesquisas para a doença de Chagas (NEWMAN DJ et al, 2019).

Considerada uma DTN, a doença de Chagas é negligenciada devido à falta de apoio político, do baixo poder aquisitivo de seus pacientes e dos sistemas de saúde mais pobres, que não conseguem gerar um retorno financeiro de interesse pela maior parte das empresas farmacêuticas (FIOCRUZ, 2017). Devido a isso não há investimento em pesquisa e desenvolvimento para essas doenças, que sem inovação, por vezes acaba agravando o sofrimento do paciente pois os tratamentos existentes são antigos, ineficazes, tóxicos ou simplesmente inexistentes (DNDi, 2018)

A doença de Chagas (DC) é uma doença descrita desde 1909 por Carlos Chagas, sendo causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Atualmente estima-se que 6 a 8 milhões de pessoas em todo mundo são portadoras da doença, com cerca de 30 mil novos casos por ano. A maioria dessas pessoas (7 em cada 10), desconhecem que estão com a doença devido não apresentarem sintomas clínicos. No Brasil, é a quarta doença

que mais causa morte dentre as DNTs (OPAS, 2021).

A DC é encontrada principalmente em áreas endêmicas de 21 países da América Latina continental, além de inúmeros casos nos Estados Unidos, Canadá e em países europeus. Nas últimas décadas, o padrão epidemiológico da doença foi alterado, passando de um ambiente rural para predominantemente urbano, sendo principalmente devido à mobilidade populacional, urbanização e emigração (OMS, 2018).

Na figura 1, podemos observar a distribuição global da doença de Chagas no mundo e as principais áreas endêmicas.

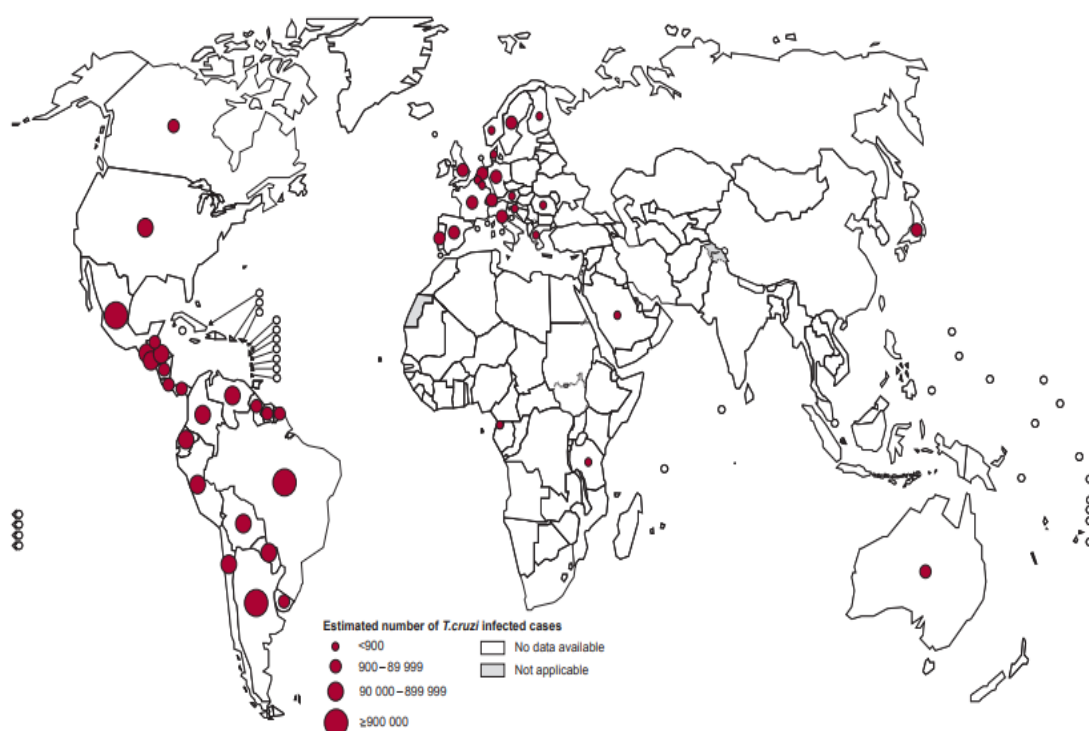


Figura 1. Distribuição global da doença de Chagas.

Fonte (adaptada): WHO, 2018.

No Brasil, 70.241 casos de infecção por *T. cruzi* foram descritos em dezembro de 2015, sendo que estes estão distribuídos em todo território nacional, com maior proporção em residentes da área urbana. Essa porcentagem superior de infecções nas populações que vivem nas cidades, está relacionada à expressiva migração populacional da zona rural para a urbana, ocorrida durante as últimas três décadas, com deslocamento estimado de 500 mil pessoas infectadas por *T. cruzi*. (SIMÕES, 2018).

No dia 14 de abril de 2021 foi comemorado o dia mundial da DC e o Ministério da Saúde nos apresentou um boletim epidemiológico mais recente sobre a doença. Em 2020 foi apresentado duas edições sobre a doença de chagas. A primeira edição, o boletim relatava informações sobre a fase crônica da doença e trazia dados de 2007 a 2017 e o segunda edição sobre a Covid-19 e a DC.

Segundo a OMS em seu boletim epidemiológico de 2020 (primeira edição), no período de 2007 a 2017 (Figura 2), foram registradas 51.293 mortes pela DC, uma média de 4.663 por ano, que supera a média anual de óbitos atribuídos à tuberculose e às hepatites virais no mesmo período, que foram de 4.616 e 2.815, respectivamente. Neste período o estado de Minas Gerais registrou o maior número de óbitos pela doença (n = 12.902), contudo os maiores coeficientes médios de mortalidade foram em Goiás (11,67/100 mil habitantes) e Distrito Federal (7,37/100 mil habitantes) (BRASIL, 2020).



Figura 2. Número de óbitos devido às principais doenças infecciosas e parasitárias no Brasil, entre os anos de 2007 e 2017

Fonte: Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM)/MS, 2019.

Em 2018, foram notificados 4.685 indivíduos suspeitos com doença de Chagas em fase aguda (DCA), e destes, 380 foram confirmados (8,1%). A região Norte registrou a maior proporção de casos do país (92,1%), com uma incidência de 1,93 casos/100 mil habitantes. (BRASIL, 2020)

A segunda edição do boletim epidemiológico traz dados sobre março a agosto de 2020 e chama atenção que do total de 125.691 óbitos registrados pela Covid-19, 207

faziam menção a DC, como comorbidade que contribuía para morte. Houve uma redução drástica no número de exames laboratoriais para DC, comparado com 2017 a 2019, devido a pandemia, o que culminou na redução da sensibilidade de vigilância epidemiológica da doença provavelmente relacionada aos esforços que foram deslocados para o enfrentamento da pandemia por COVID-19. Em 2020, foram confirmados 146 casos de DCA no Brasil, com uma letalidade de 2% (3/146), sendo que todos os óbitos ocorreram no estado do Pará. A região Norte apresentou a maior taxa de incidência da doença (BRASIL, 2021).

A infecção pelo *T. cruzi* pode ser adquirida por meio de vários tipos de transmissão, como a vertical (via placenta), oral, por transplante de órgãos, transfusão sanguínea, manejo de animais infectados, via sexual, e acidentes de laboratório (DIAS et al., 2011). A forma de transmissão mais conhecida é a vetorial, ocorre quando o hospedeiro, tem o contato das fezes do inseto conhecido como barbeiro, contaminadas com o protozoário (FIOCRUZ, 2013). Existem mais de 300 espécies que podem transmitir o *T. cruzi*, como *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus*, dentre mais (MSF, 2018).

A forma de transmissão por via oral tem crescido no Brasil, principalmente na região Amazônica, com a ingestão de alimentos contaminados como açaí e cana-de-açúcar. Há uma grande carga parasitária nesses alimentos, o que resulta em uma fase aguda inicial muito severa e com alto índice de mortalidade (PEREIRA et al., 2009). A contaminação por alimento pelo *T. cruzi* ocorre quando o triatomíneo deposita suas fezes na superfície de alimentos, ou quando esses são esmagados durante processamento de sucos de frutas ou durante o processamento do açaí (FERREIRA et al., 2016).

Na transmissão vertical, o parasito presente na mulher grávida passa para a criança, pela placenta, leite ou durante o parto, ocorrendo o envolvimento de vários fatores como, seu sistema imunológico, condições nutricionais e aspectos genéticos (AGUILAR et al., 2012). Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), ainda existem 1,12 milhão de mulheres em idade fértil infectadas na América Latina, onde são esperados anualmente entre 8 mil e 15 mil bebês nascidos com a DC. A Organização Pós-Americana de Saúde (OPAS) está trabalhando com os países para fortalecer sistemas de saúde materno-infantil para que possam detectar e tratar a DC rotineiramente, ao mesmo tempo que diagnosticam e tratam HIV, sífilis e hepatite B, eliminando assim a transmissão materno-infantil.

A infecção pelo *T. cruzi* ocorre em transplantes de órgãos a partir do doador chagásico como transplantes de coração, fígado, medula óssea, pâncreas ou rim e a partir de doador vivo, com morte cerebral. Isso afeta diretamente o transplante dessas estruturas, tendo em vista que a taxa parasitária é desconhecida (CHIEFFI et al, 2000; DIAS et al, 2005; BENVENUTTI, 2017). Os primeiros relatos de ocorrência de transmissão da DC datam do início da década de 1980, especialmente por meio de transplante de rins (CHOCAIR, 1981).

A transmissão por via sexual é possível em indivíduos na fase aguda da doença que mantenham relações sexuais nas quais ocorram eventual exposição ao sangue, incluindo, sexo anal, pouca lubrificação vaginal etc. (CHIEFFI et al, 2000; FIOCRUZ, 2013).

A DC pode ser classificada em duas fases, de acordo com os sintomas: a fase aguda e a fase crônica. As manifestações clínicas da fase aguda incluem, sinais Romaña ou chagoma de inoculação (localizada na região da picada), bem como sinais de infecção, febre prolongada, vômito, diarreia, mal-estar (TOSO; VIAL; GALANTI, 2011; RASSI et al., 2010).

Na fase aguda há o predomínio do parasita circulante na corrente sanguínea e tem duração de aproximadamente de 8 a 12 semanas. Se não tratada, a maioria dos casos evolui para a fase crônica, após anos ou até mesmo décadas e cerca de 20 a 30% dos pacientes desenvolvem complicações cardíacas ou gastrointestinais (HERNÁNDEZ et al., 2018). Nesta fase pode ocorrer complicações como miocardite e meningoencefalite, podendo levar a óbito (SILVA, A. P. et al., 2019). Na fase aguda é realizado o diagnóstico laboratorial que é baseado na observação do parasito presente no sangue dos indivíduos infectados (FIOCRUZ, 2017)

As manifestações clínicas da fase crônica incluem lesões cardíacas, aumento do volume do coração, alterações do ritmo de contração bem como as manifestações digestivas como comprometimento do tubo digestivo, com aumento de volume do esôfago e do estômago, podendo até levar a morte (FIOCRUZ, 2013). Em relação as manifestações digestivas, estudos demonstraram que 15% a 20% dos indivíduos em fase indeterminada evoluíram para a forma digestiva da DC (STANAWAY, ROTH, 2015). A DC está associada a presença de megacólon e megaesôfago (aumento de tamanho do cólon intestinal e do esôfago, respectivamente). Dentre as manifestações clínicas presentes estão a disfagia, soluços, regurgitação, constipação e distensão abdominal

(PEREZ-MOLINA, MOLINA, 2018).

Em relação as alterações cardiovasculares, um dos problemas clínicos mais frequentes é a cardiopatia chagásica crônica (CCC), acometendo 20% a 40% da população chagásica. A CCC é uma condição clínica caracterizada por diversas manifestações clínicas como insuficiência cardíaca, complicações tromboembólicas, arritmias ventriculares e morte súbita (TANOWITZ et al., 2015).

Ao mesmo tempo em que as pesquisas foram se desenvolvendo, os medicamentos para tratamento surgiram apenas há meio século, mostrando ser eficaz apenas durante a fase aguda e no início da fase crônica. À medida que a DC progride e surgem complicações, a eficácia do tratamento diminui, e os protocolos existentes não recomendam o tratamento de pacientes em estágio crônico avançado (DNDi, 2018).

Nas Américas menos de 10% das pessoas com a doença de Chagas apresentam diagnóstico e apenas 1% delas recebem o tratamento adequada. A importância de diagnosticar a doença em seu estágio inicial é relevante para o controle de mortalidade por esta DTN e melhor previsão de análise dos dados para desenvolvimento de pesquisas. Além do diagnóstico, a falta de investimento para pesquisa e desenvolvimento (P&D) é um problema comum (DNDi, 2018).

1.2. Doença de chagas e Covid-19

A Covid-19 é uma doença infecciosa causada pelo coronavírus - SARS-CoV-2 e gerou um alto impacto social e econômico. À medida que a doença avançou, impactou cada vez mais as populações vulneráveis e que já carregam uma grande carga de DTNs (OPAS, 2021; WILLIAMSON et al, 2020).

Segundo a OMS alguns grupos de pessoas são mais vulneráveis ao COVID-19, incluindo idosos, diabéticos, hipertensos, insuficiência renal crônica, problemas respiratórios crônicos e quem tem doenças cardiovasculares.

Considerando os problemas relacionados com a DC, devemos levar em consideração de que há evidências de que as enfermidades cardiovasculares são fatores de risco para agravamento da Covid-19. A forma cardíaca é a principal responsável pela mortalidade da DC e ainda não se sabe ao certo a influência das cepas, resposta imune e suscetibilidade genética da interação entre a infecção por SARS-CoV-2 e *T. cruzi*, porém, o que se sabe é que o SARS-CoV-2 se liga ao receptor humano da enzima conversora da

angiotensina 2 (ECA2), e essa interação pode desencadear uma resposta inflamatória levando à lesão e disfunção progressiva do miocárdio (ZAIDEL EJ. et al. 2020)

Um dos problemas agravados com a pandemia Covid-19 foi a forma de controlar, cuidar e prevenir as DTN's, incluindo a DC. Em muitos países foram interrompidas as ações de assistência e vigilância de saúde, devido ao distanciamento social, sobrecarga de serviços etc. Até a diminuição de distribuição de benznidazol para os estados, no ano de 2020 ocorreu. Comparando 2020 com a média de distribuição dos anos de 2016 a 2019, observa-se a diminuição nas entregas do medicamento após o decreto da pandemia pela OMS em 11 de março de 2020. Com as dificuldades enfrentadas pelas Secretarias de Saúde estaduais e municipais, devido às ações de enfrentamento da pandemia, de 2016 a 2019 houve a perda de 51.485 comprimidos, todos com vencimento em dez/2020. Devido à aproximação da validade e a não dispensação do medicamento para uso, foi encaminhada uma remessa para os estados reporem o estoque, o que justifica o aumento da distribuição no final do ano de 2020 (BRASIL, 2020).

É um desafio compreender os impactos da pandemia sobre as DTNS e ainda faltam evidências sobre a interação entre Covid-19 e DC (BRASIL, 2020).

1.3 *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi pertence à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e ao subgênero Schizotrypanum, sendo um organismo unicelular, caracterizado por um único flagelo, uma mitocôndria grande e cinetoplasto, sendo diferenciado de acordo com forma, tamanho, posicionamento do mesmo e flagelo (DIAS et al; 2011; VOTÝPKA et al., 2015).

O ciclo biológico do *T. cruzi* passa por duas fases complexas, envolvendo o vetor e o hospedeiro, apresentando três formas evolutivas: amastigotas, tripomastigota e epimastigotas (CDC, 2019; TELLERIA; TIBAYRENC, 2017) (Figura 3).

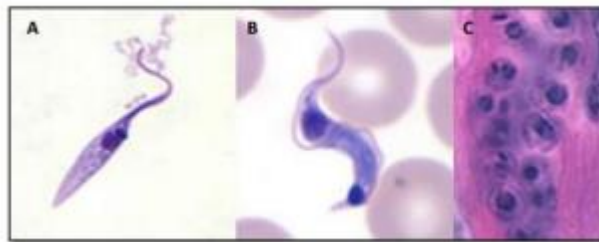


Figura 3. Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*. (A) Epimastigota extracelular, replicativa no intestino médio do inseto-vetor; (B) Tripomastigota; (C) Amastigota intracelular, replicativa no hospedeiro vertebrado.

Fonte: DCD, 2019.

A forma epimastigota é encontrada no intestino do inseto-vetor e apresenta um formato alongado e núcleo celular central. A forma tripomastigota é encontrada na porção final do intestino, sangue ou no espaço intracelular do hospedeiro, exibindo uma morfologia alongada, levemente achatada com o cinetoplasto bem afastado ao núcleo, o qual é centralizado e ovalado e um flagelo é mais alongado. A forma amastigota é uma forma multiplicativa de divisão binária, encontrada no interior das células nucleadas dos mamíferos (ADADE et al., 2014; ÁLVAREZ et al., 2014).

O ciclo de vida do *T. cruzi* se inicia quando o triatomíneo ingere as formas tripomastigotas metacíclicas e no seu organismo ocorre a diferenciação nas formas epimastigotas. Ao fazer o repasto sanguíneo libera junto com as fezes a forma infectante no homem ou em outro mamífero infectado e em contato com a pele lesionada, invadem a circulação sanguínea do hospedeiro e infectam diversos tipos celulares, se diferenciando em tripomastigotas metacíclicas (forma infectante). No citoplasma, ocorre divisão binária e as formas tripomastigotas metacíclicas se diferenciam em formas amastigotas. Após um período, as formas amastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas, rompem a célula e caem na circulação sanguínea, começando um novo ciclo (FERREIRA; ÁVILA, 1996; TEIXEIRA et al., 2012) (Figura 4).

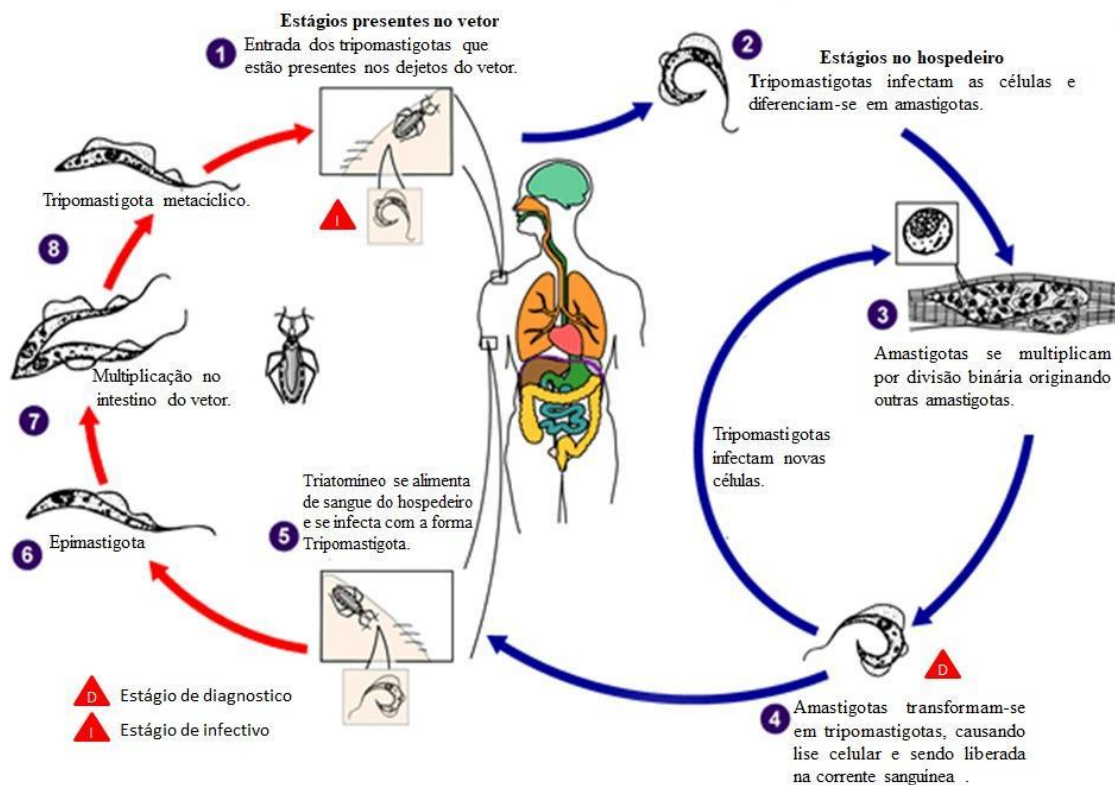


Figura 4. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

Fonte: DPC, 2019. (adaptado)

1.4 Tratamento da Doença de Chagas

Atualmente existem somente dois fármacos disponíveis comercialmente para o tratamento da doença de Chagas, benznidazol (Bnz) e o nifurtimox (Nfx) (Figura 5). O Nfx não está mais disponível como tratamento no Brasil devido à sua toxicidade e efeitos adversos. Os dois fármacos apresentam grande eficácia com altas taxas de redução parasitemia durante a fase aguda, porém sua eficácia é reduzida na fase crônica da doença (COURA, 2014).

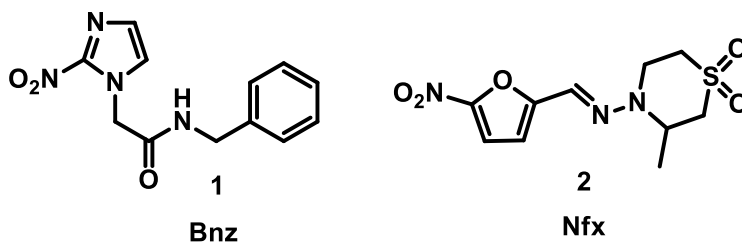


Figura 5. Fármacos utilizados no tratamento da doença de Chagas

O tratamento com Bnz tem suas limitações, como os efeitos adversos relatados, incluindo intolerância gástrica, erupções cutâneas ou problemas neuromusculares, inclusive ineficácia na evolução clínica em sua formulação para desenvolvimento de um tratamento eficaz. A alta incidência de efeitos adversos, especialmente em adultos, leva ao abandono do tratamento em muitas situações (PINAZO et al., 2010; JACKSON et al., 2010). Cerca de 20% dos pacientes abandonam o tratamento antes do término do esquema terapêutico. Além dessas complicações, para o estágio crônico avançado, os protocolos que existem não são recomendados e as únicas maneiras de tratamento acabam sendo intervenções como cirurgias corretivas, marca-passo e transplante de coração, além de farmacoterapia para controlar os sintomas cardíacos ou digestivos (PEREZ-MOLINA et al., 2012).

Ambos os fármacos são nitro-heterocíclicos, sendo o Bnz um 2-nitroimidazol e o Nfx um 5-nitrofurano. Os nitrocompostos são conhecidos pela sua toxicidade potencial, que está associada ao grupo nitro e seus produtos reduzidos, os quais podem provocar alterações de biomoléculas (lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos). Contudo o grupo nitro possui grande contribuição farmacofórica para a atividade terapêutica dos fármacos antichagásicos (FRANCISCO et al., 2015; KEENAN; CHAPLIN, 2015; PATTERSON; WYLLIE, 2014; WALSH; MIWA, 2011).

Em linhas gerais, Bnz e Nfx são pró-fármacos que são ativados por nitroredutases do *T. cruzi*, levando a geração intracelular de radicais nitros aniônicos que são responsáveis pelo efeito tripanocida. O grupo nitro (NO_2) é reduzido, metabolicamente a grupo amino (NH_2) por ação dessas nitroredutases e o início desse processo é a reação catalisada pela NADPH citocromo P_{450} redutase, levando a um intermediário nitro radicalar (R-NO_2^\bullet). Para o Nfx, esse radical é reduzido pelo oxigênio molecular (O_2) formando o íon superóxido (O_2^\bullet) e regenerando o grupo NO_2 , num ciclo redox. O íon superóxido formado é captado pela enzima superóxido dismutase gerando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que, por meio da reação de Haber-Weiss na presença de íons Fe^{III} , forma o radical hidroxila ($^\bullet\text{OH}$). Esse radical hidroxila, por mecanismos complexos que envolvem ligações a lipídios, proteínas e ao DNA do *T. cruzi*, que é atribuído o efeito tripanocida. No Bnz, o radical nitro se liga covalentemente com as macromoléculas vitais do *T. cruzi* gerando então o efeito tripanocida (DÍAZ DE TORANZO et al., 1988; ROMANHA et al., 2002).

De uma forma geral, esses radicais são altamente reativos e podem atuar em outros sistemas do hospedeiro, tendo baixa especificidade e sendo citotóxicos nos tratamentos para os pacientes, resultando diversos efeitos adversos (FRANCISCO et al., 2015; KEENAN; CHAPLIN, 2015; PATTERSON; WYLLIE, 2014; WALSH; MIWA, 2011)

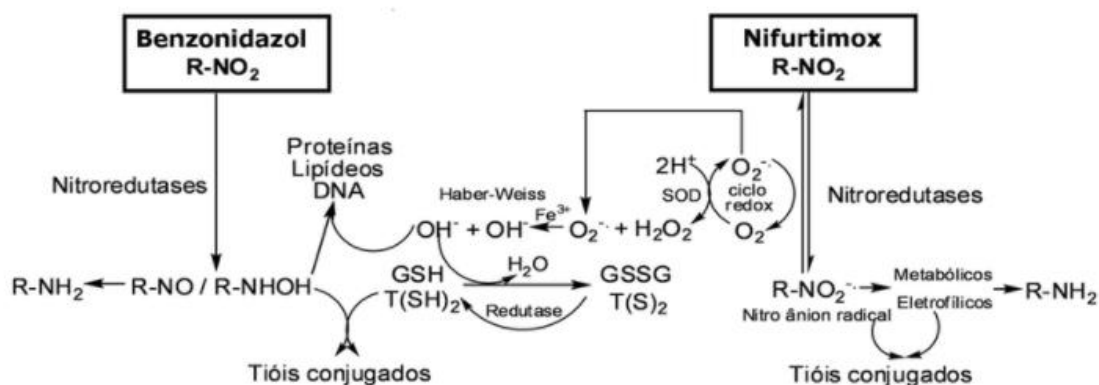


Figura 6. Mecanismo de ação dos fármacos antichagásicos Nfx e Bzn

Fonte: DIAS, LUIZ, C. et. al, 2010.

O Bzn é utilizado atualmente, mas existem estudos para desenvolver fármacos mais efetivos e menos tóxicos. A membrana plasmática parasitária é um dos alvos estudados, pois o mecanismo de ação está relacionado à inibição da biossíntese dos seus esteróis. O ergosterol é um dos esteróis e seu bloqueio é letal para os protozoários e fungos, pois afeta o crescimento celular e ocorre lise da membrana, levando a morte do parasito (URBINA, 2010).

Um dos fármacos testados para inibição da biossíntese de esteroides é o posaconazol, no momento ele é utilizado para o tratamento de micoses invasivas, porém se encontra em ensaio clínico para o tratamento da DC crônica, além dos estudos recentes da combinação de Bzn com o posaconazol (URBINA, 2010; MOLINA, 2015; MORILLO, 2017).

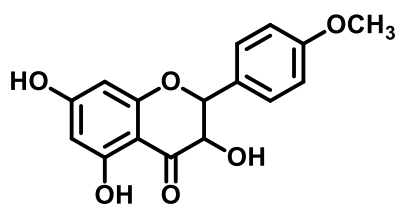
Dois fármacos vêm sendo estudados para futuro reposicionamento, estando em fase clínica. A amiodorona, utilizada no tratamento antiarrítmico e que atua por meio da ligação a canais de Ca^{2+} do parasito e da biossíntese do ergosterol. A colchicina, no tratamento de crise aguda de gota. No caso da colchicina, o ensaio clínico teve o objetivo de avaliar o potencial de tratar a inflamação do miocárdio em pacientes com a DC, e não o combate ao parasita. Apesar disso, o emprego desses dois fármacos evidencia a importância do reposicionamento de fármacos, uma estratégia que, diferentemente do

processo tradicional, proporciona maior economia de tempo e dinheiro (XUE et al, 2018; PITA et al, 2011).

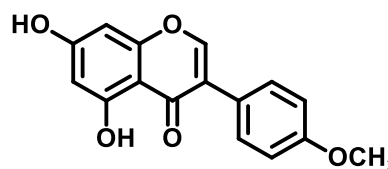
Outra estratégia para encontrar uma atividade antiparasitária é a utilização de produtos naturais, como aqueles presentes em óleos essenciais (OES). OES estão presentes nas plantas e possuem nas suas estruturas os compostos aromáticos voláteis, originados do metabolismo secundário de plantas (SIMÕES, 2000). Os metabólitos secundários são classificados como alcaloides, flavonoides, terpenos e quinonas (FUMAGALI et al, 2008). Alguns trabalhos mostram a utilização dos óleos essenciais para atividade contra *T. cruzi* CARNEIRO et al. (2015), incluindo com óleos da citronela e palmorosa, SANTORO et al. (2007), com óleos do orégano e do tomilho etc.

1.5 Chalconas

Flavonoides constituem um grupo de substâncias com estruturas fenólicas variáveis, que são comumente encontradas em frutas, flores, folhas, raízes e grãos, contribuindo na sua pigmentação (NIJVELDT, 2001; WINKEL-SHIRLEY, 2001). Existem diversos trabalhos com atividade de flavonoides contra *T. cruzi*. IZUMI e colaboradores, compilaram uma revisão sobre compostos vegetais e suas atividades contra *T. cruzi*. Um exemplo é a 5,6,7-trihidroxi-4'-metoxiflavanona com um IC_{50} contra a forma tripomastigota de 0,066 μM . Outro composto com atividade para forma tripomastigota é a biochanina A com um valor de IC_{50} de 0,070 μM . Ambos flavonoides foram isolados das espécies *Baccharis retusa* e *Cassia fistula*, respectivamente.



5,6,7-Trihidroxi- 4'-metoxiflavanona
 IC_{50} tripo = 0,066 μM



Biochanina A
 IC_{50} tripo = 0,070 μM

Figura 7. Flavonoides com atividade contra *Trypanosoma cruzi*

Chalconas ou 1,3- diaril-2-propen-1-onas (**3**) são substâncias de origem natural e fazem parte da classe dos flavonoides de cadeia aberta. São de ocorrência abundante em

plantas das famílias Fabaceae, Asteraceae e Moraceae. Nas flores, ela confere um pigmento amarelo característico às pétalas de algumas plantas de uso medicinal, auxiliando na polinização como atraentes de insetos e/ou pássaros (FERREIRA et al, .2017).

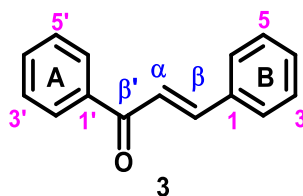


Figura 8. Estrutura do núcleo chalcônico

As chalconas vêm sendo utilizadas como protótipos em Química Medicinal, no que diz respeito ao desenvolvimento de novos candidatos a fármacos devido a sua estrutura relativamente simples e atividades farmacológicas diversas, destacando-se a atividade contra *T. cruzi* (VENTURELLI et al., 2016).

As chalconas preniladas são aquelas que possuem o núcleo chalcônico ligado a grupos terpenoílas, principalmente isoprenila (5 carbonos), e geranila (10 carbonos) e farnesila (15 carbonos). Esses grupos quando ligados ao núcleo chalcônico por átomos de carbono e oxigênio são denominados *C*-prenila e *O*-prenila, respectivamente (FRIIS-MØLLER et al., 2002). Na figura 9 é possível analisar quais são os grupos terpenoílas citados.

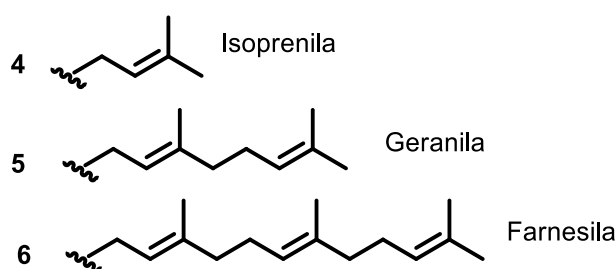


Figura 9. Grupos terpenoílas

Os produtos naturais prenilados foram isolados há tempos, mas nessa última década, essa classe de compostos recebeu uma atenção particular devido sua atividade farmacológica (ALHASSAN, 2014). A adição de grupos prenilas a um metabólito

secundário aromático frequentemente resulta em um derivado com potencial atividade farmacológica. Esses produtos naturais representam atualmente uma nova oportunidade para o desenvolvimento de novos fármacos (EPIFANO, 2007).

Existem poucos relatos de chalconas preniladas naturais e sintéticas contra *T. cruzi*. Espinoza-Hicks e colaboradores sintetizaram chalconas preniladas (Figura 10) e testaram contra as formas epimastigotas de *T. cruzi* (10 µg/mL). As substâncias monopreniladas **7** e **8** foram as mais ativas contra *T. cruzi*, com valores de CI_{50} aproximados ($CI_{50} = 17,5 \mu M$). Ambas as substâncias foram mais ativas que o Bnz, que foi utilizado como fármaco antichagásico de referência. ($CI_{50} = 42,3 \mu M$). O CI_{50} das substâncias dipreniladas **9** e **10** foram maiores, sendo menos ativas que seus análogos monoprenilados **7** e **8**, contudo valores menores do que o fármaco de referência. A substância **7** apresentou maior índice de seletividade (IS) de 75,11 quando ensaiadas contra macrófagos murinos J774A.1 (ATCC ® TIB-67TM) seguidas pelas substâncias **10** (33,52), **9** (27,36). O IS dessas três chalconas foi superior aos fármacos antichagásicos Bnz (8,31) e Nfx (23,10) (ESPINOZA-HICKS et al., 20)

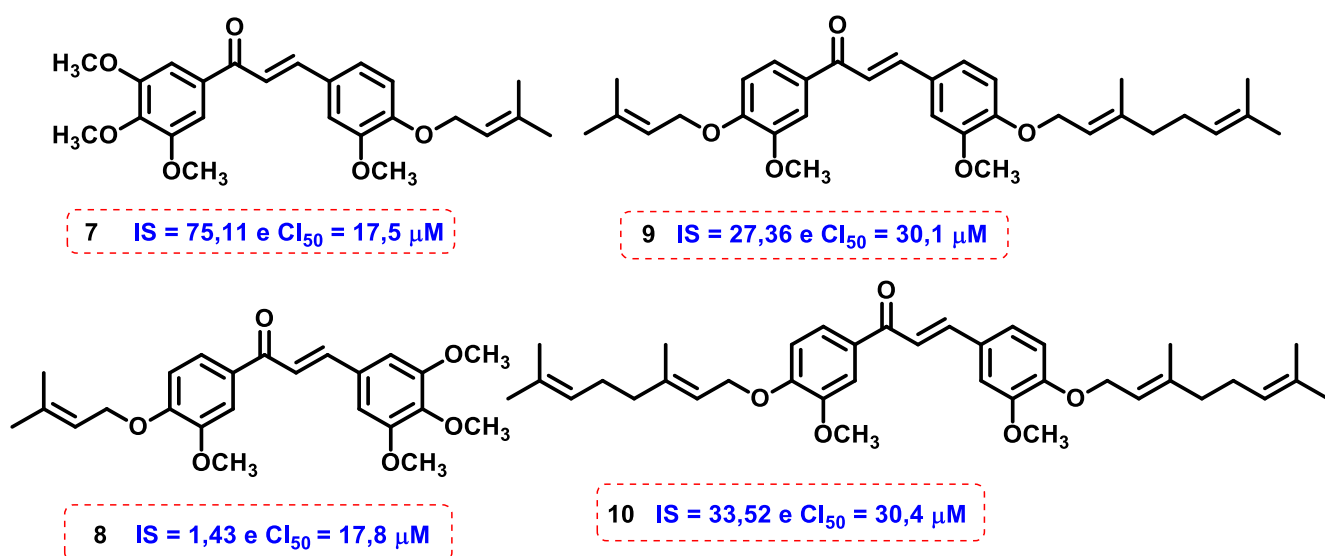


Figura 10. Chalconas preniladas com atividade contra *Trypanosoma cruzi*

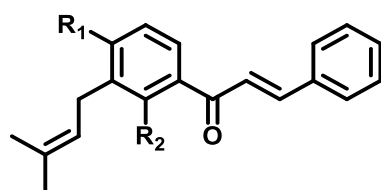
De acordo com (BORGES-ARGÁEZ et al., 2009), chalconas preniladas isoladas das raízes de *Lonchocarpus xuul* Lundell, uma leguminosa endêmica da península Yucatán foram ativas contra *T. cruzi* (Figura 11).



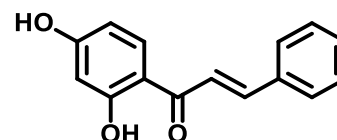
Figura 11. *Lonchocarpus xuul*

FONTE: IREKANI, 2014.

Seis substâncias foram avaliadas *in vitro* contra as formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa MOHM / MX / 1994 / INC 5). A substância **12**, **13** e **14** apresentaram valores inferiores ao Nfx ($CI_{50} = 6,1 \mu\text{M}$) e Bnz ($CI_{50} = 12,0 \mu\text{M}$).



- (11) $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{OH}$ ($CI_{50} = 7.00 \mu\text{M}$ e $IS = 1.25$)
 (12) $R_1 = \text{OAc}$, $R_2 = \text{OAc}$ ($CI_{50} = 1,8 \mu\text{M}$ e $IS = 23.66$)
 (13) $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \text{OCH}_3$ ($CI_{50} = 1,5 \mu\text{M}$ e $IS = 109,33$)



- (14) $CI_{50} = 5 \mu\text{M}$ e $IS = 6.30$

Figura 12. Chalconas isoladas das raízes de *Lonchocarpus xuul* Lundell

1.6 4-*O*-geranilisiquiritigenina e 4-*O*-isoprenilisiquiritigenina

Duas chalconas preniladas, em artigos diferentes, foram isoladas de plantas e exibiram atividade excelente para alvos biológicos diferentes. A diferença de ambas foi uma subunidade isoprênica, mostrando que esses grupos podem exibir atividade e podem ser testadas futuramente para DC.

TSEGAYE DEYOU e colaboradores (2015), isolaram cinco novas substâncias a partir do extrato $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:1) das cascas e das raízes de *Millettia usaramensis*. Dentre essas a 4-*O*-geranilisiquiritigenina (**15**) exibiu atividade antiplasmódica com CI_{50} de $3,7 \mu\text{M}$ contra as linhagens 3D7 de *Plasmodium falciparum* sensíveis a cloroquina ($CI_{50} = 4,3 \mu\text{M}$) e CI_{50} de $5,3 \mu\text{M}$ de Dd2 resistentes a cloroquina.

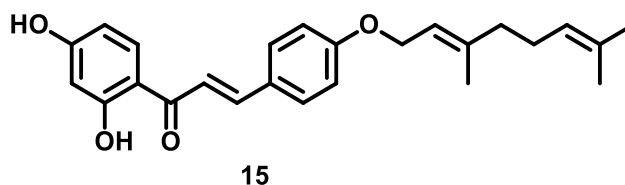


Figura 13. Estrutura da 4-*O*-geranilsoliquitinigenina

Musa e colaboradores, no artigo “Bioactive chalcone from *Indigofera pulchra*” isolaram uma nova chalcona prenilada a partir de um extrato metanólico de *I. pulchra*(Willd). n O composto foi isolado como uma substância sólida amorfo amarela e foi caracterizado por RMN (Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear).

Indigofera (família: Leguminosae, subfamília: Papilionoideae) é uma espécie de erva ou arbusto que pode crescer até 1 m de altura. Possui mais de 750 espécies e é amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, especialmente na África Ocidental.

Rao e colaboradores (2008), no artigo “Síntese de (±) Abissínio I e compostos relacionados: Suas atividades antioxidantes e citotóxicas” sintetizaram a 4-*O*-isoprenilsoliquiritigenina e obtiveram uma atividade citotóxica (CI₅₀ = 70 μM) contra células tumorais (MCF-7) de câncer de mama.

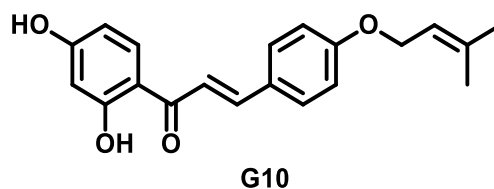


Figura 14. Estrutura da 4-*O*-isoprenilsoliquitinigenina

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho consiste no planejamento, síntese e avaliação do potencial anti- *Trypanosoma cruzi* da 4-*O*-geranilsoliquiritigenina e seus análogos.

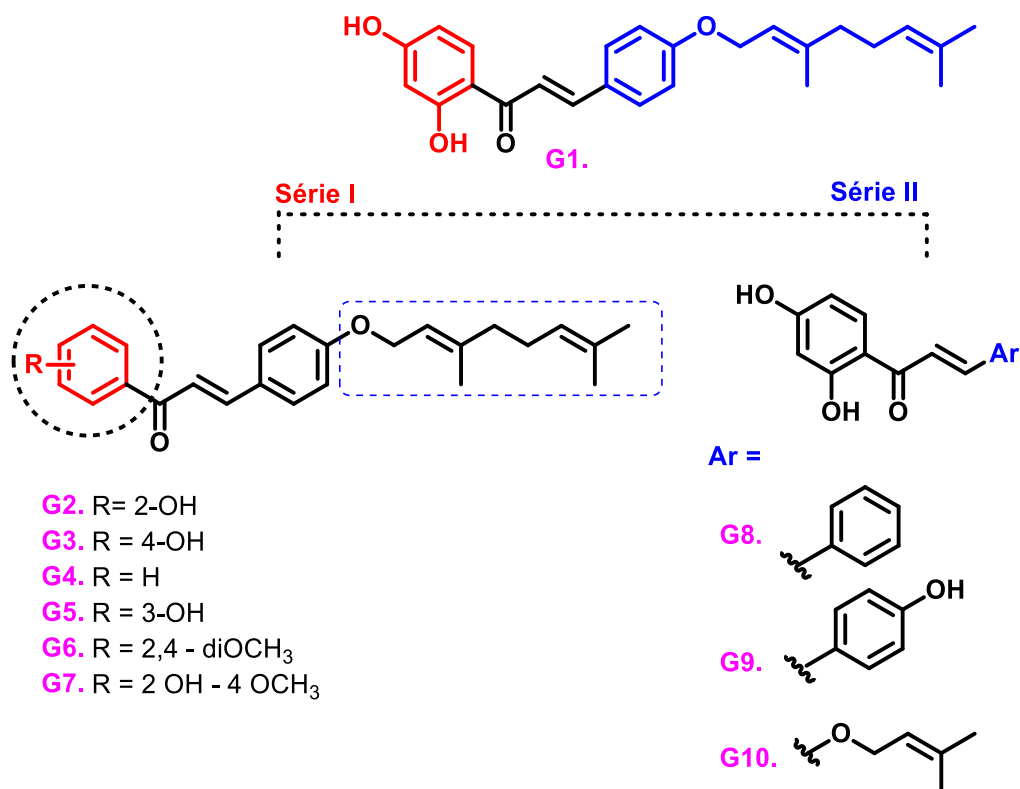
2.2 Objetivos Específicos

- A) Síntese de 4-*O*-geranilisoliquiritigenina e análogos com modificações nos anéis (A e B);
- B) Purificação e identificação das substâncias por métodos cromatográficos e espectroscópicos;
- C) Avaliação da atividade das substâncias, contra as formas tripomastigotas e amastigotas do *Trypanosoma cruzi*, por meio do estabelecimento de parcerias científicas;
- D) Avaliação da toxicidade das substâncias utilizando fibroblastos NCTC clone 929 e atividade hemolítica;
- E) Avaliação *in silico* das substâncias para predição de suas propriedades farmacocinéticas e *druglikeness*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Planejamento dos análogos de 4-*O*-geranilisoliquiritigenina

Foram planejadas duas séries de análogos da 4-*O*-geranilisoliquiritigenina **G1** (séries I e II). Na série I, inicialmente aplicou-se a simplificação molecular levando aos análogos simplificados **G2**, **G3** e **G4** com o objetivo posterior de avaliar a influência das hidroxilas na atividade biológica. Para analisar a modificação da posição da hidroxila no anel A, foi planejada a substância **G5**. Além disso, foi planejada a introdução de grupos metoxilas, substâncias **G6** e **G7**. Na série II, buscou-se investigar a influência da presença e número de subunidades isoprênicas, substituindo a sub subunidade geranila por um grupo isoprenila, bem como propondo a simplificação do grupo *O*-geranila (**Esquema 1**).



Esquema 1. Planejamento dos análogos de 4-*O*-geranilsiquiritigenina (**G1**)

3.2 Reagentes e solventes

Os reagentes utilizados na síntese das substâncias, foram o brometo de geranila, brometo de isoprenila, 4- hidroxibenzaldeído, cloreto de metoximetila (MOMCl) e 2',4'-dihidroxiacetofenona, os quais foram adquiridos comercialmente da Merck (Sigma Aldrich®). Os catalisadores utilizados foram o hidróxido de sódio e o carbonato de potássio e os solventes hexano, acetato de etila acetona e etanol, os quais foram adquiridos comercialmente da Synth®.

3.1 Métodos cromatográficos

3.3.1 Cromatografia em Camada Delgada

As reações foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada utilizando cromatoplasmas de gel de sílica sob base de alumínio da marca Supelco®. Como fase móvel foram utilizados gradientes de solventes hexano/acetato de etila de acordo com a polaridade das substâncias. As placas foram reveladas sob inspeção em câmera de luz

ultravioleta (254 e 365 nM) e dependendo dos analitos também se utilizou o anisaldeído sulfúrico.

3.3.2 Cromatografia em Coluna de Fase Normal

A cromatografia em coluna de fase normal foi um dos métodos utilizados para a purificação das substâncias. Como fase estacionária utilizou-se gel de sílica de 100 a 200 mesh (Sigma Aldrich®) aplicadas em colunas de vidro de variáveis diâmetros e alturas. Foram utilizadas acetato de etila e hexano como fase móvel e suas porcentagens de acordo com a polaridade estudada.

3.3.3 Cromatografia de permeação em gel

Alguns produtos com diferentes pesos moleculares, foram separados por Sephadex (LH 20). Esses foram eluídos em etanol e aplicados em DMSO. Foram coletadas as frações a partir da saída do produto, analisado por cromatografia em camada delgada e na câmara de ultravioleta.

3.4 Ressonância Magnética Nuclear – RMN ^1H e ^{13}C e determinação da Lipofilicidade (Log Po/w)

Para a determinação das estruturas foram realizadas as análises dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H) e de Carbono Treze (RMN de ^{13}C) nos espectrômetros Bruker Avance III, de 14,0 Tesla (600 MHz), presentes no Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular (CMIB) (Processo Fapesp 2009/53989-4). Os solventes utilizados foram dimetilsulfóxido-hexadeuterado (DMSO- d_6) e clorofórmio deuterado (CDCl_3) da Sigma Aldrich®. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm, tendo como referência o solvente não-deuterado residual ou tetrametilsilano (TMS). Para os deslocamentos químicos de hidrogênio (δH) foram indicados a multiplicidade do sinal (*s* - sinpleto; *d* - duplete; *dd* - duplo duplete; *ddd* - duplo duplo duplete; *t* - tripleto; *q* - quadruplete; *m* - multiplete), e a constante de acoplamento foi expressa (*J*) em Hz.

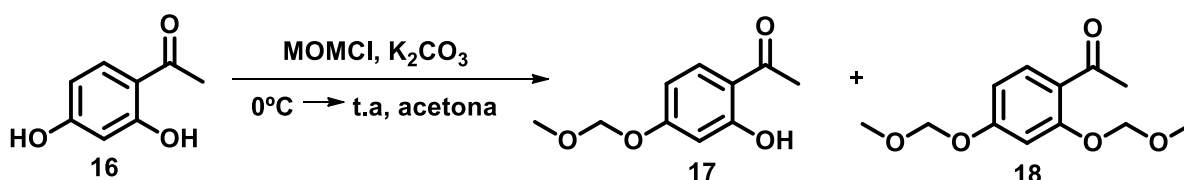
O valor de log Po/w foi determinado utilizando o método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detecção por Arranjo de Fotodiodos. A análise de CLAE foi realizada no equipamento Agilent 1220 Infinity LC e do software: Agilent

Chemstation, no Bioen no Ibilce. O volume de injeção foi 20 μL e fase móvel metanol: água (3:1) com 0,5 % de ácido acético e tempo de corrida de 60 minutos.

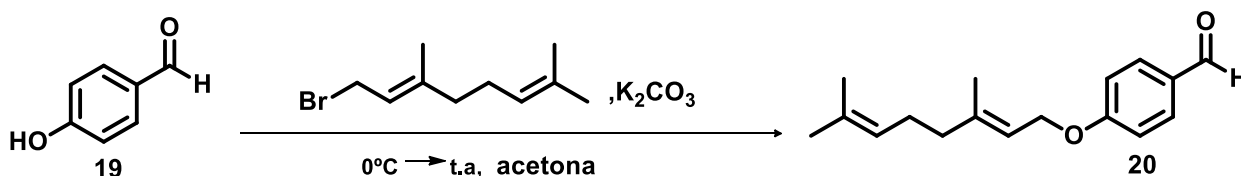
3.5 Síntese da 4-*O*-geranilisoliquiritigenina e de seus análogos

Inicialmente foi planejada a síntese da 4-*O*-geranilisoliquiritigenina (**G1**), realizada em 4 etapas: proteção da 2,4-dihidroxiacetofenona (**16**), seguida de *O*-geranilação do 4-hidroxiacetofenona (**17**), condensação aldólica de Claisen- Schmidt sob catálise básica (**Etapa 3**) e a reação desproteção, em meio ácido, da chalcona (**21**) (**Esquema 2**).

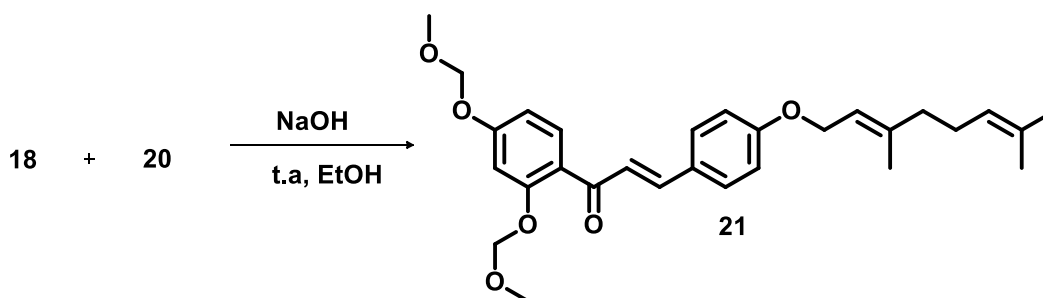
Etapa 1. Proteção da 2,4 dihidroxiacetofenona



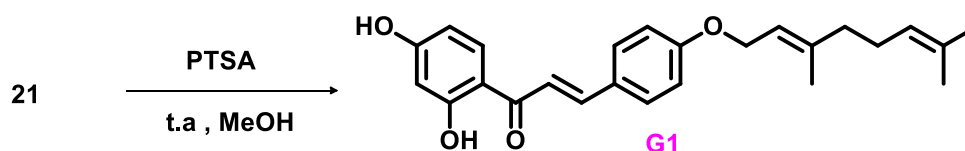
Etapa 2. Geranilação do 4-hidroxiacetofenona



Etapa 3. Condensação aldólica de Claisen- Schmidt



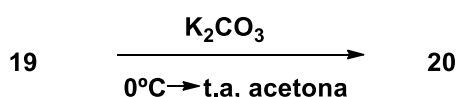
Etapa 4. Desproteção do intermediário geranilado



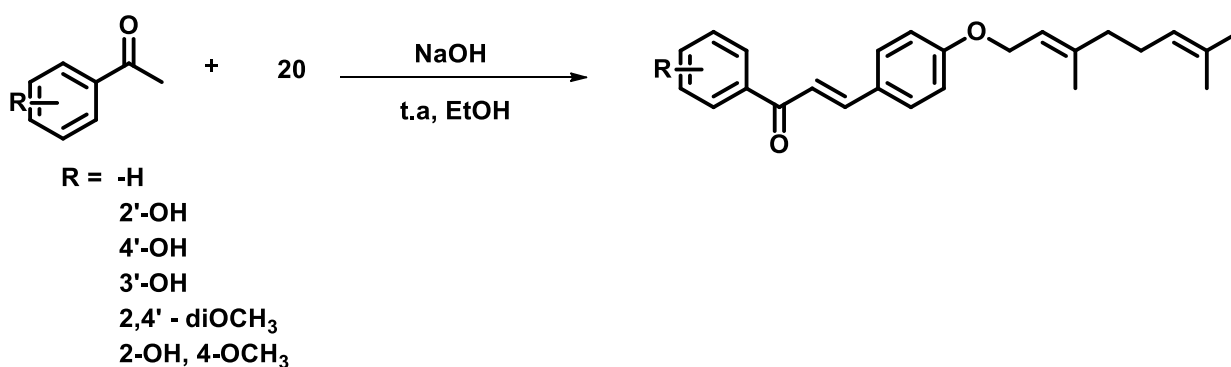
Esquema 2. Esquema geral de síntese para a 4-*O*-geranilisoliquiritigenina

Para os análogos da série I, a síntese foi realizada em 2 etapas: a *O*-geranilação do 4- hidroxibenzaldeído (**19**) e a etapa 2 a condensação aldólica com as acetofenonas comerciais: 2'-hidroxiacetofenona (**22**), 4'-hidroxiacetofenona (**23**), 3'-hidroxiacetofenona (**24**), acetofenona (**25**), 2',4'-dimetoxiacetofenona (**26**) e 2'-hidroxi-4-metoxiacetofenona (**27**) (**Esquema 3**).

Etapa 1. Geranilação do 4- hidroxibenzaldeído



Etapa 2. Condensação aldólica de Claisen - Schmidt



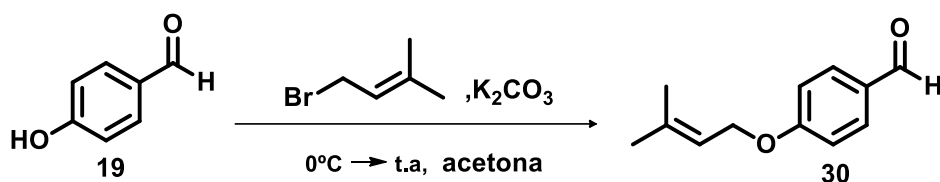
Esquema 3. Esquema geral de síntese para os análogos da série I

Para a síntese da substância **G10**, foram realizadas 4 etapas como mostrado no **esquema 2**, contudo na **etapa 2** deste esquema, em vez de se utilizar brometo de geranila como reagente, se utilizou brometo de isoprenila para a obtenção do 4-*O*-isoprenilbenzaldeído (30). Na **etapa 3** utilizou-se a reação de condensação aldólica e a última etapa a reação de desproteção com ácido do intermediário *O*-isoprenilado (**Esquema 4**).

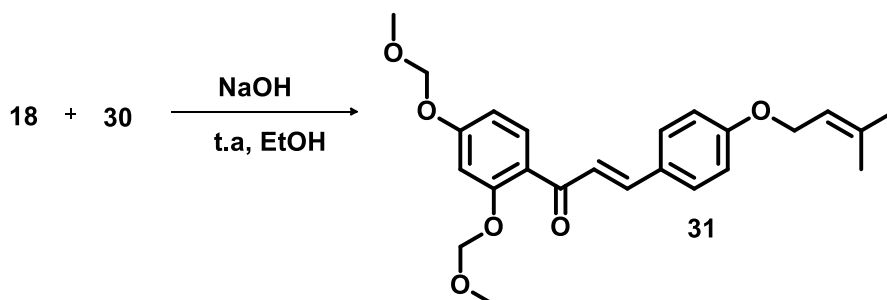
Para as substâncias **G8** e **G9** as reações ocorrem em 3 etapas. A **etapa 1** consiste na proteção da 2,4'-dihidroxiacetofenona (16). A etapa 2 é a condensação aldólica de Claisen-Schmidt com os aldeídos (benzaldeído (28) e 4-hidroxibenzaldeído (29) e por último na **etapa 3** a desproteção das hidroxilas representadas no **esquema 5**.

Etapa 1. Proteção da 2,4 dihidroxiacetofenona

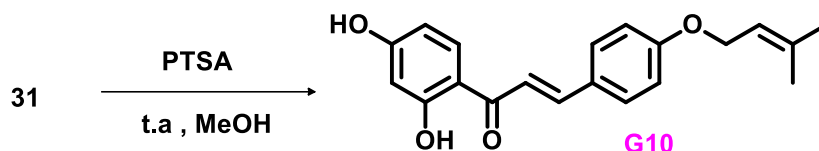
Etapa 2. Isoprenilação do 4-hidroxibenzaldeído



Etapa 3. Condensação aldólica de Claisen- Schmidt

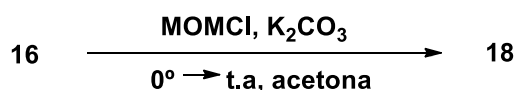


Etapa 4. Desproteção do intermediário isoprenilado

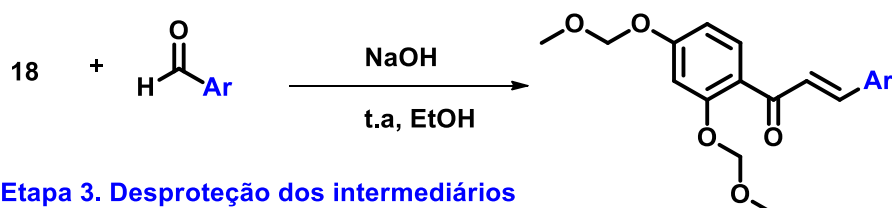


Esquema 4. Esquema geral de síntese para o análogo G10 da série II

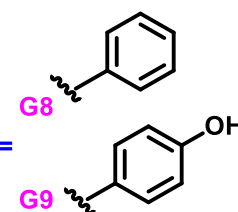
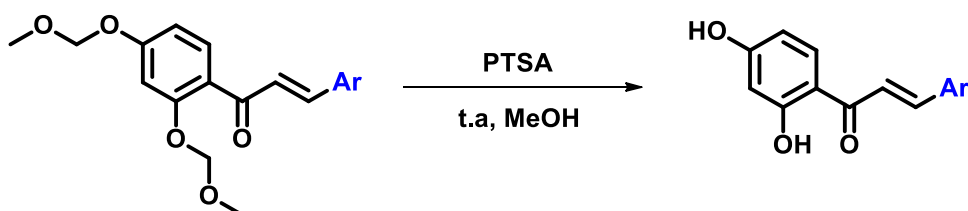
Etapa 1. Proteção da 2,4 dihidroxiacetofenona



Etapa 2. Condensação aldólica de Claisen Schmidt



Etapa 3. Desproteção dos intermediários



Esquema 5. Esquema geral de síntese para os análogos G8 e G9 da série II

3.5.1 Reação de proteção da 2',4'-dihidroxiacetofenona

Em um balão de 100 mL foi adicionado o carbonato de potássio (2,76 g, 20 mmol) e 10 mL de acetona, deixando sob agitação por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida a 2',4'-dihidroxiacetofenona (16) (0,760 g, 5 mmol) foi solubilizada em 10 mL de acetona e adicionada no meio reacional. A solução resultante foi colocada em banho de gelo e 1,51 g (20 mmol) de cloreto de metoximetila (MOMCl), o qual foi adicionado gota a gota. A reação foi acompanhada por cromatografia de camada delgada e o produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica utilizando uma mistura de hexano e acetato de etila como fase móvel (4:1), obtendo-se dois produtos, 2-hidroxi-4-metoximetoxiacetofenona (17) e 2,4-bis(metoximetoxi)acetofenona (18), (WANG et al, 2015).

3.5.2 Síntese do 4-*O*-geranilbenzaldeído

Em um balão reacional, uma mistura de 4-hidroxibenzaldeído (29) (950 mg, 7,78 mmol), K₂CO₃ (1,075 g, 25,68 mmol) e 20 mL de acetona foi agitada à temperatura ambiente durante 10 minutos. A solução resultante foi colocada em banho de gelo e 1,5 mL (8,56 mmol) de brometo de geranila foi adicionado gota à gota. Após 24 horas, a mistura reacional foi filtrada e o solvente foi removido sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica utilizando uma mistura de hexano e acetato de etila como fase móvel (9:1), obtendo-se um óleo amarelo (20).

3.5.3 Reação de condensação aldólica de Claisen-Schmid

Em um balão de 100 mL foram adicionados a 2,4-bis(metoximetoxi)acetofenona (0,929 mg, 3,87 mmol), 4-*O*-geranilbenzaldeído (1,00 g, 3,87 mmol), e 15 mL de etanol, sob agitação constante. Em seguida foi adicionado o hidróxido de sódio (0,464 g, 11,61 mmol) solubilizado em etanol, sendo o meio reacional mantido por 24 horas a temperatura ambiente. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada e após o consumo dos reagentes, obteve-se o intermediário *O*-geranilado (20).

3.5.4 Reação de desproteção do intermediário *O*-geranilado 20

Realizou-se a reação de desproteção de 20 na presença de ácido *para*-toluenossulfônico (PTSA) (0.060, 0,032 mmol), 5 mL de metanol. O meio reacional foi mantido sob refluxo 48 horas sendo vertido em gelo triturado e mantido a 5 °C por 24 horas. O produto bruto foi, filtrado e purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica, utilizando fase móvel hexano:acetato de etila 4;1, hexano:acetato de etila (7:3) e hexano:acetato de etila (3:2), (WANG et al, 2015; SUGAMOTO, 2011).

3.5.5 Síntese dos análogos da série I

Inicialmente foi realizada a síntese do 4-*O*-geranilbenzaldeído (20), em quantidades apreciáveis como relatado no item 3.5.2. Em seguida, para todos os análogos da série I foram realizados os mesmos procedimentos sintéticos. Em um balão de 100 mL foram adicionadas as respectivas acetofenonas, 2'-hidroxiacetofenona (22), 4'-hidroxiacetofenona (23), 3'-hidroxiacetofenona (24), acetofenona (25), 2',4'-dimetoxiacetofenona (26), 2'-hidroxi-4-metoxiacetofenona (27), em quantidade de 1 mmol e o 4-*O*-geranilbenzaldeído (0,258 g, 1 mmol) em 10 mL de etanol, sob agitação constante. Em seguida foi adicionado o hidróxido de sódio (0,200 g, 5 mmol), solubilizado em etanol, e a reação foi mantida por diferentes horas, de acordo com cada acetofenona e temperatura ambiente. Os produtos brutos foram purificados por técnicas de recristalização e cromatografia em coluna de Sephadex®.

3.5.5.1 Síntese de 2'-hidroxi-4-*O*-geranilchalcona

A síntese foi realizada por meio de condensação aldólica de Claisen-Schmid utilizando 1 mmol de cada reagente como descrito no item 3.5.5. Depois de quatro horas de reação foram adicionadas 3 gotas de solução catalizadora (0,600 g de NaOH em 2 mL de H₂O). A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada e a cromatoplaça foi revelada no ultravioleta a 294 nm e 365 nm. Depois de 24 horas de reação, os reagentes não estavam sendo consumidos, adicionou-se mais 2 gotas de solução catalizadora e deixou mais 3 horas sob agitação. O meio reacional foi aquecido a 45° C e após 5 horas sob refluxo em banho de óleo, perfazendo um total de 48 horas. O meio reacional foi vertido no gelo triturado obtido de água deionizada e acidificado com ácido acético glacial até pH 3-5. O produto bruto foi particionado com acetato de etila (3 ×15 mL) e solução saturada de cloreto de sódio (10 mL). A fase orgânica foi seca com

sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida. O Produto bruto foi submetido a cromatografia em gel de sílica, tendo hexano: acetato de etila (9:1), como fase móvel. Para a retirada do aldeído (20) foi realizada uma partição com 10 mL de solução saturada de bissulfito de sódio, 5 mL de DMF, 25 mL de H₂O, e 25 mL de fase móvel 4:1, hexano e acetato de etila, as quantidades foram adaptadas, seguindo a metodologia descrita por BOUCHER e Colaboradores, 2017. A partir desse protocolo, uma parte do aldeído foi removido, contudo devido estar no mesmo R_f da chalcona obtida, foi realizada a cromatografia de permeação em gel e por meio dessa técnica foi possível a retirada do restante de 20.

3.5.5.2 Síntese de 4'-hidroxi-4-O-geranilchalcona

A síntese foi realizada por meio de condensação aldólica de Claisen- Schmidt utilizando as quantidades de 1 mmol de cada reagente como descrito no item 3.5.5. Após 24 horas de reação acompanhadas por cromatografia em camada delgada, a reação foi colocada em aquecimento e adicionada 2 gotas de solução catalisadora. Após 4 horas, o meio reacional foi colocado sob refluxo, havendo conversão dos reagentes. O 4-O-geranilbenzaldeído e a 4-hidroxiacetofenona foram consumidos total e parcialmente, respectivamente. O produto apresentou valor de R_f bem similar a 4-hidroxiacetofenona, em fase móvel constituída por hexano: acetato de etila (4:1). O meio reacional foi vertido no gelo triturado obtido de água deionizada e acidificado com ácido acético glacial até pH 3-5. Foi realizada partição como descrita no item 3.5.5.1 e o precipitado foi submetido a recristalização etanol/água.

3.5.5.3 Síntese de 3'-hidroxi-4-O-geranilchalcona

A síntese foi realizada por meio de condensação aldólica de Claisen- Schmidt utilizando 1 mmol de cada reagente como descrito no item 3.5.5. A reação durou 24 horas e o meio reacional foi vertido no gelo triturado obtido de água deionizada e acidificada com ácido acético glacial até pH 3-5. Durante a reação, o 4-O-geranilbenzaldeído foi consumido e a 3'-hidroxiacetofenona (24) foi consumida parcialmente. Devido a substância 24 estar no mesmo R_f da 3'-hidroxi-4-O-geranilchalcona foi realizada a cromatografia de gel permeação em gel.

3.5.5.4 Síntese de 4-*O*-geranilchalcona

A síntese foi realizada por meio de condensação aldólica de Claisen- Schmidt utilizando as quantidades de 1 mmol de cada reagente como descrito no item 3.5.5. A reação durou 5 horas e foi vertida em banho de gelo triturado obtido de água deionizada e acidificada com ácido acético glacial até pH 3-5. A acetofenona e o 4-*O*-geranilbenzaldeído foram observados no mesmo R_f da 4-*O*-geranilchalcona, sendo necessária a cromatografia de permeação em gel. A 4-*O*-geranilchalcona foi confirmada por RMN de ¹H e ¹³C em mistura com a acetofenona e o 4-*O*-geranilbenzaldeído. A reação foi realizada novamente, utilizando um tempo maior, colocando uma quantidade maior de solução catalisadora e aquecimento, contudo os reagentes não foram totalmente consumidos.

3.5.5.5. Síntese de 2,4'-dimetoxi-4-*O*-geranilchalcona e 2'-hidroxi-4'-metoxi-4-*O*-geranilchalcona.

A síntese das chalconas **G6** e **G7** foi realizada por meio de condensação aldólica de Claisen- Schmidt utilizando as quantidades de 1 mmol de cada reagente como descrito no item 3.5.5. Durante a síntese dessas chalconas houve dificuldade em consumir os reagentes. Foram utilizadas diversas estratégias como, aquecimento da reação em banho de água, refluxo em banho de óleo, aumento da quantidade de solução catalisadora, diferentes tempos de reação etc. O problema maior foi a similaridade do R_f de reagentes e produtos e também os produtos não eram totalmente consumidos na reação. Diversas tentativas de purificação, foram realizadas sem êxito, incluindo cromatografias em coluna de gel de sílica, bem como partição para remoção de aldeídos.

3.5.6 Síntese dos análogos da série II

3.5.6.1 Síntese das substâncias G8 e G9

Para os análogos da série II, inicialmente na primeira etapa foi realizada a reação de proteção da 2',4'-dihidroxicetofenona utilizando a mesma metodologia relatada no item 3.5.1. Em um balão de 100 mL foi adicionado 1 mmol do aldeído e 1 mmol da 2',4'-dihidroxicetofenona em 10 mL de etanol, sob agitação constante. Para a substância G8 foi utilizado o benzaldeído e para a substância G9 o 4-hidroxibenzaldeído. Em seguida

foi adicionado o hidróxido de sódio (0,200 g, 5 mmol), solubilizado em etanol, e a reação foi mantida por 24 horas a temperatura ambiente. A última etapa consistiu na reação de desproteção, adicionando-se os intermediários em um balão com o PTSA, solubilizado em 5 mL de metanol. O meio reacional foi vertido em gelo triturado e mantido a 5 °C por 24 horas. O produto bruto foi filtrado e purificados por cromatografia de gel de sílica, hexano e acetato de etila (7:3).

3.5.6.2 Síntese de 4-*O*-isoprenil-isoliquiritigenina

A síntese da substância **G10**, foi relatada por Rao e colaboradores (2008) utilizando hidreto de sódio (NaH) em DMF para a proteção da 2',4'-dihidroxiacetofenona e prenilação do 4-hidroxibenzaldeído. Para a condensação de acordo com esse trabalho foi utilizado catalisador de transferência de fase para obter o produto, 4-*O*-isoprenil-isoliquiritigenina.

A metodologia utilizada para síntese neste trabalho seguiu o artigo de Wang e colaboradores (2015), sendo realizada em 4 etapas: proteção da 2',4'-dihidroxiacetofenona, seguida da isoprenilação do 4-hidroxibenzaldeído, condensação aldólica de Claisen-Schmidt e reação de desproteção.

3.5.6.2.1 Síntese do 4-*O*-isoprenilbenzaldeído

Em um balão reacional, uma mistura de 4-hidroxibenzaldeído (0,610 g, 5 mmol) e K₂CO₃ (2,073 g, 15 mmol) em 15 mL de acetona foi agitada à temperatura ambiente durante 10 minutos. A solução resultante foi colocada em banho de gelo e 1,20 mL de brometo de isoprenila foi adicionado gota a gota. Após 5 horas, foi realizada a partição com a mistura reacional e o solvente foi removido sob pressão reduzida. O produto bruto apresentou-se como um óleo avermelhado (30).

3.5.6.2.2 Condensação aldólica de Claisen-Schmidt para obtenção do intermediário isoprenilado

Foram adicionados, em um balão de 100 mL, a 2'-hidroxi-4'-metoximetoxiacetofenona (250 mg, 1,31 mmol) e o 4-*O*-isoprenilbenzaldeído (257 mg, 1,30 mmol) em 15 mL de etanol, sob agitação constante. Em seguida foi adicionado o hidróxido de sódio (0,262 g, 14 mmol) solubilizado em 1 mL de etanol, e o meio

reacional foi mantido por 24 horas em temperatura ambiente. A reação foi acompanhada por cromatografia de camada delgada, e após o consumo dos reagentes, o produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica utilizando hexano: acetato de etila (4:1).

3.5.6.2.3 Reação de desproteção

Na etapa de desproteção, foram adicionados em um balão de 100 mL, o intermediário isoprenilado (100 mg, 0,00028 mmol), em 5 mL de etanol e PTSA (106 mg, 0,00056 mmol), dissolvido em 5 mL de metanol. O produto foi submetido a uma partição líquido-líquido e cromatografia em coluna de gel de sílica utilizando hexano: acetato de etila (3:2) (SUGAMOTO, 2011).

3.6 Estudo *in silico* utilizando a ferramenta SwissADME

Foi realizado um estudo *in silico* usando a ferramenta (SwissADME). Este permite o cálculo de descritores físico-químicos, bem como predição dos parâmetros farmacocinéticos, ADME (Absorção, Distribuição, Metabolismo e Eliminação), bem como propriedade *druglikeness* (SwissADME, 2017).

3.7 Ensaios biológicos

Os ensaios biológicos foram realizados para avaliar a atividade contra as formas tripomastigotas e amastigotas de *Trypanosoma cruzi*, toxicidade contra células NCTC-clone L929 (Cultura de Células do Tecido Conjuntivo de Camundongo) e atividade hemolítica. Esses ensaios foram realizados pela Dra. Érica Levatti sob supervisão do Dr. André Gustavo Tempone Cardoso nas dependências do Centro de Parasitologia e Micologia - Instituto Adolfo Lutz (São Paulo-SP).

3.7.1 Animais em experimentação

Para a obtenção de macrófagos peritoneais e, para a manutenção de *Trypanosoma cruzi* os camundongos BALB/ c foram obtidos no biotério do Instituto Adolfo Lutz – São Paulo, Brasil e mantidos em ambiente controlado, com água e alimento *ad libitum*. Os

procedimentos foram realizados com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CTC IAL 72J / 2017)

3.7.2 Atividade contra as formas tripomatigotas de *Trypanosoma cruzi*

Tripomastigotas de *T. cruzi* (Cepa Y) foram mantidos em células renais de macaco Rhesus ATCC CCL 7. Para avaliação da atividade anti-tripomastigota, o composto **G3** foi incubado em meio RPMI-1640, a uma faixa de concentração de 200 - 0 μM , juntamente com as formas tripomastigotas (1×10^6 /poço) por 24 horas em incubadora de CO_2 5%, a 37°C. O benznidazol foi usado como fármaco antichagásico de referência (200 a 0 μM). A viabilidade dos tripomastigotas foi avaliada pelo método colorimétrico da resazurina (REIMÃO et al., 2011) e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (FilterMax F5 Multi-Mode) com absorbância a 570 nm.

3.7.3 Atividade contra as formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi*

A atividade anti-amastigota foi realizada em macrófagos infectados com *T. cruzi*, previamente obtidos da cavidade peritoneal de camundongos BALB / c. Os macrófagos (1×10^5 células/poço) foram adicionados em lâmina de 16 poços (placa NUNC, Merck; 1×10^5 /poço) e incubados por 24 h em incubadora de CO_2 5%, a 37 °C. Os macrófagos foram infectados com tripomastigotas, obtidos de culturas LLC-MK2 previamente infectadas, (proporção parasita: macrófago = 10:1), e após 2 h de incubação, os parasitas não internacionalizados foram removidos por lavagem com RPMI-1640. O composto **G3** foi incubado com os macrófagos infectados por 48 horas, em faixa de concentração de 30 a 0,07 μM , a 37°C. O benznidazol (20 a 0,07 μM) foi utilizado como fármaco antichagásico de referência (REIMÃO et al, 2011). Ao término do ensaio as lâminas foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa. Para determinação da concentração efetiva 50% (CE_{50}), foi utilizado o índice de infecção (IF), obtido por meio da contagem diferencial de 200 macrófagos/poço e calculado pela seguinte fórmula descrita abaixo (CHANG et al., 1986):

$$\text{IF} = \frac{\text{Macrófagos Infectados} \times \text{Amastigotas Intracelulares}}{\text{Macrófagos Totais}}$$

As imagens das lâminas coradas foram adquiridas em um microscópio óptico digital (EVOS M5000, Thermofisher).

3.7.4 Toxicidade em células NCTC

As células NCTC-clone L929 foram cultivadas em uma placa de 96 poços em meio RPMI-1640 com SFB 10% na presença de diferentes concentrações (200 – 1,56 μM) da substância **G3** e mantidas a temperatura de 37 °C em estufa contendo 5% de CO_2 por 48 horas. A concentração citotóxica (CC_{50}) foi determinada pelo método colorimétrico MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio) (TADA et al., 1986) e a leitura foi realizada no espectrômetro FilterMax F5 Multi-Mode a 570 nm. O índice de seletividade (IS) foi determinado usando a seguinte equação: CC_{50} contra células de NCTC/ IC_{50} contra parasitas (AMARAL et al., 2019).

3.7.5 Atividade hemolítica

A fim de complementar os estudos toxicológicos iniciais, a atividade hemolítica foi avaliada. Dessa maneira é possível estabelecer se o composto possui alguma ação de lise de eritrócitos e, portanto, não pode ser considerado um protótipo para novos fármacos.

A hemólise, destruição de eritrócitos por rompimento da membrana, causa liberação de hemoglobina no meio, tornando-o avermelhado (Jeswani et al., 2015). Com isso, é possível determinar a atividade hemolítica utilizando um ensaio colorimétrico.

Eritrócitos foram coletados de camundongos BALB/c, adicionados a uma concentração de 3% em placas de 96 poços com fundo em “U” e incubados a 24°C por 2 h com o composto FS017 serialmente diluído em base 2 (200 a 6,25 μM) em PBS. Posteriormente, a atividade hemolítica foi determinada no sobrenadante celular pela leitura em espectrofotômetro (FilterMax F5Multi-Mode) com comprimento de onda de 570 nm (AMARAL et al, 2019). A hemólise máxima foi obtida utilizando água ultrapura mili-Q e eritrócitos não tratados foram utilizados como controle negativo (100% viabilidade).

3.7.6 Análises Estatísticas

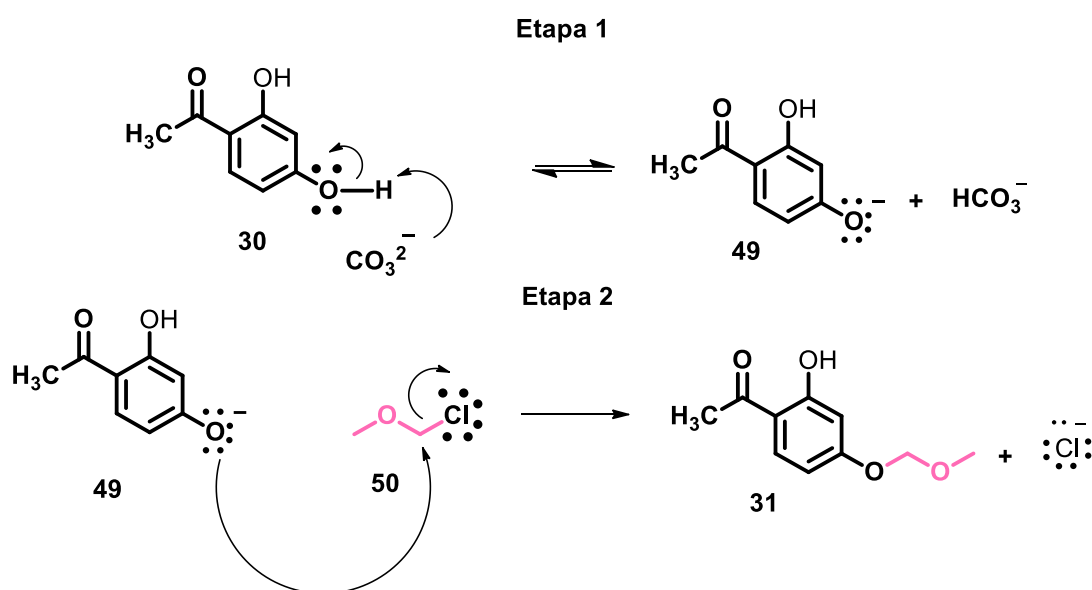
A determinação dos valores de CC_{50} e CE_{50} foi realizada a partir de curvas sigmóides concentração-resposta e a significância estatística entre amostras foi avaliada por meio dos valores de P pelo método One-way ANOVA, aplicando o teste Tukey's

Multiple Comparison. Para a determinação do percentual de atividade hemolítica os valores de absorbância foram normalizados a partir da hemólise total (100%). Todas as análises foram realizadas utilizando o software Graph Pad Prism 5. As amostras foram testadas em duplicata e os ensaios foram reproduzidos no mínimo duas vezes.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 4-*O*-geranilsoliquiritigenina

A proposta de síntese da 4-*O*-geranilsoliquiritigenina envolveu em 4 etapas. Na etapa I, a reação para proteção dos grupos hidroxilas levou a formação de dois produtos, os quais foram caracterizados por RMN de ^1H e ^{13}C como análogos hidroxilados *para*-MOM (9%) e *orto-para*-MOM (64%), respectivamente. No esquema 6 é descrito o mecanismo de reação de proteção. Na etapa 1, o carbonato, uma espécie nucleofílica captura um próton da hidroxila fenólica da 2,4-dihidroxiacetofenona (**16**), levando a desprotonação da hidroxila. Na etapa 2, a reação ocorre via substituição nucleofílica bimolecular (SN2), a 2',4'-dihidroxiacetofenona desprotonada ataca o carbono metilênico do cloreto de metoximetila (MOMCl) e o cloro se retira da molécula como grupo de saída, levando a acetofenona monoprottegida. A reação procede da mesma forma para a reação de proteção da outra hidroxila, seguindo o mesmo mecanismo.



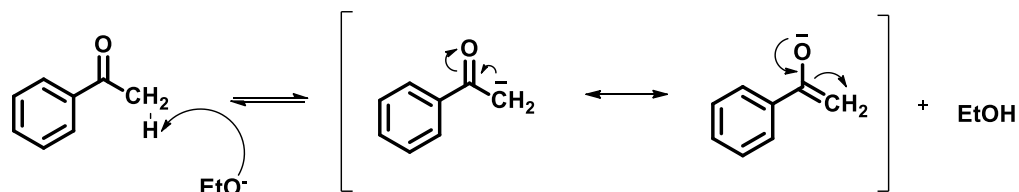
Esquema 6. Mecanismo de reação da proteção da 2,4-dihidroxiacetofenona com cloreto de metoximetila (MOMCl)

Em seguida foi realizada a reação de *O*-geranilação do 4-hidroxibenzaldeído (**19**) com o brometo de geranila para obtenção do 4-*O*-geranilbenzaldeído (**20**), com rendimento de 36 %. A reação segue o mesmo mecanismo descrito para a proteção das hidroxilas da 2',4'-dihidroxiacetofenona (**Esquema 6**). Na etapa de geranilação do 4-hidroxibenzaldeído formaram-se 3 subprodutos, contudo eles não foram caracterizados, e o rendimento baixo pode ser explicado devido a isso.

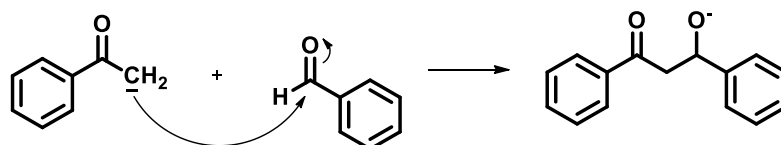
Após a *O*-geranilação do 4-hidroxibenzaldeído, foi realizada a reação de condensação aldólica de Claisen-Schmidt, entre 4-*O*-geranilbenzaldeído e 2,4-bismetoximetoxiacetofenona sob catálise básica com rendimento de purificação de 61%.

No **esquema 7**, consta o mecanismo de reação da condensação aldólica de Claisen-Schmidt sob catálise básica. Esse mecanismo ocorre em quatro etapas. Na primeira etapa, o etóxido remove um hidrogênio ácido α -metílico da acetofenona formando o íon enolato, que é estabilizado por ressonância. Na segunda etapa, ocorre o ataque nucleofílico do íon enolato ao carbono carbonílico do benzaldeído, estabelecendo uma ligação carbono-carbono, levando ao intermediário tetraédrico alcóxido. Na terceira etapa o intermediário ataca o hidrogênio ácido do etanol, restabelecendo a estrutura do etóxido (catalisador). A quarta etapa envolve a captura de um hidrogênio α -cetônico, gerando um segundo enolato, o qual pode ser estabilizado por uma ligação de hidrogênio intramolecular, formando um pseudoanel de seis membros. Em seguida, a cetona α,β -insaturada é formada a partir da liberação de um grupo hidróxido por eliminação unimolecular via base conjugada (E1cB) (PERRIN & CHANG, 2016).

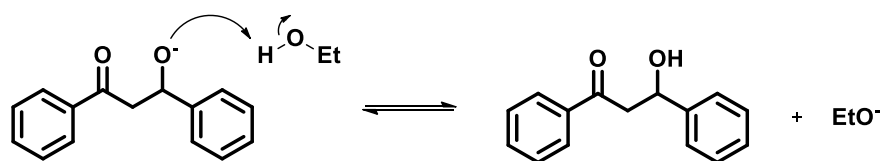
Etapa 1. Formação do enolato



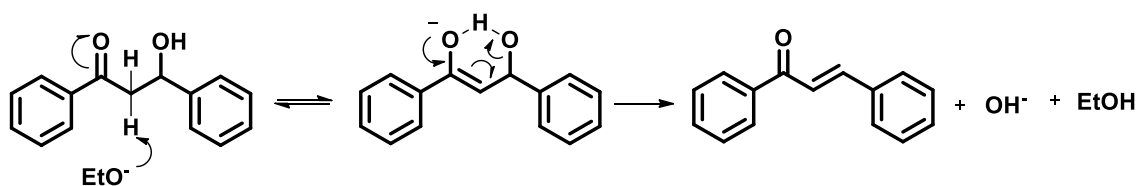
Etapa 2. Ataque nucleofílico do ion enolato ao carbono carbonílico do benzaldeído



Etapa 3. Intermediário tetraédrico ataca o hidrogênio ácido do etanol



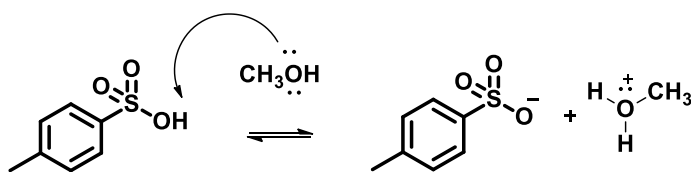
Etapa 4. Formação do pseudoanel de 6 membros



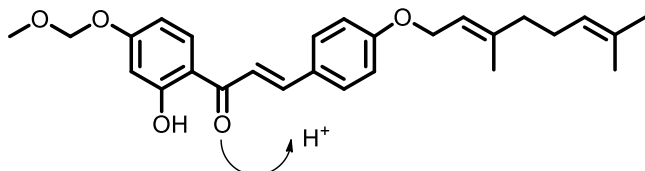
Esquema 7. Mecanismo de condensação aldólica de Claisen- Schmidt

Por fim, foi realizada a desproteção em meio ácido do intermediário **21** (SUGAMOTO, 2011). O **esquema 8** mostra o mecanismo proposto da reação de desproteção de uma hidroxila. Na primeira etapa, o PTSA transfere um próton para o metanol, gerando os íons PTSA^- e CH_3OH_2^+ . Na segunda etapa, os pares livres de oxigênio capturam um próton do metanol, gerando um intermediário protonado. Na terceira etapa, o nucleófilo ataca o carbono metilênico do intermediário protonado formando então o produto desprotegido.

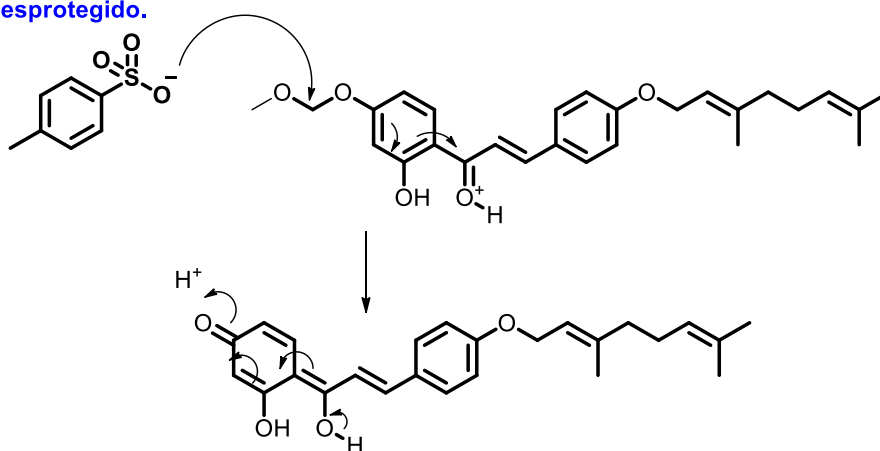
Etapa 1. PTSA transfere um próton para o metanol, gerando os íons PTSA^- e CH_3OH_2^+



Etapa 2. Pares livres do oxigênio capturam um próton do metanol, gerando um intermediário protonado



Etapa 3. O nucleófilo ataca o carbono metilênico do intermediário protonado formando então o produto desprotegido.

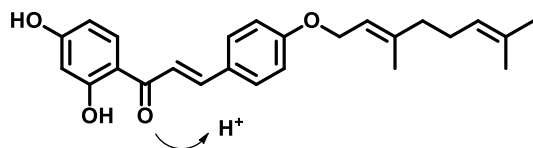


Esquema 8. Mecanismo de desproteção

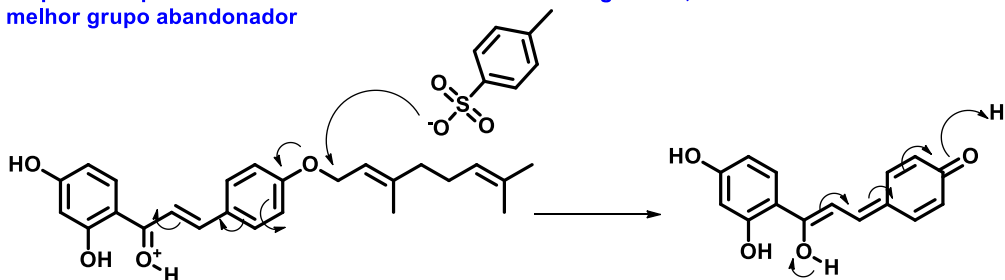
Todas essas 4 etapas foram executadas, contudo a 4-*O*-geranilisiquiritigenina não foi obtida totalmente pura, durante sua purificação observou-se intermediários por análise de RMN (**anexos 8 e 9**). As etapas foram repetidas, mas foi possível perceber que mesmo utilizando-se o PTSA, um ácido mais fraco, quando comparado ao ácido clorídrico (HCl), a maior massa que se obtinha era isiquiritigenina (**G9**), ou seja, ocorre a perda da geranila no anel B. Essa perda da geranila pode ser explicado a partir do mecanismo de desgeranilação/desisoprenilação **esquema 9**, pois forma um melhor grupo abandonador do que a reação de desproteção apresentado no **esquema 8**.

Etapa 1. PTSA transfere um próton para o metanol, gerando os íons PTSA^- e CH_3OH_2^+

Etapa 2. Os pares livres de oxigênio capturam um próton do metanol, gerando um intermediário protonado



Etapa 3. Ataque do nucleófilo no carbono metilênico da geranila, forma um melhor grupo abandonador



Esquema 9. Mecanismo de Desgeranilação/Desisoprenilação (forma um melhor grupo abandonador que a reação de desproteção)

4.2 Análogos da série I

Dos análogos planejados para a série I, as substâncias **G2-G7** foram sintetizadas e caracterizadas por RMN ^1H e ^{13}C , contudo desses 6 análogos apenas 3 (**G2**, **G3** e **G5**) estão puros de acordo com a análise de RMN (**Anexo 16, 18 e 14**).

Os rendimentos foram de 35% e 97% e 42%, para as substâncias **G2**, **G3** e **G5**, respectivamente. Esses rendimentos variáveis podem ser explicados pelas técnicas de purificação cromatográficas utilizadas.

Para a substância **G3** foi possível a utilização da técnica de recristalização, conduzindo um maior rendimento de 97%. Durante a reação, os reagentes praticamente foram consumidos e a substância demonstrou características sólida e R_f diferente dos reagentes, facilitando o processo de purificação por recristalização.

As substâncias **G2** e **G5**, não foi purificada de modo satisfatório, devido ao seu caráter oleoso e não apresentar diferença de polaridade dos reagentes, possuindo mesmo R_f . Devido a esses fatores, foram utilizadas diversas técnicas cromatográficas no item **3.5.5.1**.

A purificação dos compostos **G4**, **G6** e **G7** não foi satisfatória, não permitindo sua caracterização estrutural. Os reagentes não foram totalmente consumidos, com a utilização de diferentes temperaturas, diferentes quantidades de solução catalisadora, e diferente ordem de adição dos reagentes.

Para a substância **G3**, a síntese e purificação foram adequadas. Foi realizado o experimento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com Detecção de Arranjo de Fotodiodos (CLAE-DAD) para analisar a pureza relativa dessa substância, obtendo-se 96 %, empregando a área da banda cromatográfica.

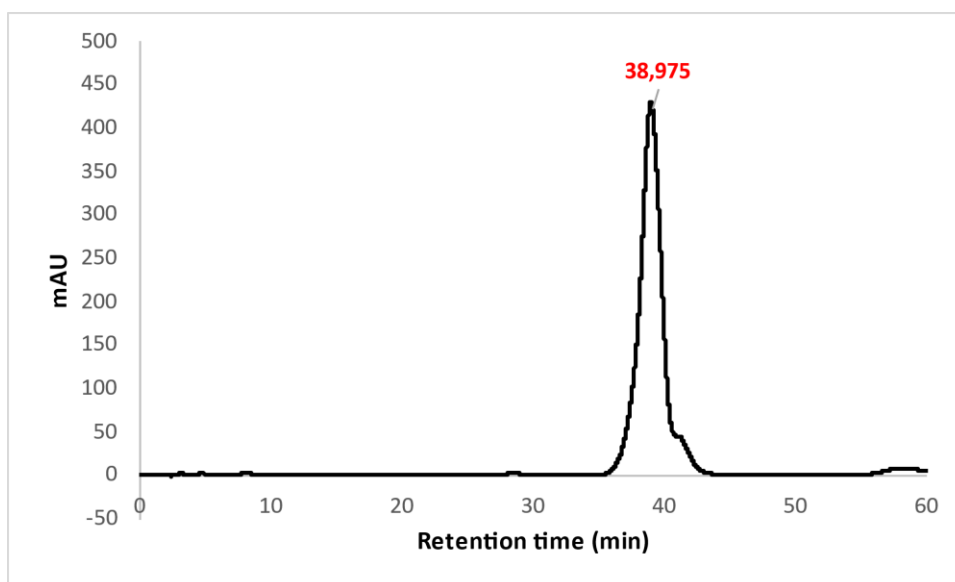


Gráfico 1. Cromatograma de 4'-hidroxi-4-O-geranilchalcona. Metanol: Água (3:1).

Em relação as substâncias da série I, todas são inéditas na literatura. Foi realizado um estudo pela plataforma SciFinder, uma ferramenta de pesquisa da Chemical Abstracts Service (CAS).

4.3 Análogos da série II

Dos análogos planejados para a série II, as substâncias **G8**, **G9** e **G10** foram sintetizadas e caracterizados por RMN ^1H e ^{13}C . Os análogos **G8** e **G9** foram realizados em três etapas de síntese (3.5.6.1). Na primeira etapa obteve-se rendimento de 90% da substância **17** e 5% da substância **18**. Na etapa de condensação aldólica para as substâncias **G8** e **G9** os rendimentos foram similares de 90%. Na etapa de desproteção o rendimento da substância **G9** foi de 60% e para a substância **G8** o rendimento de 80%.

No artigo de BORGES-ARGÁEZ et al., 2009, reportaram que a substância **G8** apresentou um $\text{IC}_{50} = 5 \mu\text{M}$ e $\text{IS} = 6,30$ contra as formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa MOHM / MX / 1994 / INC 5). A substância **G8**, apresentou um valor inferior ao nifurtimox ($\text{IC}_{50} = 6,1 \mu\text{M}$) e benznidazol ($\text{IC}_{50} = 12,0 \mu\text{M}$).

Para o análogo **G10** foram realizadas 4 etapas de síntese, a etapa de proteção das hidroxilas, etapa de prenilação do 4-hidroxibenzaldeído, etapa de condensação aldólica e desproteção do intermediário **31**. A etapa 1 obteve-se mesmos rendimentos relatados acima, 90% da substância **17** e 5% da substância **18**. Em seguida foi realizada a reação de isoprenilação do 4-hidroxibenzaldeído (**19**) com o brometo de isoprenila para obtenção do 4-*O*-isoprenilbenzaldeído, com rendimento de 89 %.

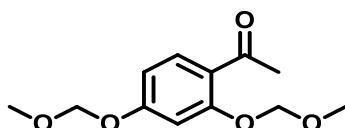
Após a isoprenilação do 4-hidroxibenzaldeído, foi realizada a reação de condensação aldólica de Claisen Schmidt entre o 4-*O*-isoprenilbenzaldeído (**18**) e 2'-hidroxi-4-(metoximetoxi)acetofenona (**15**) sob catálise básica com rendimento de 60%. Por fim, através da desproteção em meio ácido, o intermediário foi desprotegido (SUGAMOTO, 2011). Nesta etapa, ao analisar o RMN de ^1H , foi possível perceber que não obteve-se o produto planejado, mas sim a isoliquiritigenina. Quando realizamos a desproteção, mesmo com um ácido fraco e controlando a reação, ocorre conversão quase que total para a isoliquiritigenina (**G9**), ou seja, ocorre a perda da isoprenila.

A 4-*O*-isoprenilisoliquiritigenina foi extraída da planta *Indigofera pulchra* (MUSA,2011), porém não foi avaliada a atividade contra o *T. cruzi*. Além disso, foi realizada a síntese dessa mesma chalcona utilizando outra metodologia como relatada por Rao e colaboradores (2008) utilizando solvente como dimetilformamida (DMF), e reagente, hidreto de sódio (NaH) para a proteção da 2'4'-dihidroxiacetofenona e prenilação do 4-hidroxibenzaldeído. Para a condensação de acordo com Rao e coautores foi utilizado catalisador de transferência de fase para obter o produto, 4-*O*-isoprenilisoliquiritigenina obtendo-se um rendimento global de 44%.

4.4 Caracterização da 4-*O*-geranilisoliquiritigenina, reagentes e análogos

4.4.1 2,4-bismetoximetoxiacetofenona

(18)



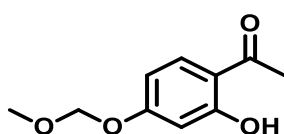
Óleo incolor

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz): $\delta = 2.53$ (s, 3H, CH_3), 3.39 (s, 3H, 2-O CH_2OCH_3), 3.44 (3H, 4-O CH_2OCH_3), 5.25 (s, 2H, 2-O CH_2OCH_3), 5.32 (s, 2H, 4-O CH_2OCH_3), 6.73 (dd, $J = 2,3$ e $8,7$, H-5), 6.79 (d, $J = 2,3$, H-3), 7.65 (d, $J = 8,7$, H-6).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz): 32.00 (CH_3), 56.37 (4-O CH_2OCH_3), 56.70 (2-O CH_2OCH_3), 94.26 (4-O CH_2OCH_3), 94.75 (2-O CH_2OCH_3), 103.2 (C-3), 109.1 (C-5), 122.5 (C-1), 132.0 (C-5), 158.3 (C-2), 161.7 (C-4), e 197.3 (C=O).

4.4.2 2-hidroxi-4-metoximetoxilacetofenona

(17)



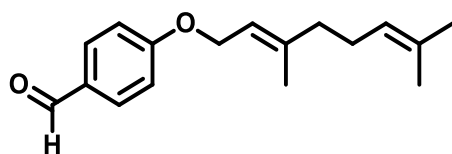
Óleo incolor

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz): $\delta = 2.57$ (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 3.38 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 5.26 (s, 2H, OCH_2), 6.60 (dd, $J = 2,4$ e $8,9$, H-5), 6.53 (d, $J = 2,4$, H-3), 7.85 (d, $J = 8,9$, H-6), 12.5 (s, 2-OH).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz): 27.20 (CH_3), 56.40 (OCH_3), 94.10 (CH_2), 103.4 (C-3), 108.6 (C-5), 115,0 (C-1), 133.8 (C-5), 163.5 (C-3), e 164.0 (C2).

4.4.3 4-O-geranilbenzaldeido

(20)



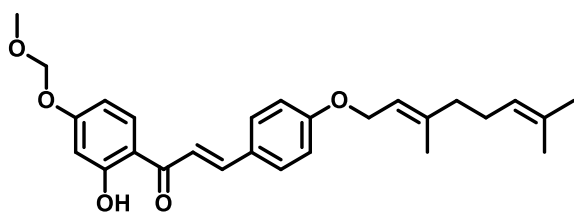
Óleo amarelo claro

RMN ^1H (CDCl_3): $\delta = 1.59$ (s, 3H, CH_3 , H-10''), 1.66 (s, 3H, CH_3 , H-9''), 1.75 (s, 3H, CH_3 , H-4''), 2.11 (m, 4H, 2- CH_2 -, H-5'' e H-6''), 4.62 (d, 2H, CH_2 , $J = 6.6$ Hz, H-1''), 5.07 (t, 1H, CH, $J = 6.7$ Hz, H-7''), 5.47 (t, 1H, CH, $J = 6.6$ Hz, H-2''), 7.00 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, H-3 e H-5), 7.82 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, H-2 e H-6), 9.87 (s, 1H, CHO).

RMN ^{13}C (CDCl_3): $\delta = 16.84$ (1C, CH_3 , C-4''), 17.81 (1C, CH_3 , C-10''), 25.79 (1C, CH_3 , C-9''), 26.34 (1C, CH_2 , C-6''), 39.61 (1C, CH_2 , C-5''), 65.36 (1C, OCH_2 , C-1''), 115.09 (2C, C-3 e C-5), 118.71 (1C, CH, C-2''), 123.74 (1C, CH, C-7''), 129.90 (1C, C-1), 132.04 (1C, CH, C-8''), 132.07 (2C, C-2 e C-6), 142.25 (1C, C-3''), 164.13 (1C, C-4). 190.94 (1C, CHO).

4.4.4 (E)-1-(2,4-bismetoximetoxifenil)-3-(O geranilfenilprop-2-em-1-ona)

(21)



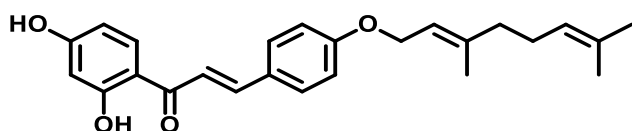
Óleo amarelo

RMN ^1H (CDCl_3): $\delta = 1.60$ (s, 3H, CH_3 , H-10''), 1.67 (s, 3H, CH_3 , H-9''), 1.74 (s, 3H, CH_3 , H-4''), 2.11 (m, 4H, 2- CH_2 -, H-5'' e H-6''), 3.49 (s, 3H, OCH_3 , 4'- OCH_2OCH_3), 3.50 (s, 3H, OCH_3 , 2'- OCH_2OCH_3), 4.57 (d, 2H, CH_2 , $J = 6.5$ Hz, H-1''), 5.09 (t, 1H, CH, $J = 6.6$ Hz, H-7''), 5.21 (s, 2H, OCH_2 , 4'- OCH_2OCH_3), 5.24 (s, 2H, OCH_2 , 2'- OCH_2OCH_3), 5.48 (t, 1H, CH, $J = 6.5$ Hz, H-2''), 6.77 (dd, 1H, $J_1 = 2.2$ Hz e $J_2 = 8.6$ Hz, H-5'), 6.85 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, H-3'), 6.92 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, H-3 e H-5), 7.32 (d, 1H, $J = 15.8$ Hz, H- α), 7.52 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, H-2 e H-6), 7.62 (d, 1H, $J = 15.8$ Hz, H- β), 7.65 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz, H-6').

Observação: Como foi intermediário de síntese e estava praticamente puro, não foi realizado RMN de ^{13}C .

4.4.5 4-O-geranilisoliquiritigenina impura

(G1) ou (15)



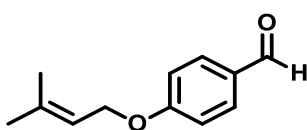
Sólido amarelo

RMN ^1H (DMSO- d_6): $\delta = 1.55$ (s, 3H, CH_3 , H-10''), 1.61 (s, 3H, CH_3 , H-9''), 1.71 (s, 3H, CH_3 , H-4''), 2.05 (m, 4H, 2- CH_2 -, H-5'' e H-6''), 4.61 (d, 2H, CH_2 , $J = 6.5$ Hz, H-1''), 5.05 (t, 1H, CH, $J = 6.6$ Hz, H-7''), 5.42 (t, 1H, CH, $J = 6.5$ Hz, H-2''), 6.28 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz, H-3'), 6.41 (dd, 1H, $J_1 = 2.4$ Hz e $J_2 = 8.9$ Hz, H-5'), 7.01 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, H-3 e H-5), 7.75 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, H-2 e H-6), 7.77 (d, 1H, $J = 15.3$ Hz, H- α), 7.83 (d, 1H, $J = 15.3$ Hz, H- β), 8.18 (d, 2H, $J = 8.9$ Hz, H-6'), 10.74 (bs, 1H, 4'-OH), 13.57 (s, 1H, 2'-OH). **RMN ^1H (DMSO- d_6) da impureza:** $\delta = 2.51$ (s, 3H, CH_3 , H- α), 6.24 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz, H-3'), 6.37 (dd, 1H, $J_1 = 2.3$ Hz e $J_2 = 8.8$ Hz, H-5'), 7.84 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz, H-6'), 10.68 (s, 1H, 4'-OH), 12.62 (s, 1H, 2'-OH). **RMN ^{13}C (DMSO- d_6):** $\delta = 16.45$ (1C, CH_3 , C-4''), 17.65 (1C, CH_3 , C-10''), 25.55 (1C, CH_3 , C-9''), 25.85 (1C, CH_2 , C-6''), 38.99 (1C, CH_2 , C-5''), 64.68 (1C, OCH_2 , C-1''), 102.66 (1C, C-3'), 108.24 (1C, C-5'), 113.08 (1C, C-1'), 115.16 (2C, C-3 e C-5), 118.46 (1C, CH, C-2''), 119.42 (1C, C- α), 123.82 (1C, CH, C-7''), 127.21 (1C, C-1), 131.04 (2C, C-2 e C-6), 133.05 (1C, C-6'), 133.82 (1C, CH, C-8''), 140.78 (1C, C-3''), 143.92 (1C, C- β), 160.79 (1C, C-4), 165.13 (1C, C-4'), 165.91 (1C, C-2'), 191.59 (1C, C- β).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6) da impureza: $\delta = 26.44$ (1C, CH_3 , C- α), 102.36 (1C, C-3'), 108.21 (1C, C-5'), 112.93 (1C, C-1'), 131.15 (1C, C-6'), 164.29 (1C, C-4'), 124.96 (1C, C-2'), 202.84 (1C, C- β).

4.4.6 4-*O*-prenilbenzaldeído

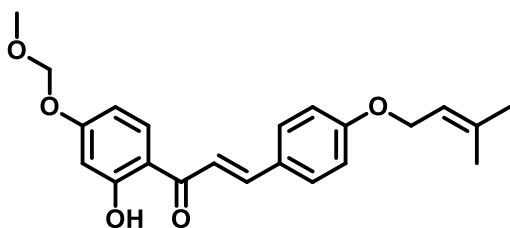
(30) Óleo incolor



RMN ^1H (DMSO- d_6): $\delta = 1.71$ (s, 3H, CH_3 , H-4''), 1.74 (s, 3H, CH_3 , H-5''), 2.50 (m, 4H, 2- CH_2 -, H-3'' e, 4.63 (d, 2H, CH_2 , $J = 6.6$ Hz, H-1''), 5.44 (t, 1H, CH, $J = 6.6$ Hz, H-2''), 7.11 (d, 2H, $J = 7,12$ Hz, H-3 e H-5), 7.85 (d, 2H, $J = 7,12$ Hz, H-2 e H-6), 9.85 (s, 1H, CHO).

4.4.7 Intermediário isoprenilado

(31)



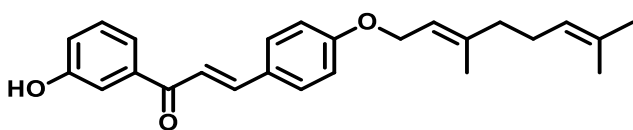
Sólido amarelo

RMN ^1H (DMSO- d_6): δ = 1.72 (s, 3H, CH₃, H-5''), 1.74 (s, 3H, CH₃, H-4''), 3.39 (s, 3H, CH₃, 4'-OCH₂OCH₃), 4.60 (d, 2H, J = 6.7 Hz, CH₂, H-1''), 5.29 (s, 2H, CH₂, 4'-OCH₂OCH₃), 5.43 (t, 1H, CH, J = 6.7 Hz, H-2''), 5.42 (t, 1H, CH, J = 6.4 Hz, H-2''), 6.56 (d, 1H, J = 2.4 Hz, H-3'), 6.63 (d, 1H, J_1 = 2.4 Hz e J_2 = 9.0 Hz, H-5'), 7.02 (d, 2H, J = 8.8 Hz, H-3 e H-5), 7.80 (d, 1H, J = 15.3 Hz, H- α), 7.86 (d, 1H, J = 15.3 Hz, H- β), 7.86 (d, 2H, J = 8.8 Hz, H-2 e H-6), 8.28 (d, 1H, J = 9.0 Hz, H-6'), 13.44 (s, 1H, 2'-OH).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6): δ = 18.16 (1C, CH₃, C-5''), 25.55 (1C, CH₃, C-4''), 56.15 (1C, OCH₃, 4'-OCH₂OCH₃), 64.69 (1C, OCH₂, C-1''), 93.80 (1C, OCH₂, 4'-OCH₂OCH₃), 103.23 (1C, C-3'), 108.30 (1C, C-5'), 114.75 (1C, C-1'), 115.19 (2C, C-3 e C-5), 118.45 (1C, CH, C-2''), 119.61 (1C, C- α), 127.13 (1C, C-1), 131.26 (2C, C-2 e C-6), 132.74 (1C, C-6'), 137.82 (1C, C-3''), 144.66 (1C, C- β), 160.99 (1C, C-4), 163.24 (1C, C-4'), 165.25 (1C, C-2'), 192.16 (1C, C- β').

4.4.8 3'-hidroxi-4-O-geranilchalcona

(G5)

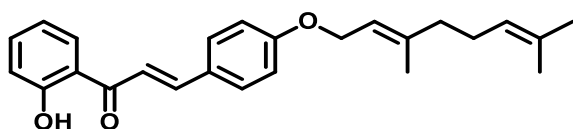


Sólido amarelo

RMN ^1H (DMSO- d_6): δ = 1.56 (s, 3H, CH₃, H-10''), 1.61 (s, 3H, CH₃, H-9''), 1.71 (s, 3H, CH₃, H-4''), 2.06 (m, 4H, 2-CH₂-, H-5'' e H-6''), 4.61 (d, 2H, CH₂, J = 7.0 Hz, H-1''), 5.06 (t, 1H, CH, J = 5.4 Hz, H-7''), 5.42 (t, 1H, CH, J = 7.0 Hz, H-2''), 7.00 (d, 2H, J = 8.8 Hz, H-3 e H-5), 7.04 (ddd, 1H, J_1 = 1.8 Hz, J_2 = 2.5 Hz e J_3 = 8.1 Hz, H-4'), 7.36 (dd, 1H, J_1 = 8.1 Hz e J_2 = 7.8 Hz, H-5'), 7.43 (dd, 1H, J_1 = 1.8 Hz e J_2 = 2.2 Hz, H-2'), 7.59 (ddd, 1H, J_1 = 2.2 Hz, J_2 = 2.5 Hz e J_3 = 7.8 Hz, H-6'), 7.67 (d, 1H, J = 15.7 Hz, H- α), 7.70 (d, 1H, J = 15.7 Hz, H- β), 7.81 (d, 2H, J = 8.8 Hz, H-2 e H-6), 7.80 (bs, 1H, 3'-OH).

4.4.9 2'-hidroxi-4-O-geranilchalcona

(G2)



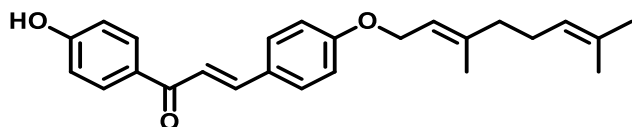
Sólido amarelo

RMN ^1H (CDCl_3): $\delta = 1.61$ (s, 3H, CH_3 , H-10''), 1.68 (s, 3H, CH_3 , H-9''), 1.76 (s, 3H, CH_3 , H-4''), 2.12 (m, 4H, 2- CH_2 -, H-5'' e H-6''), 4.60 (d, 2H, CH_2 , $J = 7.1$ Hz, H-1''), 5.10 (t, 1H, CH, $J = 6.7$ Hz, H-7''), 5.49 (t, 1H, CH, $J = 7.1$ Hz, H-2''), 6.94 (ddd, 1H, $J_1 = 1.1$ Hz, $J_2 = 7.1$ Hz e $J_3 = 8.1$ Hz, H-5'), 6.96 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, H-3 e H-5), 7.02 (dd, 1H, $J_1 = 1.1$ Hz e $J_2 = 8.4$ Hz, H-3'), 7.49 (ddd, 1H, $J_1 = 1.5$ Hz, $J_2 = 7.1$ Hz e $J_3 = 8.4$ Hz, H-4'), 7.54 (d, 1H, $J = 15.4$ Hz, H- α), 7.62 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, H-2 e H-6), 7.91 (d, 1H, $J = 15.4$ Hz, H- β), 7.92 (dd, 1H, $J_1 = 1.5$ Hz e $J_2 = 8.1$ Hz, H-6'), 12.95 (s, 1H, 2'-OH).

RMN ^{13}C (CDCl_3): $\delta = 16.73$ (1C, CH_3 , C-4''), 17.72 (1C, CH_3 , C-10''), 25.71 (1C, CH_3 , C-9''), 26.27 (1C, CH_2 , C-6''), 39.54 (1C, CH_2 , C-5''), 65.10 (1C, OCH_2 , C-1''), 115.25 (2C, C-3 e C-5), 117.41 (2C, C-3' e C-5'), 118.60 (1C, CH, C-2''), 118.76 (1C, CH, C-7''), 120.61 (1C, C- α), 123.70 (1C, C-1), 127.21 (2C, C-2 e C-6), 129.53 (1C, C-1'), 130.55 (2C, C-2' e C-6'), 131.92 (1C, CH, C-8''), 136.13 (1C, C-3''), 141.87 (1C, C- β), 161.43 (1C, C-4), 163.57 (1C, C-4'), 193.89 (1C, C- β').

4.4.10 4'-hidroxi-4-O-geranilchalcona

(G3)



Sólido alaranjado

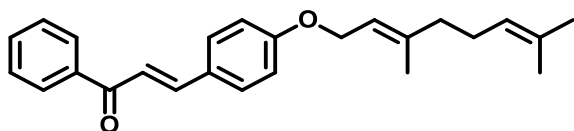
RMN ^1H ($\text{DMSO}-d_6$): $\delta = 1.55$ (s, 3H, CH_3 , H-10''), 1.61 (s, 3H, CH_3 , H-9''), 1.71 (s, 3H, CH_3 , H-4''), 2.05 (m, 4H, 2- CH_2 -, H-5'' e H-6''), 4.60 (d, 2H, CH_2 , $J = 6.4$ Hz, H-1''), 5.06 (t, 1H, CH, $J = 6.6$ Hz, H-7''), 5.42 (t, 1H, CH, $J = 6.4$ Hz, H-2''), 6.89 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, H-3 e H-5), 6.99 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, H-3' e H-5'), 7.64 (d, 1H, $J = 15.5$ Hz, H- α),

7.75 (d, 1H, $J = 15.5$ Hz, H- β), 7.79 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, H-2' e H-6'), 10.39 (bs, 1H, 4'-OH).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6): $\delta = 16.41$ (1C, CH₃, C-4''), 17.60 (1C, CH₃, C-10''), 25.50 (1C, CH₃, C-9''), 25.82 (1C, CH₂, C-6''), 38.95 (1C, CH₂, C-5''), 64.61 (1C, OCH₂, C-1''), 115.07 (2C, C-3 e C-5), 115.36 (2C, C-3' e C-5'), 119.45 (1C, CH, C-2''), 119.52 (1C, CH, C-7''), 123.79 (1C, C- α), 127.44 (1C, C-1), 129.40 (2C, C-2 e C-6), 130.53 (1C, C-1'), 131.06 (2C, C-2' e C-6'), 131.09 (1C, CH, C-8''), 140.64 (1C, C-3''), 142.77 (1C, C- β), 160.39 (1C, C-4), 162.04 (1C, C-4'), 187.11 (1C, C- β').

4.4.11 4-O-geranilchalcona impura

(G4)



Sólido amarelo claro

RMN ^1H (DMSO- d_6): $\delta = 1.55$ (s, 3H, CH₃, H-10''), 1.61 (s, 3H, CH₃, H-9''), 1.71 (s, 3H, CH₃, H-4''), 2.04 (m, 4H, 2-CH₂-, H-5'' e H-6''), 4.61 (d, 2H, CH₂, $J = 7.1$ Hz, H-1''), 5.05 (t, 1H, CH, $J = 6.1$ Hz, H-7''), 5.42 (t, 1H, CH, $J = 7.1$ Hz, H-2''), 7.00 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, H-3 e H-5), 7.56 (dd, 2H, $J_1 = 7.4$ Hz e $J_2 = 7.3$ Hz, H-3' e H-5'), 7.65 (dd, 1H, $J_1 = 1.2$ Hz e $J_2 = 8.3$ Hz, H-4'), 7.72 (d, 1H, $J = 15.5$ Hz, H- α), 7.72 (d, 1H, $J = 15.5$ Hz, H- β), 7.83 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, H-2 e H-6), 8.13 (dd, 2H, $J_1 = 1.2$ Hz e $J_2 = 8.3$ Hz, H-2' e H-6').

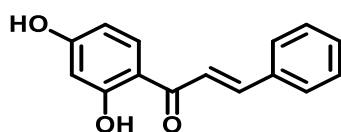
RMN ^1H (DMSO- d_6): $\delta = 2.57$ (s, 3H, H- α) sinal da acetofenona, 9.85 (s, 1H, CHO) sinal de aldeído;

Os sinais mais baixos no espectro correspondem aos reagentes aldeído geranilado e acetofenona.

RMN ^{13}C (DMSO- d_6): $\delta = 26.71$ (1C, C- α) e 191.26 (1C, C- β) sinais de impureza característico de acetofenonas, além desses, os sinais mais baixos na região de alifáticos sugere a presença de aldeído também.

4.4.12 2'4'-dihidroxicalcona

(G8)



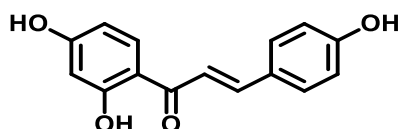
Sólido amarelo

Rf (hexano/AcOEt: 5:5): RMN ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz): 6,32 (*d*, J 2,31 Hz, 1 H), 6,45 (*dd*, J = 2,32 e 8,86 Hz, 1 H), 7,48 (*dd*, J = 5,03 e 1,87 Hz, 1 H), 7,82 (*d*, J = 15,47, 1H), 7,91 (*dd*, J = 6,52 e 3,02 Hz, 2H), 7,99 (*d*, J = 15,49 Hz, 1H), 8,22 (*d*, J = 8,96 Hz, 1H), 10,78 (*s*, 1-OH), 13,41 (*s*, 1-OH).

Foi realizado apenas o espectro de RMN de ^1H como descrito acima. Os dados de ^{13}C não foram executados. Em comparação com os dados relatados, os dados de RMN de ^1H estão de acordo com a literatura (CHEN CHEN et al, 2019). Nesse artigo também se encontram dados de RMN de ^{13}C .

4.4.13 Isoliquiritigenina

(G9)



Sólido alaranjado

Rf (hexano/AcOEt: 5:5): RMN ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz): 6,30 (*d*, J 2,3 Hz, 1 H), 6,42 (*dd*, J = 2,3 e 8,8 Hz, 1 H), 6,85 (*d*, J = 8,6 Hz, 2 H), 7,76 (*s*, 2H), 7,77 (*d*, J = 8,7 Hz, 2H), 8,17 (*d*, J = 8,8 Hz, 1H), 10,14 (*s*, 1-OH), 10,68 (*s*, 1-OH), 13,62 (*s*, 1-OH).

Os dados de ^{13}C não foram executados. Em comparação com os dados relatados, os dados de RMN de ^1H estão de acordo com a literatura (WANG et al, 2017). Nesse artigo também se encontram dados de RMN de ^{13}C .

4.5 Estudos *in silico* para a 4'-hidroxi-4-*O*-geranilchalcona e fármacos de referência utilizando SwissADME®

Para discutir as características *druglikeness*, propriedades físico-químicas e propriedades farmacocinéticas foram preditos, valores de lipofilicidade, tamanho, polaridade, solubilidade, flexibilidade e saturação. Foi utilizada a ferramenta SwissADME (DAINA A et al, 2017) e alguns parâmetros físico-químicos foram apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas previstas da 4'-hidroxi-4-*O*-geranilchalcona usando a ferramenta SwissADME.

Propriedades	Valores preditos
Peso molecular (g/mol)	376,49
Hibridização C_{sp^3}	0,24
Número de ligações rotativas	9
TPSA	46.56 Å
Número de aceptores de hidrogênio	3
Números de doadores de hidrogênio	1
Log <i>Po/w</i>	4,42
Log S (ESOL)	-6.09
Solubilidade em água	Solubilidade moderada; permeabilidade moderada

O coeficiente de partição entre n-octanol e água (log *Po/w*) é um descritor clássico para a lipofilicidade, sendo predito um valor de 4,42 para **G3**, bem similar ao valor obtido pelos experimentos cromatográficos (log *Po/w* = 4,83).

Os valores ideais log *Po/w* variam de -0,7 a 5,0, e os valores mais altos impactam na baixa solubilidade em água (DAINA; ZOETE, 2017). A lipofilicidade descreve a concentração de um composto entre ambiente aquoso e um lipídico tendo uma forte inter-relação com propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, estando diretamente correlacionada com muitas outras propriedades, tais como: solubilidade, permeabilidade, toxicidade e biodisponibilidade (PICCIRILLO, AMARAL, 2018; HENCHOZ et al.,2008). Devido á maior característica lipofílica, o composto 4'-hidroxi-4-*O*-geranilchalcona foi considerado moderadamente solúvel em água. Conforme observado no Radar de Biodisponibilidade (**Figura 14**), apesar dessa característica o composto apresentou valores aceitáveis para todos os parâmetros.

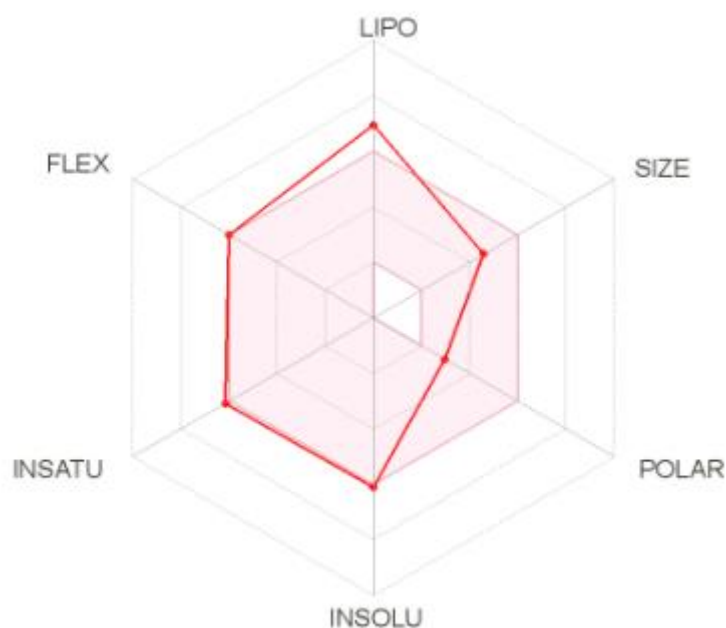


Figura 15. Radar de Biodisponibilidade (SwissADME) para a 4'-hidroxi-4-O-geranilchalcona

A área rosa representa o intervalo ideal para cada propriedade (flexibilidade, insolubilidade, insaturação, polaridade, tamanho e lipofilicidade) (RITCHIE et al, 2011; LOVERING et al.,2009).

Para uma flexibilidade ideal, os compostos não deveriam ultrapassar mais de nove ligações rotativas, a 4'-hidroxi-4-O-geranilchalcona tem exatamente nove ligações, avaliação essa considerável já que o número de rotação molecular influencia, em particular, na passagem pela membrana e biodisponibilidade (RITCHIE et al., 2011;).

A substância G3 apresenta peso molecular (376,49 Da), valor inserido na faixa ótima entre 150 e 500 Da. O peso molecular está entre as regras de Lipinski para um fármaco ser administrado por via oral, pois o tamanho molecular implica na determinação de alguns compartimentos que a substância permeará (ERMONDI et al., 2020; LIPINSKI, 2001).

A polaridade do composto resultou em 46.56 Å, representada na tabela 1 por TPSA (área de superfície polar topológica) valor inserido na faixa ótima entre 20 e 130 Å, pois na literatura indica que compostos com TPSA menor ou igual a referência apresenta melhor biodisponibilidade oral (ERMONDI et al., 2020; DAINA et al., 2017).

Em relação a solubilidade (Log S) resultou em um valor de -6.09, de acordo com o modelo ESOL o valor ótimo não deve ser superior a 6, contudo para esse composto é

muito próximo. A saturação, que representa a fração de carbonos na hibridização sp^3 , apresentou um valor de 0,24, também aproximado e de acordo com o valor ótimo ($\geq 0,25$).

O SwissADME não previu nenhum alerta para um comportamento PAIN (pan-assay interference compounds). Conforme afirmado por Baell, compostos promíscuos que podem apresentar múltiplos comportamentos que podem interferir na leitura do ensaio, como quelação de metal, ciclo redox e reatividade com alvos moleculares, são conhecidos como PAINS.

Tabela 2. Predição das propriedades farmacocinéticas e *drug-likeness* da 4'-hidroxi-4-O-geranilchalcona utilizando a ferramenta SwissADME.

Propriedades farmacocinéticas	Valores Calculados
I – Absorção	
Absorção gastrointestinal	Alta absorção
Substrato P-gp	Não
II – Distribuição	
Permeabilidade na membrana	Não
Lipinski	Sim, 1 violação, Log P > 4,15
Veber	Sim
Muegge	Não, 1 violação, Log P > 5,6
Ghose	Não, 1 violação, Log P > 5
Egan	Não, 1 violação log P > 5,88

A **tabela 2** nos traz parâmetros farmacocinéticos que avaliam comportamentos ADME (absorção, distribuição, metabolismo e eliminação) de uma substância. Para a 4'-hidroxi-4-O-geranilchalcona previu uma alta absorção gastro-intestinal sugerindo que esta vem a ser um bom candidato por via oral.

A possibilidade de um composto atuar como substrato para a P-glicoproteína (P-gp) é de alto valor na fase inicial da descoberta de fármacos, principalmente por sua capacidade de influenciar as propriedades ADME. A glicoproteína-P é uma proteína de membrana do tipo transportadores ABC presente no fígado, rins, intestinos, barreira hematoencefálica, barreira placentária e foi atribuída a drogas por meio de sua ejeção como mecanismo de defesa. A P-gp é relevante uma vez que a proteína é significativa entre os transportadores de cassete de ligação de ATP ou transportadores ABC, sendo funcionalmente como uma bomba de efluxo ativo através de membranas biológicas contra xenobióticos prejudiciais ao organismo e um dos principais papéis da P-gp é proteger o sistema nervoso central (SZAKÁCS et al, 2008).

Apesar da substância não se apresentar como um substrato para P-gp, podendo apresentar certa toxicidade e o *T. cruzi* podendo entrar na barreira hemato encefálica, por outro lado poderia ser até interessante em doença de Chagas cerebral, por exemplo. Além disso vale ressaltar que é uma predição desses valores.

Além dos parâmetros analisados acima, a 4'-hidroxi-4-O-geranilchalcona foi comparada aos intervalos de permissividade segundo os filtros de Lipinski, Veber, Muegge, Ghose e Egan (LVMGE), indicado o número de violações na **tabela 3**. De acordo com esses intervalos, para Veber e Lipinski essa substância não teria semelhança com um possível fármaco, e para Ghose, Egan e Muegge sim, pois não violaria o parâmetro Log P.

4.6 Atividade biológica

Foi avaliada a atividade biológica da substância **G3** contra as cepas de *T. cruzi* para as formas tripomastigotas (extracelular), amastigotas (intracelular) e a toxicidade contra células NCTC (clone -L929), e atividade hemolítica.

4.6.1. Determinação de Concentrações Efetivas (EC₅₀) contra as formas tripomastigotas e amastigotas de *Trypanosoma cruzi*

A determinação da concentração efetiva (EC₅₀) contra a forma tripomastigota de *T. cruzi* foi determinada por meio do método colorimétrico Alamar Blue®. Esse método consiste em em uma reação redox, no qual a resazurina é oxidada ao ser adicionada em uma cultura, sendo convertida na forma reduzida (resorufina) pela atividade de enzimas mitocondriais. Por meio desta reação redox, o corante passa da cor azul (forma oxidada) para rosa (forma reduzida), conversão que pode ser mensurada pela leitura colorimétrica ou fluorimétrica (RÓLON et al, 2006; O'BRIEN et al, 2000). Esse ensaio foi utilizado para determinar a viabilidade celular. As células vivas podem reduzir rapidamente a esse reagente e o aumento na intensidade da fluorescência pode ser monitorado com o espectrofluorímetro. Quando as células não são viáveis, ou seja, não possuem capacidade metabólica, não ocorre a redução do corante. O ensaio foi realizado em placa de 96 poços onde os tripomastigotas foram cultivadas em meio RPMI completo na presença de diferentes concentrações de **G3** e mantidas à temperatura de 37 °C em estufa contendo

5% de CO₂ por 48 horas. A avaliação da CE₅₀ do benznidazol foi realizada como fármaco antichagásico de referência.

Para a determinação da CE₅₀ contra as formas amastigotas de *T. cruzi*, macrófagos peritoneais foram plaqueados em lamínulas na proporção de 2×10^5 por poço em meio RPMI. Em seguida, foi realizada a infecção com formas tripomastigotas com multiplicidade de infecção (MOI) de 1:10 (1 macrófago para 10 tripomastigotas) por um período de 2 horas. Em seguida, foi realizada uma lavagem para remoção dos parasitas que não aderiram ou infectaram nos macrófagos. A infecção foi mantida em meio RPMI contendo diferentes concentrações de **G3** por 48 horas. Após este período as lamínulas foram lavadas, fixadas com metanol e coradas com Giemsa para realizar a contagem em microscopia de luz dos macrófagos infectados e número de amastigotas. Em seguida, o índice de infectividade foi calculado para determinação do EC₅₀ em formas amastigotas. (TABELA 3)

Tabela 3. Atividade contra *Trypanosoma cruzi* e citotoxicidade de **G3**

Composto	CE ₅₀ (µM) ± DP		CC ₅₀ (µM) ± DP	IS
	Tripomastigot a	Amastigota	NCTC clone 929	
G3	2,14 ± 0.14	12,28 ± 1,79	39,10 ± 0.97	3,45
Benznidazol	12,28 ± 3.35	5,0 ± 1,52	>200	>40

CC₅₀: Concentração Citotóxica 50% em células NCTC; CE₅₀: Concentração Efetiva 50% em amastigotas intracelulares; IS: Índice de Seletividade, dado pela razão entre CC₅₀ e CE₅₀ de amastigotas; DP: Desvio Padrão.

O índice de seletividade IS foi calculado após a determinação do CE₅₀ para os amastigotas de *T. cruzi*. Ele é determinado dividindo o valor da CE₅₀ obtidos dos ensaios células NCTC macrófagos pela CE₅₀ obtidas dos ensaios com as amastigotas. Quanto maior essa razão, mais seletiva é a substância sobre o parasita, e consequentemente, apresenta um menor efeito tóxico sobre a célula hospedeira. Com esses valores foi possível determinar a possível janela terapêutica, que consiste no intervalo de concentração que garante a eficácia de um determinado composto sem que ocorra

toxicidade pelo uso. O IS de **G3** apresentou valor de 3,45, o que representa baixa seletividade e potencial janela terapêutica.

A ação de **G3** contra as formas tripomastigotas de *T. cruzi* apresentou uma potência três vezes maior do que foi ao fármaco de referência, já para a forma amastigota apresentou uma potência três vezes menor sendo a **G3** menos ativa que o benznidazol. Contudo, comparando os dados com a literatura é possível perceber a substância é muito ativa e além disso é um composto inédito.

Quando se analisa a literatura, como por exemplo no artigo de BORGES ARGAEZ, a maioria das substâncias foram testadas para a forma epimastigota de *T. cruzi*, a chalcona 2'4'-dihidroxicalcona apresentou 5 μM . Se analisarmos o composto **G3** foi mais potente para a forma tripomastigota com valor de 2,14 μM , sendo uma forma evolutiva do *T. cruzi* até mais importante para determinação da atividade.

4.6.2 Avaliação da toxicidade contra células NCTC

Para análise da toxicidade contra células NCTC clone 929, fibroblastos de tecido conjuntivo de camundongo, foi utilizado o método colorimétrico MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio) e determinou-se a concentração citotóxica de 50% (CC_{50}). Esse método mede a viabilidade celular e citotoxicidade com base no dano induzido nas mitocôndrias. O princípio é a avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais, quantificadas pela redução do MTT (um sal de coloração amarela solúvel em água) à formazana (cristais de coloração púrpura, insolúveis em água) (LI & SONG, 2007).

O ensaio foi realizado em placa de 96 poços onde as células foram cultivadas em meio RPMI completo na presença de diferentes concentrações de **G3** e mantidas à temperatura de 37 °C em estufa contendo 5% de CO_2 por 48 horas. A avaliação da CC_{50} do benznidazol foi realizada uma vez que é o fármaco de referência de tratamento utilizados nos ensaios de infecção *in vitro*.

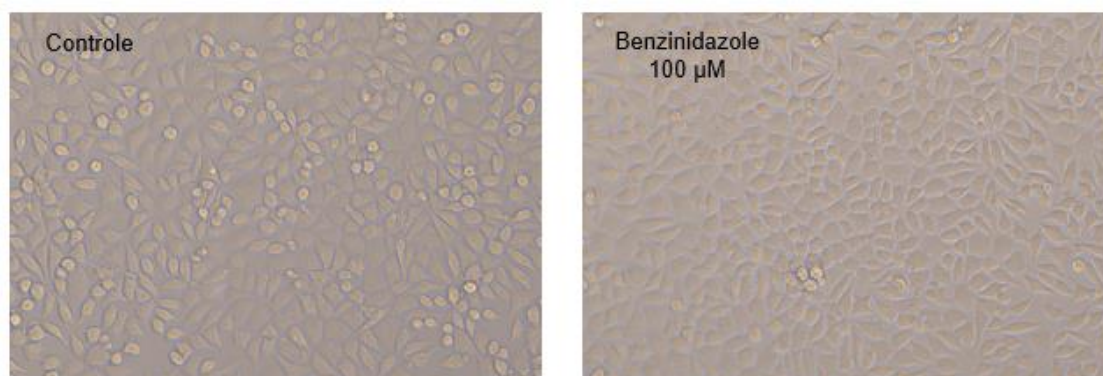
Observamos que **G3** apresentou toxicidade ($39,10 \pm 2,96 \mu\text{M}$) quando comparado com o fármaco de referência e literatura. O benznidazol apresenta valor superior a $\geq 200 \mu\text{M}$ conforme esperado (Tabela 4).

Tabela 4. Avaliação da toxicidade de **G3** contra células NCTC.

	CC ₅₀ ± DP Célula de mamífero NCTC
G3	39,10 ± 2.96
Benznidazol	>200

CC₅₀: Concentração Citotóxica 50%; µM, micro molar; DP, Desvio Padrão

Esses efeitos citotóxicos podem ser verificados a partir da morfologia da linhagem celular NCTC, observada na figura 16. As células que não foram expostas a G3, apresentaram padrão típico, crescimento após 48 horas e atingiram confluência, ou seja, após a multiplicação formam uma monocamada celular. O mesmo efeito é observado nas células incubadas com benznidazol em alta concentração, visto que não apresenta efeito citotóxico.

**Figura 16.** Efeitos citotóxicos em células controles e nas células incubadas com benznidazol

Entretanto, quando as células foram incubadas na presença de **G3** observamos efeito citotóxico em concentrações que variam de 50-100 µM, onde observamos alterações na morfologia típica da célula NCTC, diminuição do crescimento e não confluência.

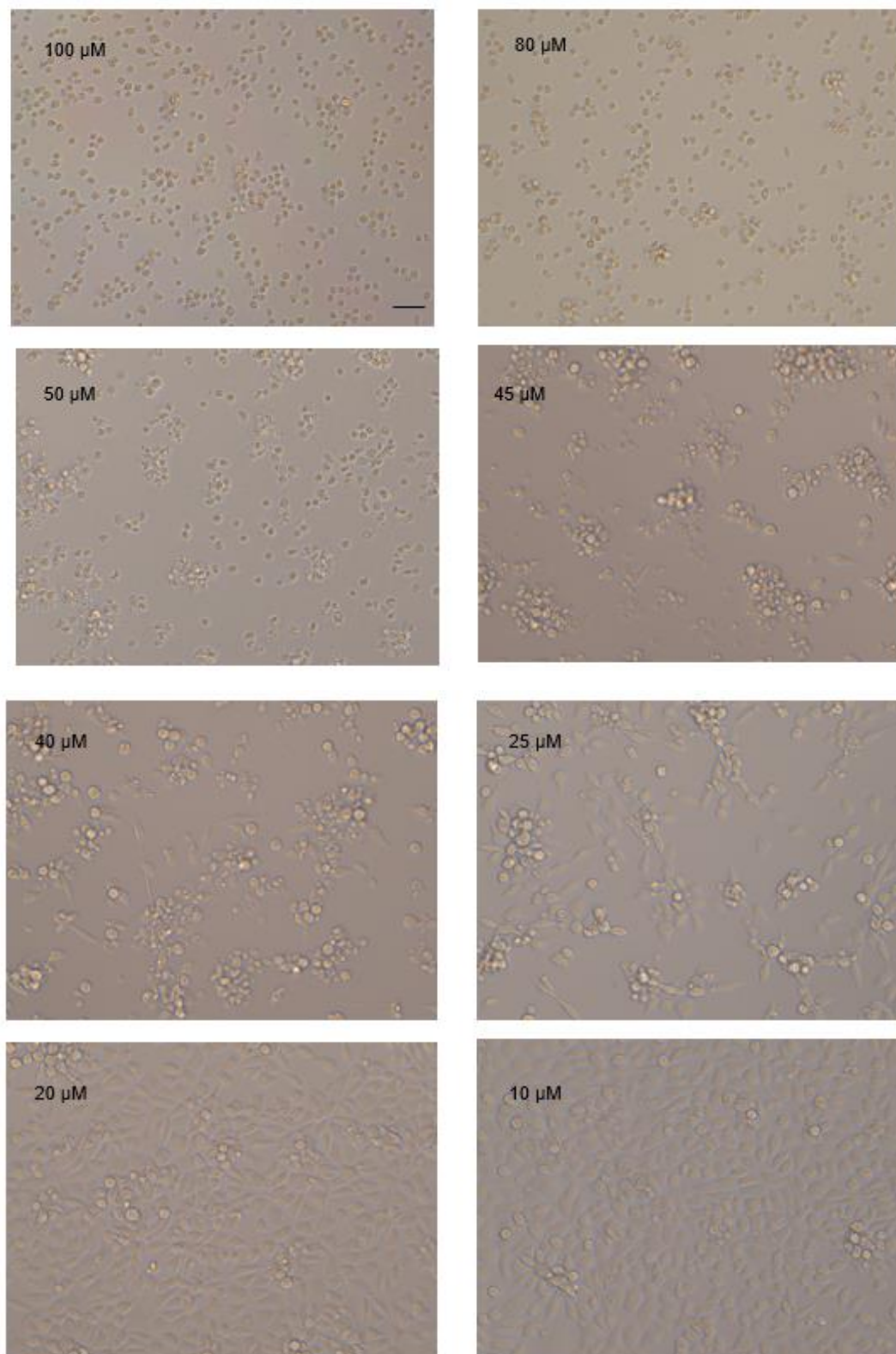


Figura 17. Citotoxicidade de **G3** em fibroblastos de tecido conjuntivo de camundongo (NCTC clone 929). Microscopia de contraste de fase (aumento 20×), morfologia das células na presença de diferentes concentrações do composto **G3**. Barra: 50 μM.

Nas concentrações de 25 μM a 45 μM , observamos alterações morfológicas, crescimento celular mais lento não atingindo confluência. Dessa forma, as fotoimagens da microscopia corroboram com o valor de CC_{50} calculado por meio do método colorimétrico de MTT. Por outro lado, nas baixas concentrações de **G3** (20-10 μM), as células apresentam morfologia típica, crescimento e confluência quando comparadas ao controle.

A partir dos gráficos de absorvância versus concentração e viabilidade celular versus concentração foi possível perceber que quanto maior a absorvância, maior a viabilidade celular. O benznidazol, apresentou viabilidade celular em todas as concentrações, enquanto o **G3**, em concentrações maiores, não promoveu viabilidade celular.

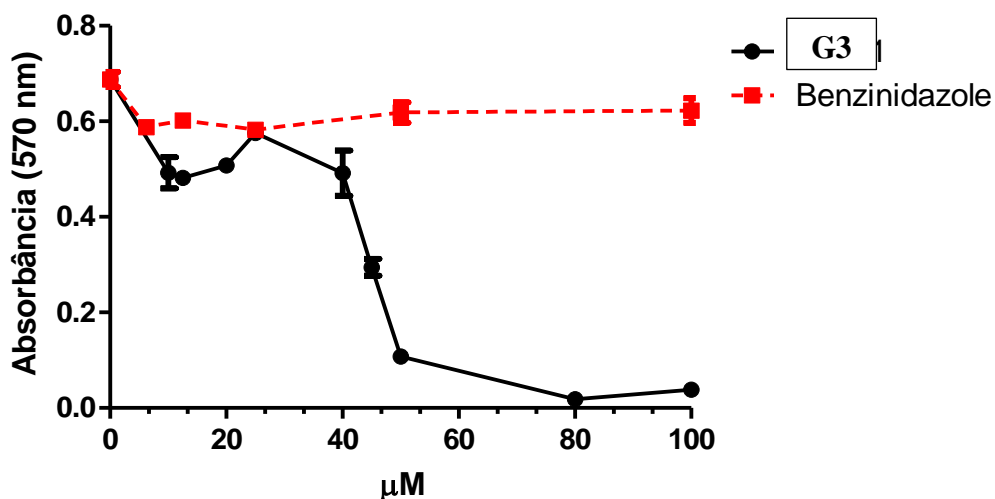


Gráfico 2. Absorvância *versus* concentração da substância **G3** comparada com benznidazol.

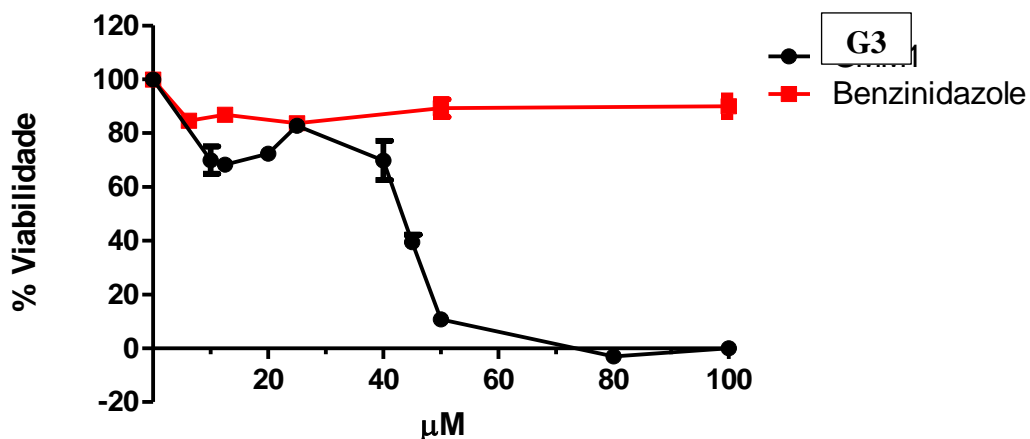


Gráfico 3. Porcentagem de viabilidade celular *versus* concentração da substância **G3** comparada com benznidazol.

4.6.3. Avaliação da atividade hemolítica

Com a finalidade de contribuir nas informações relacionadas à citotoxicidade em célula de mamífero, avaliamos a atividade hemolítica. A atividade hemolítica foi determinada no sobrenadante celular pela leitura em espectrofotômetro (FilterMax F5Multi-Mode) com comprimento de onda de 570 nm (AMARAL et al, 2019). A hemólise máxima foi obtida utilizando água ultrapura mili-Q e eritrócitos não tratados foram utilizados como controle negativo (100% viabilidade).

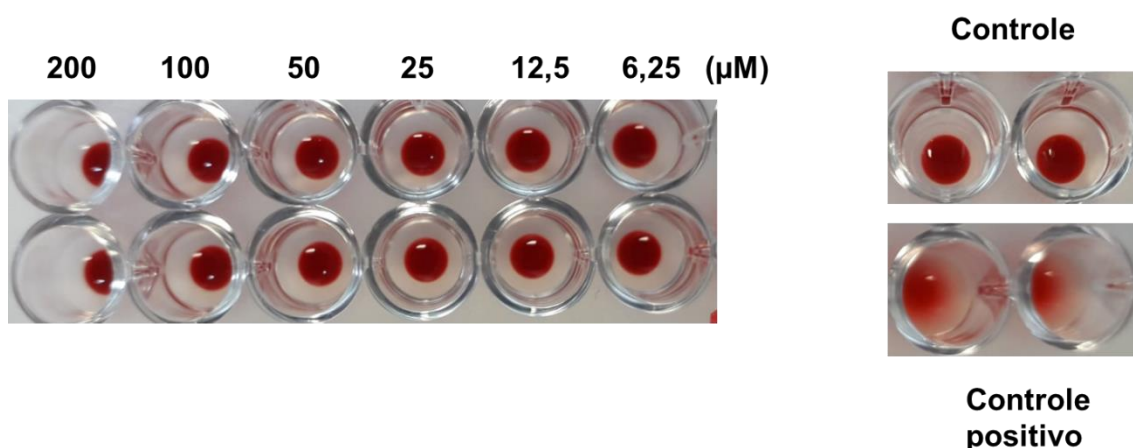


Figura 18. Análise visual da atividade hemolítica

Observamos na análise visual da placa que **G3** não induziu a hemólise (**Figura 18**), mesmo na maior concentração testada de 200 μM. Resultados foram confirmados com a leitura do sobrenadante em espectrofotômetro, que apresentaram absorvância

semelhante ao controle. A avaliação da atividade hemolítica dos compostos em eritrócitos indicou que eles não induzem hemólise.

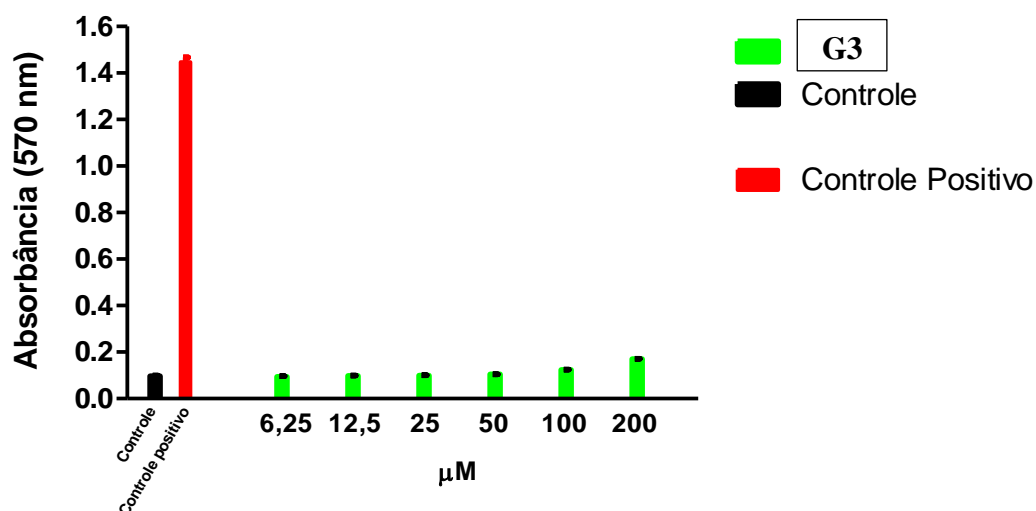


Gráfico 4. Absorbância *versus* concentração comparando substância **G3**, controle e controle positivo.

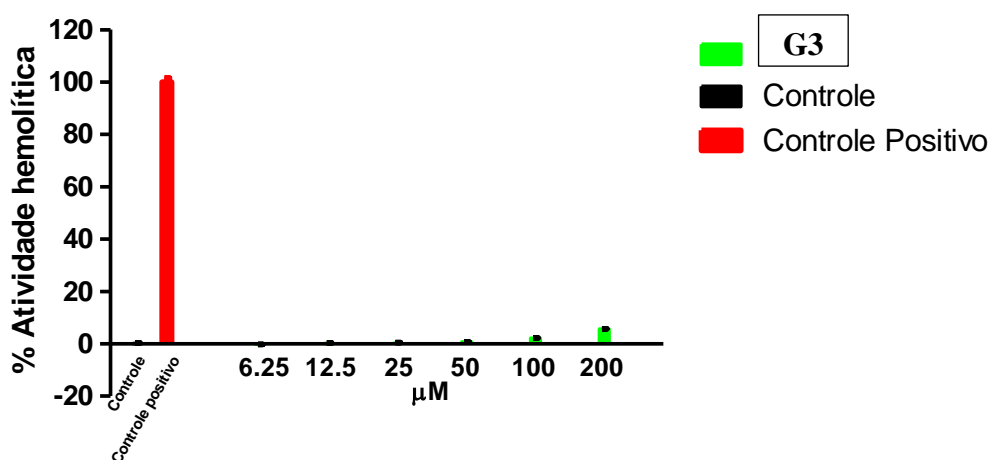


Gráfico 5. Porcentagem da atividade hemolítica *versus* concentração da substância **G3**, controle e controle positivo.

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi realizada a síntese e purificação dos análogos da 4-*O*-geranilsoliquiritigenina. Sintetizamos e purificamos a 4-*O*-geranilsoliquiritigenina e na última etapa, da reação da desproteção em meio ácido, ocorreu a perda da subunidade geranílica, obtendo-se o produto denominado isoliquiritigenina.

Para os análogos da série I, três análogos mostraram-se puros (**G2**, **G3** e **G5**), de acordo com a análise de RMN de ^1H e ^{13}C , com 35% e 97% e 42% de rendimento, respectivamente. Os **G4**, **G6** e **G7** foram realizadas diversas tentativas no processo de purificação, utilizando diferentes métodos de recristalização e cromatográficos, contudo, não conseguiu-se realizar a caracterização estrutural. Todos os análogos da série I, de acordo com a literatura são inéditos.

Dos análogos planejados para a série II, as substâncias **G8** e **G9** foram confirmadas por RMN de ^1H e ^{13}C , com rendimentos de 80% e 60% respectivamente. Para a substância **G10**, ocorreu o mesmo do que para a 4-*O*-geranilisoliquiritigenina, a perda da isoprenila.

A 4'-hidroxi-4-*O*-geranilchalcona foi selecionada para enviar para ensaios biológicos, visto que, sua síntese e purificação foram executadas de modo satisfatório e com um rendimento de 97%, sendo apenas 2 etapas de síntese. A 4'-hidroxi-4-*O*-geranilchalcona apresentou atividade para forma tripomastigotas, sendo 2 vezes mais potente que o fármaco de referência. Para forma amastigota apresentou atividade quando comparado ao fármaco de referência. Apesar de apresentar citotoxicidade quando comparada ao fármaco de referência, em baixas concentrações não promoveu hemólise. Além disso obtivemos dados *in silico* excelentes como por exemplo a G1 sendo um bom candidato por via oral devido apresentar alta absorção gastrointestinal, não foi previsto p nenhum alerta para um comportamento PAINS e conforme observado no radar de biodisponibilidade o composto apresentou valores aceitáveis para todos os parâmetros como flexibilidade, insolubilidade, insaturação, polaridade, tamanho e lipofilicidade.

Obtivemos um composto inédito na literatura e com atividade para as formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADADE, C. M.; CARVALHO, A. L. O.; THOMAZ, M. A.; COSTA, T. F. R.; GODINHO, J. L.; MELO, P. A.; LIMA, A. P. C. A.; RODRIGUES, J. C. F. ZINGALI, R. B. SOUTO-PADRÓN, T. Crovirin, uma proteína secretora rica em cisteína de veneno de cobra (CRISP) com atividade promissora contra tripanossomas e leishmania. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 8, n. 10, 2014.

AGUILAR, M. C. P; ALARCÓN, M; ARAUJO S; GONCALVES, L. Efecto de la Infección Congénita por Trypanosoma cruzi sobre el Desarrollo Intrauterino y la Respuesta Inmune Fetal-Neonatal. *Revist. Investigación Clínica. Venezuela*, 2012, Ano 2, n. 5, p. 190-204

ÁLVAREZ, J.M.; FONSECA, R.; BORGES DA SILVA, H .; MARINHO, C. R. F.; BORTOLUCI, K.R.; SARDINHA, L. R .; EPIPHANIO, S . D'IMPERIO LIMA, doença de M. R. Chagas: Ainda muitos problemas não resolvidos, **Hindawi Publishing Corporation**, 2014.

ALHASSAN, A.M.; *et al.*, "Prenylation of Aromatic Secondary Metabolites: A New Frontier for Development of Novel Drugs". *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2014. 13(2), 307-314

AMARAL, M., de Sousa, F.S., Silva, T.A.C. et al. A semi-synthetic neolignan derivative from dihydrodieugenol B selectively affects the bioenergetic system of *Leishmania infantum* and inhibits cell division. *Sci Rep* 9, 6114, 2019

ANDREWS, K. T.; FISHER, G.; SKINNER-ADAMS, T. S. Reaproveitamento de drogas e doenças de protozoários parasitas humanos, Elsevier Ltd, 2014.

BENVENUTI, L. A. et al. An autopsy-based study of *Trypanosoma cruzi* persistence in organs of chronic chagasic patients and its relevance for transplantation. *Transplant Infectious Disease*, v. 19, n. 6, p. e12783, 2017.

BORGES-ARGÁEZ, R .; VELA-CATZÍN, T .; YAM-PUC, A.; CHAN-BACAB, M. J.; MOO-PUC, R.E.; CÁCERES-FARFÁN, M. Estudos antiprotozoários e citotóxicos em alguns derivados de isocordoína. *Planta Medica*, [s. l.], v. 75, n. 12, pág. 1336–1338, 2009.

BOUCHER et al. Protocolo de extração líquido-líquido para a remoção de aldeídos e Cetonas Altamente Reativas de Misturas. *Organic Process Research & Development*. 7, 21, 1394–1403, 2017

CARNEIRO JNP. et al. Avaliação da atividade tripanocida, leishmanicida e citotóxica do geraniol e citronelal. *Cad Cult Cienc*. 2015; 13(2):29-36

CDC. **African Trypanosomiasis**. 2019. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/sleepingsickness/index.html>>. acesso em: 8/06/2021.

CAEIRO, Lucas D. et al. The protein family TcTASV-C is a novel *Trypanosoma cruzi* virulence factor secreted in extracellular vesicles by trypomastigotes and highly expressed in bloodstream forms. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 12, p. e0006475, 2018.

CHANG K-P, Nacy CA, Pearson RD. Intracellular parasitism of macrophages in leishmaniasis: in vitro systems and their applications. *Methods Enzymol*. 1986; 132: 603-626

CHIEFFI PP, Amato Neto V. Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *Trypanosoma cruzi*. São Paulo: CLB Balieiro Editores; 2000.

CHEN, chen ; Fengqin Liu , Jingyang Zhao , Tao Chen , Yulin Li ; Dejun Zhang. Separação eficiente de cinco flavonóides de *Oxytropis falcata* Bunge por cromatografia em contracorrente de alta velocidade e sua atividade anticâncer, v. 32, ed. 3, pág 189-193, 2019.

CHOCAIR PR, Sabbaga E, Amato Neto V, Shiroma M, Góes GM. Transplante de rim: nova modalidade de transmissão da doença de Chagas. Rev Inst Med Trop São Paulo 1981; 23:280-292

COURA, J. R. Os principais cenários da transmissão da doença de Chagas. Os vetores, sangue e transmissões orais - Uma revisão abrangente. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, [s. l.], v. 110, n. 3, pág. 277-282, 2014.

DAINA A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. Sci Rep. 2017 Mar 3; 7:42717. doi: 10.1038/srep42717. PMID: 28256516; PMCID: PMC5335600

DE SOUZA, W. **DOENÇAS NEGLIGENCIADAS**. [s.l: s.n.], 2010

DIAS JCP, Amato Neto V. Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 2011;44 supl 2:68-72

DIAS JCP, Macêdo VO. Doença de Chagas 2005. In: Coura JR, editor. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p. 557-594

DÍAZ DE TORANZO, E.G .; CASTRO, J. A.; FRANKE DE CAZZULO, B. M.; CAZZULO, J. J. Interação de metabólitos reativos de benzimidazol com DNA nuclear e cinetoplástico, proteínas e lipídios de *Trypanosoma cruzi*. Experientia, [s. l.], v. 44, n. 10, pág. 880–881, 1988.

DIÁRIO DE SAÚDE, 2019. Doenças negligenciadas continuam esquecidas pela indústria. Disponível em: <(diariodasaude.com.br)> Acesso em: 08 de jun. de 2021.

DNDi. 2018. Disponível em <https://dndi.org/wp-content/uploads/2018/09/DNDi_inovacao-e-acesso-para-populacoes-negligenciadas.pdf> Acesso em: 12 de janeiro de 2021

ERMONDI, G., VALLARO, M., & CARON, G. Degradability early developability assessment: face-to-face with molecular properties. **Drug discovery today**, 25(9), 1585-1591 – 2020.

EPIFANO, F.; *et al.*, "Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites". *Phytochemistry*. 2007, 68, 939-953

ESPINOZA-HICKS, J.C.; CHACÓN-VARGAS, K. F.; HERNÁNDEZ-RIVERA, J. L.; NOGUEDA-TORRES, B.; TAMARIZ, J .; SÁNCHEZ-TORRES, L.E.; CAMACHO-DÁVILA, A. Novas preniloxialconas como potenciais agentes leishmanicidas e tripanocidas: Desenho, síntese e avaliação. European Journal of Medicinal Chemistry, [s. l.], v. 167, p. 402–413, 2019.

FERREIRA, A.W.; ÁVILA, S. do L. M. De. Diagnóstico laboratorial. Avaliação de métodos de diagnóstico das doenças infecciosas, parasitárias e autoimunes. Correlação clínico-laboratorial. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, [s. l.], v. 38, n. 4, pág. 264-264, 1996.

FERREIRA, R. T. et al. Trends on acute Chagas' disease transmitted by oral route in Brazil: Steady increase in new cases and a concealed residual fluctuation *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, p. 190-195, Mar-Apr, 2016.

FRANCISCO, A. F.; LEWIS, M. D.; JAYAWARDHANA, S.; TAYLOR, M. C.; CHATELAIN, E.; KELLY, J. M. Capacidade limitada de posaconazol para curar infecções por *Trypanosoma cruzi* agudas e crônicas reveladas por imagens altamente sensíveis in vivo. *Agentes Antimicrobianos e Quimioterapia*, [s. l.], v. 59, n. 8, pág. 4653–4661, 2015.

FIOCRUZ, 2017. Disponível em: <<https://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7as-negligenciadas>> Acesso em: 12 de janeiro de 2021.

FRIIS-MØLLER, A.; CHEN, M.; FUURSTED, K.; CHRISTENSEN, S. B.; KHARAZMI, A. Atividade antimicobacteriana e antilegionella in vitro de licochalcona A de raízes de alcaçuz chinês. *Planta Médica*, [s. l.], v. 68, n. 5, pág. 416–419, 2002.

FUMAGALI, E et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy* 18(4): 627-641, out./dez. 2008

HEINEN, Maria.AM: Consumo de açaí pode ser a causa de infecção por doença de Chagas. *Radioagência Nacional*, Brasília, 12 de abril de 2021. Disponível em: < AM: Consumo de açaí pode ser a causa de infecção por doença de Chagas | *Radioagência Nacional* (ebc.com.br)>

IZUMI, E et al. Natural products and Chagas' disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. *Nat.Prod.Rep.*, 2011,28, 809

KEENAN, M.; CHAPLIN, J. H. Uma nova era para a descoberta de medicamentos para a doença de Chagas? In: *Progress in Medicinal Chemistry*. [s.l.]: Elsevier B.V., 2015. v. 54p. 185–230.

LOVERING, F., BIKKER, J., HUMBLET, C. Escape from flatland: increasing saturation as an approach to improving clinical success. *Journal of medicinal chemistry*, v. 52, n. 21, p. 6752-6756, 2009.

MACAEV, F .; BOLDESCU, V .; POGREBNOI, S .; DUCA, G. Chalcone Scaffold based Antimycobacterial Agents. *Agentes Antimicobacterianos à Base de Andaimos de Chalcone*. *Química médica*, [s. l.], v. 4, n. 6, pág. 487-493, 2014.

Ministério da Saúde (BRASIL). Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença de Chagas: 14 de abril – Dia Mundial. *Bol Epidemiol* [Internet]. 2020 abr [data da citação]; 51(n.esp.):1-43. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>

Ministério da Saúde (BRASIL). Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença de Chagas: 14 de abril – Dia Mundial. *Bol Epidemiol* [Internet]. 2021 abr [data da citação]; Ano 2, 1-36. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>

MOLINA I, Salvador F, Sánchez-Montalvá A. The use of posaconazole against Chagas disease. *Curr Opin Infect Dis*. 2015 Oct;28(5):397-407.

MORRILLO, A. Carlos et al. Benznidazol e Posaconazol na Eliminação de Parasitas em Portadores Assintomáticos de T. Cruzi. *Journal of the American College of Cardiology* vol. 69, n. 8, 2017.

MUSA M Aliyu, ABDULHAHI Mubarak, ALIYU A Babando, YARO Ah. Chalcona bioativa da *Indigofera pulchra*. *Journal of Medicinal Plants* v. 5 (22), p. 5444-5449, 2011

MEIS, J. de.; CASTRO, R. S. da S. Manual para diagnóstico em doença de Chagas para microscopistas de base no estado do Pará. 2017. Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/wpcontent/uploads/2018/08/02-Manual-de-RESBAM: Rev.Ens.Saúd.Biot.Am. | http://periodicos.ufam.edu.br/resbam ISSN: 2675-4525 | Coari, AM | v. 3 | n. 1 | p. 28-45 | ago. 2021 44 SILVA e ALVES Doenças tropicais negligenciadas sob a perspectiva de graduandos de um curso de Ciências Biológicas a distância Chagas-Diagramado.pdf>. Acesso em: 26 jan. 2021.

MSF. Doença de Chagas. Disponível em: <<https://www.msf.org.br/o-que-fazemos/atividades-medicas/doenca-de-chagas>>. Acesso em: 01 de novembro de 2021.

Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J Nat Prod.* 2020 Mar 27;83(3):770-803. doi: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285. Epub 2020 Mar 12. PMID: 32162523.

NIJVELDT, R. J. et al. Flavonoids : a review of probable mechanism of action and potential applications. *The American journal of clinical nutrition*, v. 74, n. 4, p. 418–425, 2001.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, England, v. 267, n. 17, p 5421-6, sep.2000.

OPAS, 2021. **Organização Pan- Americana da Saúde**. 70% das pessoas que estão infectadas não sabem que estão infectadas. Disponível em: <OPAS: 70% das pessoas com Chagas não sabem que estão infectadas - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde (paho.org)> Acesso em: 08 de jun de 2021.

PATTERSON, S.; WYLLIE, S. Nitro drogas para o tratamento de doenças tripanossomáticas: Past, present, and future prospects, Elsevier Ltd, 2014.

PEREIRA, K. S. et al. Chagas' Disease as a foodborne illness. *Journal of Food Protection*, v. 72, n. 2, p. 441-446, 2009

PEREZ, C. J.; LYMBERY, A. J.; THOMPSON, R. C. A. Reactivation of Chagas Disease: Implications for Global Health. *Trends in Parasitology*, v. 31, p. 595 – 603, 2015.

PÉREZ-MOLINA JA, MOLINA I. Chagas disease. *Lancet.* 2018 Jan 6;391(10115):82-94. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31612-4. Epub 2017 Jun 30. PMID: 28673423.

PERRIN, C. L; CHANG, K.L. O mecanismo completo de uma condensação aldólica. *J. Org.Chem.* v. 81, pág. 5631 a 35 de 2016.

PICCIRILLO, E., AMARAL, A. T. Busca virtual de compostos bioativos: conceitos e

aplicações. *Química Nova*, v. 41, p. 662-677, 2018

PRICE, E., KALVASS, J. C., DEGOEY, D., HOSMANE, B., DOKTOR, S. and DESINO, K. Análise global de modelos para prever a absorção humana: QSAR, modelos in vitro e pré-clínicos. *Journal of Medicinal Chemistry* 64 (13), 9389-9403 – 2021

PITA SSR, Pascutti G.P. Alvos terapêuticos na doença de Chagas: a Tripanotona Redutase como Foco. *Rev Virtual Quim.* 2011; 3(4):307-324

RASSI Júnior A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet.* 2010 Apr;375(9723):1388-402

REIMÃO JQ, Tempone AG. Investigation into in vitro anti-leishmanial combinations of calcium channel blockers and current anti-leishmanial drugs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011; 106: 1032-8.

RITCHIE, T. J., ERTL, P., LEWIS, R. The graphical representation of ADME-related molecule properties for medicinal chemists. **Drug Discovery Today**, vol. 16, n. 1-2, p. 65-72, 2011

RÓLON, M.; VEJA, C.; ESCARIO, J.A.; GÓMEZ-BARRIO, A. Development of rezazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitology Reserarch, Germany*, v. 99, n.2, p. 103-7. jul. 2006.

ROMANHA, A.J. ; ALVES, R.O. ; MURTA, S. M. F. ; SILVA, J. S. ; ROPERT, C. ; GAZZINELLI, R. T. Quimioterapia experimental contra infecção por *Trypanosoma cruzi*: Papel essencial do interferon- γ endógeno na mediação da cura parasitológica. *Journal of Infectious Diseases*, [s. l.], v. 186, n. 6, pág. 823–828, 2002.

SANTORO GF et al. Effect of oregano (*Origanu vulgare L.*) and thyme (*Thymus vulgaris L.*) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. *Parasitol Res.* 2007b ; 100:783-790.

SILVA, A. P. da, Andrade Júnior, F. P. de, & Dantas, B. B. (2019). Doença de Chagas: Perfil de morbidade hospitalar na Região do Nordeste brasileiro. *Revista de Ciências da Saúde Nova Esperança*, 17(3), 08–17.

SIMOES CMO. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento.* 5 ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 2000

SIMÕES, M. V., Romano, M. M. D., Schmidt, A., Martins, K. S. M. & Marin-Neto, J. A. Chagas Disease Cardiomyopathy. *Int. J. Cardiovasc. Sci.* 31, 173–189 (2018)

STANAWAY Jd, ROTH. G. **A carga da doença de Chagas: estimativas e desafios** *Glob. Coração*, 10 , pp. 139 – 144, 2015

SUGAMOTO, K. Synthesis and antibacterial activity of chalconas contendo grupos prenil ou geranil de *Angelica keiskei*. *Tetrahedron*, v. 67, pág. 5346–5359, 2011.

SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci. Rep.* (2017) 7:42717.

TADA H, Shiho O, Kuroshima K, Koyama M, Tsukamoto M. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Methods*. 1986; 93: 157-165

TANOWITZ HB, MACHADO FS, Spray DC, et al. Avanços no tratamento da cardiomiopatia chagásica. *Expert Rev Cardiovasc Ther* . 2015; 13 (12): 1393-1409. doi: 10.1586 / 14779072.2015.1103648

TEIXEIRA, D. E .; BENCHIMOL, M .; CREPALDI, P. H .; DE SOUZA, W. Multimídia interativa para ensinar o ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*, o agente causador da doença de Chagas. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, [s. l.], v. 6, n. 8, 2012.

TELLERIA, J .; TIBAYRENC, M. American Trypanosomiasis Chagas Disease - 2ª Edição. 6. ed. [s.l: s.n.].

TOSO M A, VIAL U F, GALANTI N. Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral [Oral transmission of Chagas' disease]. *Rev Med Chil*. 2011 Feb;139(2):258-66. Spanish. Epub 2011 Jul 11. PMID: 21773665.

URBINA J. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. *Acta Trop*, Elsevier BV. 2010; 115(1-2):55-59

VENKATESWARA, Rao. et al. Synthesis of (\pm) Abyssinone I and related compounds: Their anti-oxidant and cytotoxic activities. *Eur. J. Med. Chem.*, v. 44, nº 5, p.2239-2245, 2009

VANLERBERGHE, Veerle; VERDONCK, Kristien. La inequidad en salud: el caso del dengue. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 2013, 30.4: 683-686. Disponível em: < <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v30n4/a23v30n4.pdf>>. Acesso em: dezembro 2019.

VENTURELLI, S. et al. Chalconas preniladas e flavonóides para a prevenção e tratamento do câncer. *Nutrição*, v. 32, p. 1171-1178, 2016.

VOTÝPKA J, d'Avila-Levy CM, Grellier P, Maslov DA, Lukeš J, Yurchenko V. New Approaches to Systematics of Trypanosomatidae: Criteria for Taxonomic (Re)description. *Trends Parasitol*. 2015 Oct;31(10):460-469. doi: 10.1016/j.pt.2015.06.015. PMID: 26433249.

WALSH, J. S .; MIWA, G. T. Bioactivation of Drugs: Risk and Drug Design. *Revisão Anual de Farmacologia e Toxicologia*, [s. l.], v. 51, n. 1, pág. 145–167, 2011.

WANG, X., Wang, D., Huo, Y. *et al.* Identificação da isoliquiritigenina como ativador que estimula a produção enzimática do monoglucuronídeo do ácido glicirretínico. *Sci Rep* 7, 12503 (2017).

WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid biosynthesis. a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant physiology*, Am Soc Plant Biol, v. 126, n. 2, p. 485–493, 2001.

WILLIAMSON EJ. et al. Factors associated with COVID-19-related death using OpenSAFELY. *Nature*. [citado 2021 Abr 7]; 2020; 584, 430-436. Disponível em:

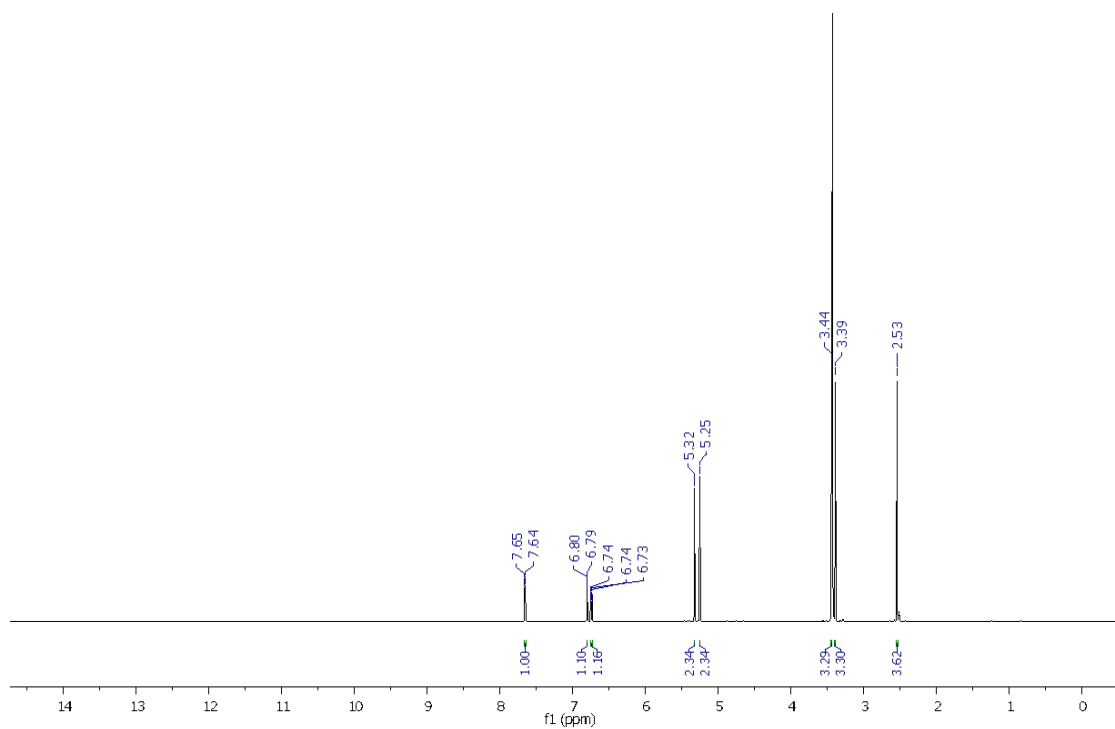
<https://bit.ly/3s4TF7m>

WHO. **Neglected tropical diseases.** 2018. Disponível em: <https://www.who.int/teams/control-of-neglected-tropical-diseases> acessado em: 10/06/2021.

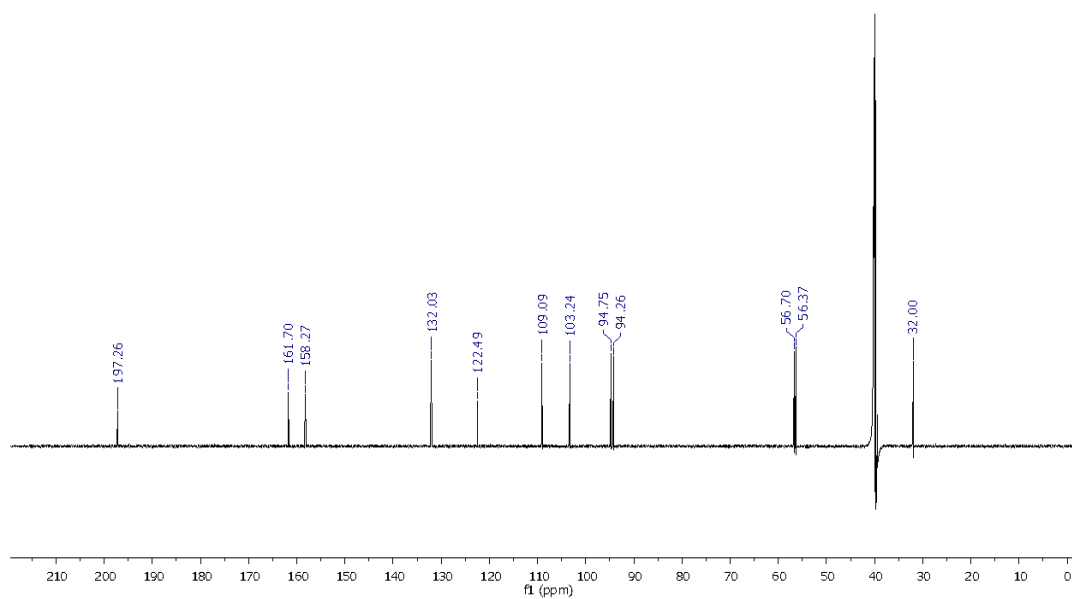
XUE, H., Li, J., XIE, H., & Wang, Y. (2018). Review of drug repositioning approaches and resources. *International Journal of Biological Sciences*, 14(10), 1232-1244. <https://doi.org/10.7150/ijbs.24612>.

ZAIDEL EJ. et al. COVID-19: Implications for People with Chagas Disease. *Global Heart*. 2020; 15(1): 69. Disponível em: <https://bit.ly/2OxLD9p>

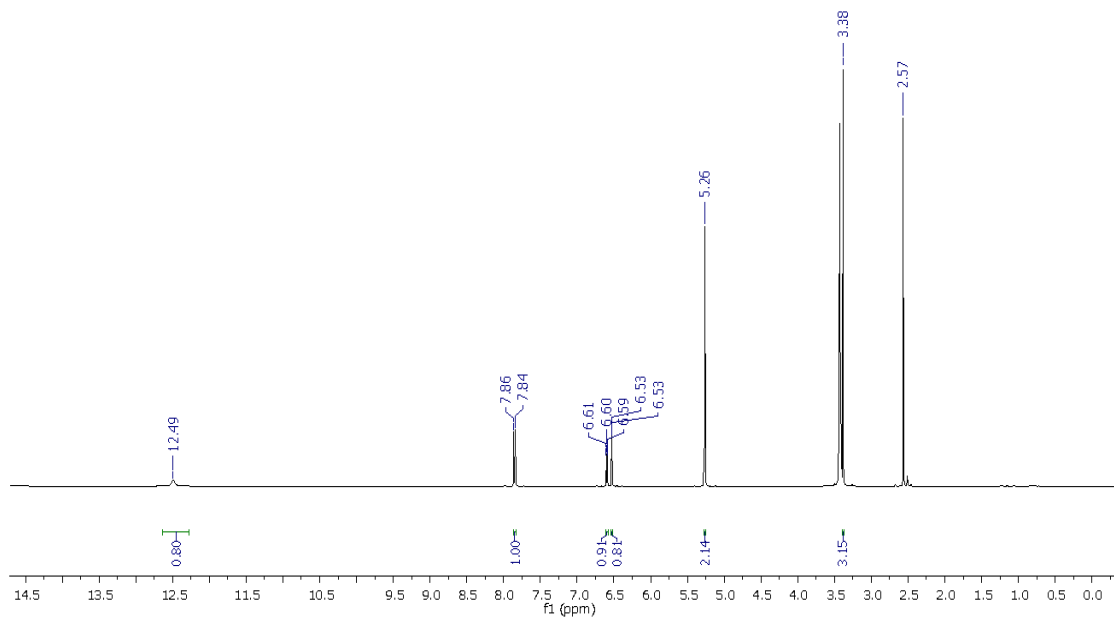
7. ANEXOS



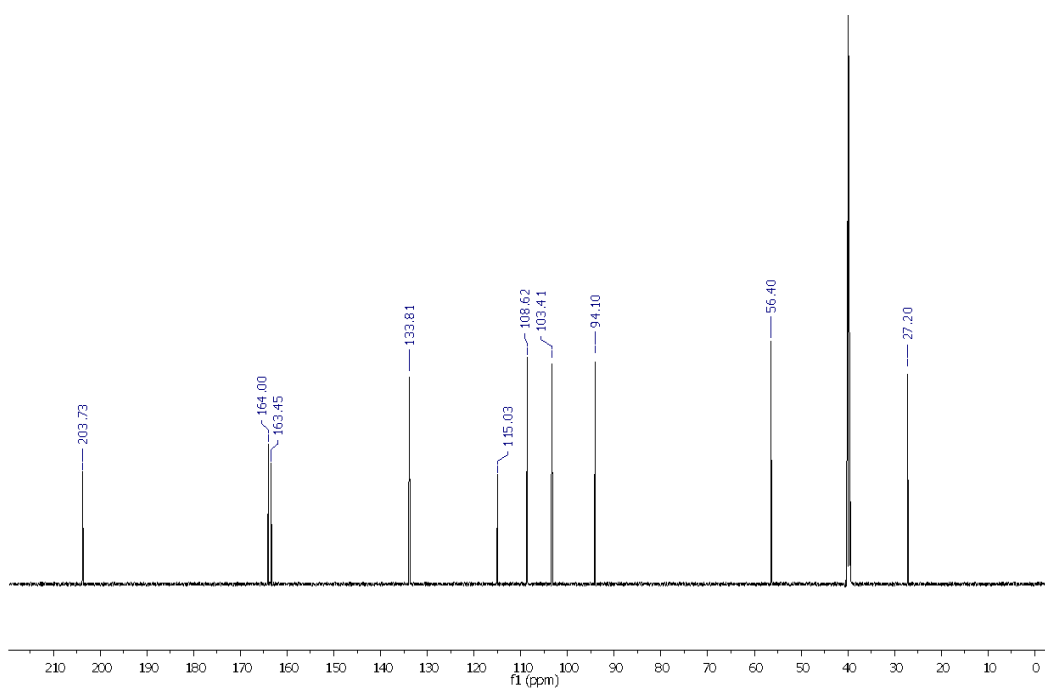
Anexo 1. Espectro de RMN de ¹H da 2,4 -bis(metoximetoxi)acetofenona (DMSO-*d*₆, 600 MHz)



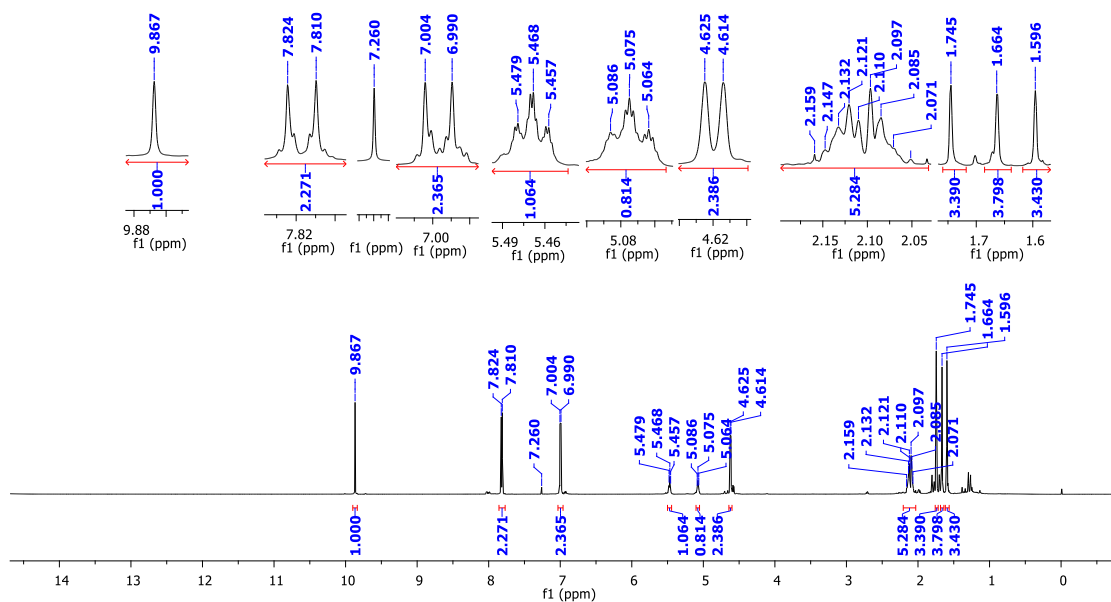
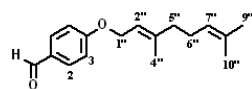
Anexo 2. Espectro de RMN de ¹³C da 2,4 -bis(metoximetoxi)acetofenona DMSO-*d*₆; 150 MHz)



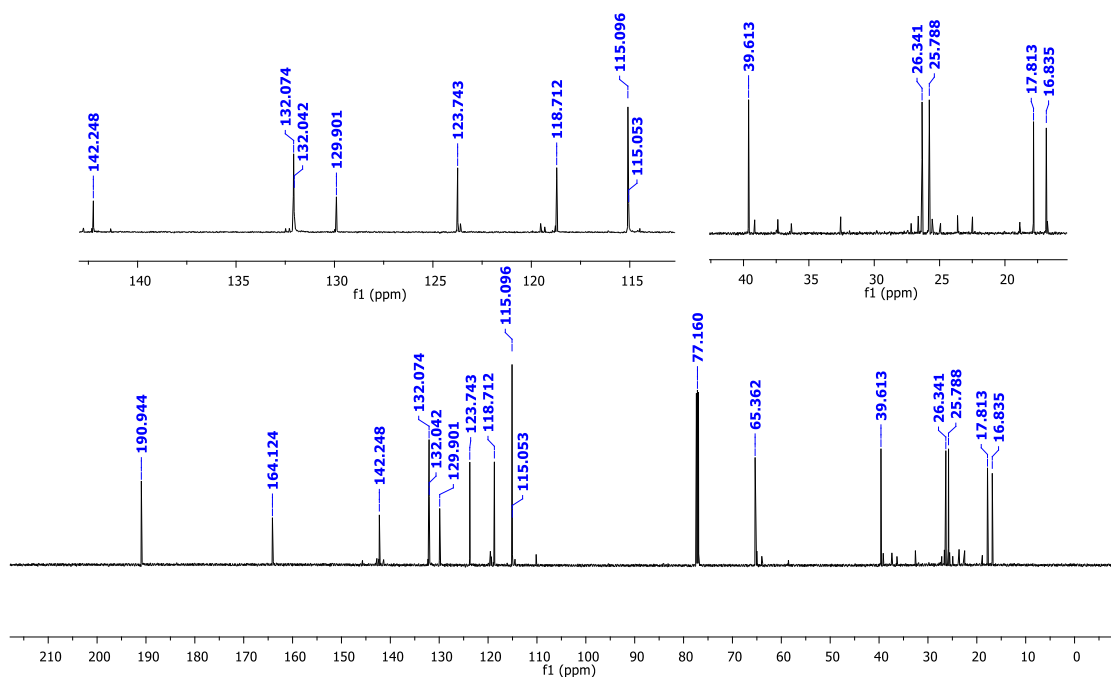
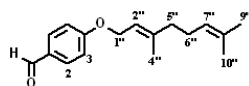
Anexo 3. Espectro de RMN de ¹H da 2 -hidroxi 4-metoximetoxiacetofenona (DMSO-*d*₆,600MHz)



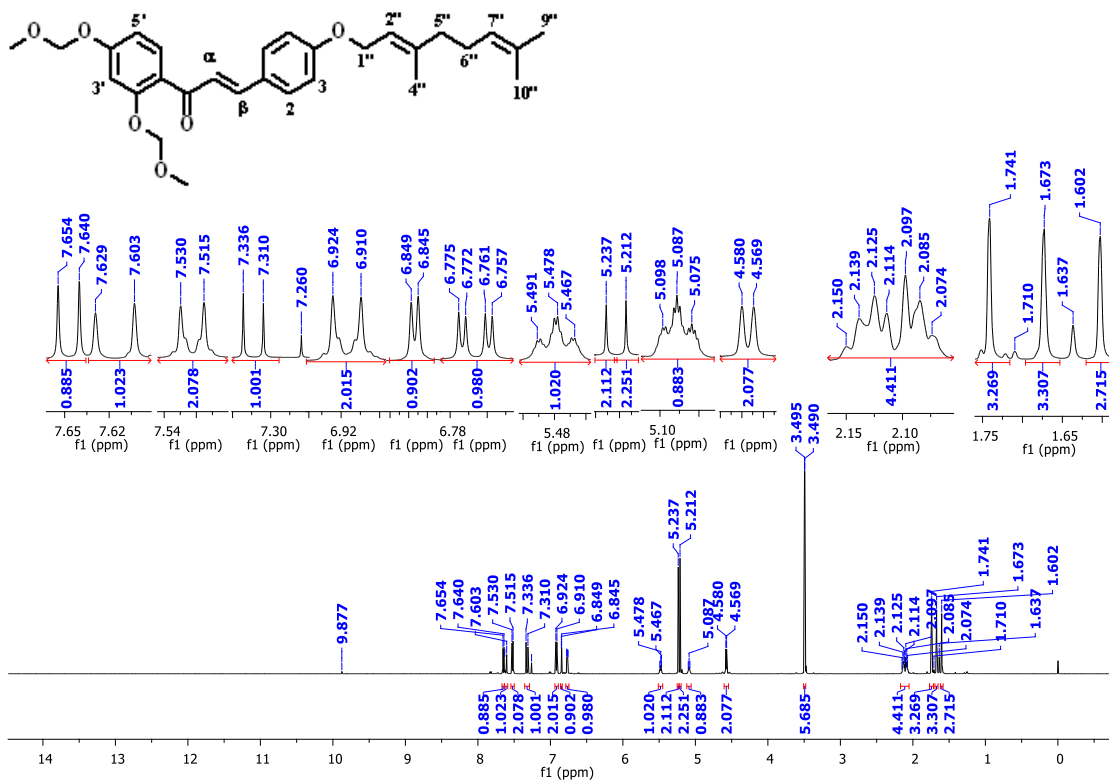
Anexo 4. Espectro de RMN de ¹³C da 2-hidroxi-4-metoximetoxiacetofenona (DMSO-*d*₆; 150 MHz)



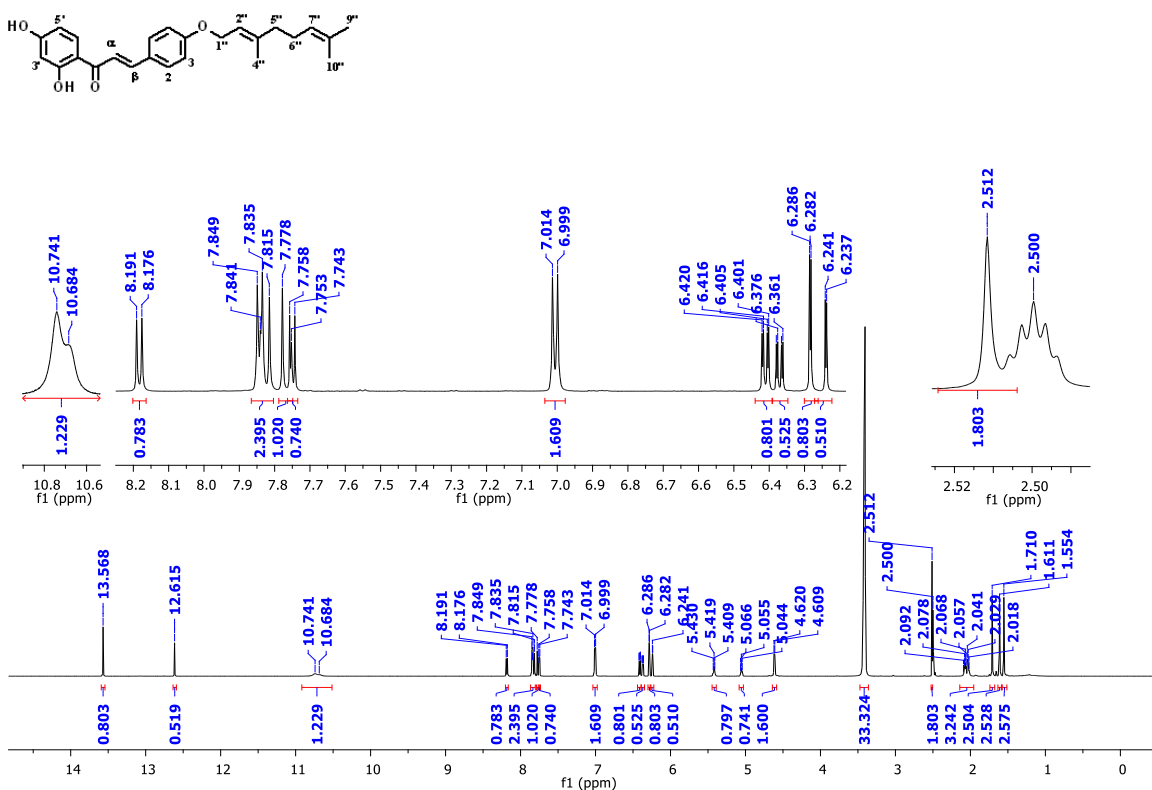
Anexo 5. Espectro de RMN de ^1H do 4-O-geraniilbenaldeído (CDCl_3 , 600 MHz)



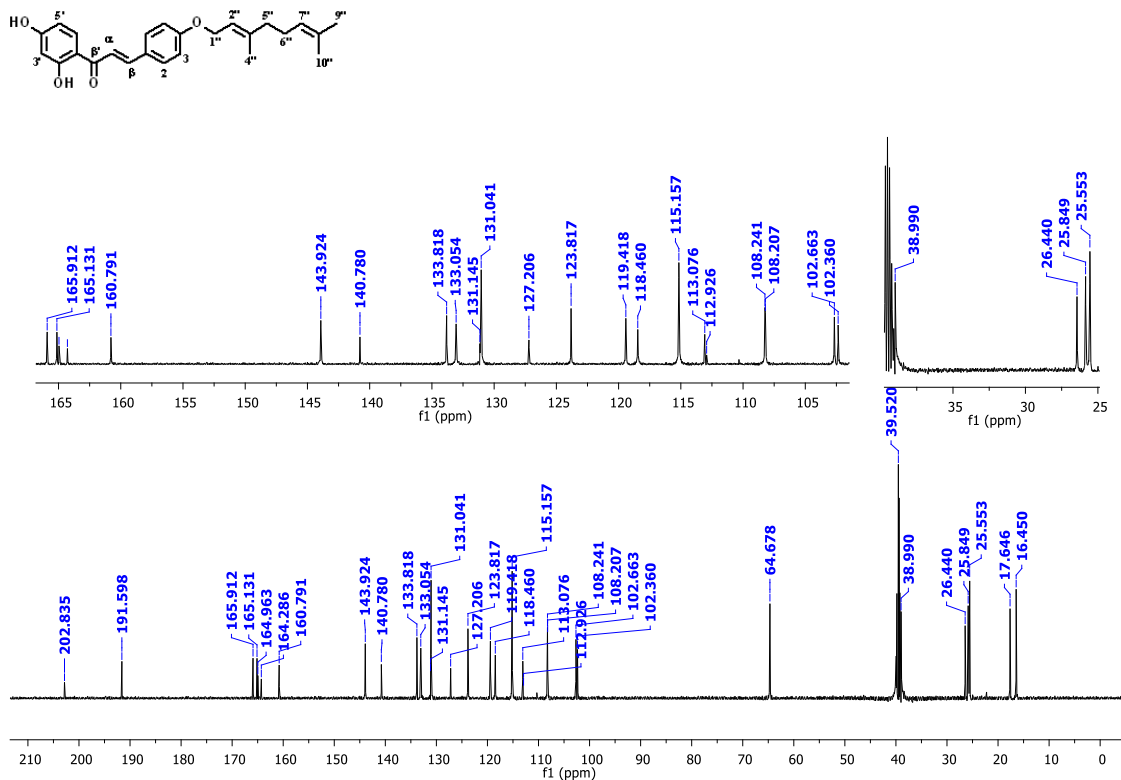
Anexo 6. Espectro de RMN de ^{13}C do 4-O-geraniilbenaldeído (CDCl_3 , 150 MHz).



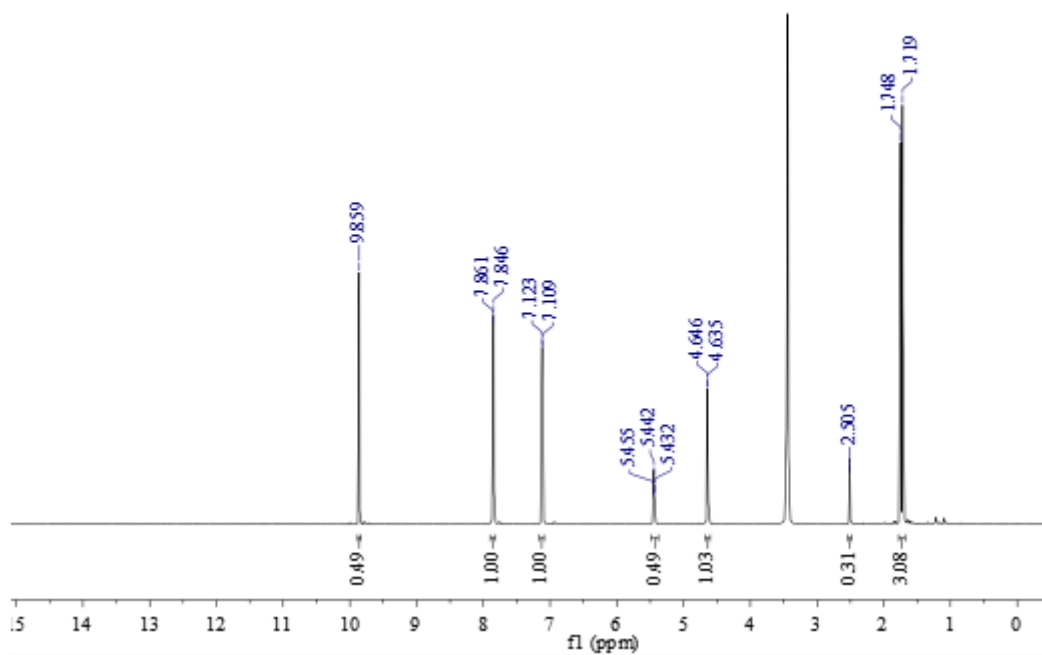
Anexo 7. Espectro de RMN de ¹H praticamente puro da substância **21** (DMSO-*d*₆, 600 MHz)



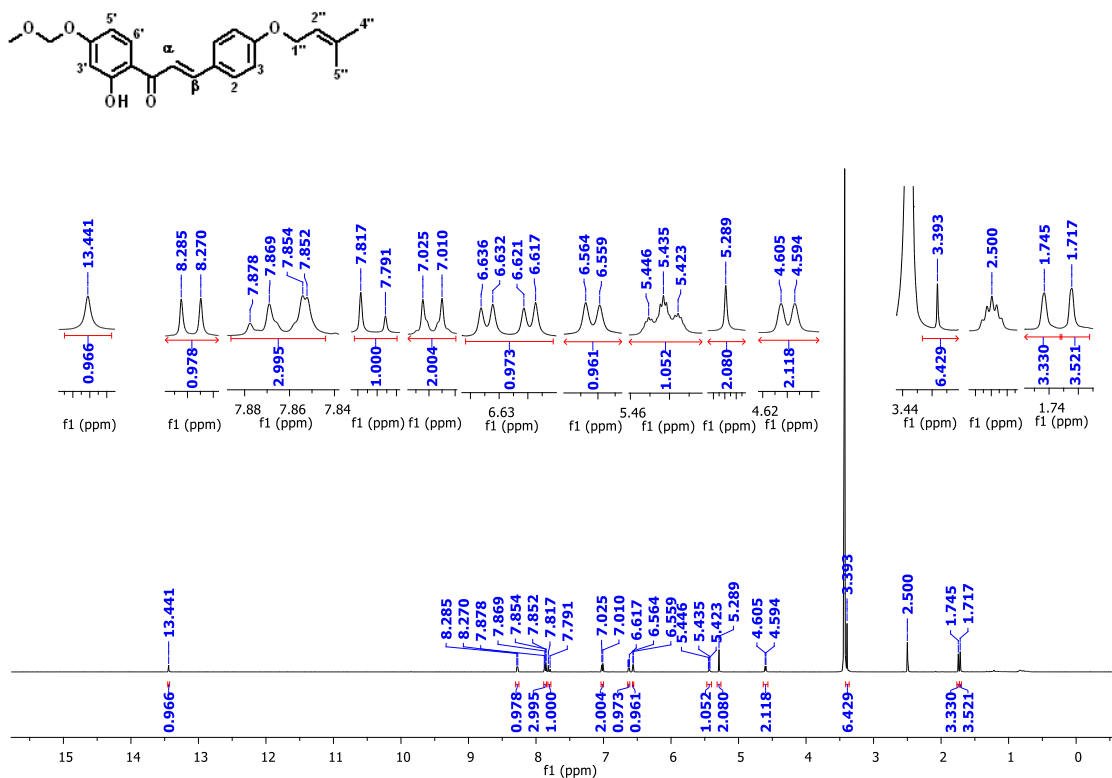
Anexo 8. Espectro de RMN de ¹H da 4-O-geranilisoliquiritigenina impura com 2-hidroxi-4-metoximetoxiacetofenona (DMSO-*d*₆, 600 MHz)



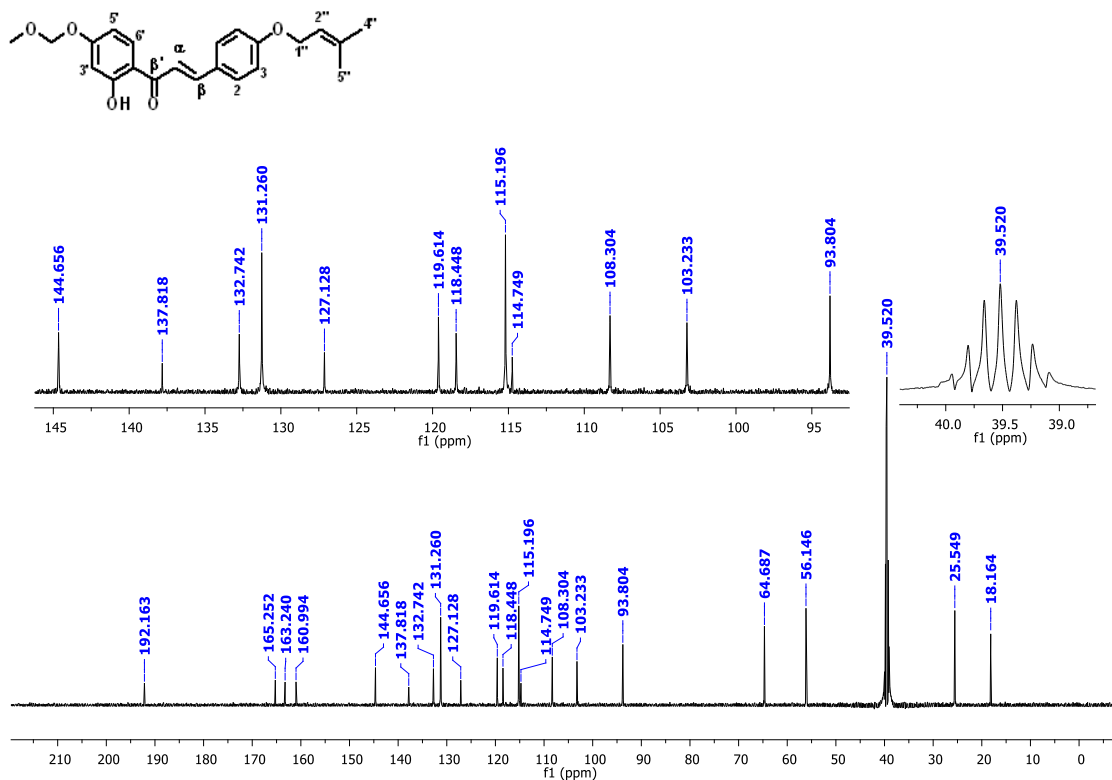
Anexo 9. Espectro de RMN de ¹³C da 4-*O*-geraniilsiquiritigenina impura com 2-hidroxi-4-metoximetoxiacetofenona (DMSO-*d*₆, 150 MHz)



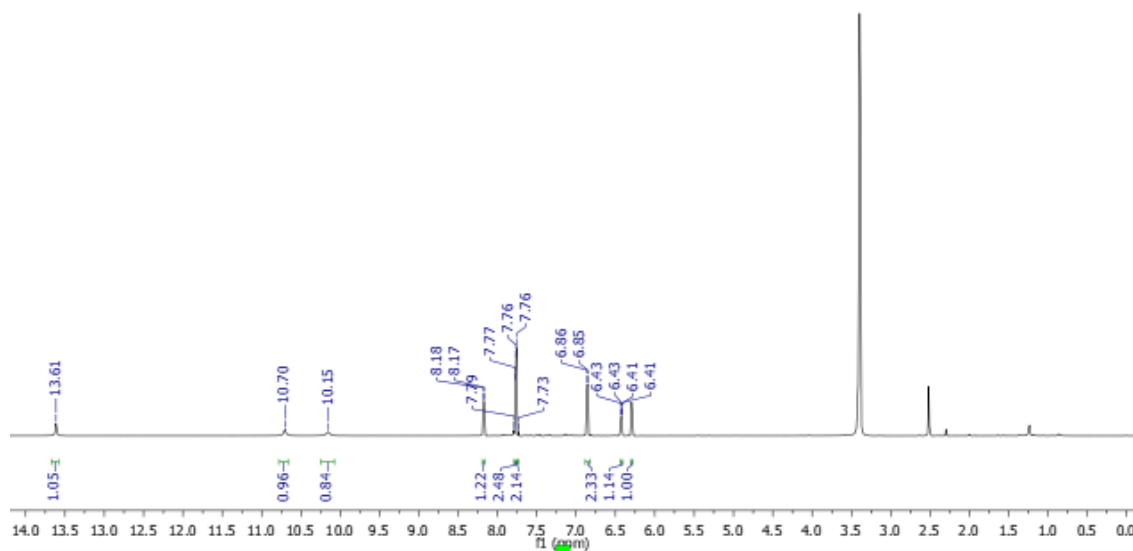
Anexo 10. Espectro de RMN de ¹H do 4-*O*-prenilbenzaléido (DMSO-*d*₆, 600 MHz)



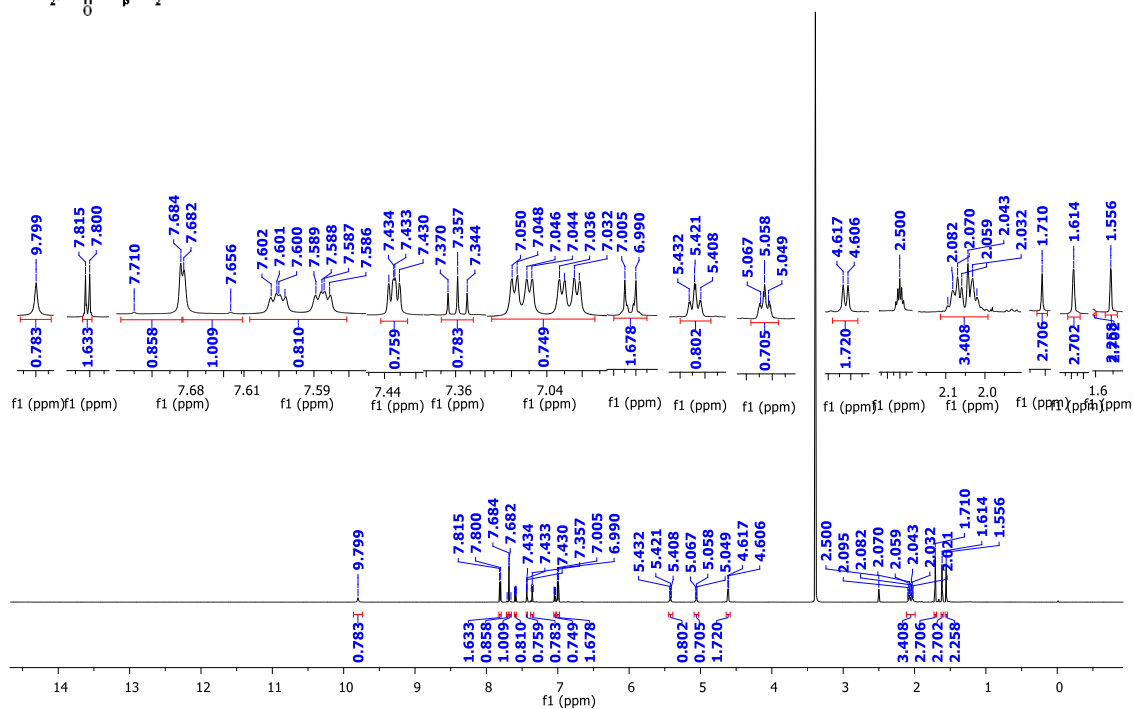
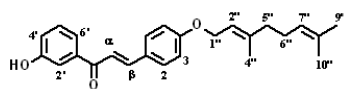
Anexo 11. Espectro de RMN de ¹H da substância 31 (DMSO-*d*₆, 600 MHz)



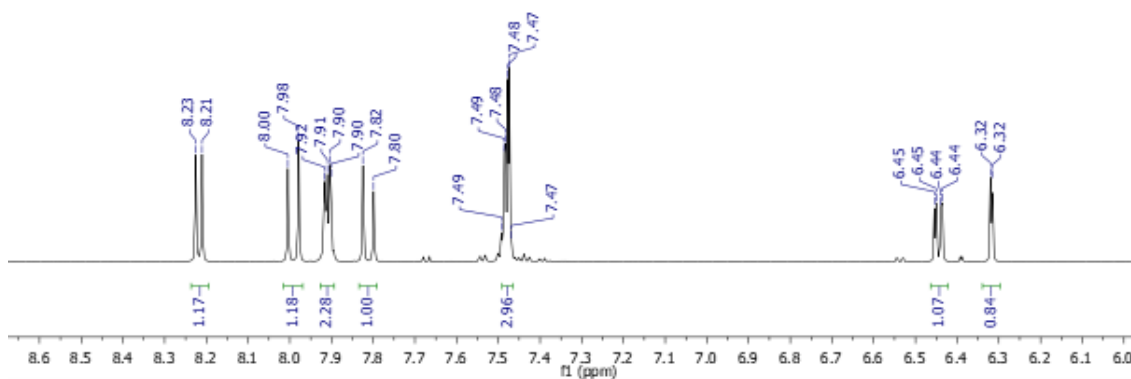
Anexo 12. Espectro de RMN de ¹³C da substância 31 (DMSO-*d*₆, 150 MHz)



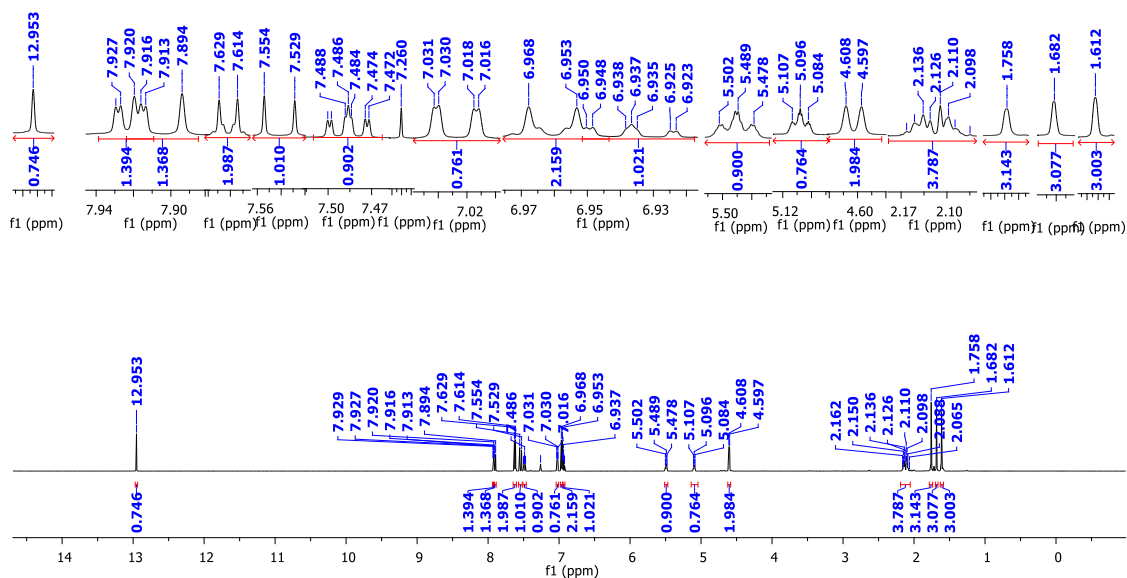
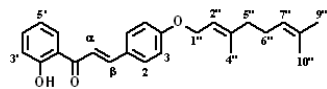
Anexo 13. Espectro de RMN de ^1H da isoliquiritigenina (DMSO- d_6 , 600MHz)



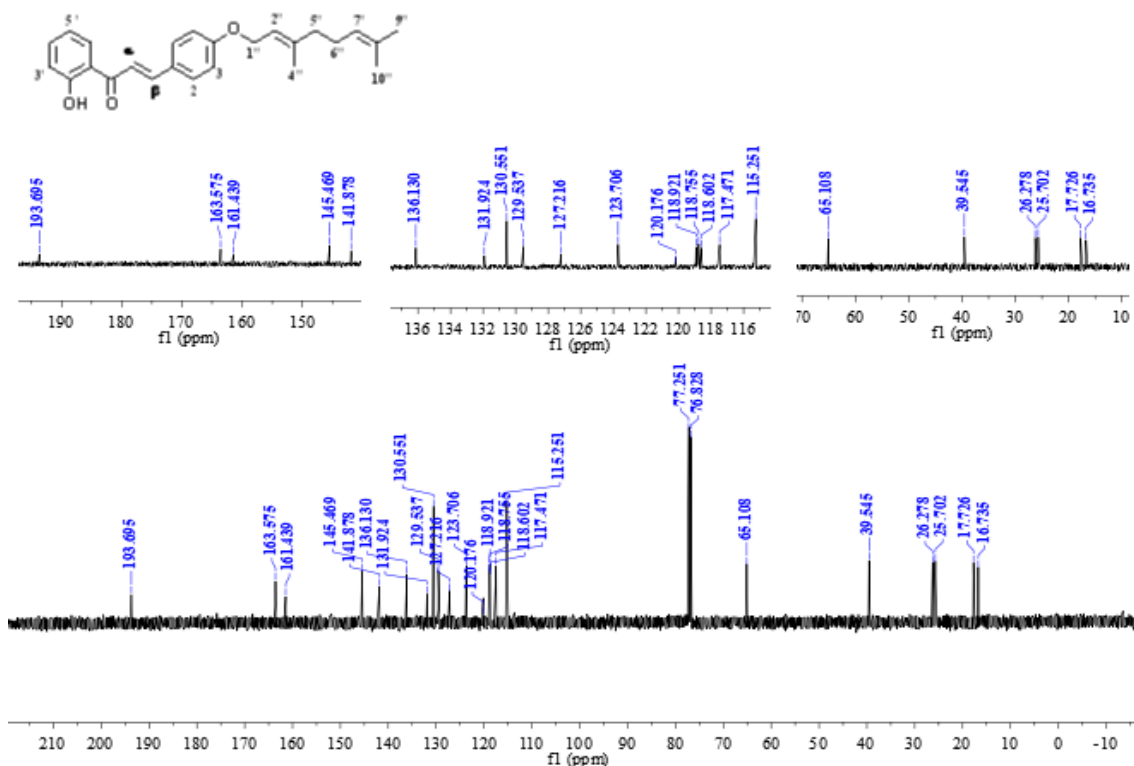
Anexo 14. Espectro de RMN de ^1H da substância G5 (DMSO- d_6 , 600MHz)



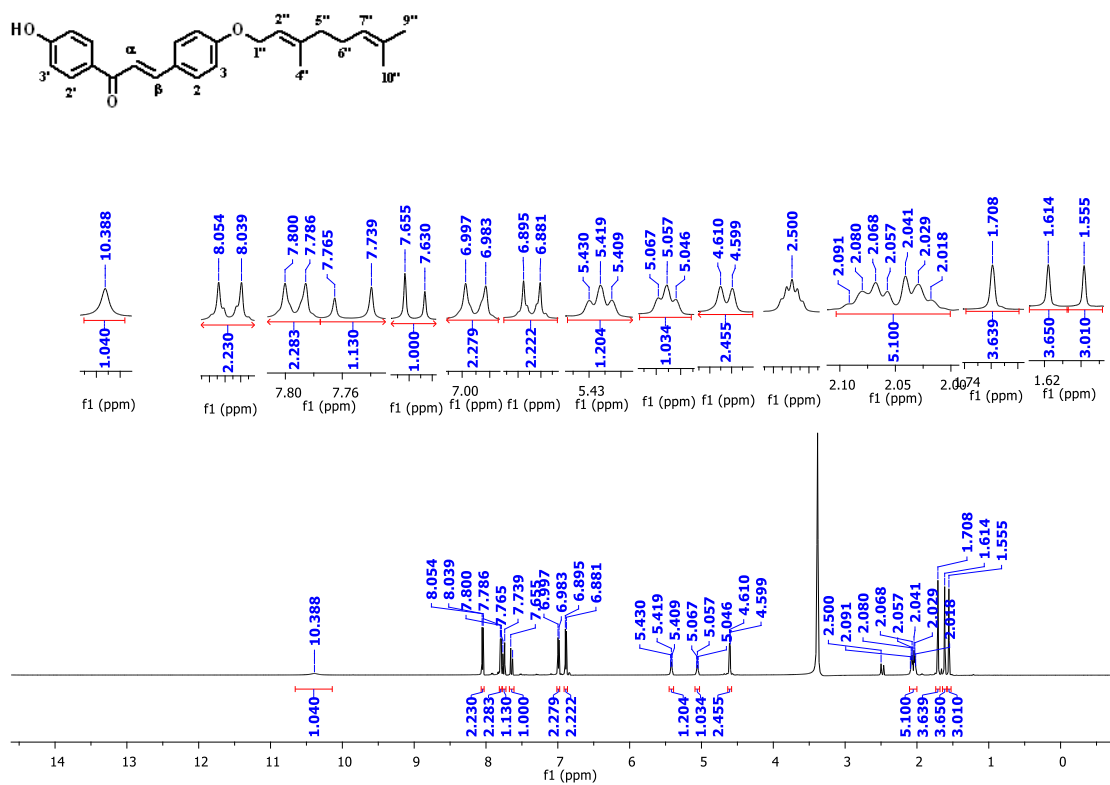
Anexo 15. Espectro de RMN de ¹H da 2',4'-dihidrochalcona (DMSO-*d*₆, 600 MHz)



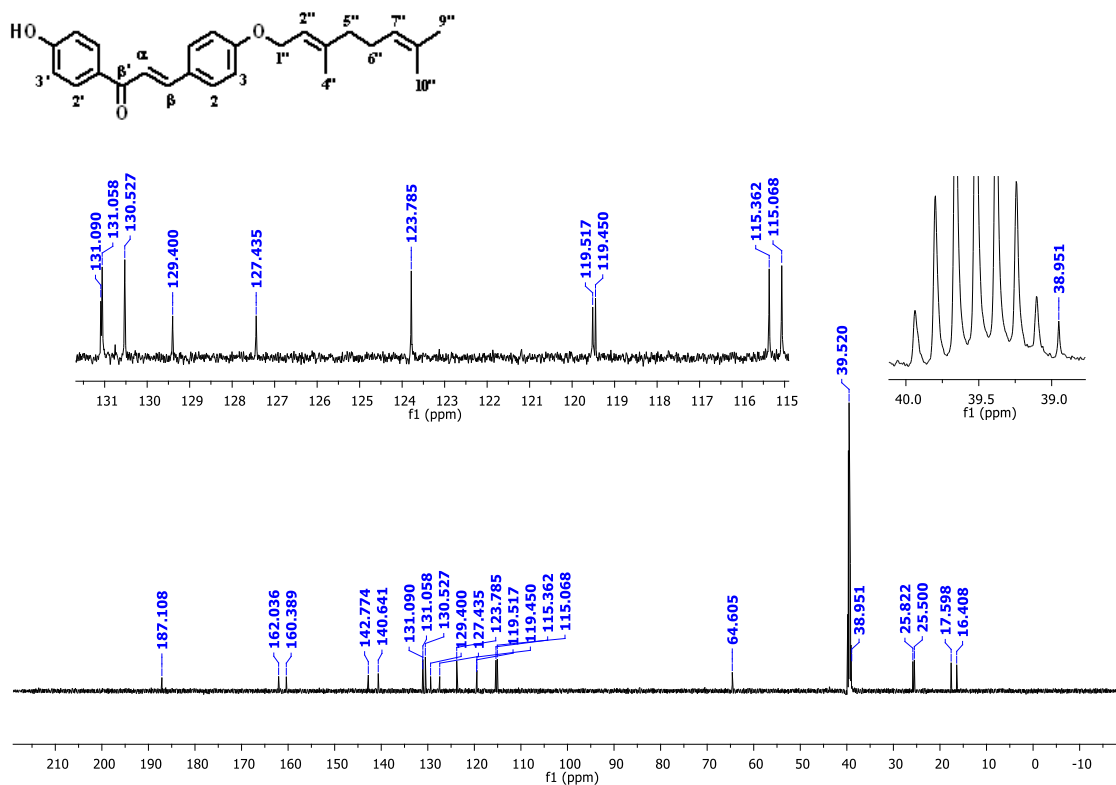
Anexo 16. Espectro de RMN de ¹H da substância G2 (DMSO-*d*₆, 600 MHz)



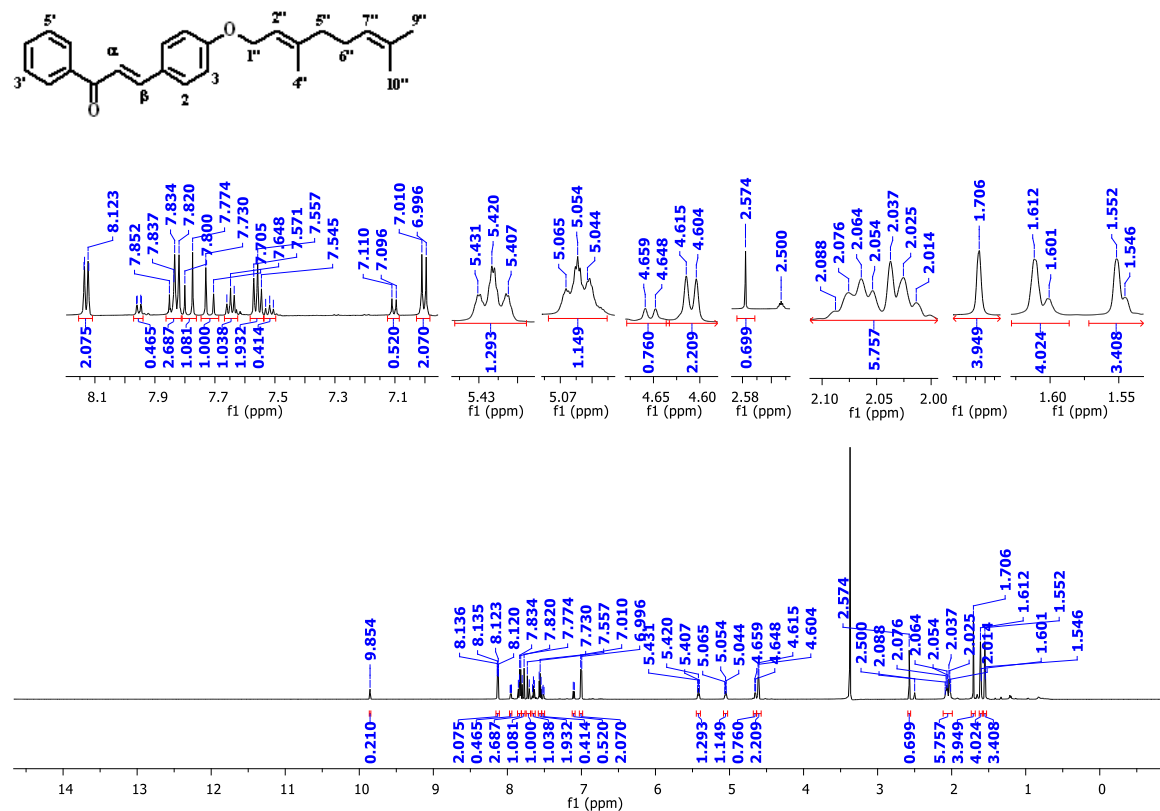
Anexo 17. Espectro de RMN de ¹³C da substância G2 (DMSO-*d*₆, 600 MHz)



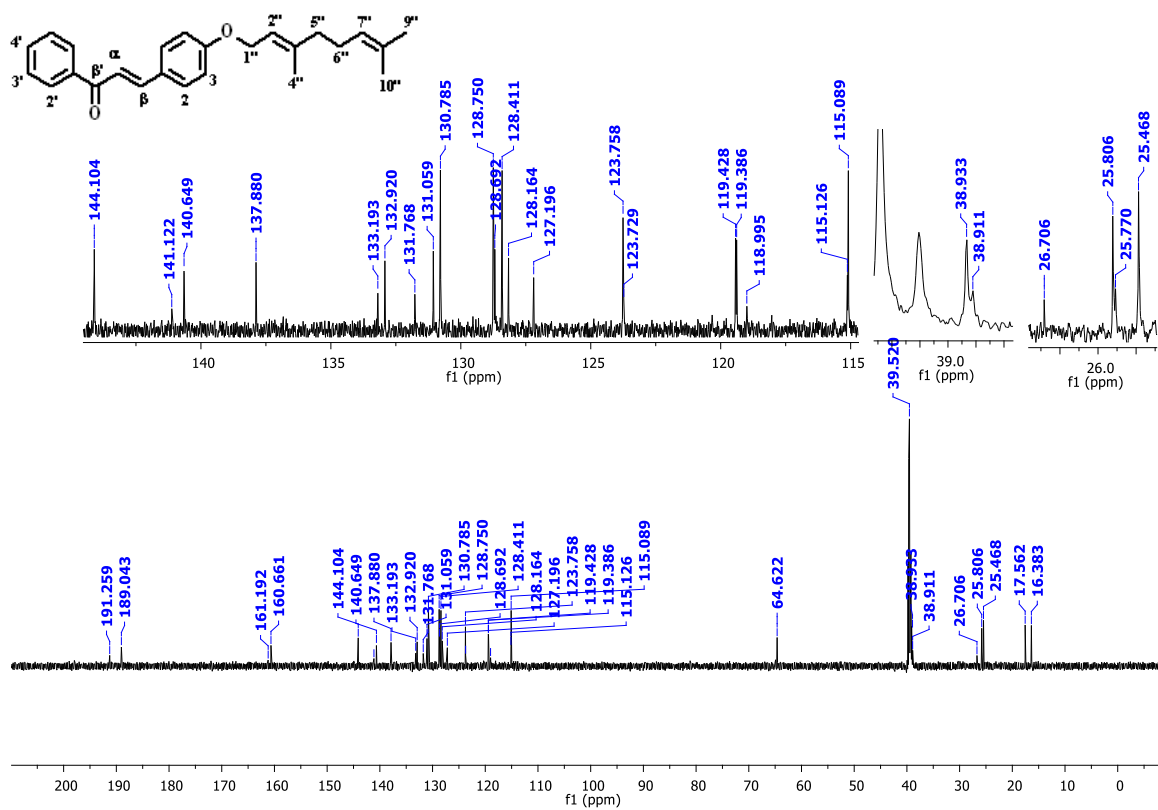
Anexo 18. Espectro de RMN de ¹H da substância G3 (DMSO-*d*₆, 600 MHz)



Anexo 19. Espectro de RMN de ^{13}C da G3 (DMSO- d_6 , 600 MHz)



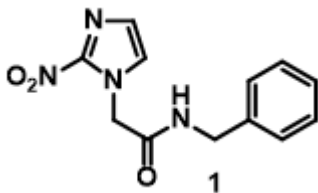
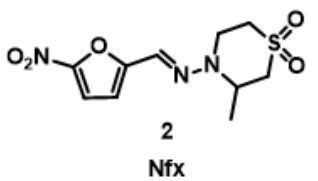
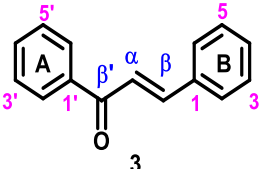
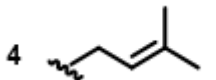
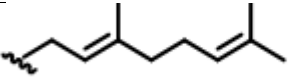
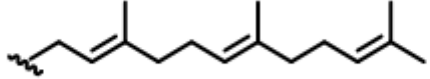
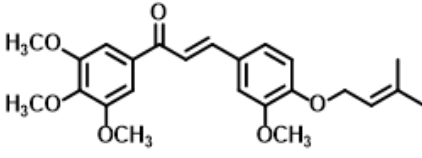
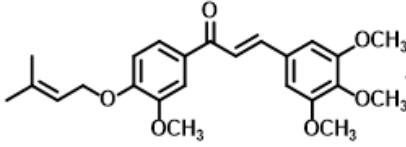
Anexo 20. Espectro de RMN ^1H da substância G4 impura (DMSO- d_6 , 600 MHz)

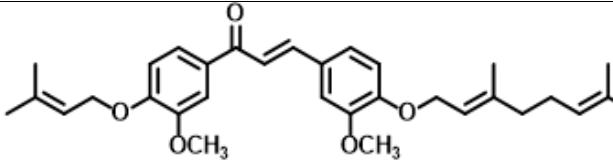
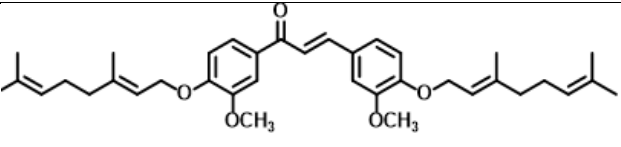

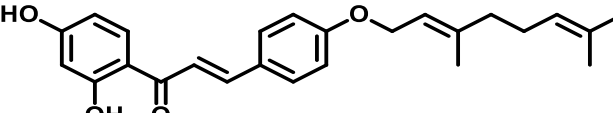
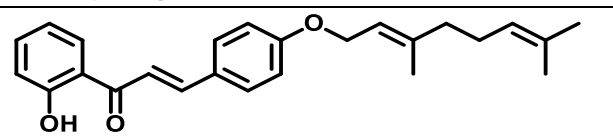
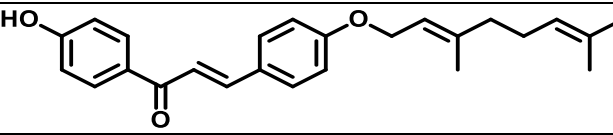
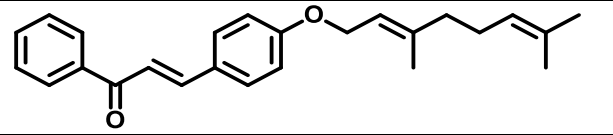
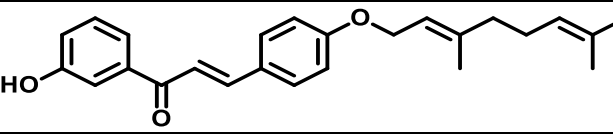
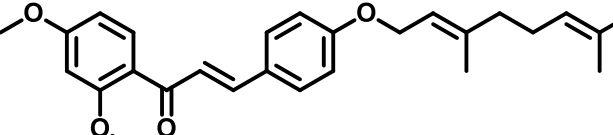
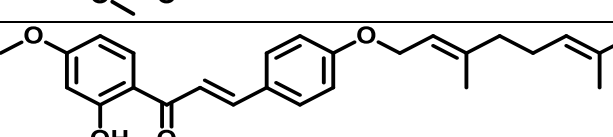
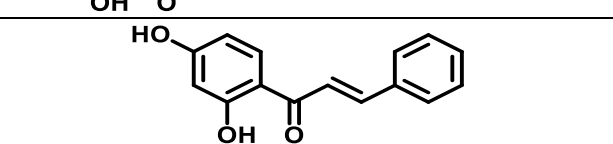


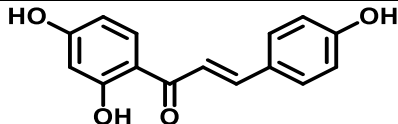
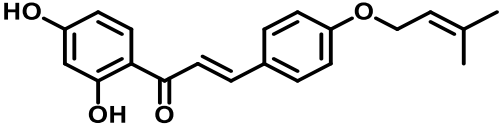
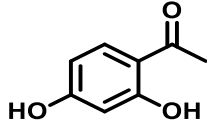
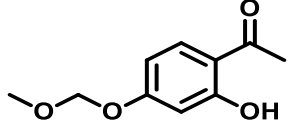
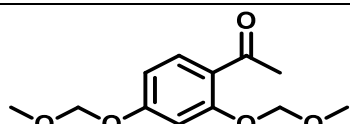
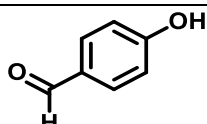
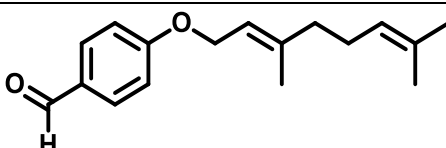
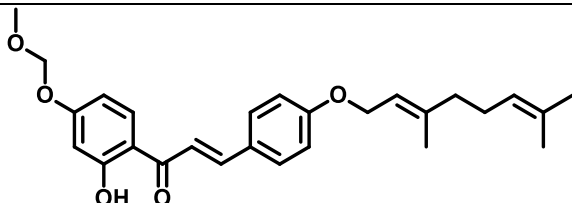
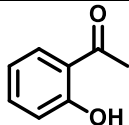
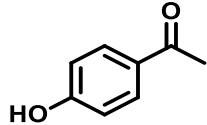
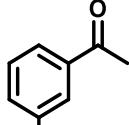
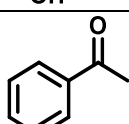
Anexo 21. Espectro de RMN ^{13}C da substância G4 impura (DMSO- d_6 , 150 MHz)

7.1 ANEXOS

Tabela 5. Número ou código das estruturas e estruturas características.

Número ou Código das estruturas	Nome das estruturas	Estruturas
1	Bnz	
2	Nfx	
3	Estrutura do núcleo chalcônico	
4	Grupo terpenoila isoprenila	
5	Grupo terpenoila geranila	
6	Grupo terpenoila farnesila	
7	Chalcona isoprenilada do artigo de ESPINOZA-HICKS et al., 20	 7 IS = 75,11 e Cl ₅₀ = 17,5 μM
8	Chalcona isoprenilada do artigo de ESPINOZA-HICKS et al., 20	 8 IS = 1,43 e Cl ₅₀ = 17,8 μM

9	Chalcona geranilada do artigo de ESPINOZA-HICKS et al., 20	
		9 IS = 27,36 e Cl ₅₀ = 30,1 μM
10	Chalcona digeranilada do artigo de ESPINOZA-HICKS et al., 20	
		10 IS = 33,52 e Cl ₅₀ = 30,4 μM
11 até 14	Chalconas 11- 14 do artigo de BORGES-ARGÁEZ et al., 2009	
		(11) R ₁ = OH , R ₂ = OH (Cl ₅₀ = 7.00 μM e IS =1.25) (14) Cl ₅₀ = 5 μM e IS = 6.30 (12) R ₁ = OAc , R ₂ = OAc (Cl ₅₀ = 1,8 μM e IS = 23.66) (13) R ₁ = OCH ₃ , R ₂ = OCH ₃ (Cl ₅₀ = 1,5 μM e IS = 109,33)
15 ou G1 ou GMM1	G1 4- <i>O</i> -geranilisoliquitigenina	
G2	2'-hidroxi-4- <i>O</i> -geranilchalcona	
G3	4'-hidroxi-4- <i>O</i> -geranilchalcona	
G4	4- <i>O</i> -geranilchalcona	
G5	3'-hidroxi-4- <i>O</i> -geranilchalcona	
G6	2,4'-dimetoxi-4- <i>O</i> -geranilchalcona	
G7	2'-hidroxi-4'-metoxi-4- <i>O</i> -geranilchalcona	
G8	2',4'- dihidroxichalcona	

G9	isoliquiritigenina	
G10	4-O-prenylisoliquiritigenina	
16	2,4-dihidroxiacetofenona	
17	2-hidroxi 4-metoximetoxiacetofenona	
18	2,4-bis(metoximetoxi)acetofenona	
19	4-hidroxi benzaldeido	
20	4-O-geranil benzaldeido	
21	(E)-1-(2,4-bis(metoximetoxi)fenil)-3-(O geranilfenilprop-2-em-1-ona)	
22	2'-hidroxiacetofenona	
23	4'-hidroxiacetofenona	
24	3'-hidroxiacetofenona	
25	acetofenona	

26	2,4'- dimetoxiacetofenona	
27	2'-hidroxi-4- metoxiacetofenona	
28	benzaldeído	
29	4-hidroxibelzaldeído	
30	4-O-prenilbenzaldeído	
31	Intermediário isoprenilado de reação	