

MARIA ISABEL GOMES DE CARVALHO

**Síntese e Avaliação de Análogos de 3-Hidroxicordoína como
Potenciais Agentes contra *Mycobacterium tuberculosis***

São José do Rio Preto

2023

MARIA ISABEL GOMES DE CARVALHO

**Síntese e Avaliação de Análogos de 3-Hidroxicordoína como
Potenciais Agentes contra *Mycobacterium tuberculosis***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para 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”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Luis Octavio Regasini

São José do Rio Preto

2023

C331s Carvalho, Maria Isabel Gomes de
Síntese e Avaliação de Análogos de 3-Hidroxicordoína
como Potenciais Agentes contra Mycobacterium
tuberculosis / Maria Isabel Gomes de Carvalho. -- São José
do Rio Preto, 2023
53 p. : il., tabs.

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

Orientador: Luis Octávio Regasini

1. Cordoína. 2. Chalconas Preniladas. 3. Claisen-
4. Tuberculose. 5. Bactérias I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca
do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto.
Dados fornecidos pelo autor(a).

MARIA ISABEL GOMES DE CARVALHO

**Síntese e Avaliação de Análogos de 3-Hidroxicordoína como
Potenciais Agentes contra *Mycobacterium tuberculosis***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para 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”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Luis Octavio Regasini
UNESP – Câmpus de São José
do Rio Preto Orientador

Prof^ª. Dr^ª. Aline Coqueiro
UTFPR – Câmpus Ponta Grossa

Prof. Dr. Marcio José Tiera
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

**São José do Rio Preto
28 de abril de 2023**

Dedico este trabalho à minha mãe
e a todas as pessoas que
sempre me apoiaram.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, **Adriana**, por sempre ter me incentivado, não me deixado desistir e ter acreditado em mim,

Ao meu avô, **Heitor**, meu irmão, **João Victor**, minha tia, **Angélica**, por todo o apoio nas minhas decisões e sonhos,

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Luis Octavio Regasini**, por me deixar fazer parte do grupo de pesquisa e possibilitar a realização do meu projeto no Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos,

Ao **Dr. Marcio Tiera** e à **Dr^a. Aline Coqueiro**, por todo apoio e disponibilidade para contribuir com o presente trabalho,

A todos meus **amigos**, especialmente ao **Carlos Piovezan**, **Lucas Ferreira**, **Bruna Sá**, **Nayara**, **Bruna**, **Paulo**, que sempre estiveram do meu lado e me apoiaram nos momentos mais difíceis,

A todos do LAQ, que colaboraram direta e indiretamente com esse trabalho, principalmente ao **Patrick**, **Álvaro**, **Beatriz** e a **Ana Paioli**,

Ao **IBILCE** e toda a **UNESP**, pela minha graduação e pós-graduação,

Ao Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP/São José do Rio Preto, especialmente ao **Dr. Fábio Moraes**, pela realização dos experimentos de Ressonância Magnética Nuclear,

Ao Prof. Dr. **Fernando Pavan**, membros do Laboratório de Tuberculose, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP/Araraquara-SP, pela colaboração nos estudos contra *Mycobacterium tuberculosis*,

Ao Prof. Dr. **Carlos Henrique Gomes Martin**, da Universidade Federal de Uberlândia, Laboratório de Ensaio Antimicrobianos – LEA, pela colaboração nos ensaios contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas,

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (**CAPES**) – Número do processo: 88887.694755/2022-00, pelo financiamento do projeto, e agradeço à **FAPESP**, pelo financiamento do

Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos (LAQ).

RESUMO

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Atualmente, essa doença é considerada um problema de saúde pública devido ao alto número de casos. Inúmeras razões justificam a busca por novos agentes tuberculostáticos, destacando-se a sua alta taxa de morbimortalidade. Dessa maneira, esforços são prementes para descobrir e desenvolver fármacos com padrões estruturais e mecanísticos inovadores. A Química Medicinal tem sido muito importante para esta busca, visando o planejamento e a descoberta de fármacos. As chalconas vêm se destacando por possuírem inúmeras bioatividades e sua síntese ser considerada concisa e versátil. O presente estudo teve como objetivo a síntese e avaliação biológica de 3-hidroxicordoína (**3HC**) e seus análogos. Foram sintetizados análogos chalcônicos com modificações no anel A e a estratégia sintética incluiu reações de *O*-alquilação, condensação aldólica de Claisen-Schmidt, rearranjo de Claisen e hidrogenação catalítica. A atividade antibacteriana da **3HC** foi avaliada contra *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv obtendo uma Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 3,9 µM.

Palavras-chave: Cordoína. Chalconas Preniladas. Claisen-Schmidt. Tuberculose. Bactérias.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by the bacterium *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Currently, this disease is considered a public health problem due to the high number of cases. Numerous reasons justify the search for new tuberculostatic agents, highlighting their high morbidity and mortality rate. Therefore, efforts are urgent to discover and develop drugs with innovative structural and mechanistic patterns. Medicinal Chemistry has been very important for this search, aiming at the planning and discovery of drugs. Chalcones have been highlighted because they have numerous bioactivities and their synthesis is considered concise and versatile. The present study aimed at the synthesis and biological evaluation of 3-hydroxychordoin (3HC) and its analogues. Chalconic analogues with modifications in the A ring were synthesized and the synthetic strategy included O-alkylation reactions, Claisen-Schmidt aldol condensation, Claisen rearrangement and catalytic hydrogenation. The antibacterial activity of 3HC was evaluated against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv obtaining an Inhibitory Concentration Minimum (MIC) of 3.9 μM .

Keywords: Cordoin. Prenylated Chalcones. Claisen-Schmidt. Tuberculosis. Bacteria.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Fármacos de Primeira Linha para o Tratamento da delafloxacino (1-4) – p. 16

Figura 2. Fármacos Modernos para o Tratamento de MDR-TB: bedaquilina (5), delamanida (6) e pretomanida (7) – p. 16

Figura 3. Estrutura geral do núcleo chalcônico – p. 17

Figura 4. Fármacos Chalcônicos [Metochalcona (8) e Sofalcona (9)] – p. 18

Figura 5. Estrutura da cordoína (10) – p. 18

Figura 6. Rota sintética A para obtenção da cordoína – p. 19

Figura 7. Estrutura química da 4-hidroxicordoína (12) – p. 20

Figura 8. Estrutura química da 3-hidroxicordoína – p. 20

Esquema 1. Planejamento molecular dos análogos chalcônicos de 3HC – p. 21

Esquema 2. Planejamento molecular dos análogos da série I – p. 22

Esquema 3. Rota sintética para síntese de 3HC e seus análogos 14-16 – p. 22

Esquema 4. Rota sintética para a síntese dos análogos 17-20 – p. 23

Esquema 5. Rota sintética para a obtenção de 3HC utilizando proteção – p. 24

Esquema 6. Planejamento molecular dos análogos da série II – p. 24

Esquema 7. Rota sintética para a obtenção dos análogos 28-29 – p. 24

Esquema 8. Reação de *O*-alquilação de 2,4-dihidroxiacetofenona – p. 26

Esquema 9. Mecanismo da reação de *O*-alquilação de 2,4-dihidroxiacetofenona – p. 26

Esquema 10. Mecanismo da reação de condensação de Claisen-Schmidt – p. 27

Esquema 11. Mecanismo parcial proposto para a reação de ciclização da 2,4-dihidroxiacetofenona – p. 28

Esquema 12. Mecanismo de proteção do 3-hidroxibenzaldeído com THP – p. 29

Esquema 13. Mecanismo de desproteção utilizando HCl e MeOH – p. 30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultado dos ensaios biológicos com **3HC** – p. 31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3HC – 3-Hidroxicordoína

TB – Tuberculose

CIM – Concentração inibitória mínima

OMS – Organização Mundial da Saúde

MTB – *Mycobacterium tuberculosis*

MDR-TB – Multidrug-Resistant Tuberculosis

FDA – Food and drug administration

CCD – Cromatografia em camada delgada

EtOH – Etanol

MeOH – Metanol

CCD – Cromatografia em camada delgada

THF – Tetraidrofurano

THP – Tetraidropirano

PPTS – p-toluenossulfonato de piridínio

AcOEt – Acetato de etila

AcO – Acetona

Hex – Hexano

ANEXOS

- Anexo 1.** Espectro de RMN de ^1H de **3HC** – p.46
- Anexo 2.** Espectro de RMN de ^1H de **3HC** – Ampliado de 0,8 a 2,2 ppm – p. 46
- Anexo 3.** Espectro de RMN de ^1H de **3HC** – Ampliado de 4,30 a 5,55 ppm – p. 47
- Anexo 4.** Espectro de RMN de ^1H de **3HC** – Ampliado de 6,3 a 8,0 ppm – p. 47
- Anexo 5.** Espectro de RMN de ^1H do composto **14** – p. 48
- Anexo 6.** Espectro de RMN de ^1H do composto **14** – Ampliado de 6,75 a 8,05 – p. 48
- Anexo 7.** Espectro de RMN de ^1H do composto **15** – p. 49
- Anexo 8.** Espectro de RMN de ^1H do composto **15** – Ampliado de 6,4 a 8,3 – p. 49
- Anexo 9.** Espectro de RMN de ^1H do composto **15** – Ampliado de 2,1 a 1,54 ppm – p. 50
- Anexo 10.** Espectro de RMN de ^1H do composto **16** – p. 50
- Anexo 11.** Espectro de RMN de ^1H do composto **16** – Ampliado de 0 a 4,0 ppm – p. 51
- Anexo 12.** Espectro de RMN de ^1H do composto **16** - Ampliado de 5,2 a 7,9 ppm – p. 51
- Anexo 13.** Espectro de RMN de ^1H do composto **17** – p. 52
- Anexo 14.** Espectro de RMN de ^1H do composto **17** - Ampliado de 6,3 a 7,9 ppm – p. 52
- Anexo 15.** Espectro de RMN de ^1H do composto **18** – p. 53
- Anexo 16.** Espectro de RMN de ^1H do composto **18** – Ampliado de 6,2 a 8,2 ppm – p. 53

SUMÁRIO

1. Introdução – p. 15

1.1. Tuberculose e antimicobacterianos – p. 15

1.2. Chalconas – p. 17

1.2.1. Cordoína – p. 18

2. Objetivo – p. 21

2.1. Objetivos específicos – p. 21

3. Metodologia p. 21

3.1. Planejamento Molecular dos Análogos Chalcônicos de 3HC – p. 21

3.2. Modificações no anel A – p. 21

3.2.1. Síntese de **3HC** e do seus análogos com Modificações no anel A – p. 22

3.2.2. Estratégia sintética 1 – p. 23

3.2.3. Planejamento molecular série II – p. 24

3.2.4. Purificação e Identificação de 3HC e seus análogos – p. 25

3.3. Ensaio biológicos – p. 25

4. Resultados e discussão – p. 25

4.1. 3-Hidroxicordoína e seus análogos – p. 25

4.2. Estratégias sintéticas 1 e 2 – p. 29

4.3. Ensaio biológicos – p. 30

5. Conclusão – p. 31

6. Procedimentos experimentais – p. 33

6.1. Síntese dos compostos – p. 33

6.2. Ensaio biológicos – p. 41

6.2.1. Ensaio antibacterianos e antimicobacterianos – p. 41

6.2.2. Ensaio antitubercular – p. 42

Referências – p. 42

Anexos – p. 46

1. INTRODUÇÃO

1.1. Tuberculose & Antimicobacterianos

A tuberculose (TB) durante muitos anos foi a doença infecciosa responsável pelo maior número de óbitos no mundo, tendo impacto superior ao da AIDS. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), até 2019 a TB foi considerada como uma das 10 principais causas de óbitos no planeta. Em 2020, ela foi superada pelas infecções causadas pela Covid-19. No entanto, este fato não representa que houve um avanço no combate à doença, transmissão ou uma redução na mortalidade. Devido à pandemia de Coronavírus (Covid-19), pela primeira vez em décadas, houve um aumento de número de óbitos causados pela infecção. Isso ocorreu em razão dos impactos na oferta e acesso a serviços essenciais para TB, havendo um decréscimo no número de pessoas diagnosticadas e notificadas com tuberculose (WHO, 2021).

O principal agente etiológico da TB é o *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), um bacilo aeróbico, que possui crescimento lento. O processo de infecção por MTB ocorre a partir da inalação de perdigotos com bacilos, expelidos pela fala, espirro ou tosse de um indivíduo contaminado. O MTB afeta principalmente os pulmões, ocasionando a forma mais comum da doença, a TB pulmonar, porém o bacilo pode se espalhar para outros órgãos dando origem a TB extrapulmonar. A maioria das pessoas desenvolve uma resposta imunológica celular capaz de conter a infecção. Porém, nessa fase, o MTB pode assumir o estado de latência no interior dos macrófagos, na qual o bacilo não se encontra ativo, podendo persistir durante décadas. No entanto, em situações em que ocorre o comprometimento do sistema imunológico, pode haver quebra de latência, dando início a infecção (EVANGELOPOULOS & MCHUGH, 2015).

O tratamento da TB recomendado pela OMS possui um período mínimo de 6 meses e são administrados quatro fármacos denominados agentes de primeira linha. Nos dois primeiros meses de tratamento, é recomendada a associação dos fármacos isoniazida (1), pirazinamida (2), etambutol (3) e rifampicina (4), seguida da fase de manutenção por quatro meses, constituída pela associação entre isoniazida e rifampicina (**Figura 1**) (WHO, 2017).

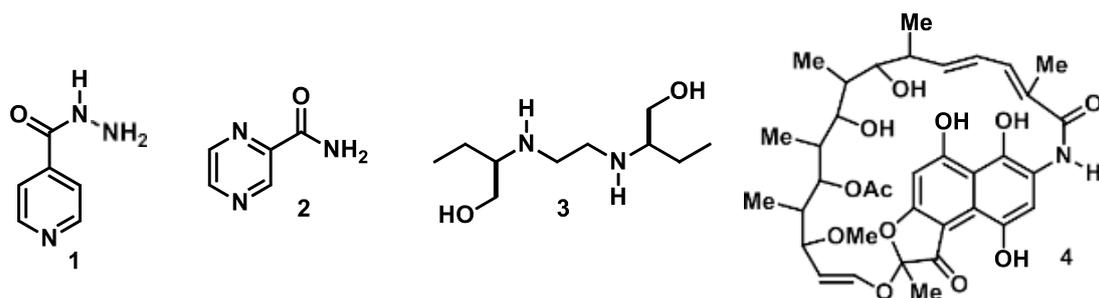


Figura 1. Fármacos de Primeira Linha para o Tratamento da Tuberculose: isoniazida (1), pirazinamida (2), etambutol (3) e rifampicina (4).

Um problema associado ao MTB é o surgimento das formas multi-fármaco resistentes (MDR-TB), as quais são refratárias a pelo menos dois dos fármacos de primeira linha empregados no tratamento. Para combater cepas MDR-TB é necessário um tratamento relativamente mais longo e tóxico, com uma menor taxa de cura em comparação ao utilizado contra a forma sensível do bacilo. Nesse tratamentosão utilizadas combinações de agentes de segunda linha por um período de 18 a 24 meses, incluindo os aminoglicosídeos (canamicina ou amicacina), capreomicina, cicloserina, ácido *para*-aminossalicílico, tioamidas (etionamida e protionamida) e fluoroquinolonas (moxifloxacino, ofloxacino e gatifloxacino) (WHO, 2017).

Nos últimos 50 anos, foram aprovados apenas 3 fármacos para o tratamento específico das formas MDR-TB, sendo eles a bedaquilina (Sirturo[®], 5), aprovada em 2012 pela FDA, a delamanida (Deltyba[®], 6), aprovada em 2015 pela *European Medicines Agency* e a pretomanida (7), o fármaco aprovado mais recentemente, em agosto de 2019 pela *Food and Drug Administration* (FDA), que é administrado simultaneamente com a bedaquilina (5) quando se encontram casos de fenótipos resistentes (Figura 2) (Bloemberg et al, 2015) (WHO, 2017).

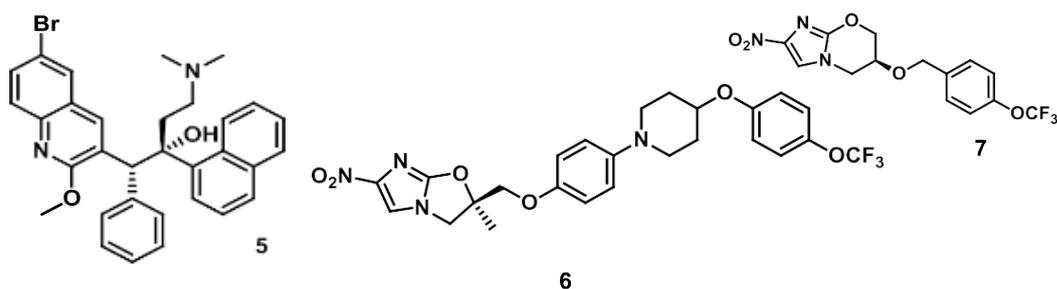


Figura 2. Fármacos modernos empregados para o tratamento de MDR-TB: bedaquilina (5), delamanida (6) e pretomanida (7).

Na busca por tratamentos alternativos, os produtos naturais tem se mostrado grandes aliados da Química Medicinal para o tratamento das formas resistentes de bactérias, micobactérias e para a descoberta de novos antibióticos (DAI 2020).

1.2. Chalconas

As chalconas são produtos naturais, consideradas compostos privilegiados pela Química Medicinal, devido ao seu amplo espectro de bioatividades, além de apresentarem estruturas que podem ser modificadas por meio de sínteses versáteis e fáceis (PHAN, 2018). Elas constituem uma das maiores subclasses de flavonoides, com distribuição ampla nas plantas, sendo precursores biossintéticos centrais dos demais flavonoides (DI CARLO, 1999).

São formadas por duas unidades fenílicas (anéis A e B), ligadas por uma cetona α,β -insaturada (**Figura 3**) (DEWICK, 2009). As chalconas são produtos naturais consideradas compostos privilegiados pela Química Medicinal.

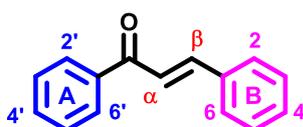


Figura 3. Estrutura geral do núcleo chalcônico.

Dentre elas, destaca-se a metochalcona (8) e a sofalcona (9) que se destacam como fármacos com ações colerética e anti-ulcerogênica/mucoprotetora, respectivamente (**Figura 4**) (BATOVSKA & TORODOVA, 2010; SAHU, 2012).

As chalconas preniladas compõem uma classe importante de chalconas de ocorrência natural (EPIFANO, 2007). São aquelas que possuem o núcleo chalcônico ligado a grupos terpenoídicos, principalmente isoprenila (5

carbonos), 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. As chalconas C-preniladas, cujo grupo terpenoílico está ligado diretamente ao átomo de carbono, são de maior ocorrência natural do que as chalconas O-preniladas (WANG, 2015). Alguns exemplos de chalconas preniladas com atividade contra *M. tuberculosis* são: licochalcona A de *Glycyrrhiza inflata* (FRIIS, 2002), kanzanol C, estipulina, 4-hidroxiloncocarpina de *Dorstenia barteri* (KUETE, 2010) e piranochalconas de *Helichrysum melanacme* (LALL, 2006).

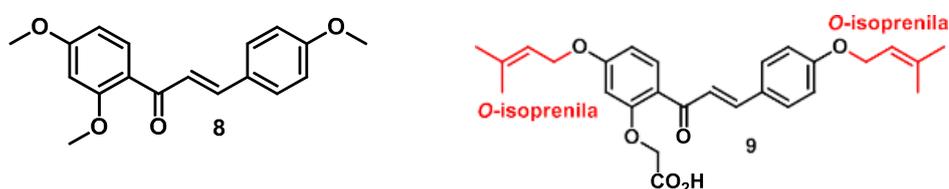


Figura 4. Fármacos chalcônicos Metochalcona (8) e Sofalcona (9).

Por esse motivo, a exploração de chalconas com atividade antibacteriana, principalmente contra *M. tuberculosis*, planejando e desenvolvendo análogos, pode resultar em moléculas mais eficientes que os protótipos estudados e conduzir a descoberta de novos antibióticos e potenciais fármacos inéditos.

1.2.1. Cordoína

Dentre as chalconas naturais preniladas, uma de grande destaque é a cordoína (10) (Figura 5). Esta apresenta uma subunidade O-isoprenila e uma hidroxila nas posições 2 e 4 do anel A, respectivamente. Ela pode ser extraída de algumas plantas, incluindo *Millettia erythrocalyx* Gagnep. (Fabaceae), *Cordia piaca* (Leguminosae) (LUPI, 1975) e *Derris* spp. (Fabaceae) (DO NASCIMENTO & MORS, 1972).

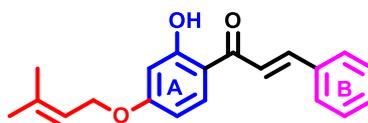


Figura 5. Estrutura da cordoína (10).

A cordoína pode ser obtida sinteticamente além de poder ser obtida através de algumas plantas. A rota mais comum para a obtenção da cordoína (Rota A) envolve duas etapas: (a) a reação *O*-prenilação da hidroxila na posição 4 da 2,4-dihidroxiacetofenona (**11**), e a (b) reação de condensação aldólica entre o derivado acetofenônico isoprenilado (**11.1**) e o benzaldeído (**Figura 6**). De modo geral, na primeira etapa reacional (etapa a), a 2,4-dihidroxiacetofenona e o brometo de isoprenila são utilizados como reagentes de partida. Essa reação tem sido catalisada por catalisadores básicos, incluindo K_2CO_3 e DBU (*1,8-diazabicycloundec-7-eno*), e a acetona tem sido utilizada como solvente. Na segunda etapa reacional (etapa b), o derivado acetofenônico isoprenilado (**11.1**) é condensado com o benzaldeído utilizando também catalisadores alcalinos, como KOH e $Ba(OH)_2$. Álcoois de cadeia curta, como EtOH e MeOH, tem sido empregados como solventes dessa etapa reacional.

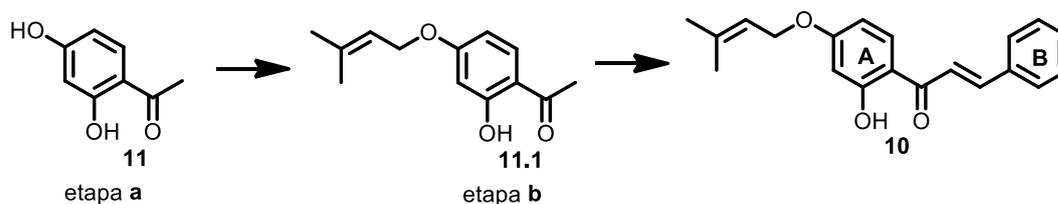


Figura 6. Rota sintética A para a obtenção da cordoína (**10**).

Inúmeros estudos têm descrito as atividades biológicas da cordoína e seus análogos naturais e sintéticos. Esses trabalhos descreveram os seus efeitos antitumoral (BOTTA, 2005; LIU, 2010; BUYÈRE, 2011; ZHANG, 2014; FONSECA, 2014; NABEKURA, 2020), antifúngico (FLORES, 2016), anticonvulsivante (GENOVESE, 2009), antidepressivo (CHIMENTI, 2009; XIE, 2014) e antiplaquetário (REDDY, 2011).

Um análogo natural da cordoína que tem se destacado pelas suas atividades biológicas é uma chalcona *O*-prenilada, a 4-hidroxicordoína (**12**) (**Figura 7**) (EPIFANO, 2007), que é isolada da planta *Lonchocarpus neuroscapha* Benth (Fabaceae).

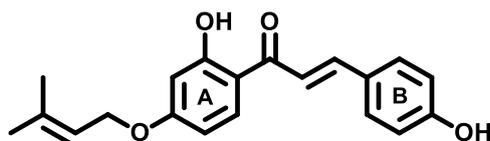


Figura 7. Estrutura química da 4-hidroxicordoína (12).

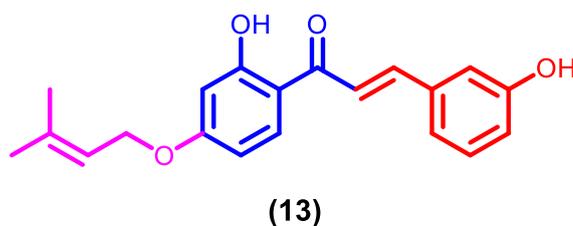
As atividades biológicas da 4-hidroxicordoína também têm sido estudadas, incluindo antifúngica (MESSIER, 2011), anti-inflamatória (FELDMAN, 2011; FIORITO, 2017), antitumoral (EPIFANO, 2012), antibacteriana (ÁVILA, 2008; DAN & DAI, 2019), e anticonvulsiva (GENOVESE, 2009).

Segundo Feldman e colaboradores, a 4-hidroxicordoína apresentou atividade contra as espécies bacterianas de interesse odontológico *Prevotella intermedia* (ATCC 25611), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586) e *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), com valores de CIM de 2,5, 40 e 5,0 µg/mL, respectivamente.

A 3-hidroxicordoína, que é um composto inédito, foi sintetizada como parte do projeto “Síntese e Avaliação Biológica de Isobavachalcona e Análogos como Potenciais Agentes contra a Tuberculose” e demonstrou uma concentração inibitória mínima (CIM) de 125 µg/mL contra *H. Pylori*.

A 3HC possui alta versatilidade para construção de um conjunto de análogos com quimiodiversidade, pois apresenta uma estrutura relativamente simples (ausência de centros estereogênicos), bem como uma síntese em poucas etapas.

Figura 8: Estrutura química da 3-hidroxicordoína (13)



2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo geral a síntese da 3-hidroxicordoína e seus análogos chalcônicos com modificações no anel A e a investigação da suas atividades antibacteriana.

2.2 Objetivos específicos

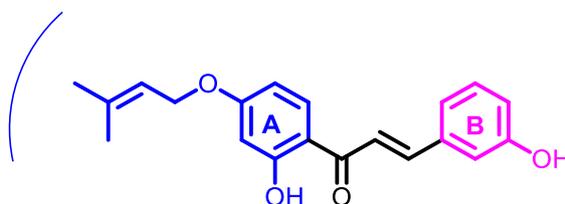
- I. Síntese de 10 análogos chalcônicos, explorando grupos terpenóilas e hidroxilas;
- II. Avaliação da atividade contra *Mycobacterium tuberculosis*, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

3. METODOLOGIA

3.1. Planejamento Molecular dos Análogos Chalcônicos de 3HC.

Foi planejado duas séries de análogos chalcônicos de **3HC** (**Esquema 1**), sendo estas séries com modificações no anel A.

Efeito de grupos alílicos
Efeito da ciclização
da isoprenila

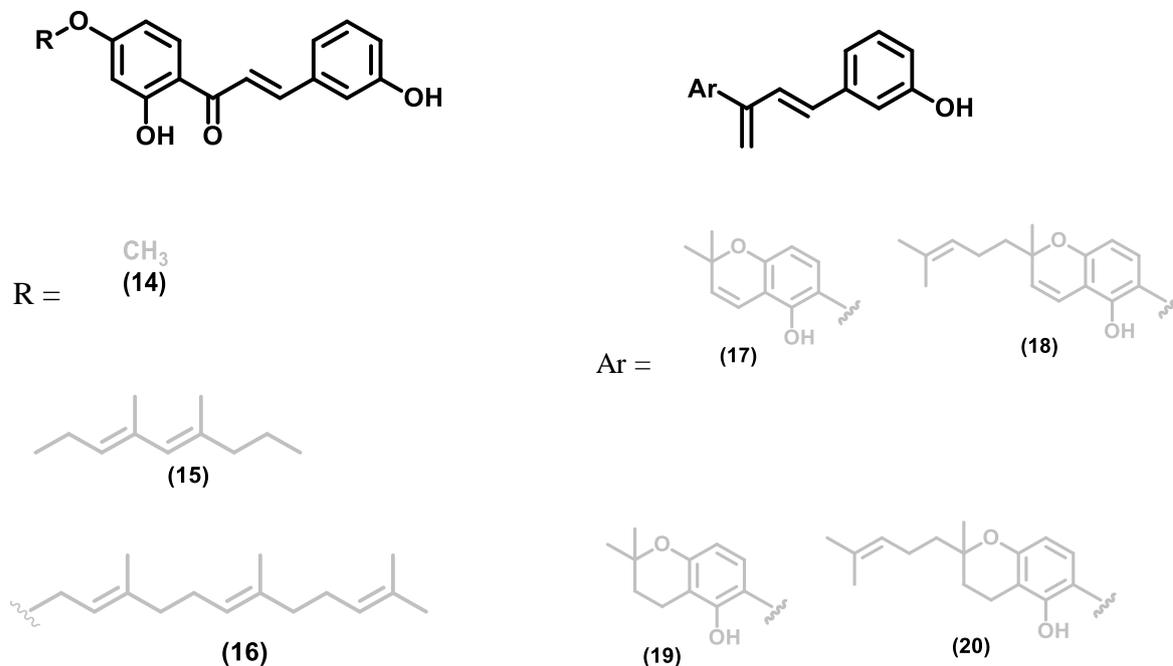


Esquema 1. Planejamento molecular dos análogos chalcônicos de **3HC**.

3.2. Modificações no Anel A

A série será constituída por **3HC** e seus análogos chalcônicos com anel B *meta*-hidroxilado e modificações feitas no anel A. (**Esquema 2**). Inicialmente, foram planejados análogos substituídos em 4' com os grupos metila (**14**), geranila (**15**) e farnesila (**16**), visando identificar a influência do grupo terpenóila sobre a bioatividade. Serão avaliados outros grupos, como as cromenochalconas **17** e **18** e cromano-chalconas **19** e **20**, visando identificar o

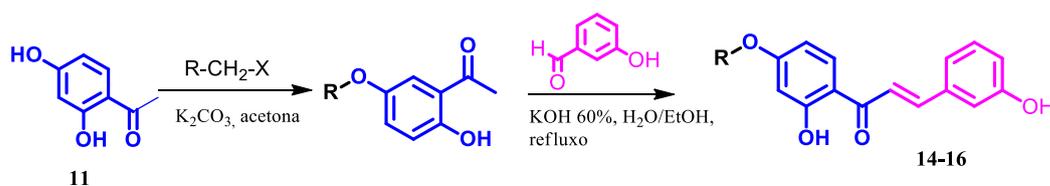
efeito da ciclização do grupo terpenoíla sobre a atividade biológica.



Esquema 2. Planejamento molecular dos análogos da série I.

3.2.1 Síntese da 3HC e dos análogos com modificações no anel A

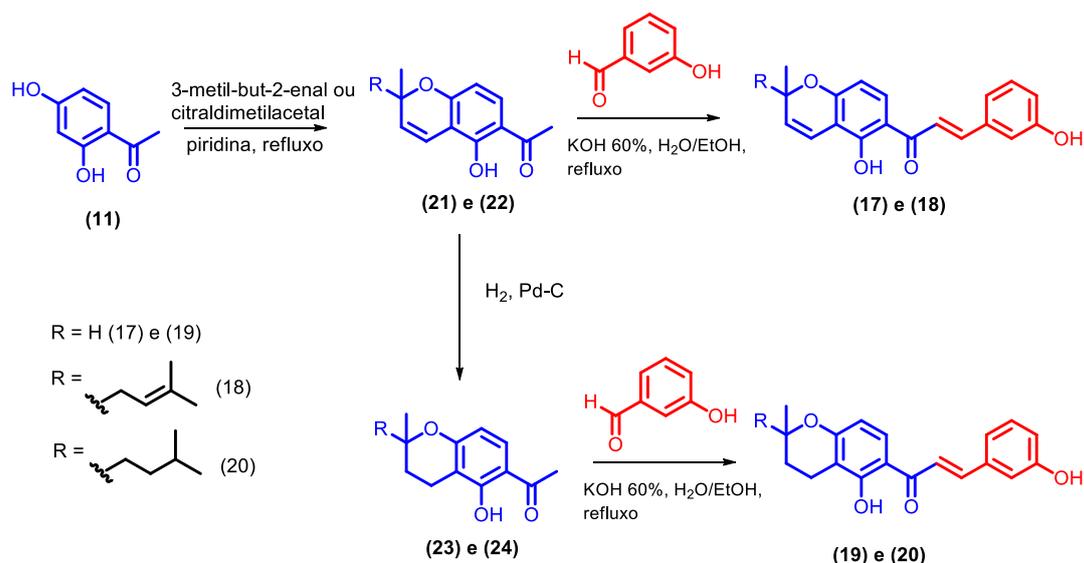
A síntese de **3HC** e dos análogos **14–16** utilizará duas etapas (ESPINOZA-HICKS, 2019; CHACO-VARGAS, 2020). A primeira etapa envolverá a reação de *O*-alquilação de 2,4-dihidroxiacetofenona (material de partida, **11**), utilizando os respectivos brometos ou cloretos (R = prenila, metila, geranila e farnesila) e carbonato de potássio anidro. A segunda etapa será constituída pela reação de condensação aldólica de Claisen-Schmidt entre as respectivas acetofenonas e 3- hidroxibenzaldeído (**25**) (**Esquema 3**).



Esquema 3. Rota sintética para síntese de **3HC** e seus análogos **14-16**.

Para a síntese das cromenochalconas **17** e **18**, como material de partida

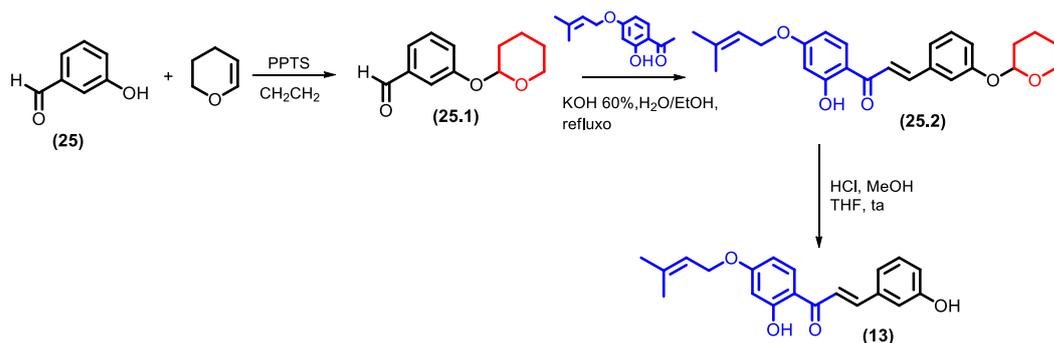
será utilizada a acetofenona **11**, a qual será submetida a um rearranjo de Claisen. As cromanoalconas **19** e **20** serão obtidas por meio da reação de hidrogenação catalítica das acetofenonas **23** e **24** seguinte da condensação aldólica com 3-hidroxibenzaldeído respectivamente (TADIGOPPULA, 2013; SHIVAHARE, 2014) (**Esquema 4**).



Esquema 4. Rota sintética para a síntese dos análogos **17–20**.

3.2.2 Estratégia sintética 1

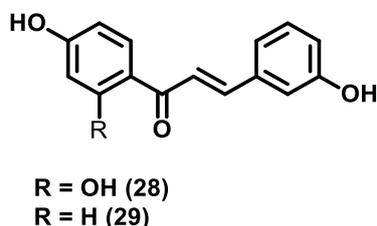
A síntese de **3HC** e seus análogos, seguindo as metodologias de Espinoza-Hicks e colaboradores (ESPINOZA-HICKS, 2019), apesar de possuir uma rota concisa, o rendimento global é baixo (**Esquema 3**). Devido a isto, surgiu a necessidade de buscar alternativas para aumentar o rendimento da síntese. Na tentativa de otimizar a síntese, foi desenvolvida uma rota para a proteção do 3-hidroxibenzaldeído com dihidropirano (THP) conduzindo à obtenção do aldeído protegido **25.1** na etapa 1. Na segunda etapa, o aldeído protegido **25.1** foi condensado com o intermediário acetofenônico **21.1**. Na terceira etapa foi realizado uma reação de desproteção para assim tentar obter a **3HC** com um maior rendimento.



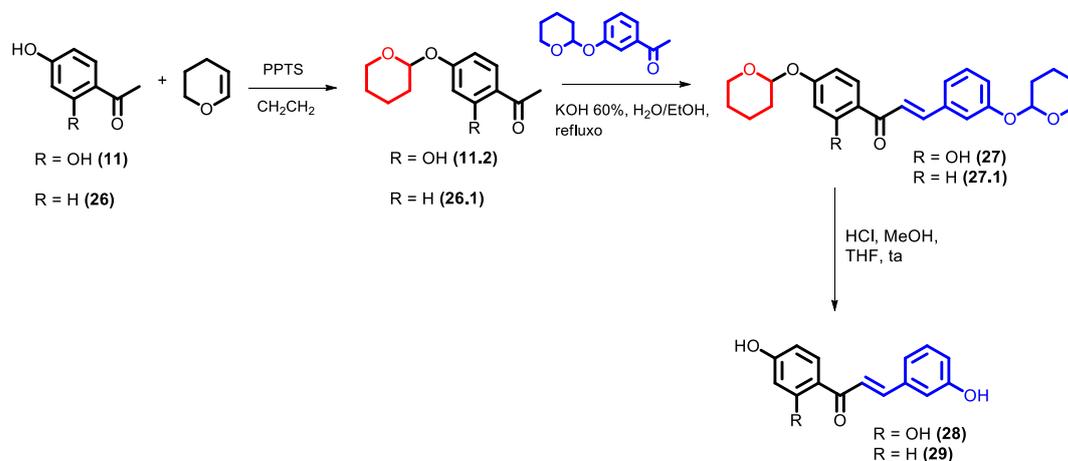
Esquema 5. Rota Sintética para a obtenção de **3HC** utilizando proteção.

3.2.3 Planejamento molecular série II

Com o objetivo de identificar a influência do grupo terpenoila e hidroxila sobre a bioatividade dos compostos, foi proposta outra série de compostos utilizando a rota sintética realizando uma reação de proteção da 2,4-dihidroxiacetofenona **11** e da 4-hidroxiacetofenona **26**. Na segunda etapa, o aldeído protegido **25.1** foi condensado com os intermediários acetofenônicos **11.2** e **26.1**. Na última etapa foi realizado as desproteções dos compostos protegidos **27** e **27.1**, respectivamente, para assim a obtenção dos produtos **28** e **29**.



Esquema 6. Planejamento Molecular dos Análogos da Série II.



Esquema 7: Rota Sintética para a obtenção dos análogos 26-27

3.2.4 Purificação e Identificação de 3HC e seus análogos

As substâncias foram purificadas por procedimentos de precipitação, extração líquido-líquido, cristalização e/ou de métodos cromatográficos, tais como: cromatografia em coluna de fase normal (gel de sílica), cromatografia em coluna de fase reversa (octadecilsilano, C18) e cromatografia por exclusão molecular (LH- 20, Sephadex®).

As reações foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada comparativa. As cromatoplasmas foram reveladas sob inspeção com luz ultravioleta (254 e 365 nm) e com o anisaldeído sulfúrico.

3.3. Ensaios biológicos

Foram usadas cepas bacterianas padrão de *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC 27294), três espécies Gram-negativas, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 35218) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), como também três espécies Gram-positivas, *S. aureus* (ATCC 6538), *S. epidermidis* (ATCC 14990) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 1299). Os ensaios foram realizados com a colaboração do Laboratório do Professor Dr. Fernando Pavan da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Campûs de Araraquara.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

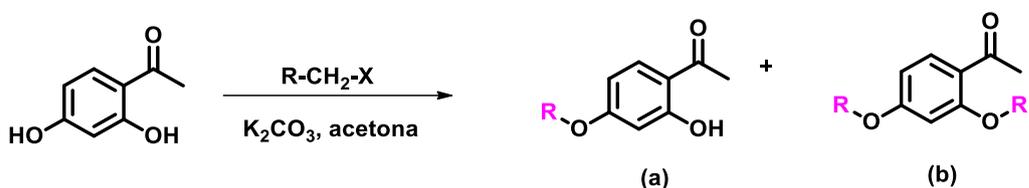
4.1 3-hidroxicordoína e seus análogos

A síntese da 3HC e seus análogos **14-16** foram realizadas em 2 etapas e utilizou-se da metodologia da condensação aldólica de Claisen-Schimidt entre a 2,4-dihidroxiacetofenona e o 3-hidroxibenzaldeído sob catalíse básica.

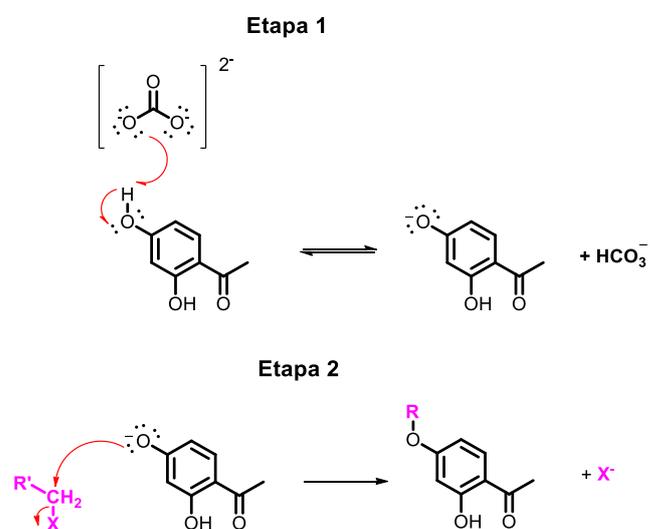
Na etapa I, a reação de *O*-alquilação da 2,4-dihidroxiacetofenona levou a formação de 2 produtos, o para *O*-alquilado e o para e orto *O*-alquilado, respectivamente. No **esquema 9** é possível acompanhar o mecanismo da reação de *O*-alquilação.

No mecanismo, inicialmente na etapa 1 da reação de *O*-alquilação de 2,4-dihidroxiacetofenona, o carbonato desprotona a acetofenona, levando a

acetofenona desprotonada. Na etapa 2 esta acetofenona desprotonada, sendo um nucleófilo, ataca o carbono metilênico próximo ao halôgenio do reagente de interesse, obtendo uma acetofenona *O*-alquilada.



Esquema 8: Reação de *O*-alquilação de 2,4-dihidroxiacetofenona



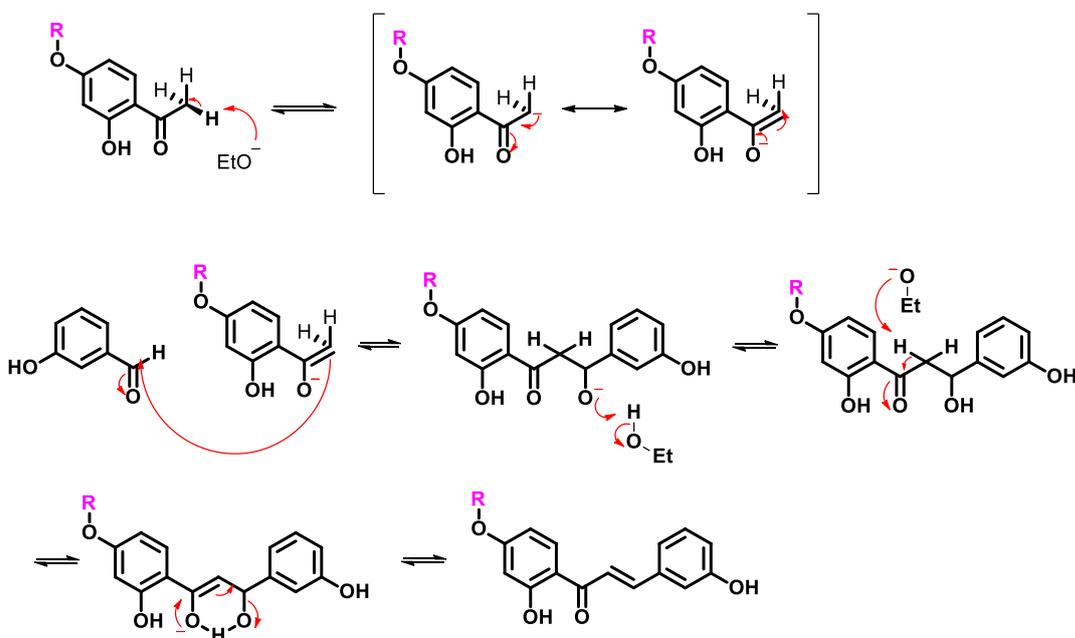
Esquema 9: Mecanismo proposto para a reação de *O*-alquilação de 2,4-dihidroxiacetofenona.

Fonte: Autoria própria

Após a reação de *O*-alquilação foi necessária a realização de uma etapa de purificação para obtenção apenas do composto desejado, o para *O*-alquilado (a) no **Esquema 8**. A separação cromatográfica de todos os compostos foi realizada em coluna de sílica empregando misturas de hexano e acetato de etila como eluentes, com a fase móvel sendo feitas de acordo com a polaridade das substâncias. Os compostos foram obtidos com rendimentos variando de 25 % à 45 %

Em seguida, realizou-se a reação de condensação aldólica de Claisen Schmidt entre as respectivas acetofenonas e 3- hidroxibenzaldeído sob catálise básica No **Esquema 10**, consta a reação do mecanismo da condensação aldólica de Claisen Schmidt. Na primeira etapa, há uma remoção de um

hidrogênio do ácido α -metílico da acetofenona pelo etóxido, formando o íon enolato, que é estabilizado por ressonância. Na segunda etapa, uma ligação carbono-carbono é estabelecida, pois ocorre o ataque nucleofílico do íon enolato ao carbono carbonílico do benzaldeído, 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, que forma um pseudoanel de 6 membros, envolve a captura de um hidrogênio α -cetônico, gerando um segundo enolato, o qual pode ser estabilizado por uma ligação de hidrogênio intramolecular. Por fim, a cetona α,β -insaturada é formada à partir da liberação de um grupo hidróxido (PERRIN & CHANG, 2016).



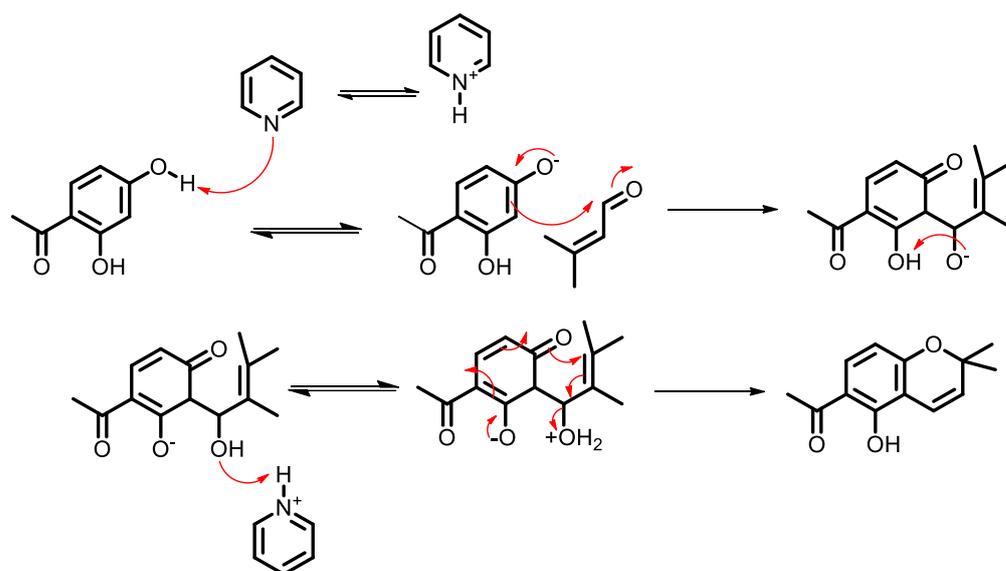
Esquema 10. Mecanismo da reação de condensação de Claisen-Schmidt.

Fonte: Autoria própria

A síntese das cromenochalconas **17** e **18**, também foi realizada em duas etapas, com a acetofenona **11** sendo utilizada como material de partida. No **Esquema 11**, é possível observar o mecanismo de reação para obtenção da acetofenona ciclica.

Primeiramente, a piridina desprotona a hidroxila na posição 4 da acetofenona, levando a formação do fenolato. Depois, uma ligação carbono-carbono será estabelecida, como resultado do ataque nucleofílo do íon enolato

ao carbono carbonílico do aldeído de interesse (3-metil-but-2-enal ou citraldimetilacetal). Em seguida, o intermediário ataca o hidrogênio da hidroxila da posição 2 da acetofenona. Na próxima etapa, o oxigênio captura o hidrogênio do íon piridínio. Na última etapa, há um rearranjo da acetofenona para a formação da acetofenona ciclizada, **17** e **18**, respectivamente.



Esquema 11. Mecanismo parcial proposto para a reação de ciclização da 2,4-dihidroxiacetofenona.

Fonte: Autoria própria

Em seguida, também realizou-se a reação de condensação aldólica de Claisen Schmidt entre as respectivas acetofenonas e 3-hidroxibenzaldeído sob catálise básica, com o mecanismo ocorrendo igual ao descrito no **Esquema 10**.

Por fim, as chalcona foram submetidas novamente a etapas de purificações para a obtenção dos compostos puros.

Após as sínteses, os compostos foram enviados para análise de RMN. E na elucidação dos espectros de RMN de ^1H foi confirmado a síntese de **3HC** e nele é possível observar quatro sinais característicos referentes ao grupo isoprenílico: dois singletos em torno de 1,7 (**Anexo 2**) referente aos hidrogênios metílicos (H-4'' e H-5''), um duplete em $\delta_{\text{H}} \sim 4,65$ referente ao H-1'' e um tripleto em $\sim 5,4$ referente ao hidrogênio H-2'' (**Anexo 3**).

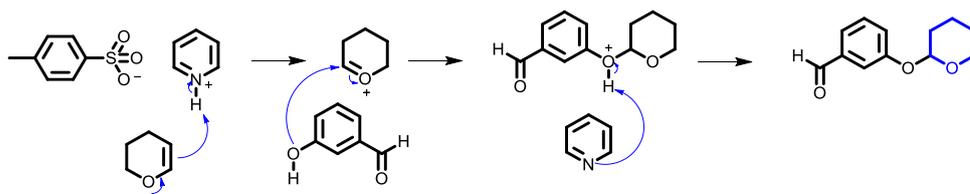
Porém nos espectros dos análogos foram analisados além dos sinais esperados para os compostos chalcônicos, como um duplete com $\delta_H \sim 7,7$ proveniente do hidrogênio vinílico α -carbonílico (**Anexo 4**) e um duplete com $\delta_H \sim 7,9$, que corresponde ao hidrogênio vinílico β -carbonílico (**Anexo 4**), os espectros também apresentaram sinais observáveis que podem indicar a presença de impurezas nas amostras.

4.2 Estratégias sintéticas 1 e 2

Devido à dificuldade de purificação dos compostos, e por apresentarem um rendimento de síntese extremamente baixo, ambos os compostos foram submetidos à uma nova estratégia sintética (reação de proteção com THP) visando solucionar os problemas da outra rota sintética. Foi realizado uma nova série de chalconas, propondo-se identificar a influência do grupo terpenoila e hidroxila sobre a bioatividade dos compostos.

Primeiramente foi realizado uma reação de proteção nos compostos 2,4-dihidroxiacetofenona, 4-hidroxiacetofenona e 3-hidroxibenzaldeído para obtenção dos compostos **11.2**, **26.1** e **25.1**, respectivamente. No **Esquema 12** é possível observar o mecanismo de proteção do 3-hidroxibenzaldeído com THP (tetraidropirano), este mesmo mecanismo ocorre na proteção da 2,4-dihidroxiacetofenona e da 4-hidroxiacetofenona.

Na primeira etapa, o THP captura o hidrogênio do piridínio gerando um íon. Na segunda etapa, o oxigênio do aldeído irá atacar o carbono do íon di-hidropirano, levando a formação de uma ligação carbono-oxigênio. Em seguida, a piridina captura o hidrogênio do íon di-hidropirano, assim obtendo o produto protegido.

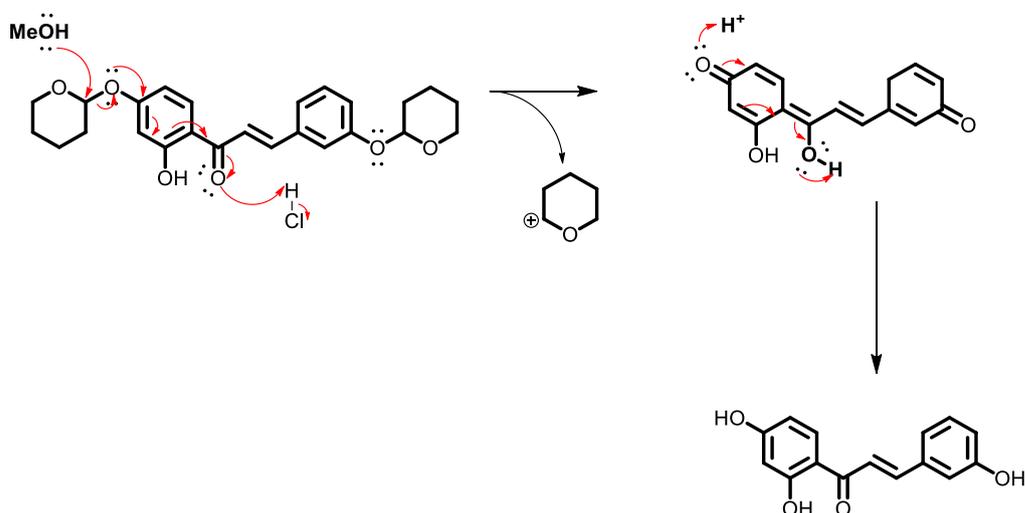


Esquema 12: Mecanismo de proteção do 3-hidroxibenzaldeído com THP.

Fonte: Autoria própria

Em seguida, foi realizado também a reação de condensação aldólica de Claisen Schmidt entre as respectivas acetofenonas e 3-hidroxibenzaldeído sob catálise básica, com o mecanismo ocorrendo igual ao descrito no **Esquema 7**. Durante a reação de condensação de Claisen-Schmidt notou-se uma melhora de rendimento.

Por fim, foi realizado a reação de desproteção em meio ácido utilizando HCl e MeOH. O **Esquema 13** mostra o mecanismo proposto para esta reação. Na primeira etapa, um par de elétrons livres do oxigênio captura o hidrogênio do ácido e o metanol ataca o carbono do íon di-hidropirano, levando a saída do grupo protetor. Através da ressonância, vai ocorrer a saída do hidrogênio, para assim o produto desprotegido ser obtido.



Esquema 13: Mecanismo de desproteção utilizando HCl e MeOH.

Fonte: Autoria própria

4.3 Ensaios biológicos

Foi avaliada a atividade biológica da **3HC** contra *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC 27294), três espécies Gram-positivas, *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 14990) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 1299), assim como três espécies Gram-negativas, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 35218) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), estas outras bactérias para avaliar se o composto teria um amplo espectro de ação. A Rifampicina foi utilizada como fármaco de referência contra *M. tuberculosis* e a tetraciclina

como fármaco de referência contra as demais bactérias. A potência antibacteriana foi expressas em valores de CIM em µg/mL (**tabela 1**).

Espécies	3HC	R.F	T.C
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3,9	0,006	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	400	-	0,09
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	400	-	>5,9
<i>Enterococcus faecalis</i>	400	-	1,47
<i>Escherichia coli</i>	400	-	0,73
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>400	-	5,9
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>400	-	1,47
Fármaco de Referência (R.F.) = rifampicina; (T.C.) = tetraciclina			

Tabela 1. Resultado dos ensaios biológicos com **3HC** (valores de CIM em µg/mL)

Até o momento, apenas a **3HC** foi possível ser submetida a ensaios biológicos, e a relação entre a atividade biológica e as estruturas moleculares serão melhor avaliadas ao término dos experimentos.. De acordo com os resultados (**tabela 1**) indicam que o composto causa efeitos inibitórios consideráveis em *Mycobacterium tuberculosis* (CIM 3,9 µg/mL), porém para as demais bactérias não obteve uma CIM satisfatória.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho a 3-hidroxicordoína foi sintetizada e purificada. Para os seus análogos planejados, diversas tentativas de purificação além de outra rota sintética foram utilizadas, porém não foi possível obter estes produtos purificados para enviar para ensaio biológico.

A **3HC** obteve um rendimento de 8%, e foi enviada para ensaio biológico, onde apresentou atividade satisfatória contra *Mycobacterium tuberculosis*, indicando que compostos aparenta ser promissor contra esta bactéria.

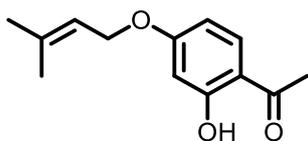
No entanto, serão necessários dados de ensaios biológicos realizados com mais análogos para compreender o mecanismo dos compostos e sua

relação estrutura-atividade.

6 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

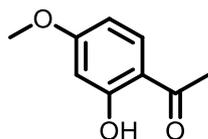
6.1 Síntese dos compostos

Síntese do *intermediário acetofenônico O'-prenilado 11.1 (a)*: solubilizou-se 3,2 mmol de 2,4-dihidroxiacetofenona em 10 mL de acetona e adicionou-se 9,6 mmol de K_2CO_3 . A mistura foi mantida sob agitação constante e banho de gelo, e gotejou-se 0,44 mL de brometo de prenila em atmosfera de N_2 . A reação foi acompanhada por cromatografia de camada delgada (CCD) e finalizada após 4h. A solução obtida foi submetida a uma partição com AcOEt/ H_2O para retirada do carbonato. O produto obtido foi purificado em coluna cromatográfica de gel de sílica (fase móvel: 95% Hex e 5% AcOEt), obtendo um cristal incolor de 45% de rendimento.



11.1

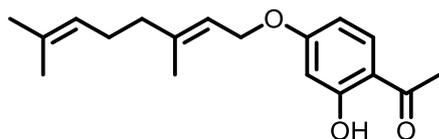
Síntese de **11.3 (a)**: solubilizou-se 3,2 mmol de 2,4-dihidroxiacetofenona em 10 mL de acetona e adicionou-se 9,6 mmol de K_2CO_3 . A mistura foi mantida sob agitação constante e banho de gelo, e gotejou-se 0,22 mL de iodo metano. A reação foi acompanhada por cromatografia de camada delgada (CCD) e finalizada após 8h. A solução obtida foi submetida a uma partição com AcOEt/ H_2O para retirada do carbonato. O produto obtido foi purificado em coluna cromatográfica de gel de sílica (fase móvel: 90% Hex e 10% AcOEt), obtendo um cristal branco de 30% de rendimento.



11.3

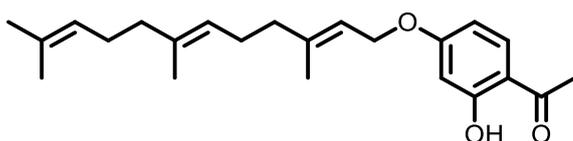
Síntese de **11.4 (a)**: solubilizou-se 3,2 mmol de 2,4-dihidroxiacetofenona em 10 mL de acetona e adicionou-se 9,6 mmol de K_2CO_3 .

A mistura foi mantida sob agitação constante e banho de gelo, e gotejou-se 0,69 mL de brometo de geranila. A reação foi acompanhada por cromatografia de camada delgada (CCD) e finalizada após 6h. A solução obtida foi submetida a uma partição com AcOEt/H₂O para retirada do carbonato. O produto obtido foi purificado em coluna cromatográfica de gel de sílica (fase móvel: 95% Hex e 5% AcOEt), obtendo um rendimento de 37%.



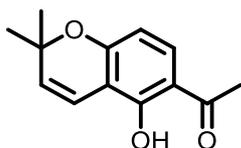
11.4

Síntese de **11.5 (a)**: solubilizou-se 3,2 mmol de 2,4-dihidroxiacetofenona em 10 mL de acetona e adicionou-se 9,6 mmol de K₂CO₃. A mistura foi mantida sob agitação constante e banho de gelo, e gotejou-se 0,87 mL de brometo de farnesila. A reação foi acompanhada por cromatografia de camada delgada (CCD) e finalizada após 6h. A solução obtida foi submetida a uma partição com AcOEt/H₂O para retirada do carbonato. O produto obtido foi purificado em coluna cromatográfica de gel de sílica (fase móvel: 95% Hex e 5% AcOEt) com um rendimento de 25%.



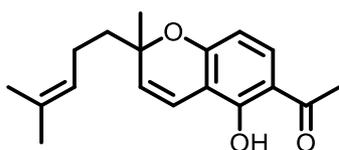
11.5

Síntese de **21**: solubilizou-se 3,2 mmol de 2,4-dihidroxiacetofenona em 10 mL de piridina. A mistura foi mantida sob agitação constante e banho de gelo, e gotejou-se 0,15 mL de 3-metil-but-2-enal. A solução foi colocada em refluxo á 150° C por 4 horas, após esse período foi adicionado 0,15 mL de 3-metil-but-2-enal, e novamente colocou-se em refluxo por mais 6 horas. A reação foi acompanhada por cromatografia de camada delgada (CCD) e finalizada após 11h. A solução obtida foi submetida a uma partição com AcOEt/H₂O e o produto obtido foi purificado em coluna cromatográfica de gel de sílica (fase móvel: 95% Hex e 5% AcOEt), obtendo um produto de rendimento 40%.



21

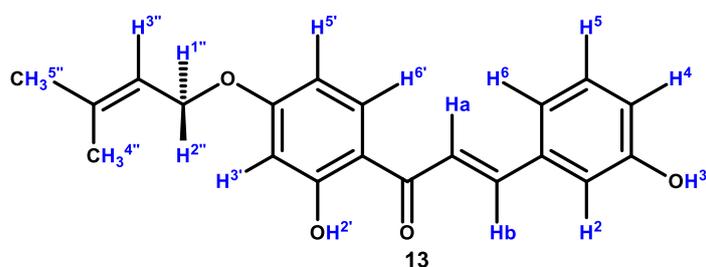
Síntese de **22**: solubilizou-se 3,2 mmol de 2,4-dihidroxiacetofenona em 10 mL de piridina. A mistura foi mantida sob agitação constante e banho de gelo, e gotejou-se 0,36 mL de citraldimetilacetal. A solução foi colocada em refluxo á 150° C por 4 horas, após esse período foi adicionado 0,36 mL de citraldimetilacetal, e novamente colocou-se em refluxo por mais 6 horas. A reação foi acompanhada por cromatografia de camada delgada (CCD) e finalizada após 11h. A solução obtida foi submetida a uma partição com AcOEt/H₂O para a retirada do carbonato e o produto obtido foi purificado em coluna cromatográfica de gel de sílica (fase móvel: 95% Hex e 5% AcOEt), obtendo um produto de rendimento 33%.



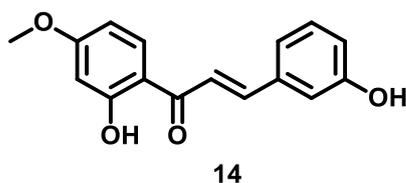
22

Síntese da 3-hidroxicordoína (**13**): solubilizou-se 1,02 mmol de **11.1** (a) em 15 mL de EtOH e, sob agitação constante e banho de gelo gotejou-se 2,04 mL de solução 60% de KOH. Adicionou-se 1,0 mmol de 3-hidroxibenzaldeído em 5 porções, com intervalos de 30 minutos entre cada adição para facilitar que o aldeído seja solubilizado. A reação foi acompanhada por CCD, e finalizada 48 h após a última adição do benzaldeído. O pH da solução foi ajustado com ácido acético glacial até 5. Verteu-se o produto bruto em gelo triturado, e o produto bruto foi particionado com acetato de etila e solução saturada de NaCl para extrair todo o produto para a fase orgânica. A substância foi purificada por coluna de gel de sílica (fase móvel 80% hexano e 20% AcOEt), cromatografia em coluna de permeação em gel (LH-20), utilizando EtOH como eluente e cromatografia em coluna de fase reversa (octadecilsilano, C18), utilizando como fase móvel 80% EtOH e 20% H₂O. O rendimento do composto foi de 8%.

RMN de ^1H (600 MHz; DMSO- d_6) δ_{H} em ppm (multiplicidade; J em Hz):
 1,78 (s; 3H) e 1,83 (s; 3H), 4,58 (d; 6,71; 1H), 5,50 (t; 6,65; 1H), 6,50 (m; 2,5;
 1H), 6,53 (m; 2,53 e 9; 1H), 6,89 (dd; 1,65 e 7,78; 1H), 7,25 (1H), 7,28 (dd;
 7,78; 1H), 7,32 (d; 7,72; 1H), 7,73 (d; 15,53; 1H), 7,90 (d; 15,45; 1H), 8,24
 (d; 9,06; 1H).

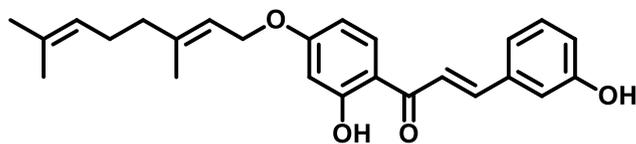


Síntese de **14**: solubilizou-se 0,9 mmol de **11.3** em 15 mL de EtOH e , sob agitação constante e banho de gelo. Gotejou-se 1,8 mL de solução 60% de KOH. Adicionou-se 0,9 mmol de 3-hidroxibenzaldeído em 5 porções, com intervalos de 30 minutos entre cada adição para facilitar que o aldeído seja solubilizado. A reação foi acompanhada por CCD, e finalizada 36h após a última adição do benzaldeído. O pH da solução foi ajustado com ácido acético glacial até 5, para protonar a *o*-OH e diminuir a solubilidade do produto em água. Verteu-se o produto bruto em gelo triturado, e o produto bruto foi particionado com acetato de etila e solução saturada de NaCl para extrair todo o produto para a fase orgânica.



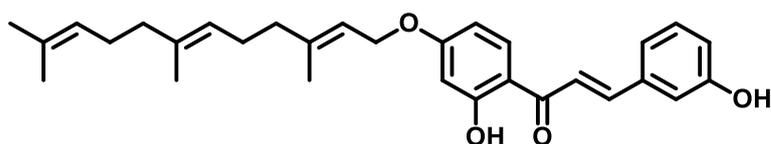
Síntese de **15**: solubilizou-se 0,64 mmol de **11.4** em 15 mL de EtOH e , sob agitação constante e banho de gelo. Gotejou-se 1,28 mL de solução 60% de KOH. Adicionou-se 0,64 mmol de 3-hidroxibenzaldeído em 5 porções, com intervalos de 30 minutos entre cada adição para facilitar que o aldeído seja solubilizado. A reação foi acompanhada por CCD, e finalizada 42h após a última adição do benzaldeído. O pH da solução foi ajustado com ácido acético glacial até 5, para protonar a *o*-OH e diminuir a solubilidade do

produto em água. Verteu-se o produto bruto em gelo triturado, e o produto bruto foi particionado com acetato de etila e solução saturada de NaCl para extrair todo o produto para a fase orgânica.



15

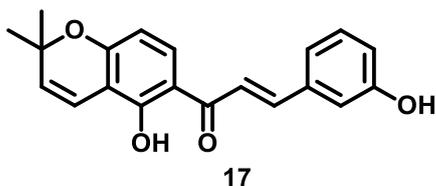
Síntese de **16**: solubilizou-se 0,35 mmol de **11.5** em 15 mL de EtOH e , sob agitação constante e banho de gelo. Gotejou-se 0,7 mL de solução 60% de KOH. Adicionou-se 0,35 mmol de 3-hidroxibenzaldeído em 5 porções, com intervalos de 30 minutos entre cada adição para facilitar que o aldeído seja solubilizado. A reação foi acompanhada por CCD, e finalizada 48h após a última adição do benzaldeído. O pH da solução foi ajustado com ácido acético glacial até 4, para protonar a *o*-OH e diminuir a solubilidade do produto em água. Verteu-se o produto bruto em gelo triturado, e o produto bruto foi particionado com acetato de etila e solução saturada de NaCl para extrair todo o produto para a fase orgânica.



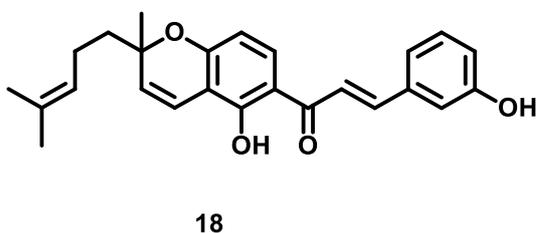
16

Síntese de **17**: solubilizou-se 0,9 mmol de **21** em 15 mL de EtOH e , sob agitação constante e banho de gelo. Gotejou-se 1,8 mL de solução 60% de KOH. Adicionou-se 0,9 mmol de 3-hidroxibenzaldeído em 5 porções, com intervalos de 30 minutos entre cada adição para facilitar que o aldeído seja solubilizado. A reação foi acompanhada por CCD, e finalizada 48h após a última adição do benzaldeído. O pH da solução foi ajustado com ácido acético glacial até 4, para protonar a *o*-OH e diminuir a solubilidade do produto em água. Verteu-se o produto bruto em gelo triturado, e o produto bruto foi particionado com acetato de etila e solução saturada de NaCl para extrair todo

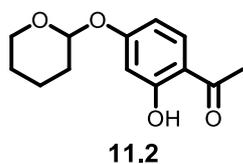
o produto para a fase orgânica.



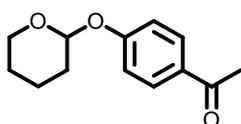
Síntese de **18**: solubilizou-se 0,58 mmol de **22** em 15 mL de EtOH e , sob agitação constante e banho de gelo. Gotejou-se 1,16 mL de solução 60% de KOH. Adicionou-se 0,58 mmol de 3-hidroxibenzaldeído em 5 porções, com intervalos de 30 minutos entre cada adição para facilitar que o aldeído seja solubilizado. A reação foi acompanhada por CCD, e finalizada 72h após a última adição do benzaldeído. O pH da solução foi ajustado com ácido acético glacial até 4, para protonar a *o*-OH e diminuir a solubilidade do produto em água. Verteu-se o produto bruto em gelo triturado, e o produto bruto foi particionado com acetato de etila e solução saturada de NaCl para extrair todo o produto para a fase orgânica.



Síntese de acetofenona protegida **11.2**: solubilizou-se 3,2 mmol de 2,4-hidroxiacetofenona em 10 mL de diclorometano e adicionou-se 0,32 mmol de PPTS. A mistura foi mantida sob e agitação constante e banho de gelo, e acrescentou-se 3,9 mmol de THP. A reação foi acompanhada por CCD e finalizada após 18 h. No work- up, a solução obtida foi submetida a uma partição com CH₂Cl₂. O produto obtido foi purificado em coluna cromatográfica de gel de sílica (fase móvel: 80% Hex e 20% AcOEt), obtendo um óleo incolor.

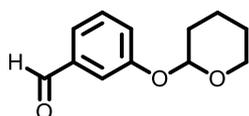


Síntese de **26.1**: solubilizou-se 3,2 mmol de 4- hidroxiacetofenona em 10 mL de diclorometano e adicionou-se 0,36 mmol de PPTS. A mistura foi mantida sob agitação constante e banho de gelo, e acrescentou-se 4,4 mmol de THP. A reação foi acompanhada por CCD e finalizada após 16 h. No work- up, a solução obtida foi submetida a uma partição com CH₂Cl₂. O produto obtido foi purificado em coluna cromatográfica de gel de sílica (fase móvel: 80% Hex e 20% AcOEt), obtendo um sólido esbranquiçado.



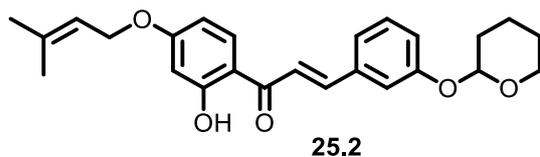
26.1

Síntese de **25.1**: solubilizou-se 3,2 mmol de 3-hidroxibenzaldeído em 10 mL de diclorometano e adicionou-se 0,4 mmol de PPTS. A mistura foi mantida sob agitação constante e banho de gelo, e acrescentou-se 4,8 mmol de THP. A reação foi acompanhada por CCD e finalizada após 24 h. No work- up, a solução obtida foi submetida a uma partição com CH₂Cl₂. O produto obtido foi purificado em coluna cromatográfica de gel de sílica (fase móvel: 80% Hex e 20% AcOEt), obtendo um óleo amarelado.

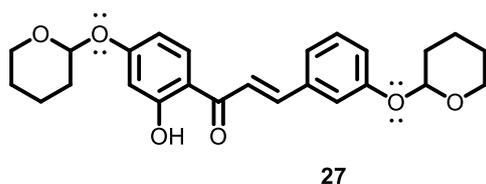


25.1

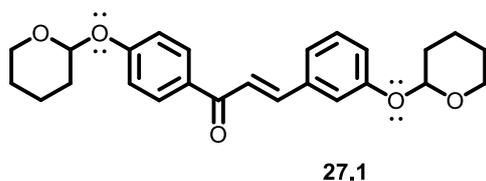
Síntese de **25.2**: solubilizou-se 1,02 mmol de **11.1** em 15 mL de EtOH e , sob agitação constante e banho de gelo. Gotejou-se 1,8 mL de solução 60% de KOH. Adicionou-se 1,34 mmol de **25.1** em 5 porções, com intervalos de 30 minutos entre cada adição. A reação foi acompanhada por CCD, e finalizada 24h após a última adição do benzaldeído. O pH da solução foi ajustado com ácido acético glacial até 5. Verteu-se o produto bruto em gelo triturado, e o produto bruto foi particionado com acetato de etila e solução saturada de NaCl para extrair todo o produto para a fase orgânica. O produto obtido foi purificado em coluna cromatográfica de gel de sílica (fase móvel: 80% Hex, 10% AcOEt, 10% acetona), obtendo um sólido amarelado.



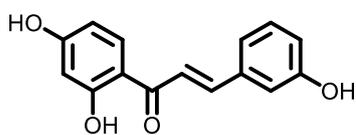
Síntese de **27**: solubilizou-se 1,07 mmol de **11.2** em 15 mL de EtOH e , sob agitação constante e banho de gelo. Gotejou-se 1,5 mL de solução 60% de KOH. Adicionou-se 1,13 mmol de **25.1** em 5 porções, com intervalos de 30 minutos entre cada adição. A reação foi acompanhada por CCD, e finalizada 24h após a última adição do benzaldeído. O pH da solução foi ajustado com ácido acético glacial até 5. Verteu-se o produto bruto em gelo triturado, e o produto bruto foi particionado com acetato de etila e solução saturada de NaCl para extrair todo o produto para a fase orgânica. O produto obtido foi purificado em coluna cromatográfica de gel de sílica (fase móvel: 80% Hex, 10% AcOEt, 10% acetona), obtendo um sólido amarelado.



Síntese de **27.1**: solubilizou-se 1,5 mmol de **26.1** em 15 mL de EtOH e , sob agitação constante e banho de gelo. Gotejou-se 2,2 mL de solução 60% de KOH. Adicionou-se 1,23 mmol de **23.1** em 5 porções, com intervalos de 30 minutos entre cada adição. A reação foi acompanhada por CCD, e finalizada 24h após a última adição do benzaldeído. O pH da solução foi ajustado com ácido acético glacial até 5. Verteu-se o produto bruto em gelo triturado, e o produto bruto foi particionado com acetato de etila e solução saturada de NaCl para extrair todo o produto para a fase orgânica. O produto obtido foi purificado em coluna cromatográfica de gel de sílica (fase móvel: 80% Hex, 10% AcOEt, 10% acetona), obtendo um sólido amarelado.

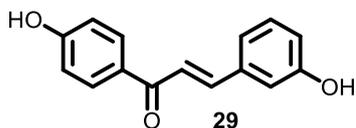


Síntese de **28**: solubilizou-se 0,5 mmol da chalcona **27** em 2 mL de uma mistura de MeOH e THF (proporção 1:1) sob agitação constante e banho de gelo. Gotejou-se 1 mL de uma solução de HCl (1 mol L⁻¹). 10 minutos depois, retirou-se o banho de gelo e o balão de reação foi acoplado a um sistema de refluxo. A reação foi acompanhada por CCD e finalizada em aproximadamente 2h. Foi realizada uma partição com acetato de etila e solução saturada de NaCl para extrair todo o produto para a fase orgânica. Realizou-se uma coluna cromatográfica de gel de sílica (fase móvel: 70% Hex, 10% AcOEt e 10%), obtendo um sólido amarelado de rendimento 15%.



28

Síntese de **29**: solubilizou-se 0,5 mmol da chalcona **27.1** em 2 mL de uma mistura de MeOH e THF (proporção 1:1) sob agitação constante e banho de gelo. Gotejou-se 1 mL de uma solução de HCl (1 mol L⁻¹). 10 minutos depois, retirou-se o banho de gelo e o balão de reação foi acoplado a um sistema de refluxo. A reação foi acompanhada por CCD e finalizada em aproximadamente 1h30. Foi realizada uma partição com acetato de etila e solução saturada de NaCl para extrair todo o produto para a fase orgânica. Realizou-se uma coluna cromatográfica de gel de sílica (fase móvel: 70% Hex, 10% AcOEt e 10%), obtendo um sólido amarelado de rendimento 19%.



29

6.2 Ensaios biológicos

6.2.1 Ensaios antibacterianos e antimicobacterianos

A concentração inibitória mínima (CIM₉₀) contra espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas foi determinada em triplicata, utilizando o

método de microdiluição em caldo em 96 microplacas. **3HC** foi solubilizada em DMSO e diluídas com caldo Mueller-Hinton ajustado para cátions (Difco). A concentração dos inóculos foi ajustada para 5×10^5 UFC/mL. As placas foram incubadas a 37°C duante 24 horas. Como controle negativo, foi utilizado DMSO e a Tetraciclina (Merk) como controle positivo. Um inóculo foi incluído para monitorar o crescimento bacteriano. A CIM foi definida como a menor concentração do agente microbiano capaz de inibir o crescimento bacteriano.

6.2.2 Ensaio antituberculoso

O ensaio foi realizado em triplicata. As amostras foram solubilizadas em DMSO e diluídas em caldo Middlebrook 7H9 (Difco), suplementado com ácido oleico, albumina, dextrose e catalase (OADC), para obter uma faixa de concentração final de 100 a 1 µM. A suspensão da cepa *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC 27294) foi cultivada em no mesmo caldo e suplementada da mesma maneira. Quando a cultura obteve uma turbidez do padrão McFarland N^o. 1, ela foi ajustada em $3-5 \times 10^5$ UFC/mL. Assim, 100 µL de inóculo foram adicionados a cada poço em uma microplaca de 96 poços com 100 µL da solução da amostra. As placas foram incubadas por 7 dias a 37° C e 5% de CO₂. Foi adicionada resazurina (30 µL de 0,01%). A fluorescência dos poços foi medida após 24 h no equipamento Cytation 3 (BioTek, Winooski, VT, EUA). A CIM foi definida como a concentração mais baixa que inibiu em 90% o crescimento de *M. tuberculosis*. Isoniazida e meio de cultura foram usados como controles positivo e negativo, respectivamente.

7 REFERÊNCIAS

AVILA, H. P.; SMANIA, E. F. A.; DELLE-MONACHE, F.; SMANIA, A. J. R. Structure-activity relationship of antibacterial chalcones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 9790–9794, 2008.

BLOEMBERG, G. V. et al. Acquired Resistance to Bedaquiline and Delamanid in Therapy for Tuberculosis. **N.Engl. J. Med.**, v. 373, p. 1986–1988, 2015.

BATOVSKA, D. I.; TODOROVA, I. T. Trends in utilization of the

pharmacological potential of chalcones. **Curr.Clin. Pharmacol.**, v. 5, p.1–29, 2010.

BOTTA, B. et al. Prenylated flavonoids: pharmacology and biotechnology. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 713–739, 2005.

BRUYERE, C. et al. growth inhibitory activities of oxyprenylated and non-prenylated naturally occurring phenylpropanoids in cancer cell lines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, p. 4173–4178, 2011.

CHIMENTI, F. et al. Synthesis, molecular modeling studies and selective inhibitory activity against MAO of *N*1-propanoyl-3,5-diphenyl-4,5-dihydro-(1*H*)-pyrazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p; 2262–2267, 2008.

DAI, J. K.; DAN, W. J. Recent developments of chalcones as potential antibacterial agents in medicinal chemistry. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 187, 2020.

DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. **John Wiley & Sons LTD**, 2^a ed., 2009.

DI CARLO, G. et al. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sci.**, v. 65, p. 337–353, p. 1999.

DO NASCIMENTO, M.C. and MORS, W.B. Chalcones of the root bark of *Derris sericea*. **Phytochemistry**, v. 11, p. 3023–3028, 1972.

EPIFANO, F. et al. Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. **Phytochemistry**, v. 68, p. 939–953, 2007.

EPIFANO, F. et al. Nelumal A, the active principle of *Ligularia nelumbifolia* is a novel farnesoid X receptor agonist. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, p.3130–3135, 2012.

EVANGELOPOULOS, D.; MCHUGH, T. D. Improving the Tuberculosis Drug Development Pipeline. **Chem.Biol. Drug Des.**, v. 86, p. 951–960, 2015.

FELDMAN, M. et al. Antibacterial and anti-inflammatory activities of 4-hydroxycordoin: potential therapeutic benefits. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 26–31, 2011.

FIORITO, S. et al. Recent acquisitions on oxyprenylated secondary metabolites as anti-inflammatory agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 153, p. 116–122, 2017.

FRIIS-MOLLER, A. et al. *In vitro* antimycobacterial and antilegionella activity of licochalcone A from Chinese licorice roots. **Planta Medica**, v. 68,

p. 416–419, 2002.

FONSECA, B. F. et al. Derricin and derricidin inhibit Wnt-catenin signaling and suppress colon cancer cell growth *in vitro*. **Plos One**, v. 10, E0120919, 2015.

FLORES, S. et al. Synthesis and evaluation of novel oxyalkylated derivatives of 2',4'-dihydroxychalcone as anti-oomycete agents against bronopol resistant strains of *Saprolegnia sp.* **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p. 1–12, 2016.

GENOVESE, S. et al. Prenyloxyphenylpropanoids as a novel class of anticonvulsive agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, p. 5419–5422, 2009.

KUETE, V. et al. Evaluation of flavonoids from *Dorstenia barteri* for their antimycobacterial, antigonorrheal and anti-reverse transcriptase activities. **Acta Trop.**, v.116, p. 100-104, 2010.

LIU, H.L.; JIANG, W.B. and XIE, M.X. Flavonoids: Recent Advances as Anticancer Drugs. **Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery**, v. 5, p. 152–164, 2010.

LUPI, A.; DELLE MONACHE, G.; DELLE MONACHE, F. Synthetic analogs of natural prenylated and chromenes chalcones. **National Library Medicine, Farmaco Science**, v. 32, p. 261–269, 1977.

MESSIER, C. et al. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation and yeast-hyphal transition by 4-hydroxycordoin. **Phytomedicine**, v. 18, p. 380–383, 2011.

NABEKURA, T. et al. Citrus auraptene induces drug efflux transporter P-glycoprotein expression in human intestinal cells. **Food & Function**, v. 11, p. 5017–5023, 2020.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à Espectroscopia**. 4a Edição ed. São Paulo: CENGAGE Learning, 2010.

PHAN, C. W.; DAVID, P.; SABARATNAM, V. Edible and medicinal mushrooms: emerging brain food for the mitigation of neurodegenerative diseases. **Journal of Medicinal Food**, v. 20, p. 1–10, 2017.

REDDY, V. B. M. et al. Structure–activity relationships of chalcone analogs as potential inhibitors of ADP- and collagen-induced platelet aggregation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 7358–7370, 2008.

SAHU, N. K. et al. Exploring pharmacological significance of chalcone scaffold: a review. **Curr. Med. Chem.**, v. 19, p. 209–225, 2012.

SHIVAHARE, R. et al. Synthesis, structure-activity relationships, and biological studies of chromenochalcones as potential antileishmanial agents. **J. Med. Chem.**, v. 57, p. 3342–3357, 2014.

TADIGOPULLA, N. et al. Synthesis and insight into the structure-activity relationships of chalcones as antimalarial agents. **J. Med. Chem.**, v. 56, p. 31–45, 2013.

WANG, H.M. et al. Synthesis and anti-cancer activity evaluation of novel prenylated and geranylated chalcone natural products and their analogs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 92, p. 439–448, 2015.

WHO, World Health Organization. **Global Tuberculosis Report**. Geneva: 2017. Disponível em: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en. Acesso em: 25 de junho de 2020.

WHO, World Health Organization. **Global Tuberculosis Report**. Geneva: 2021. Disponível em: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en. Acesso em: 25 junho de 2022.

WHO, World Health Organization. **Global 2020 antibacterial agents in clinical and preclinical development: an overview and analysis**. Geneva: 2020. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240021303>. Acesso em: 25 junho de 2022.

ZHANG, F. et al. Inhibition of drug-metabolizing enzymes by Jingyin granules: implications of herb–drug interactions in antiviral therapy. **Acta Pharmacologica Sinica**, 2021. DOI: 10.1038/s41401-021-00697-2

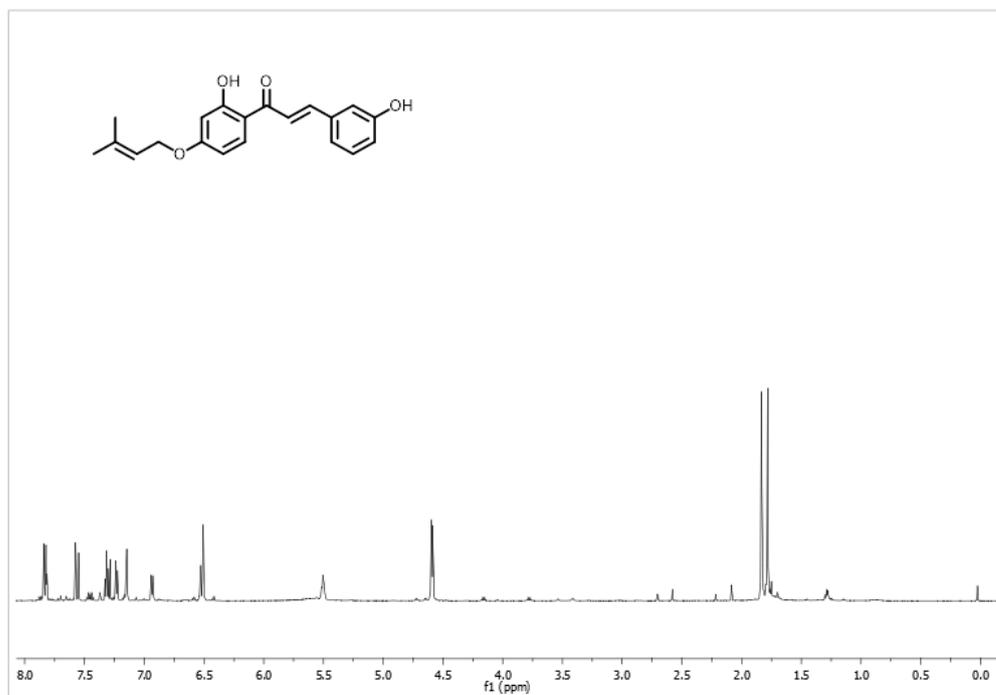
ZHANG, J. et al. Chalcones derivatives as potent Cell division cycle 25B phosphatase inhibitors. **Pharmacological Reports**, v. 66, p. 515–519, 2014.

ZHUANG, C. et al. Chalcone: A Privileged Structure in Medicinal Chemistry. **Chem.Rev.**, v. 117, p. 7762–7810, 2017.

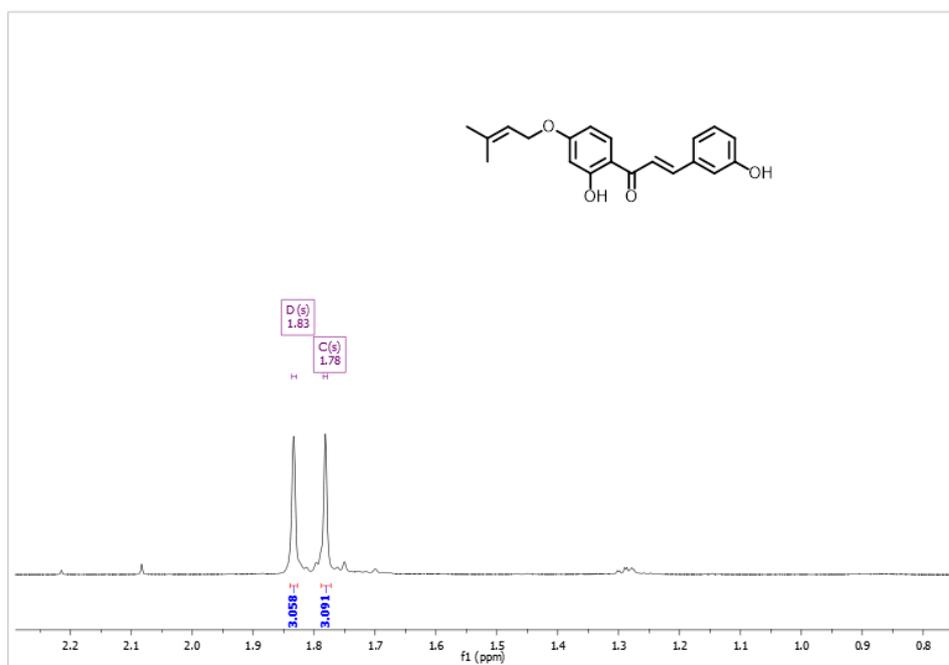
8 ANEXOS

8.1 Espectros de RMN de ^1H

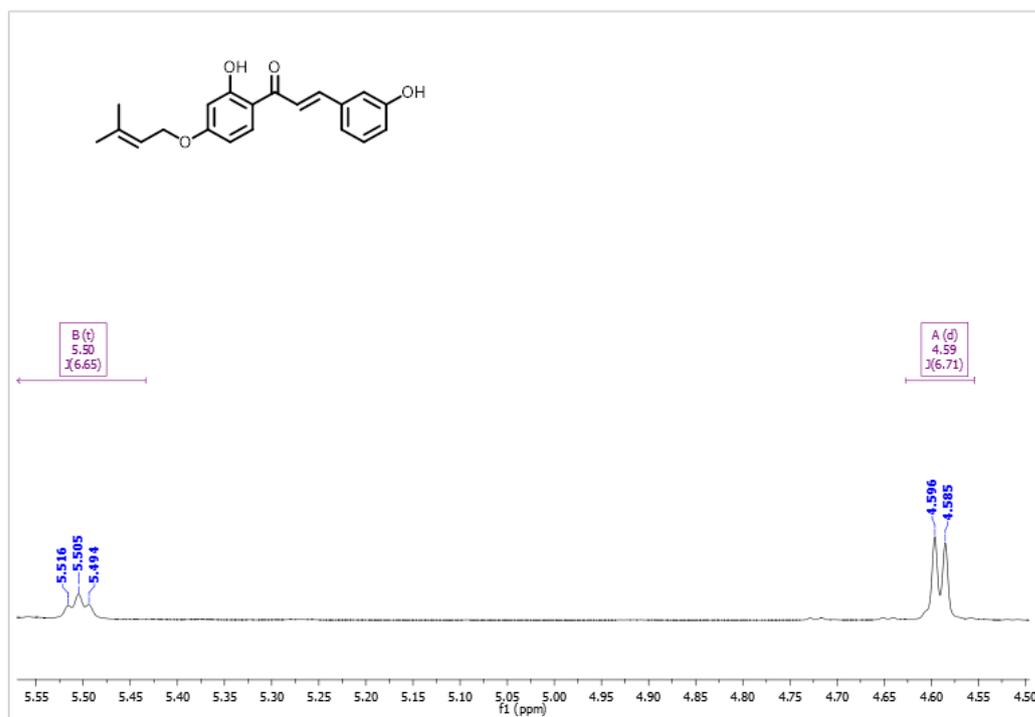
Anexo 1. Espectro de RMN de ^1H de **3HC** (600 MHz; $\text{DMSO-}d_6$).



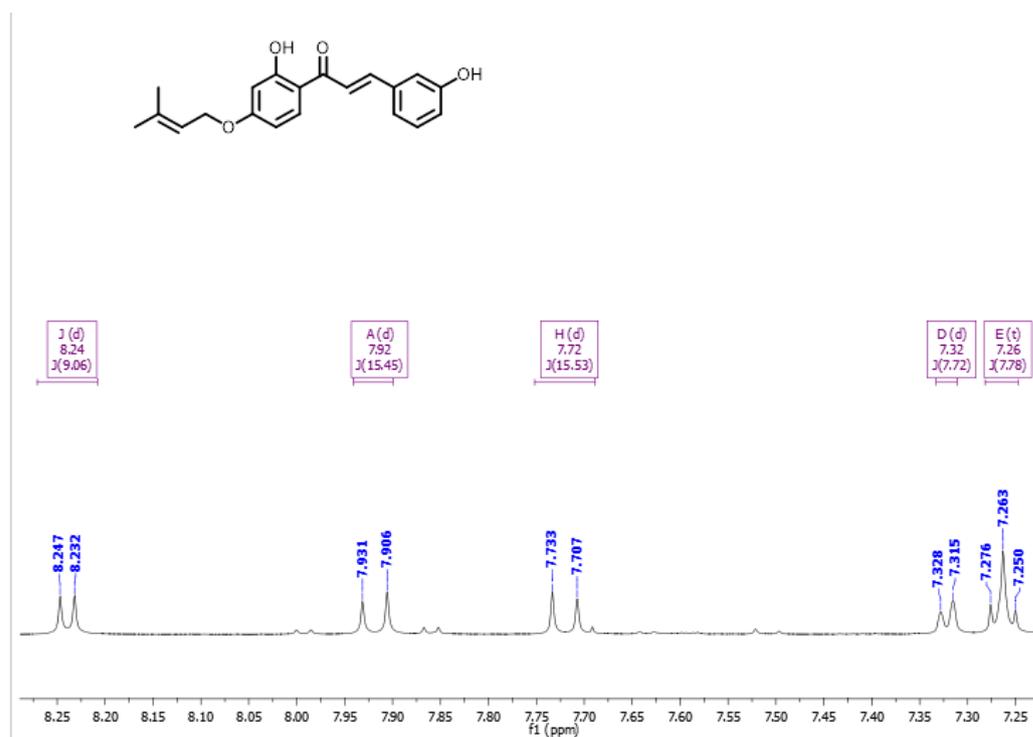
Anexo 2. Espectro de RMN de ^1H de **3HC** – Ampliado de 0,8 a 2,2 ppm (600 MHz; $\text{DMSO-}d_6$).



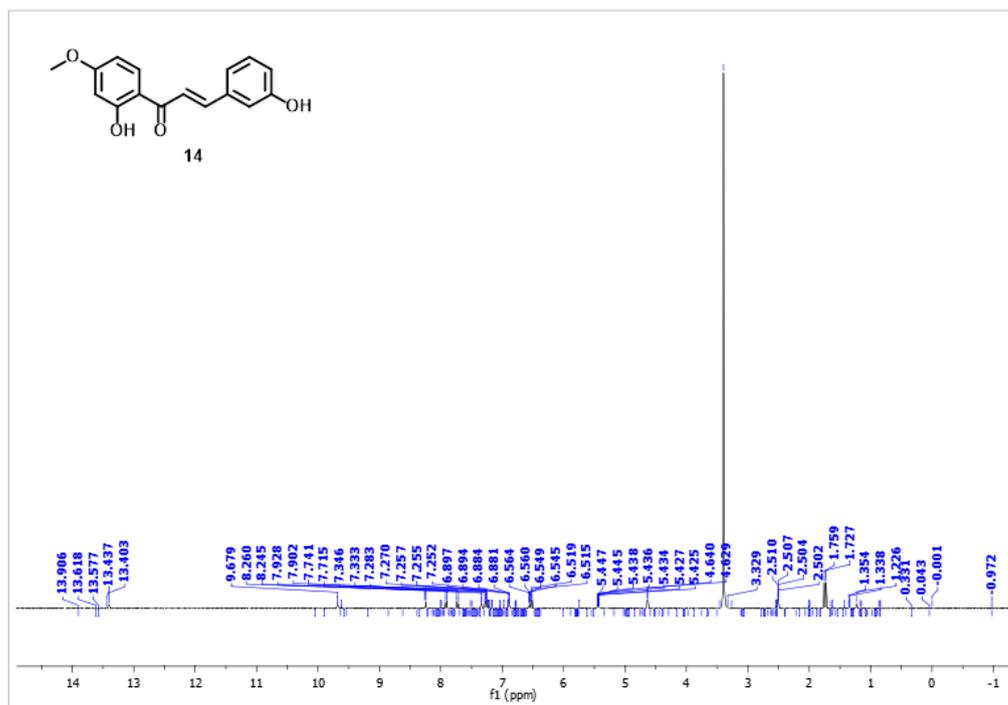
Anexo 3. Espectro de RMN de ^1H de **3HC** – Ampliado de 4,50 a 5,55 ppm (600 MHz; $\text{DMSO-}d_6$).



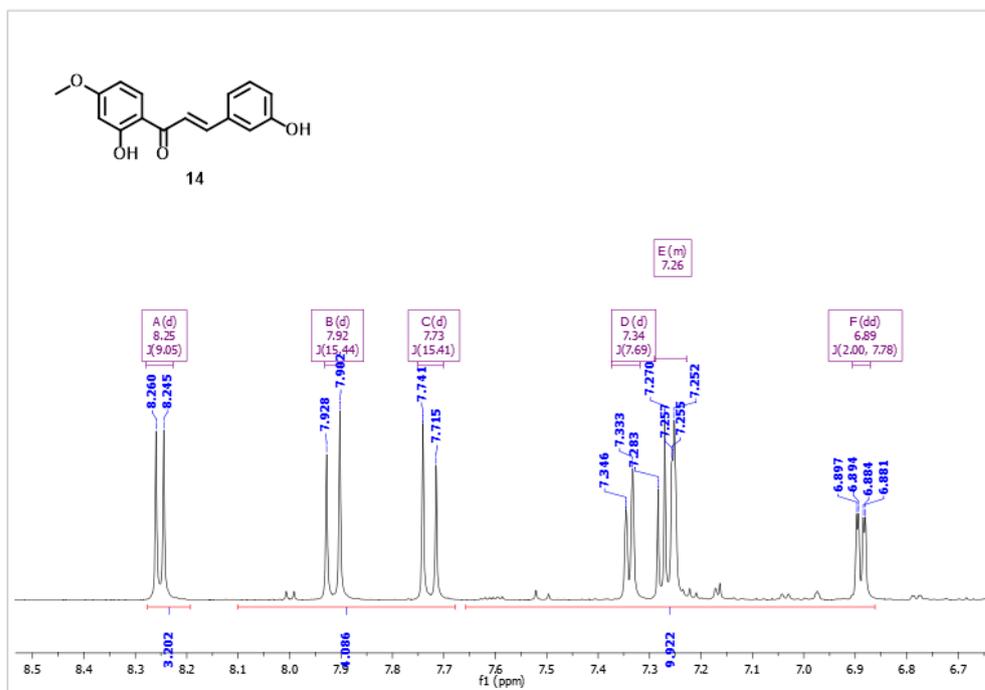
Anexo 4. Espectro de RMN de ^1H de **3HC** – Ampliado de 7,25 a 8,25 ppm (600 MHz; $\text{DMSO-}d_6$).



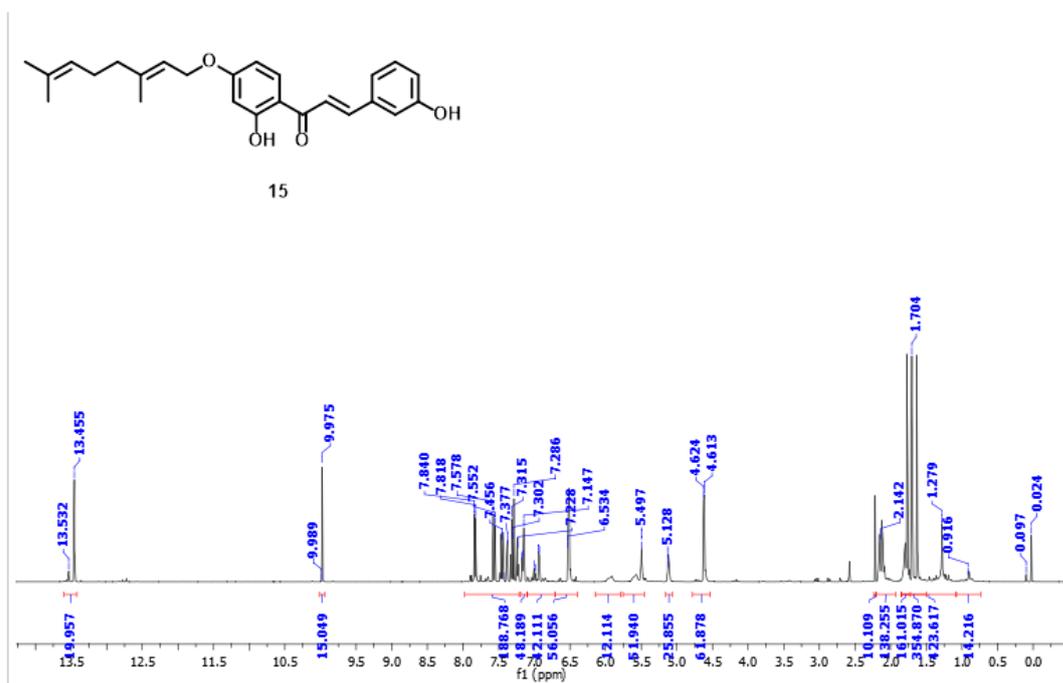
Anexo 5. Espectro de RMN de ^1H de **14** (600 MHz; $\text{DMSO-}d_6$).



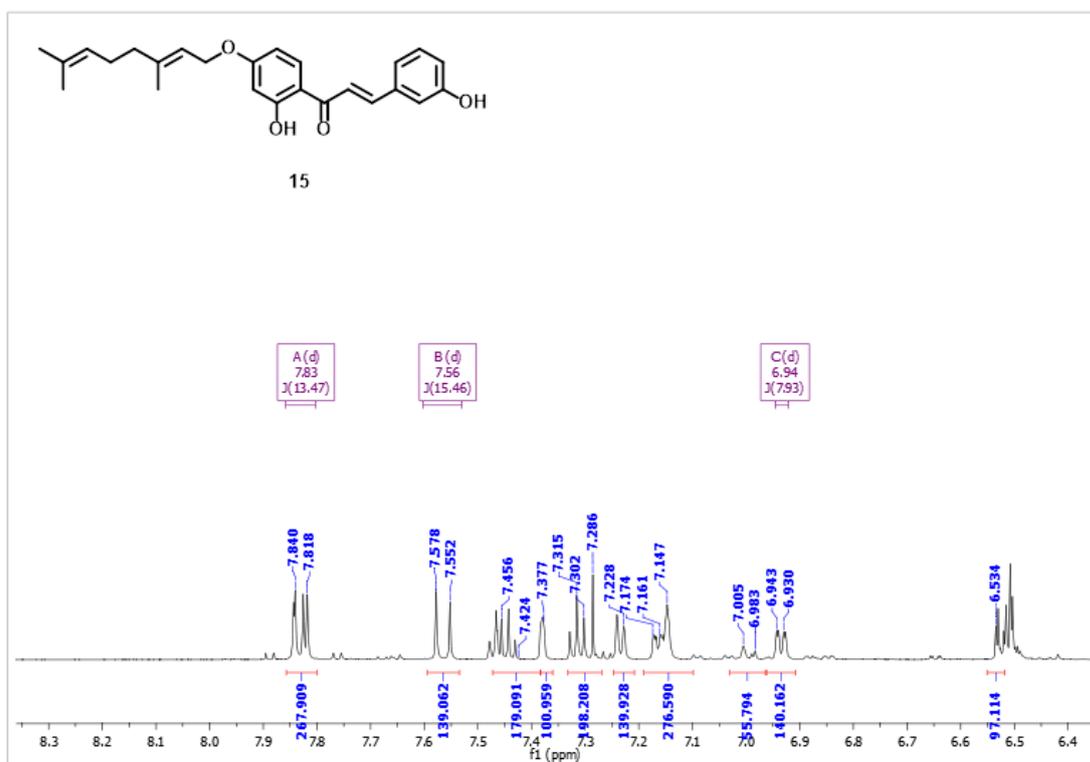
Anexo 6. Espectro de RMN de ^1H de **14** – Ampliado de 6,75 a 8,05 ppm (600 MHz; $\text{DMSO-}d_6$).



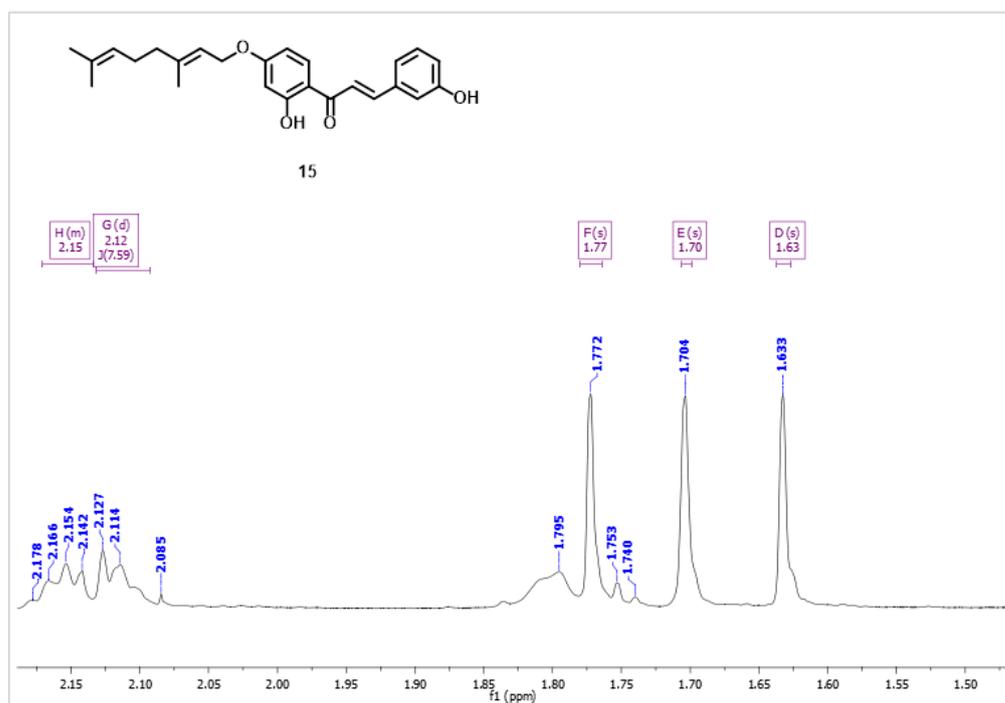
Anexo 7. Espectro de RMN de ^1H de **15** (CDCl_3 , 600 MHz).



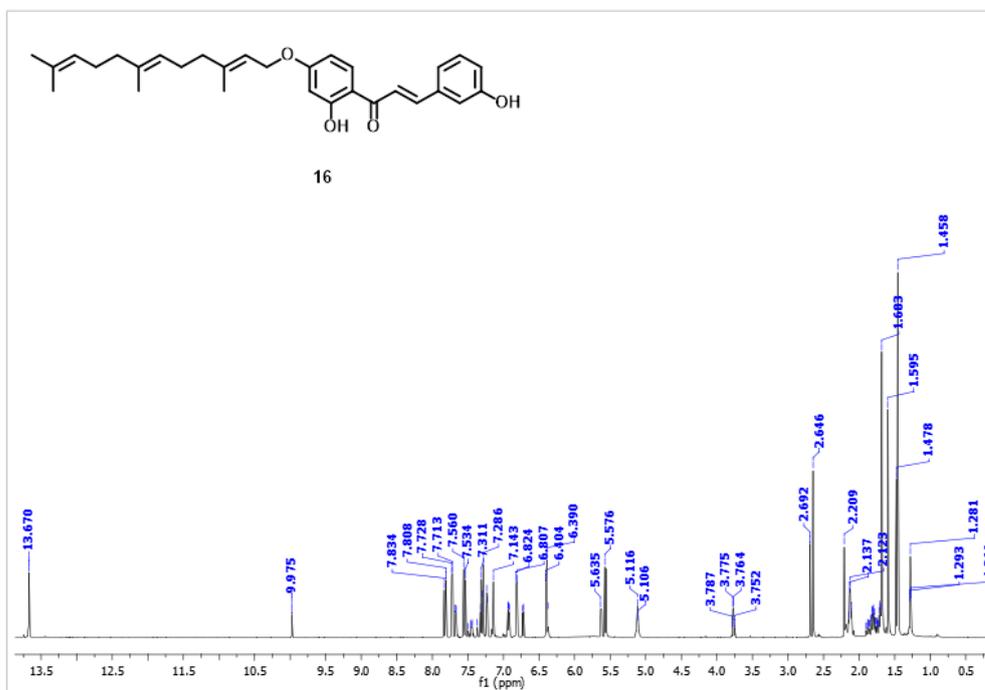
Anexo 8. Espectro de RMN de ^1H de **15** – Ampliado de 6,4 a 8,3 ppm (CDCl_3 , 600 MHz).



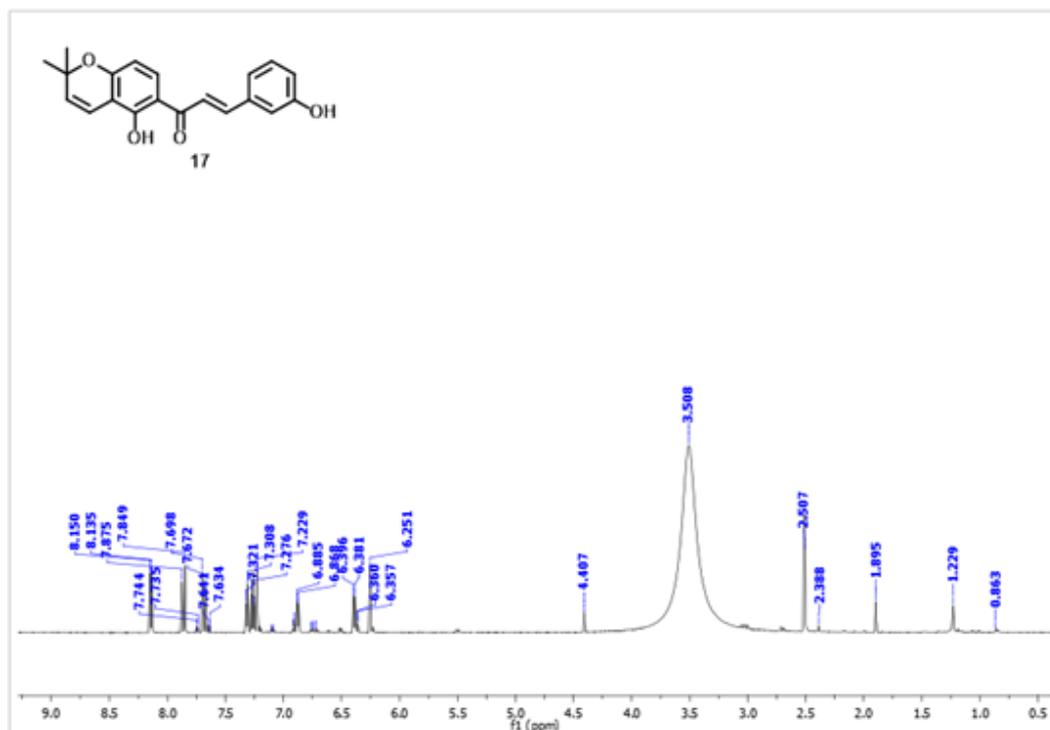
Anexo 9. Espectro de RMN de ^1H de **15** – Ampliado de 2,1 a 1,54 ppm (CDCl_3 , 600 MHz).



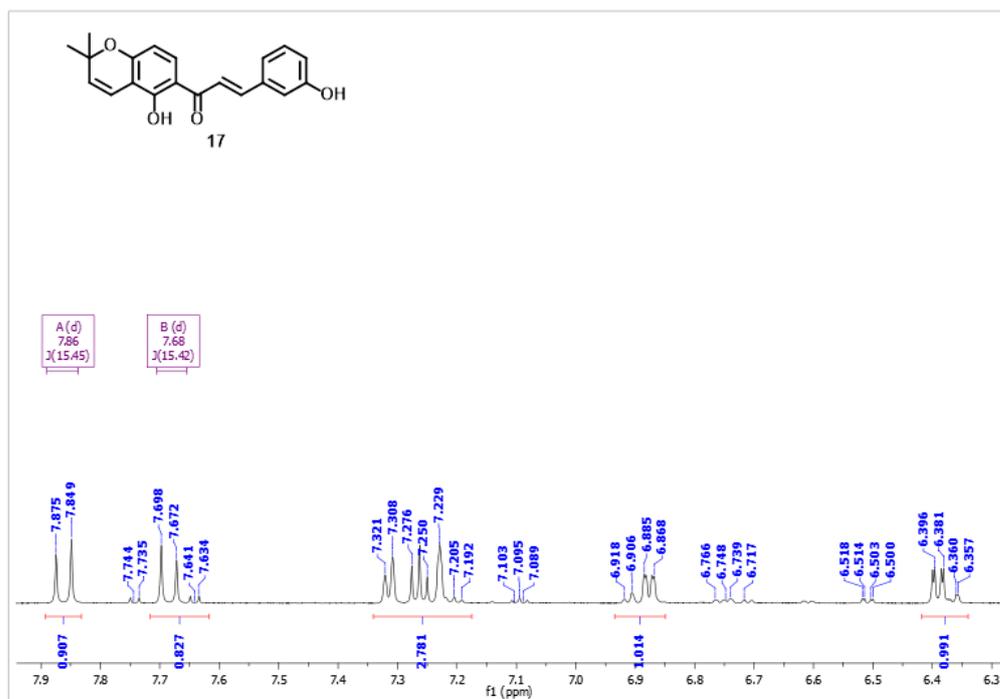
Anexo 10. Espectro de RMN de ^1H de **16** (CDCl_3 , 600 MHz).



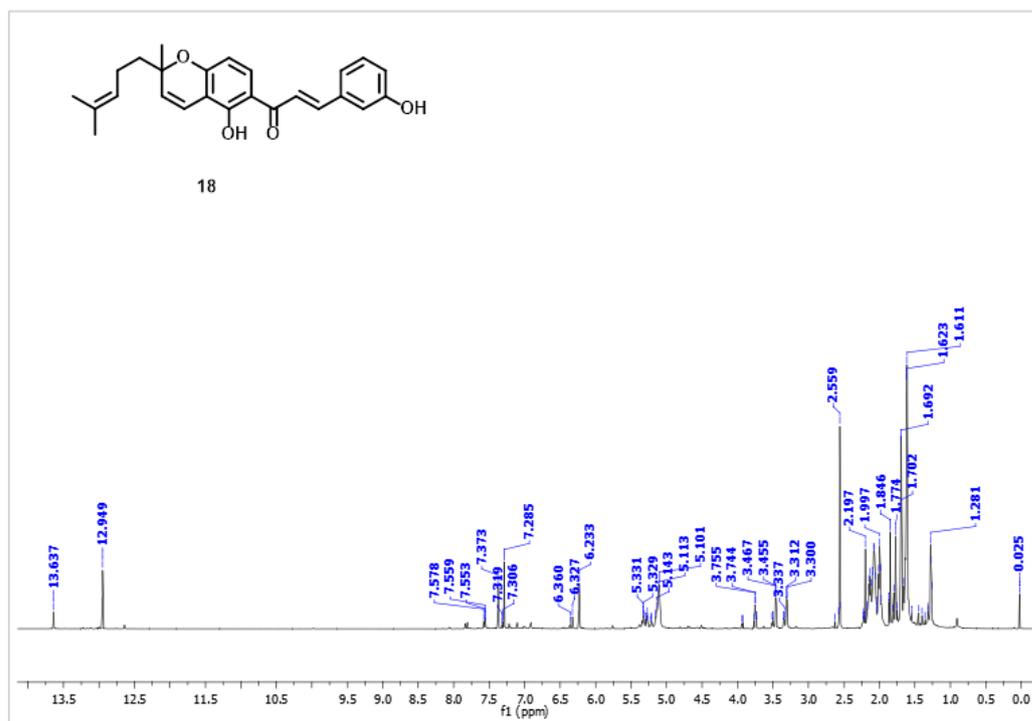
Anexo 13. Espectro de RMN de ^1H de **17** (CDCl_3 , 600 MHz).



Anexo 14. Espectro de RMN de ^1H de **17** - Ampliado de 6,3 a 7,9 ppm (600 MHz; $\text{DMSO-}d_6$).



Anexo 15. Espectro de RMN de ^1H de **18** (600 MHz; DMSO- d_6).



Anexo 16. Espectro de RMN de ^1H de **18** – Ampliado de 6,2 a 8,2 ppm (600 MHz; DMSO- d_6).

