



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

**Síntese e Atividade Anti-HCV, Anti-*Candida* e Antibacteriana de
Nitrochalconas**

ÉDER RAMOS PAGANINI

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

2016

ÉDER RAMOS PAGANINI

**Síntese e Atividade Anti-HCV, Anti-*Candida* e Antibacteriana de
Nitrochalconas**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas como
parte do requisito para a obtenção do título
de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Luis Octavio Regasini

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Carolina Gomes Jardim

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

2016

Paganini, Éder Ramos.

Síntese e atividade anti-HCV, anti-Candida e antibacteriana de nitrochalconas / Éder Ramos Paganini. -- São José do Rio Preto, 2016
97 f. : il., tabs.

Orientador: Luis Octavio Regasini

Coorientador: Ana Carolina Gomes Jardim

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Química farmacêutica. 2. Chalconas. 3. Agentes antivirais.
4. Antimicóticos. 5. Agentes antibacterianos. 6. Hepacivirus. 7. Cândida.
I. Regasini, Luis Octavio. II. Jardim, Ana Carolina Gomes. III. Universidade
Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e
Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 615.07

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

ÉDER RAMOS PAGANINI

Síntese e Atividade Anti-HCV, Anti-*Candida* e Antibacteriana de Nitrochalconas

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas como parte do requisito para a obtenção do título de Mestre em Química.

São José do Rio Preto, 11 de março de 2016

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luis Octavio Regasini

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP

Prof. Dr. Diogo Paschoalini Volanti

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP

Profa. Dra. Margarete Teresa Gottardo de Almeida.

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP

Dedico à minha mãe Neuza Ap. Ramos

Paganini, ao meu pai José Genor

Paganini e à minha irmã Iara Ramos

Paganini, pelo incentivo e apoio
incondicional que sempre me deram.

Agradecimentos

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dando força interior para superar as dificuldades.

A minha família, minha mãe Neuza, meu pai José Genor e minha irmã Iara, pelo incentivo, carinho, amor paciência e pela compreensão nos momentos de minha ausência.

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Luis Octavio Regasini, por ter confiado em mim, por ter me mostrado esse novo caminho da química medicinal, pela orientação e toda ajuda durante o meu mestrado.

A todos os meus amigos e companheiros que estão e que passaram pelo Laboratório de Química Verde e Medicinal, por caminharem comigo, me ajudarem e me ensinarem; principalmente à Mariana Bastos, Carlos Polaquini, Gabriela Ayusso e Beatriz Carvalho.

A Profa. Dra. Paula Rahal, por todo o suporte e apoio na realização dos experimentos com HCV. Aos alunos Carina Machado Pereira, Jacqueline Farinha Shimizu e Guilherme Rodrigues Fernandes Campos pela realização dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen e a Dra. Janaina Orlandi Sardi pelo apoio e realização dos experimentos com as *candidas* e com as bactérias.

Ao Fabio pela realização dos espectros de RMN, e por estar sempre pronto em nos atender.

Gostaria de agradecer a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Pró-Reitoria de Pesquisa da Unesp (PROPe-Unesp), a Pró-Reitoria de Pós-Graduação (PROPG-Unesp) e a Pró-Reitoria de Administração (PRAd-Unesp).

Gostaria de agradecer ao Ronaldo Nunes, Mariana Rojas, Juliene Médis, Vinicius Xavier, Danilo de Carvalho, Lucas Viana e Fernando Ribeiro, que sempre me apoiaram, e muito me ajudaram, obrigado!

Resumo

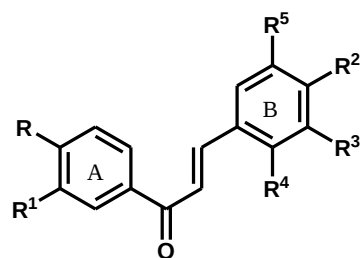
Chalconas são flavonoides de cadeia aberta com uma cetona α,β -insaturada, a qual separa duas subunidades fenílicas (anéis A e B). Estas substâncias podem ser sintetizadas pela condensação de Claisen-Schmidt e apresentam inúmeras atividades biológicas, tais como; antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e antitumoral. O presente trabalho objetivou a síntese de uma série de 21 chalconas contendo o grupo nitro em diferentes posições nos anéis A e B. A síntese das substâncias foi realizada pela condensação aldólica sob catálise com ácido sulfúrico e ácido acético como solvente, demonstrando rendimentos que variaram de 63 a 97%. As purificações das nitrochalconas foram realizadas por técnicas cromatográficas, tais como; Cromatografia em Coluna de Fase Normal (gel de sílica) e Cromatografia de Permeação em Gel (Sephadex, LH-20). A confirmação estrutural das substâncias foi realizada por meio da análise dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C . A Hepatite C se apresenta como uma doença de grande incidência na população mundial e pode levar a carcinoma hepatocelular. Essa doença é causada pelo vírus da Hepatite C (HCV). A substância **E.08** (2-hidroxi-5-flúor-4'-nitrochalcona) inédita na literatura, foi capaz de inibir a replicação do HCV em 30% a $2\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$, segundo ensaio de luciferase. A candidíase é uma infecção fúngica causada por leveduras do gênero *Candida*. A substância **E.23** (3'-nitrochalcona) demonstrou atividade anti-*Candida*, exibindo valores de CIM de $0,97\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ contra *C. albicans*. As bactérias são responsáveis por inúmeras doenças ao homem. A substância **E.47** (2-hidroxi-5-nitrochalcona) demonstra atividade anti-*Staphylococcus aureus* e anti-*Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (MRSA), exibindo valores de CIM de 0,97 e $1,95\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente.

Palavras-chave: Chalcona, Flavonoide, Antiviral, Antifúngico e Antibacteriano.

Abstract

Chalcones are opened-chain flavonoids, bearing an α,β -unsaturated ketone, which separates two phenyl subunits (rings A and B). These 21 compounds have been synthesized by Claisen-Schmidt condensation reactions. They exhibit several biological activities, such as antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial and antitumoral. The current work aimed the synthesis of two series of 21 chalcones containing nitro group at A and B rings. Synthetic procedures used aldol condensation under sulfuric acid catalysis and acetic acid as solvent, with yield ranging from 63 to 97%. Purification of crude products was performed over chromatography columns; normal phase (silica gel) and gel permeation (Sephadex, LH-20). Structural identification was carried out by Nuclear Magnetic Resonance spectra analysis (NMR ^1H and NMR ^{13}C). Hepatitis C is a disease with high incidence around world, and can conduce to hepatocellular carcinoma. This disease is caused by HCV (Hepatitis C Virus). Compound **E.08** (2-hydroxy-5-fluoro-4'-nitrochalcone) inhibited 30% of HVC replication at $2\ \mu\text{mol L}^{-1}$. Candidiasis is a yeast infection caused by *Candida*, mainly *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* and *C. parapsilosis*. Compound **E.23** (3'-nitrochalcone) demonstrated anti-*Candida* activity, exhibiting MIC value of $0.97\ \mu\text{mol L}^{-1}$ against *C. albicans*. Bacteria are responsible by several human diseases. Compound **E.47** (2-hydroxy-5-nitrochalcone) demonstrated anti-*Staphylococcus aureus* and anti-methicilin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) activities, presenting MIC values of 0.97 and $1.95\ \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively.

Keywords: Chalcone, Flavonoid, Antiviral, Antifungal and Antibacterial.



CÓDIGO	R	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
E.02	NO ₂	H	OH	H	H	H
E.03	NO ₂	H	H	OH	H	H
E.06	NO ₂	H	OH	OH	H	H
E.07	NO ₂	H	H	H	OH	CH ₃
E.08	NO ₂	H	H	H	OH	F
E.10	NO ₂	H	Cl	H	H	H
E.11	NO ₂	H	Br	H	H	H
E.12	H	NO ₂	F	H	H	H
E.14	H	NO ₂	Br	H	H	H
E.23	H	NO ₂	H	H	H	H
E.25	H	NO ₂	OCH ₃	H	H	H
E.26	NO ₂	H	OCH ₃	H	H	H
E.30	NO ₂	H	CH ₃	H	H	H
E.31	H	NO ₂	Cl	Cl	H	H
E.32	NO ₂	H	Cl	Cl	H	H
E.33	OCH ₃	H	H	NO ₂	H	H
E.34	OCH ₃	H	NO ₂	H	H	H
E.36	Cl	Cl	NO ₂	H	H	H
E.42	H	H	NO ₂	H	H	H
E.43	H	H	H	NO ₂	H	H
E.47	H	H	H	H	OH	NO ₂

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura de Núcleo Chalcônico.....	1
Figura 2. Estruturas dos Derivados Nitrofurânicos, Nitrotiofênicos, Nitrobenzênicos, e Nitroimizólicos.....	5
Figura 3: Nitrochalconas Bioativas (E, F e G)	6
Figura 4. <i>Replicon</i> subgenômico JFH1 de genoma 2a contendo o gene FEO que expressa a proteína fosfotransferase de fusão da luciferase - neomicina denominado SGR-JFH1-FEO.....	13
Figura 5. Viabilidade de Hepatócitos Huh 7.5, Expostos as Nitrochalconas e Ciclosporina A (CsA).....	29
Figura 6. Atividade Anti-HCV das Nitrochalconas e CsA.....	30

Lista de Esquemas

Esquema 1. Reação de Condensação de Claisen-Schmidt para Obtenção de Chalconas.....	2
Esquema 2. Mecanismo da Reação de Condensação de Claisen-Schmidt para Síntese de Chalconas sob Catálise Ácida.....	3
Esquema 3. Etapas de Biorredução de Nitrocompostos Aromáticos.....	4
Esquema 4. Redução do MTT à Formazana por Desidrogenases Mitocondriais.....	12

Lista de Tabelas

Tabela 1. Rendimentos das Sínteses das Nitrochalconas16

Tabela 2. Atividade Anti-*Candida* das Nitrochalconas Expressa como Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM em $\mu\text{g mL}^{-1}$) e Concentração Fungicida Mínima (CFM em $\mu\text{g mL}^{-1}$).....31

Tabela 3. Atividade Antibacteriana das Nitrochalconas Expressa como Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM em $\mu\text{g mL}^{-1}$) e Concentração Bactericida Mínima (CBM em $\mu\text{g mL}^{-1}$).....33

Lista de Anexos

ANEXO 1. Espectro de RMN de ^1H da substância E.02 (DMSO- d_6 ; 400 MHz).....	40
ANEXO 2. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância E.02 (DMSO- d_6 ; 400 MHz).....	40
ANEXO 3. Espectro de RMN de ^{13}C da substância E.02 (DMSO- d_6 ; 100 MHz).....	41
ANEXO 4. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância E.02 (DMSO- d_6 ; 100 MHz).....	41
ANEXO 5. Espectro de RMN de ^1H da substância E.03 (DMSO- d_6 ; 400MHz).....	42
ANEXO 6. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância E.03 (DMSO- d_6 ; 400 MHz).....	42
ANEXO 7. Espectro de RMN de ^{13}C da substância E.03 (DMSO- d_6 ; 100 MHz).....	43
ANEXO 8. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância E.03 (DMSO- d_6 ; 100 MHz).....	43
ANEXO 9. Espectro de RMN de ^1H da substância E.06 (DMSO- d_6 ; 400 MHz).....	44
ANEXO 10. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância E.06 (DMSO- d_6 ; 400MHz).....	44
ANEXO 11. Espectro de RMN de ^{13}C da substância E.06 (DMSO- d_6 ; 100 MHz).....	45
ANEXO 12. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância E.06 (DMSO- d_6 ; 100 MHz).....	45
ANEXO 13. Espectro de RMN de ^1H da substância E.07 (DMSO- d_6 ; 400 MHz).....	46
ANEXO 14. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância E.07 (DMSO- d_6 ; 400 MHz).....	46
ANEXO 15. Espectro de RMN de ^{13}C da substância E.07 (DMSO- d_6 ; 100 MHz).....	47
ANEXO 16. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância E.07 (DMSO- d_6 ; 100 MHz).....	47
ANEXO 17. Espectro de RMN de ^1H da substância E.08 (DMSO- d_6 ; 400MHz).....	48
ANEXO 18. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância E.08 (DMSO- d_6 ; 400 MHz).....	48
ANEXO 19. Espectro de RMN de ^{13}C da substância E.08 (DMSO- d_6 ; 100 MHz).....	49
ANEXO 20. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância E.08 (DMSO- d_6 ; 100 MHz).....	49
ANEXO 21. Espectro de RMN de ^1H da substância E.10 (DMSO- d_6 ; 400 MHz).....	50
ANEXO 22. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância E.10 (DMSO- d_6 ; 400 MHz).....	50
ANEXO 23. Espectro de RMN de ^{13}C da substância E.10 (DMSO- d_6 ; 100 MHz).....	51
ANEXO 24. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância E.10 (DMSO- d_6 ; 100 MHz).....	51
ANEXO 25. Espectro de RMN de ^1H da substância E.11 (DMSO- d_6 ; 400 MHz).....	52
ANEXO 26. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância E.11 (DMSO- d_6 ; 400 MHz).....	52
ANEXO 27. Espectro de RMN de ^{13}C da substância E.11 (DMSO- d_6 ; 100 MHz).....	53
ANEXO 28. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância E.11 (DMSO- d_6 ; 100 MHz).....	53

ANEXO 29. Espectro de RMN de ^1H da substância E.12 (DMSO- d_6 ; 400 MHz).....	54
ANEXO 30. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância E.12 (DMSO- d_6 ; 400 MHz).....	54
ANEXO 31. Espectro de RMN de ^{13}C da substância E.12 (DMSO- d_6 ; 100 MHz).....	55
ANEXO 32. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância E.12 (DMSO- d_6 ; 100 MHz).....	55
ANEXO 33. Espectro de RMN de ^1H da substância E.14 (DMSO- d_6 ; 400 MHz).....	56
ANEXO 34. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância E.14 (DMSO- d_6 ; 400MHz).....	56
ANEXO 35. Espectro de RMN de ^{13}C da substância E.14 (DMSO- d_6 ; 100 MHz).....	57
ANEXO 36. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância E.14 (DMSO- d_6 ; 100 MHz).....	57
ANEXO 37. Espectro de RMN de ^1H da substância E.23 (DMSO- d_6 ; 400 MHz).....	58
ANEXO 38. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância E.23 (DMSO- d_6 ; 400 MHz).....	58
ANEXO 39. Espectro de RMN de ^{13}C da substância E.23 (DMSO- d_6 ; 100 MHz).....	59
ANEXO 40. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância E.23 (DMSO- d_6 ; 100 MHz).....	59
ANEXO 41. Espectro de RMN de ^1H da substância E.25 (DMSO- d_6 ; 400 MHz).....	60
ANEXO 42. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância E.25 (DMSO- d_6 ; 400 MHz).....	60
ANEXO 43. Espectro de RMN de ^{13}C da substância E.25 (DMSO- d_6 ; 100 MHz).....	61
ANEXO 44. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância E.25 (DMSO- d_6 ; 100 MHz).....	61
ANEXO 45. Espectro de RMN de ^1H da substância E.26 (DMSO- d_6 ; 400 MHz).....	62
ANEXO 46. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância E.26 (DMSO- d_6 ; 400 MHz).....	62
ANEXO 47. Espectro de RMN de ^{13}C da substância E.26 (DMSO- d_6 ; 100 MHz).....	63
ANEXO 48. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância E.26 (DMSO- d_6 ; 100 MHz).....	63
ANEXO 49. Espectro de RMN de ^1H da substância E.30 (DMSO- d_6 ; 400 MHz).....	64
ANEXO 50. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância E.30 (DMSO- d_6 ; 400 MHz).....	64
ANEXO 51. Espectro de RMN de ^{13}C da substância E.30 (DMSO- d_6 ; 100 MHz).....	65
ANEXO 52. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância E.30 (DMSO- d_6 ; 100 MHz).....	65
ANEXO 53. Espectro de RMN de ^1H da substância E.31 (DMSO- d_6 ; 400 MHz).....	66
ANEXO 54. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância E.31 (DMSO- d_6 ; 400 MHz).....	66
ANEXO 55. Espectro de RMN de ^{13}C da substância E.31 (DMSO- d_6 ; 100 MHz).....	67
ANEXO 56. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância E.31 (DMSO- d_6 ; 100 MHz).....	67
ANEXO 57. Espectro de RMN de ^1H da substância E.32 (DMSO- d_6 ; 400 MHz).....	68

ANEXO 58. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância E.32 (DMSO- d_6 ; 400 MHz).....	68
ANEXO 59. Espectro de RMN de ^{13}C da substância E.32 (DMSO- d_6 ; 100 MHz).....	69
ANEXO 60. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância E.32 (DMSO- d_6 ; 100 MHz).....	69
ANEXO 61. Espectro de RMN de ^1H da substância E.33 (DMSO- d_6 ; 400 MHz).....	70
ANEXO 62. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância E.33 (DMSO- d_6 ; 400 MHz).....	70
ANEXO 63. Espectro de RMN de ^{13}C da substância E.33 (DMSO- d_6 ; 100 MHz).....	71
ANEXO 64. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância E.33 (DMSO- d_6 ; 100 MHz).....	71
ANEXO 65. Espectro de RMN de ^1H da substância E.34 (DMSO- d_6 ; 400 MHz).....	72
ANEXO 66. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância E.34 (DMSO- d_6 ; 400 MHz).....	72
ANEXO 67. Espectro de RMN de ^{13}C da substância E.34 (DMSO- d_6 ; 100 MHz).....	73
ANEXO 68. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância E.34 (DMSO- d_6 ; 100 MHz).....	73
ANEXO 69. Espectro de RMN de ^1H da substância E.36 (DMSO- d_6 ; 400 MHz).....	74
ANEXO 70. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância E.36 (DMSO- d_6 ; 400 MHz).....	74
ANEXO 71. Espectro de RMN de ^{13}C da substância E.36 (DMSO- d_6 ; 100 MHz).....	75
ANEXO 72. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância E.36 (DMSO- d_6 ; 100 MHz).....	75
ANEXO 73. Espectro de RMN de ^1H da substância E.42 (DMSO- d_6 ; 400 MHz).....	76
ANEXO 74. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância E.42 (DMSO- d_6 ; 400 MHz).....	76
ANEXO 75. Espectro de RMN de ^{13}C da substância E.42 (DMSO- d_6 ; 100 MHz).....	77
ANEXO 76. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância E.42 (DMSO- d_6 ; 100 MHz).....	77
ANEXO 77. Espectro de RMN de ^1H da substância E.43 (DMSO- d_6 ; 400 MHz).....	78
ANEXO 78. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância E.43 (DMSO- d_6 ; 400 MHz).....	78
ANEXO 79. Espectro de RMN de ^{13}C da substância E.43 (DMSO- d_6 ; 100 MHz).....	79
ANEXO 80. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância E.43 (DMSO- d_6 ; 100 MHz).....	79
ANEXO 81. Espectro de RMN de ^1H da substância E.47 (DMSO- d_6 ; 400 MHz).....	80
ANEXO 82. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância E.47 (DMSO- d_6 ; 400 MHz).....	80
ANEXO 83. Espectro de RMN de ^{13}C da substância E.47 (DMSO- d_6 ; 100 MHz).....	81
ANEXO 84. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância E.47 (DMSO- d_6 ; 100 MHz).....	81

Lista de Abreviaturas e Símbolos

ATCC – American Type Culture Collection

BHI – Brain Heart Infusion

Ca 90028 – *Candida albicans* ATCC 90028

Ca 5314 – *Candida albicans* ATCC 5314

Cg – *Candida glabrata*

Ck – *Candida krusei*

Ct – *Candida tropicalis*

Cp – *Candida parapsilosis*

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CC-FN – Cromatografia em Coluna de Fase Normal

CI₅₀ – Concentração Capaz de Inibir 50% de um Fenômeno Biológico

CBM – Concentração Bactericida Mínima

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CFM – Concentração Fungicida Mínima

CPG – Cromatografia de Permeação em Gel

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

d – dubleto

dd – duplo dubleto

ddd – duplo duplo dubleto

DMSO-*d*₆ – dimetilsulfóxido hexadeuterado

HCV – Hepatitis C Virus

IFN- α – Interferon Alfa

Kp – *Klebsiella pneumoniae*

La – *Lactobacillus acidophilus*

m – múltiplo

MTT – brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]

Pa – *Pseudomonas aeruginosa*

QSAR-2D – Quantitative Structure-Activity Relationships -2D

REA – Relação Estrutura Atividade

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMN de ^1H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN de ^{13}C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze

RNAm – RNA mensageiro

s – singleto

SAR – structure-activity relationship

sl – singleto largo

Sa – *Staphylococcus aureus*

Sa MRSA – *Staphylococcus aureus* methicilin-resistant

Sm – *Streptococcus mutans*

t – tripleto

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

Sumário

1.	Introdução.....	1
1.1	Chalconas.....	1
1.2	Nitrocompostos Bioativos.....	4
1.3	Hepatite C e o Vírus da Hepatite C (HCV).....	6
1.4	<i>Candida</i> e Candidíase.....	7
1.5	Bactérias e Infecções Bacterianas.....	8
2.	Objetivos.....	9
3.	Procedimentos Experimentais	9
3.1	Reagentes e Solventes.....	9
3.2	Preparação de Nitrochalconas.....	9
3.3	Purificação de Nitrochalconas	10
3.3.1	Cromatografia em Coluna de Fase Normal (CC-FN).....	10
3.3.2	Cromatografia de Permeação em Gel (CPG).....	10
3.4	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	11
3.5	Atividade Anti-HCV	11
3.5.1	Avaliação da Viabilidade de Hepatócitos Humanos após tratamento com Nitrochalconas.....	11
3.5.2	Inibição da Replicação de HCV - Ensaio de Luciferase.....	12
3.6	Atividade Anti- <i>Candida</i>	13
3.7	Atividade Antibacteriana.....	14
4.	Resultados.....	16
4.1	Resultados das Sínteses e das Análises Espectrocópicas de RMN	16
4.1.1	Substância E.02	17
4.1.2	Substância E.03	18
4.1.3	Substância E.06	18

4.1.4	Substância E.07	19
4.1.5	Substância E.08	19
4.1.6	Substância E.10	20
4.1.7	Substância E.11	20
4.1.8	Substância E.12	21
4.1.9	Substância E.14	21
4.1.10	Substância E.23	22
4.1.11	Substância E.25	22
4.1.12	Substância E.26	23
4.1.13	Substância E.30	23
4.1.14	Substância E.31	24
4.1.15	Substância E.32	24
4.1.16	Substância E.33	25
4.1.17	Substância E.34	25
4.1.18	Substância E.36	26
4.1.19	Substância E.42	26
4.1.20	Substância E.43	27
4.1.21	Substância E.47	27
4.2	Avaliação da Atividade Anti-HCV	28
4.2.1	Viabilidade de Hepatócitos Huh 7.5 - Ensaio do MTT	28
4.2.2	Inibição da Replicação do HCV - Ensaio de Luciferase	30
4.3	Avaliação da Atividade Anti- <i>Candida</i>	31
4.4	Avaliação da Atividade Antibacteriana	32
5.	Conclusões	34
6.	Referências	36

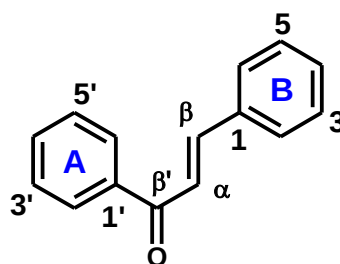
1. Introdução

1.1 Chalconas

Os flavonoides são substâncias naturais provenientes de via metabólica mista, sendo biossintetizadas pelas vias do acetato e do chiquimato. Têm como característica um esqueleto de quinze átomos de carbono, $C_{6}C_3C_6$. Essas substâncias são acumuladas em plantas e possuem funções de crescimento e desenvolvimento dessas, assim como proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias (ZUANAZZI, 2001).

As chalconas compreendem a classe de flavonoides, as quais são precursoras dos demais flavonoides. Apresentam cadeia aberta com uma cetona α,β -insaturada, que separa duas subunidades fenílicas (anéis A e B) (Figura 1, p. 1). Estes flavonoides demonstram um amplo espectro de atividades biológicas, tais como; anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral e antimicrobiana (PRASHAR, 2012).

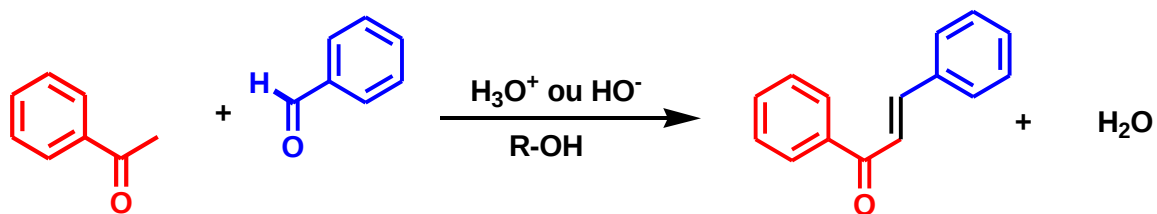
Figura 1. Estrutura de Núcleo Chalcônico



Fonte: Autor (2016)

Em laboratório, as chalconas podem ser sintetizadas por diversas metodologias. Convencionalmente, as metodologias mais empregadas envolvem a condensação aldólica de Claisen-Schmidt (BUCKARI, 2013). Essa reação ocorre entre um derivado benzaldeídico e uma acetofenona, sendo mais frequentemente a catálise homogênea, ácida ou básica, utilizando compostos inorgânicos, bem como álcoois alquílicos de cadeia curta como solventes (Esquema 1, p. 2).

Esquema 1. Reação de Condensação de Claisen-Schmidt para Obtenção de Chalconas



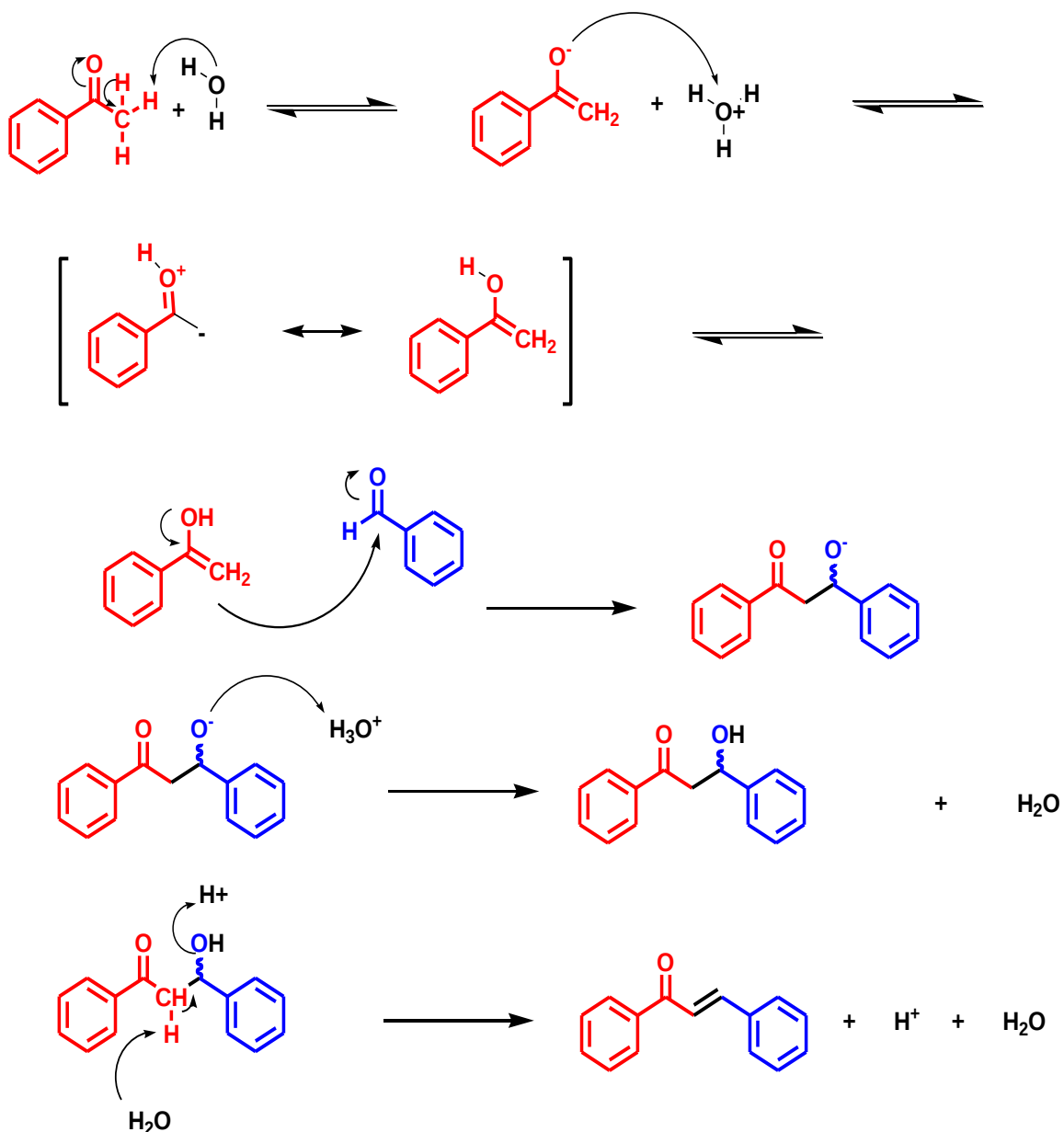
R-OH: álcoois alquílicos de cadeia curta

Fonte: Autor (2016)

Existem variações de metodologias da condensação de Claisen-Schmidt, tais como; **(i)** *Grinding*: reação mecanoquímica na ausência de solvente sob catálise de NaOH (ZANGADE, 2011); **(ii)** K₂CO₃ anidro em pastilhas, sob micro-ondas para ativação dos reagentes (JAYAPAL, 2010); **(iii)** Catálise heterogênea: empregando *catalisadores sólidos* reutilizáveis, tais como; argila, hidrocalcita, hidroxiapatita, zeólitas, e fosfato de zircônio mesoporoso; e utilizando *catalisador líquido*, tal como líquido iônico sulfuroso (BUCKARI, 2013).

Outras metodologias podem ser empregadas na preparação de chalconas incluindo a condensação de Allan-Robinson, *via* acoplamento de Suzuki (EDDARIR, 2003), na presença de eterato de trifluoreto de boro e acilação de Friedel-Crafts (BUCKHARI, 2013). Apesar de estas metodologias serem úteis à preparação de cetonas arílicas α,β -insaturadas, aproximadamente 75 % dos experimentos, para a preparação de chalconas, utilizam a reação de Claisen-Schmidt (Esquema 2, p. 3) (BUCKHARI, 2013).

Esquema 2. Mecanismo da Reação de Condensação de Claisen-Schmidt para Síntese de Chalconas, sob Catálise Ácida

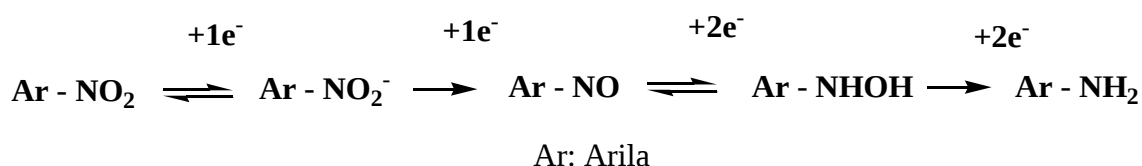


Fonte: Autor (2016)

1.2 Nitrocompostos Bioativos

Os nitrocompostos demonstram inúmeras bioatividades, incluindo antineoplásica, antiparasitária e antibacteriana. Estes compostos atuam fisiologicamente por biorreduções metabólicas (Esquema 3, p. 4) (PAULA, 2009).

Esquema 3. Etapas de Biorredução Metabólica de Nitrocompostos Aromáticos



Fonte: Adaptado de PAULA (2009)

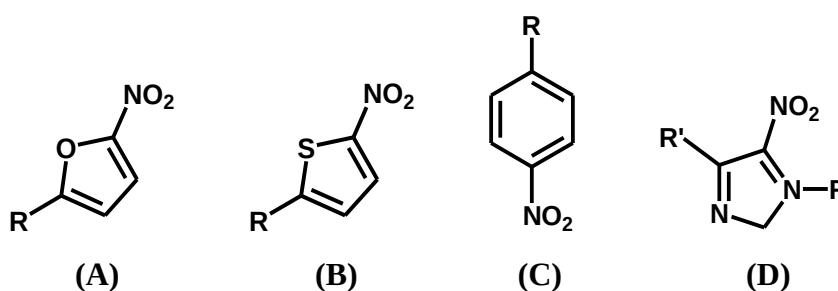
Em nível molecular, as mudanças estruturais ocorrem devido à facilidade de redução do grupo nitro, o qual possui caráter fortemente aceptor de elétrons, tanto pelo efeito indutivo como pelo efeito de mesomérico (PAULA, 2009).

O transporte de nitrocompostos pelas biomembranas ocorre por difusão passiva e aumenta à medida que os radicais livres, provenientes do processo de biorredução, desestabilizam as membranas biológicas. Assim, devido ao aumento da concentração intracelular de nitrocompostos, uma maior quantidade de radicais livres é gerada e, conseqüentemente, maior é o dano causado pelo estresse oxidativo. A redução completa destes compostos envolve seis elétrons até o derivado arilamínico (Ar-NH_2), embora o intermediário reativo hidroxilamínico (Ar-NHOH), envolvendo quatro elétrons, seja o produto final da biorredução da maioria dos nitrocompostos (PAULA, 2009).

Com relação aos mecanismos de ação de nitrocompostos, observa-se que a redução *in vivo* do grupo nitro é fundamental para a consolidação da sua bioatividade. Os radicais livres reativos formados no processo de biorredução têm meia-vida extremamente curta, mas supõe-se que esta seja suficientemente longa para migrar até o alvo biológico ou mesmo que sejam formados junto ao local de ação, podendo reagir com o DNA, enzimas ou com fosfolipídios de membrana. A ação de nitrocompostos sobre alvos adicionais é responsável pela sua toxicidade alta e efeitos adversos (PAULA, 2009).

Entre as diversas classes de nitrocompostos que apresentam interesse biológico destacam-se os derivados nitrofurânicos (**A**), derivados nitrotiofênicos (**B**), derivados nitrobenzênicos (**C**), e derivados nitroimidazólicos (**D**) (Figura 2, p. 5) (PAULA, 2009).

Figura 2. Estruturas de Derivados Nitrofurânicos (**A**), Nitrotiofênicos (**B**), Nitrobenzênicos (**C**), e Nitroimidazólicos (**D**)



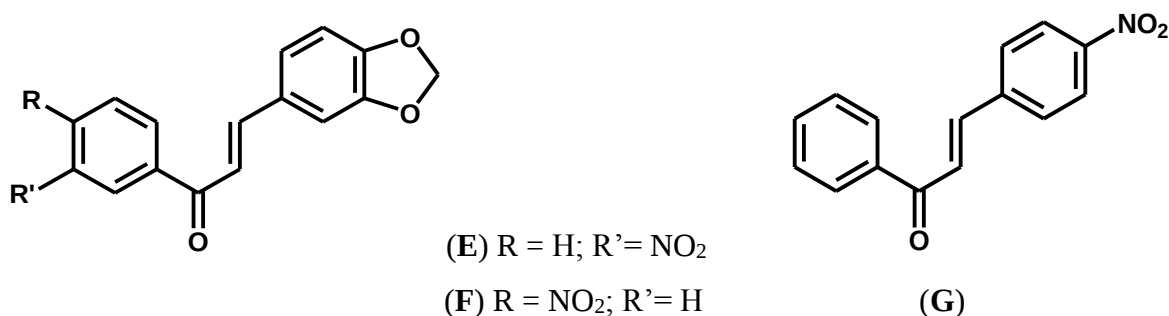
Fonte: Autor (2016).

Os nitrocompostos têm sido alvo de inúmeras discussões visando o esclarecimento de sua toxicidade e portanto alguns nitrocompostos necessitam de triagens toxicológicas nas etapas iniciais da descoberta e desenvolvimento de fármacos (KATZUNG, 2001).

Alberton et al. (2008) verificaram que a presença do nitro adicionado às posições 3' e 4' de chalconas (contendo metilenodioxila no anel B) (**E** e **F**, Figura 3, p. 6) conferiram efeito hipoglicemiante em ratos hiperglicêmicos. As substâncias (**E** e **F**, Figura 3, p. 6) foram anti-hiperglicêmicas por administração por gavagem em doses de 10 mg Kg⁻¹. Estes autores descreveram que as nitrochalconas aumentam a indução da secreção de insulina em 25%, após 30 minutos de administração.

Dalla Via et al. (2009) verificaram que a 4-nitrochalcona (**G**, Figura 3, p. 6) reduziu a viabilidade de células de melanoma JR8, demonstrando uma concentração capaz de inibir 50% o crescimento celular (CI₅₀), de 6 µmol L⁻¹. Ilango et al. (2010) observaram que (**G**) diminuiu a viabilidade de células tumorais MCF-7 e T47D tendo uma CI₅₀ de 55 e 52 µmol L⁻¹, respectivamente. A substância **G** reduziu aproximadamente 50% da viabilidade de hepatócitos HepG2 na concentração de 20 µmol L⁻¹ no tempo de 24 horas. Contra fibroblastos L929, a substância **G** não alterou a viabilidade nesta mesma concentração e tempo de tratamento, sugerindo um efeito seletivo contra células tumorais.

Figura 3. Nitrochalconas Bioativas (E, F e G)



Fonte: Autor (2016)

1.3 Hepatite C e o Vírus da Hepatite C (HCV)

O vírus da Hepatite C (HCV) se apresenta como uma das principais causas de doenças hepáticas, podendo causar infecções agudas ou crônicas. Atualmente, estima-se que cerca de 185 milhões de pessoas estejam infectadas pelo HCV (aproximadamente 3% da população mundial). Desses, infere-se que 80% desenvolvem o quadro crônico, e 25% podem desenvolver cirrose hepática, e nos casos mais severos carcinoma hepatocelular (KOHLLI, 2014).

A doença tem como principal forma de contágio o contato com o sangue de pessoas infectadas, sendo via parental a principal rota de transmissão. Os grupos de maior risco de infecção compreendem os usuários de drogas de abuso injetáveis, assim como pacientes que requerem múltiplas transfusões sanguíneas (MUNIR, 2010).

O tratamento da hepatite C foi iniciado, antes do conhecimento da estrutura bioquímica do HCV, em 1986, com interferon- α (IFN- α). Essa glicoproteína não atua diretamente no ciclo viral, mas atua ligando-se a receptores gangliosídicos das células do hospedeiro, induzindo a produção de enzimas que inibem a tradução do RNA mensageiro (RNAm) em proteínas virais e consequentemente inibindo o ciclo viral (HOOFNAGLE, 2005; RANG & DALE, 2011). Atualmente, o tratamento da hepatite C se baseia no IFN- α -PEG combinado com a ribavirina, a qual é um análogo de nucleosídeo. Essa associação aumenta a Resposta Virológica Sustentada (RVS) na monoterapia (LIANG, 2013). A monoterapia apresenta RVS de 12% nos pacientes tratados; e o uso do IFN- α peguilado

(IFN ligado a uma cadeia de polietileno glicol) associado a ribavirina, aumentou essa taxa para 35-40% (HOOFNAGLE, 2014).

O HCV apresenta seis tipos de genótipos (G1–G6), os quais respondem diferencialmente aos tratamentos, sendo o genótipo mais comum o G1. Atualmente há indicações de terapia tripla para o tratamento da hepatite C, onde se faz uso de fármacos, como declatasvir, simeprevir, teleprevir, boceprevir e sofosbuvir que atuam diretamente na replicação viral, sendo potentes inibidores das proteases NS3, NS4A, NS5A e NS5B, aumentando assim as taxas de RVS (KOHLI, 2014).

A terapia dupla com IFN- α e ribavirina apresenta efeitos adversos como anemias, neutropenia e trombocitopenia, sendo que há possibilidade do desenvolvimento de resistência (MUNIR, 2010). A terapia tripla apresenta efeitos adversos severos. No caso do boceprevir é comum ocorrência de alterações no paladar. Já a administração do teleprevir pode ocorrer erupções cutâneas e intenso desconforto intestinal (LIANG, 2013).

1.4 *Candida* e Candidíase

As leveduras, especialmente *Candida albicans*, são organismos comumente encontrados na cavidade oral de indivíduos saudáveis ou doentes. A região mais frequentemente habitada é o dorso da língua, mas *C. albicans* também pode ser encontrada na bochecha, gengiva, palato e bolsas periodontais. Essas regiões são consideradas importantes portas de entrada para infecções sistêmicas (ADDY, 1977). Elas estabelecem um equilíbrio com o hospedeiro denominado simbiose, quando este equilíbrio é rompido devido às mudanças no mecanismo de defesa e no ambiente oral, estas leveduras podem causar infecções orais oportunistas. Caso essas infecções não sejam tratadas podem se tornar generalizada e/ou disseminarem sistemicamente provocando fungemia (GREENSPAN, 1994).

A candidíase bucal é a infecção fúngica mais comum em pacientes portadores do Vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV), podendo ocorrer em mais de 90% dos pacientes com AIDS e, muitas vezes, com episódios recorrentes. A espécie que mais causa candidíase é a *C. albicans*, a qual está presente em 90% dos casos, seguida pelas espécies *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei* (WYLES, D, 2009).

A resistência do gênero *Candida* ao tratamento com antifúngicos tem sido atribuída à episódios recorrentes da infecção e exposição intermitente e irracional aos antifúngicos, sendo que as espécies que não são *albicans* apresentam maior resistência à terapêutica, como por exemplo *C. krusei*, que apresenta resistência intrínseca ao fluconazol (SANT'ANA, 2002). Em estudo realizado por Sant'ana et al, (2002), encontrou-se 17% de resistência ou sensibilidade dose-dependente aos fármacos da classe dos azóis (imidazóis e triazóis) e à anfotericina B (poliênico), em isolados de lesão na boca de pacientes HIV-positivos.

1.5 Bactérias e Infecções Bacterianas

As bactérias são responsáveis por centenas doenças ao homem. *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa extremamente versátil. Em seres humanos causa infecções nos pulmões de indivíduos imunocomprometidos (PELLEGRINO, 2002). *Klebsiella pneumoniae* é uma espécie de bactéria Gram-negativa, encapsulada, anaeróbia facultativa em forma de bacilos. Pode causar pneumonia embora seja mais comum a sua implicação em infecções hospitalares, em particular em doentes imunologicamente deprimidos como portadores do vírus HIV (SMITH MOLAND, 2003). *Lactobacillus acidophilus* é uma espécie de bactérias Gram-positivas, anaeróbicas em forma de bacilos. Estão presentes em biofilmes dentários, em pequeno número, aumentando em quantidade com o avanço da cárie dentária (BANERJEE, 2000). *Streptococcus mutans* é uma espécie de bactéria Gram-positiva com morfologia de coco. Esta bactéria é comumente encontrada na boca do homem, sendo o principal fator do desenvolvimento de cáries. *Staphylococcus aureus* é uma bactéria esférica, do grupo dos cocos, Gram-positivos, frequentemente encontrada na pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis. Entretanto pode provocar infecções graves (BUISCHI, 2000).

2. Objetivos

(I). Síntese de uma série de 21 chalconas substituídas por grupos nitro nas posições 3' e 4' (anel A) e 3 e 4 (anel B);

(II). Avaliação da atividade tóxica de nitrochalconas em hepatócitos humanos Huh-7.5;

(III). Avaliação da atividade inibitória de nitrochalconas sobre a replicação do vírus da hepatite C (HCV);

(IV). Avaliação da atividade antifúngica de nitrochalconas contra *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida glabrata*;

(V). Avaliação da atividade antibacteriana contra espécies Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus acidophilus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*.

3. Procedimentos Experimentais

3.1 Reagentes e Solventes

Para a síntese das nitrochalconas foram utilizados acetofenonas e benzaldeídos como reagentes, ácido acético como solvente e ácido sulfúrico como catalisador. Reagentes, solventes e catalisador foram das marcas Sigma Aldrich® ou Synth®.

Para as purificações por precipitação, lavagem e técnicas cromatográficas, os solventes acetato de etila, etanol e hexano foram adquiridos da marca Synth®.

3.2 Preparação de Nitrochalconas

Em um balão monotubulado, foram adicionados 5 mmol das respectivas acetofenonas dissolvidas em 10,0 mL de ácido acético (1,0 mol L⁻¹), sob banho de gelo e agitação. Foram solubilizados 5 mmol dos aldeídos em 10,0 mL de ácido acético, e adicionados ao meio reacional, gota-à-gota. As reações foram mantidas sob refluxo, até ser constatada a conversão total dos reagentes (BUCKHARI, 2013).

O meio reacional foi vertido em gelo triturado, formando um precipitado, o qual foi mantido a 7 °C por 24 h. O precipitado foi submetido à filtração simples, e seco à temperatura ambiente por 48 h (BUCKHARI, 2013).

Nos casos em que não houve precipitação, o meio reacional foi submetido à extração líquido-líquido, empregando acetato de etila e água destilada. A fase orgânica foi seca à temperatura ambiente (BUCKHARI, 2013).

Para o acompanhamento das reações e análise de pureza dos produtos foi realizada Cromatografia em Camada Delgada, em placas cromatográficas de gel de sílica sob base de alumínio (BUCKHARI, 2013).

As cromatoplasmas foram desenvolvidas em misturas de hexano e acetato de etila, em proporções que variaram de acordo com a polaridade dos analitos. As cromatoplasmas foram reveladas fisicamente sob inspeção no ultravioleta, em 254 e 365 nm. Para a revelação química, utilizou-se solução etanólica de anisaldeído sulfúrico (2,0 mL de anisaldeído em 20,0 mL de ácido acético, 10 mL de ácido sulfúrico e 170 mL de etanol) seguida de aquecimento intenso em chapa aquecedora (BUCKHARI, 2013).

3.3 Purificação de Nitrochalconas

As nitrochalconas foram purificadas por precipitação, lavagem e técnicas cromatográficas, incluindo cromatografia em coluna (CC).

3.3.1 Cromatografia em Coluna de Fase Normal (CC-FN)

As purificações das nitrochalconas foram realizadas por cromatografia em coluna de fase normal, empregando gel de sílica com tamanho de partícula de 100 a 200 Mesh (Sigma-Aldrich®), e misturas de hexano e acetato de etila como fases móveis (BUCKHARI, 2013).

As nitrochalconas **E.02, E.03, E.06–E.08, E.10, E.12, E.23, E.25, E.26, E.30–E.34, E.36 E42, E.43 e E.47** foram purificadas por CC-FN, utilizando gradiente de eluição com as porcentagens de hexano variando de 100 a 80% e acetato de etila, de 0 a 20%.

3.3.2 Cromatografia de Permeação em Gel (CPG)

Para os procedimentos envolvendo a cromatografia de permeação em gel (LH-20 (biopolímero de dextrana hidroxipropilada - Sephadex[®]), este foi empregado como suporte cromatográfico, bem como etanol como fase móvel. A coluna possui como dimensão altura de 120 cm e diâmetro de 3 cm. A CPG foi utilizada para as purificações das nitrochalconas E.11 e E.14 (BUCKHARI, 2013).

3.4 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Para confirmação da estrutura molecular das nitrochalconas, foram realizados experimentos de espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze (RMN de ¹³C) e de Hidrogênio (RMN de ¹H).

Os experimentos de RMN foram realizados no Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular (CMIB) do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Unesp- Ibilce, em Espectrômetros Bruker Advance III, de 14,0 Tesla (600 MHz), e de 9,4 Tesla (450 MHz). As amostras foram solubilizadas em dimetilsulfóxido hexadeuterado (DMSO-*d*₆) da marca Aldrich[®].

3.5 Atividade Anti-HCV

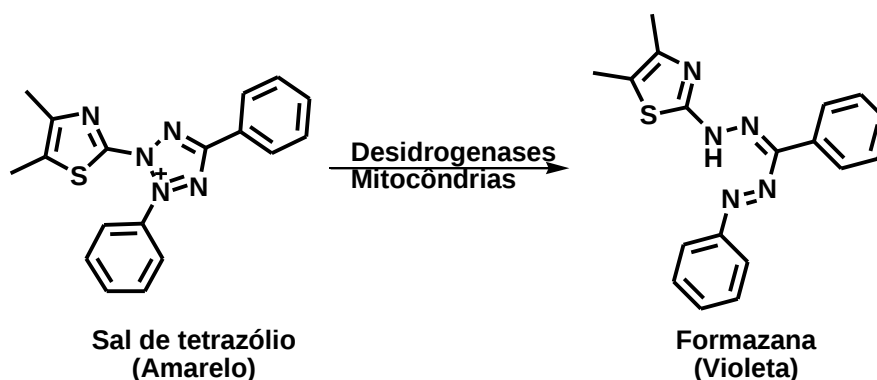
Os ensaios de atividade anti-HCV foram realizados em colaboração com o Laboratório de Estudos Genômicos, Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Unesp – São José do Rio Preto; pelos alunos Carina Machado Pereira, Jacqueline Farinha Shimizu e Guilherme Rodrigues Fernandes Campos, sob supervisão da Profa. Dra. Paula Rahal.

3.5.1 Avaliação da Viabilidade de Hepatócitos Humanos após Tratamento com Nitrochalconas

Uma suspensão de 1.0×10^4 hepatócitos Huh-7.5 foi transferida para microplacas de 96 poços, sendo incubadas em estufa a 37 °C, com atmosfera a 5% de CO₂ por 4 horas. Soluções com concentrações de 50, 10 e 2,0 μmol L⁻¹ de cada nitrochalcona em meio de

cultura foram adicionadas aos poços em triplicatas. Como controle negativo, adicionou-se às células apenas meio de cultura com 1% de DMSO na ausência de substâncias. As microplacas foram incubadas por 18 horas a 37 °C e atmosfera a 5% de CO₂. Em seguida, o sobrenadante foi removido sendo adicionada solução de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]; Sigma®) a 1 mg mL⁻¹ de meio de cultura aos poços, quais foram incubadas a 37 °C por 30 minutos. A solução de MTT foi removida, substituída pelo mesmo volume de DMSO para solubilização dos cristais de formazana (Esquema 4, p. 12), e as soluções foram submetidas à análise espectrofotométrica em 570 nm (LUI, 1997).

Esquema 4. Redução do MTT à Formazana por Desidrogenases Mitocondriais



Fonte: Autor (2016)

A porcentagem da viabilidade celular foi determinada, pela equação abaixo, utilizando a média das absorvâncias das replicatas.

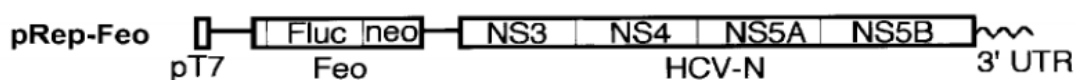
$$\% \text{ Viab. Hep.} = \frac{(Abs_{(c.positivo)} - Abs_{(amostra)})}{Abs_{(c.positivo)}} \times 100$$

Na qual: % Viab. Hep. refere-se à porcentagem de viabilidade celular de hepatócitos Huh-7.5; Abs_(c.positivo) a absorvância média do controle positivo; Abs_(amostra) a absorvância média das amostra (LUI, 1997).

3.5.2 Inibição da Replicação de HCV - Ensaio de Luciferase

As células Huh-7.5 (4.0×10^6) foram lavadas e ressuspensas em 400 μ L de PBS tratado com dietilpirocarbonato (PBS-DEPEC) e transfectadas por eletroporação com 5 μ g do *replicon* subgenômico do HCV com expressão da proteína fosfotransferase de fusão luciferase-neomicina (SGR-Luc-JFH-1 FEO) (Figura 4, p.13), em cubetas de 0,4 cm a 950 μ F, 270 V. Posteriormente, as células eletroporadas foram transferidas para placas de 96 orifícios e então lisadas após 4 e 24 h da transfecção em tampão de lise passiva (PLB) (Promega®). A atividade de luciferase foi medida utilizando o reagente para ensaio de luciferase (LAR; Promega) em leitor de placa (FLUOstar Omega – BMG Labtech®) (WYLES, 2009).

Figura 4. *Replicon* subgenômico JFH1 de genoma 2a contendo o gene FEO que expressa a proteína fosfotransferase de fusão da luciferase - neomicina denominado (SGR-JFH1-FEO)



Fonte: WYLES (2009)

As nitrochalconas foram adicionadas nas concentrações de 10 ou 2 μ mol L⁻¹ segundo a citotoxicidade no teste de MTT (item 3.5.1, p. 11). Os lisados de 4 h após transfecção foram utilizados como controle e os de 24 h para avaliar o efeito inibitório das nitrochalconas na replicação do HCV. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas. Em paralelo, foram realizados experimentos com a ciclosporina A, como droga de referência, na concentração de 1 μ mol L⁻¹ (WYLES, 2009).

3.6 Atividade Anti-*Candida*

Os ensaios de atividade anti-*Candida* foram realizados em colaboração com os pesquisadores Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen e Dra. Janaina Orlandi Sardi do Departamento

de Ciências Fisiológicas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

A determinação da atividade antifúngica das nitrochalconas foi realizada contra 5 espécies de *Candida*, inculindo *C. albicans* (ATCC 90028), *C. tropicalis* (ATCC 750), *C. krusei* (ATCC 6258), *C. parapsilosis* (ATCC 22019), *C. glabrata* (ATCC 90030).

A concentração inibitória mínima (MIC) foi determinada pelo teste de microdiluição em caldo de acordo com o documento M27 A3-S3 (2008) do CLSI com algumas modificações. A suspensão de leveduras foi ajustada para 1.0×10^4 UFC mL⁻¹ em RPMI-1640 e os inóculos foram preparados RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio, suplementado com 2% glicose, tamponado a pH 7,0 empregando tampão MOPS (0,165 mol L⁻¹) (Sigma-Aldrich). As nitrochalconas foram dissolvidas em DMSO e testadas em concentrações que variaram de 62,5 a 0,48 µg mL⁻¹. Após a determinação da CIM, uma alíquota do poço teste foi transferida para placa de meio Sabouraud Dextrose Ágar. Após 24 horas, a concentração fungicida mínima (CFM) foi determinada como sendo a menor concentração capaz de não se observar desenvolvimento da cultura fúngica (CLSI, 2008).

3.7 Atividade Antibacteriana

Os ensaios foram de atividade antibacteriana foram realizados em colaboração com os pesquisadores Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen e Dra. Janaina Orlandi Sardi no Departamento de Ciências Fisiológicas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Foram selecionadas três espécies Gram-positivas: *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Streptococcus mutans* UA 159, bem como duas espécies Gram-negativas: *Klebsiella pneumoniae* (isolado clínico) e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Estes ensaios foram realizados segundo o documento M07 A9 (2012) do CLSI com algumas adaptações. Para o desenvolvimento da metodologia, foi utilizado o meio Miller Hynton (DIFCO®) como preconizado no documento.

Os fármacos antibacterianos utilizados foram obtidas dos fabricantes em forma de pó. As nitrochalconas foram dissolvidas assepticamente em quantidades adequadas de

DMSO e solubilizadas por agitação com o auxílio do vórtex. As substâncias foram testadas em concentrações que variam de 0,48 a 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

As cepas congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ foram repicadas em ágar BHI em temperatura $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, a partir dessas culturas foram preparados os inóculos em salina 0,85 % estéril, sendo preparados em concentração de 2,5 a $5 \times 10^6\text{ UFC mL}^{-1}$. Todos os inóculos foram conferidos por meio da contagem de células em câmara de Neubauer. Em seguida, o inóculo foi diluído em meio Miller Hynton em uma proporção de 1:100, para a obtenção de uma suspensão 2,5 a $5 \times 10^4\text{ UFC mL}^{-1}$, a qual foi distribuída em placas de 96 poços, sendo um volume de 100 μL nas fileiras de 2 a 12 onde estão as substâncias que se deseja avaliar a atividade antibacteriana em concentrações a partir de diluição seriada. Desta forma, a suspensão do inóculo passou a ser 10^3 UFC mL^{-1} . O controle positivo do teste foi adicionado na fileira 12 com adição de 100 μL do meio Miller Hynton livre da substância e 100 μL da suspensão de bactérias. Também foi utilizado o controle de esterilidade do meio ou branco para a leitura espectrofotométrica, na fileira 1, onde foi adicionado somente 200 μL do meio Miller Hynton. As placas foram incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob agitação constante de 150 rpm e a leitura ocorreu após um período de 24 horas, por meio de leitura visual com o revelador resazurina (1 mg em 10 ml de água destilada) e da leitura por espectrofotometria a 490 nm. (CLSI, 2012).

O ensaio para determinar a concentração bactericida mínima foi realizado com a finalidade analisar a ação letal da substância. Para isso, após a leitura do resultado da CIM, cada concentração da microplaca de 96 poços foi transferida para placa com ágar BHI (Brain Heart Infusion). As placas foram incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ e após 24 horas, sendo realizada a leitura visual observando a formação de colônias. (CLSI, 2012).

4. Resultados

4.1 Resultados das Sínteses e das Análises Espectroscópicas de RMN

A quantidade de 21 nitrochalconas foram sintetizadas e submetidas a análises espectroscópicas de RMN. Os rendimentos das sínteses estão apresentados na Tabela 1. p. 16.

Tabela 1. Rendimentos das Sínteses das Nitrochalconas

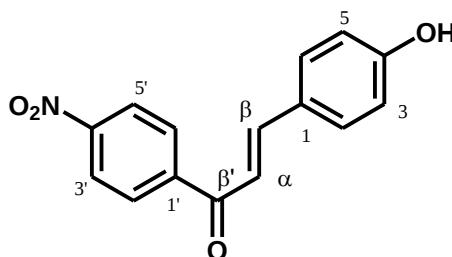
		Rendimentos (%)
Chalconas com nitro na posição 3' (anel A)	E.12	63
	E.14	68
	E.23	78
	E.25	73
	E.31	91
Chalconas com nitro na posição 4' (anel A)	E.02	75
	E.03	67
	E.06	77
	E.07	82
	E.08	75
	E.10	70
	E.11	82
	E.26	66
	E.30	85
	E.32	96
Chalconas com nitro na posição 3 (anel B)	E.33	68
	E.43	96
	E.47	90
Chalconas com nitro na posição 4 (anel B)	E.34	89
	E.36	84
	E.42	97

As nitrochalconas com o grupo nitro na posição 4 apresentaram os maiores rendimentos de síntese, com rendimento médio de 90%, seguidas pelas nitrochalconas com o grupo nitro nas posições 3, 4' e 3', com rendimentos médios de aproximadamente 84, 77 e 74% respectivamente.

A interpretação dos espectros de RMN de ^1H permitiu constatar a obtenção das nitrochalconas planejadas. Os espectros de RMN confirmaram a presença de dubletos com constantes de acoplamento características de ligação dupla carbono-carbono α,β - insaturadas com configuração *trans* ($J \approx 15$ Hz). O espectro de RMN de ^{13}C apresentou sinais característicos de cetonas α,β -insaturadas ($\delta \approx 188$ ppm). A análise simultânea dos espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C conduziram à confirmação das nitrochalconas planejadas.

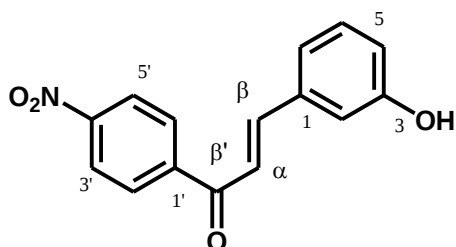
A seguir, descrevem-se os rendimentos das reações de síntese, as atribuições dos deslocamentos químicos δ , em ppm, dos sinais obtidos nos espectros, sendo especificado entre parênteses, a multiplicidade do sinal (s - singlete; d - dublete; dd - duplo dublete; ddd – duplo duplo dublete e m-multiplete) e constante de acoplamento (J).

4.1.1 Substância E.02



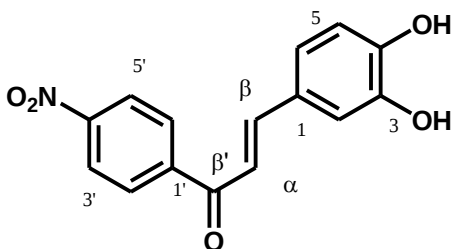
Substância E.02: Rendimento 75%. RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (*mult.*; J em Hz): 8,35 (d, $J = 8,7$ Hz, H-3' e H-5'), 8,32 (d, $J = 7,8$ Hz, H-2' e H-6'), 7,66 (d, $J = 15,4$ Hz, H- α), 7,54 (d, $J = 15,4$ Hz, H- β), 6,95 (d, $J = 8,7$ Hz, H-3 e H-5), 7,71 (d, $J = 7,8$ Hz, H-2 e H-6). RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 188,3 (C- β'), 163,5 (C-4), 150,0 (C-4'), 147,1 (C- β), 143,5 (C-1'), 132,1 (C-6), 130,0 (C-2'), 124,2 (C-2), 117,0 (C-3), 127,1 (C-1), 115,3 (C-5), 121,6 (C-3'), 130,7 (C-6'), 121,8 (C-5') 137,2 (C- α). (Anexos 1–4, p. 40-41).

4.1.2 Substância E.03



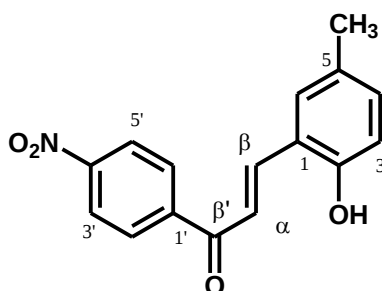
Substância E.03: Rendimento 67%. RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (*mult.*; J em Hz): 8,36 (d, $J = 8,9$ Hz, H-3' e H-5'), 8,33 (d, $J = 8,9$ Hz, H-2' e H-6'), 7,93 (d, $J = 15,6$ Hz, H- β), 7,70 (d, $J = 15,6$ Hz, H- α), 6,91 (dd, $J = 8,3$ e $8,3$; H-5), 7,33 (d, $J = 8,3$; H-6), 7,45 (d, $J = 8,3$; H-4), 7,35 (s, H-2). RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 158,2 (C- β'), 150,2 (C-3), 146,3 (C-4'), 142,8 (C- β), 144,2 (C-1'), 136,1 (C-1), 130,4 (C-2' e C-6'), 130,1 (C-5), 124,3 (C-5' e C-3'), 122,1 (C- α), 120,7 (C-6), 118,8 (C-4), 115,9 (C-2). (Anexos 5–8, p. 42-43).

4.1.3 Substância E.06



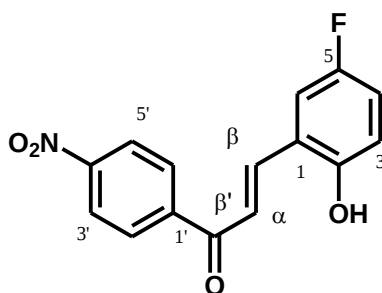
Substância E.06: Rendimento 77%. RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (*mult.*; J em Hz): 8,44 (d, $J = 8,8$ Hz, H-3' e H-5'), 7,74 (d, $J = 15,4$ Hz, H- β), 7,63 (d, $J = 15,4$ Hz, H- α), 8,31 (d, $J = 8,2$ Hz, H-2' e H-6'), 7,22 (d, $J = 8,1$ Hz, H-6), 7,30 (s, H-2), 6,91 (d, $J = 7,9$ Hz, H-5). RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 185,1 (C- β'), 149,8 (C-4'), 147,1 (C-4), 147,0 (C-3), 146,1 (C- β), 143,4 (C-2'), 143,2 (C-6'), 130,1 (C-1), 126,5 (C-5'), 124,3 (C-3'), 123,3 (C- α), 118,6 (C-6), 116,2 (C-5), 116,1 (C-2). (Anexos 9–12, p. 44-45).

4.1.4 Substância E.07



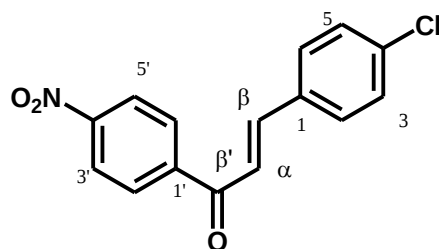
Substância E.07: Rendimento 82%. RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (*mult.*; J em Hz): 8,38 (d, $J = 8,6$ Hz, H-3' e H-5'), 8,29 (d, $J = 8,5$ Hz, H-2' e H-6'), 8,05 (d, $J = 15,3$ Hz, H- β), 7,84 (d, $J = 15,3$ Hz, H- α), 7,70 (s, H-6), 6,84 (d, $J = 7,1$ Hz, H-4), 7,12 (dd, $J = 8,29$; $J = 1,81$ Hz, H-3), 2,35 (s, 5- CH_3). RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 187,9 (C- β'), 155,3 (C-2), 145,2 (C- β), 144,0 (C-1'), 130,9 (C-5), 130,8 (C-2' e C-6'), 129,7 (C-4), 128,1 (C-6), 121,6 (C-5' e C-3'), 122,4 (C- α), 116,5 (C-1), 115,7 (C-3), 24,7 (CH_3 -5). (Anexos 13–16, p. 46-47).

4.1.5 Substância E.08



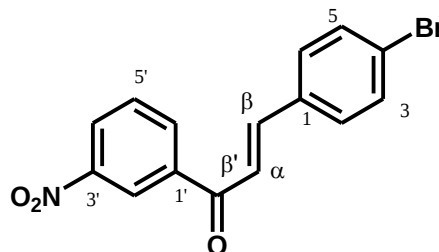
Substância E.08: Rendimento 75%. RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (*mult.*; J em Hz): 8,83 (d, $J = 8,4$ Hz, H-3' e H-5'), 8,41 (d, $J = 8,1$ Hz, H-2' e H-6'), 8,17 (d, $J = 15,8$ Hz, H- β), 8,01 (d, $J = 15,8$ Hz, H- α), 7,68 (dd, $J = 8,2$ e $8,2$; H-6), 7,19 (d, $J = 7,7$ Hz, H-4), 7,11 (d, $J = 8,43$; H-3). RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 188,9 (C- β'), 188,6 (C-4), 154,1 (C-4'), 153,7 (C-2), 140,1 (C- β), 144,8 (C-1'), 130,4 (C-2' e C-6'), 129,7 (C-4), 121,7 (C-5' e C-3'), 121,4 (C- α), 118,2 (C-1), 121,6 (C-3), 120,7 (C-6). (Anexos 17–20, p. 48-49).

4.1.6 Substância E.10



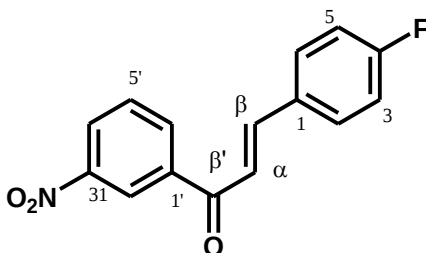
Substância E.10: Rendimento 70%. RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (*mult.*; J em Hz): 8,39 (s, H-5'), 7,99 (d, $J = 9,1$ Hz, H-2' e H-6'), 8,03 (d, $J = 15,8$ Hz, H- β), 7,83 (d, $J = 15,8$ Hz, H- α), 7,57 (d, $J = 7,4$ Hz, H-2 e H-6), 7,56 (d, $J = 8,7$ Hz, H-3 e H-5). RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 188,7 (C- β'), 152,5 (C-4'), 151,1 (C- β), 144,2 (C-1'), 142,5 (C-4), 144,3 (C-1), 140,8 (C-2' e C-6'), 131,8 (C-3 e C-5), 129,5 (C-2 e C-5), 124,6 (C-3' e C-5'), 123,2 (C- α). (Anexos 21–24, p. 50-51).

4.1.7 Substância E.11



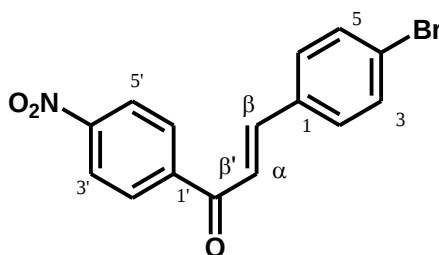
Substância E.11: Rendimento 82%. RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (*mult.*; J em Hz): 7,91 (dd, $J = 1,7$ e $1,7$ Hz, H-2'), 8,60 (ddd, $J = 7,8$ e $7,8$ Hz, H-4'), 8,50 (dd, $J = 9,3$ e $9,3$ Hz, H-6'), 7,80 (dd, $J = 7,4$ e $7,4$ Hz, H-5'), 8,07 (d, $J = 15,6$ Hz, H- β), 7,92 (d, $J = 7,8$ Hz, H-3 e H-5), 7,81 (d, $J = 15,6$ Hz, H- α), 7,68 (d, $J = 8,4$ Hz, H-2 e H-6). RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 188,3 (C- β'), 148,6 (C-3'), 144,0 (C- β), 135,2 (C-1'), 139,1 (C-6'), 135,4 (C-1), 134,6 (C-3), 132,1 (C-5), 131,4 (C-5'), 131,0 (C-6), 130,5 (C-2), 127,3 (C-4'), 124,4 (C-2'), 123,9 (C-4), 122,6 (C- α). (Anexos 25–28, p. 52-53).

4.1.8 Substância E.12



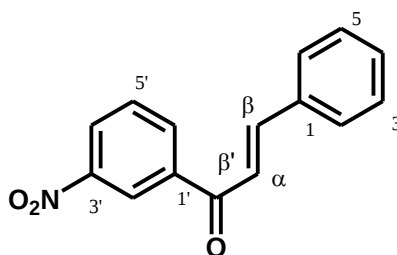
Substância E.12: Rendimento 63%. RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (*mult.*; J em Hz): 8,65 (dd, $J = 1,9$ e $1,9$ Hz, H-2'), 7,90 (ddd, $J = 7,4$ e $7,4$ Hz, H-4'), 8,50 (dd, $J = 9,3$ e $9,3$ Hz, H-6'), 7,84 (dd, $J = 7,4$ e $7,4$ Hz, H-5'), 8,05 (d, $J = 15,6$ Hz, H- β), 7,92 (d, $J = 7,8$ Hz, H-3 e H-5), 7,8 (d, $J = 15,6$ Hz, H- α), 7,55 (d, $J = 8,4$ Hz, H-2 e H-6). RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 188,0 (C- β'), 148,1 (C-4), 145,9 (C-3'), 139,2 (C- β), 138,1 (C-1'), 136,0 (C-6'), 130,8 (C-1), 130,2 (C-5'), 130,6 (C-2 e C-6), 129,9 (C-4'), 127,8 (C-2'), 123,8 (C- α), 122,4 (C-3 e C-5). (Anexos 29–32, p. 54-55).

4.1.9 Substância E.14



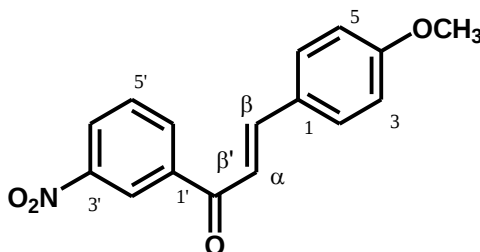
Substância E.14: Rendimento 68%. RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (*mult.*; J em Hz): 8,41 (d, $J = 2,1$ Hz, H-3' e H-5'), 8,35 (d, $J = 8,9$ Hz, H-2' e H-6'), 7,99 (d, $J = 15,5$ Hz, H- β), 7,77 (d, $J = 15,5$ Hz, H- α), 7,87 (d, $J = 8,4$ Hz, H-3 e H-5), 7,68 (d, $J = 7,8$ Hz, H-2 e H-6). RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 188,7 (C- β'), 150,3 (C-4'), 144,6 (C- β), 142,3 (C-1'), 134,6 (C-1), 134,1 (C-3), 132,4 (C-5), 132,1 (C-2'), 131,4 (C-6'), 130,3 (C-2), 124,9 (C-6), 124,3 (C-4), 123,4 (C-3'), 1229, 5 (C-5'), 122,4 (C- α). (Anexos 33-36, p. 56-57).

4.1.10 Substância E.23



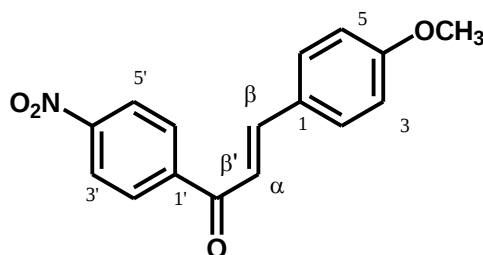
Substância E.23: Rendimento 78%. RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (*mult.*; J em Hz): 8,85 (ddd, $J = 0,6$; 1,8 e 8,0; H-4'), 8,51 (dd, $J = 7,8$ e 7,8; H-5'), 8,64 (dd, $J = 1,8$ e 1,8; H-2'), 7,33 (d, $J = 7,8$; H-3), 7,96 (m, H-3 – H-5), 8,07 (d, $J = 15,6$; H- α), 7,87 (d, $J = 15,6$; H- β), 7,51 (m, H-2 e H-6). RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 187,6 (C- β'), 154,4 (C-3'), 146,0 (C- β), 145,8 (C-1'), 140,6 (C-6'), 145,8 (C-1), 139,0 (C-5'), 138,7 (C-3 e C-5), 135,0 (C-4), 133,9 (C-4'), 130,4 (C-2), 126,3 (C-6), 122,9 (C-2'), 119,2 (C- α). (Anexos 37–40, p. 58-59).

4.1.11 Substância E.25



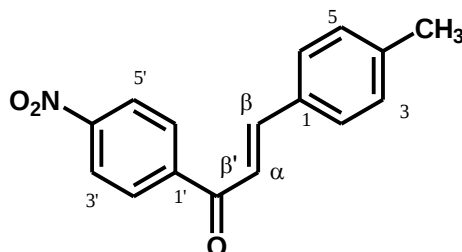
Substância E.25: Rendimento 73%. RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (*mult.*; J em Hz): 8,49 (ddd, $J = 0,4$; 1,7 e 8,3 Hz, H-4'), 8,60 (dd, $J = 8,5$ e 8,5 Hz, H-5'), 7,94 (dd, $J = 1,6$ e 1,6 Hz, H-2'), 7,90 (d, $J = 14,5$ Hz H- β), 7,83 (d, $J = 14,5$ Hz, H- α), 7,80 (d, $J = 8,7$ Hz, H-2 e H-6), 7,05 (d, $J = 7,9$ Hz, H-3 e H-5), 3,73 (s, 4- OCH_3). RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 187,8 (C- β'), 162,2 (C-4), 148,6 (C-3'), 146,1 (C- β), 138,1 (C-1'), 135,1 (C-5'), 131,8 (C-1), 130,2 (C-2), 127,6 (C-6), 123,2 (C-4'), 119,2 (C-2'), 114,9 (C- α), 114,4 (C-3), 114,1 (C-5), 55,9 (4- OCH_3). (Anexos 41–44, p. 60-61).

4.1.12 Substância E.26



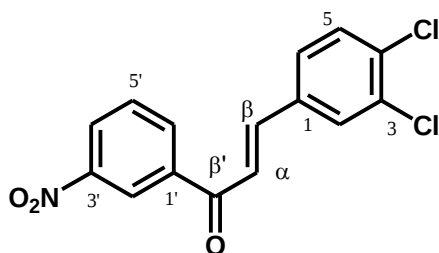
Substância E.26: Rendimento 66%. RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (*mult.*; J em Hz): 8,38 (d, $J = 8,8$ Hz, H-3' e H-5'), 8,33 (d, $J = 8,7$ Hz, H-2' e H-6'), 7,87 (d, $J = 14,6$ Hz, H- β), 7,76 (d, $J = 14,6$ Hz, H- α), 7,89 (d, $J = 8,6$ Hz, H-2 e H-6), 7,04 (d, $J = 5,6$ Hz, H-3 e H-5), 3,73 (s, 4-OCH₃). RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 188,6 (C- β'), 162,2 (C-4), 150,5 (C-4'), 150,2 (C- β), 150,1 (C-1'), 146,7 (C-2'), 146,6 (C-6'), 143,8 (C-1), 131,5 (C-2), 130,3 (C-6), 129,7 (C-3'), 127,0 (C-5'), 124,6 (C- α), 119,9 (C-3), 114,9 (C-5), 55,6 (4-OCH₃). (Anexos 45–48, p. 62-63).

4.1.13 Substância E.30



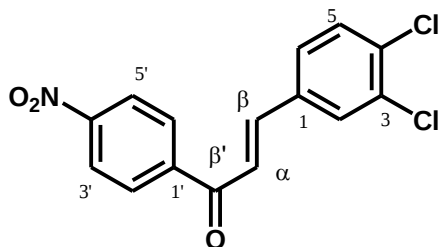
Substância E.30: Rendimento 85%. RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (*mult.*; J em Hz): 8,31 (d, $J = 9,1$, H-2' e H-6'), 8,00 (d, $J = 15,6$ Hz, H- β), 8,21 (d, $J = 7,9$, $J = 1,7$ Hz, H-2' e H-5'), 8,63 (d, $J = 15,6$ Hz, H- α), 7,51 (d, $J = 7,6$ Hz, H-2 e H-6), 7,21 (m), 2,71 (s, 4-CH₃). RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 188,7 (C- β'), 150,9 (C-3'), 142,8 (C- β), 142,5 (C-1'), 136,0 (C-6'), 135,2 (C-1), 130,2 (C-5'), 128,7 (C-3 e C-5), 128,0, 126,9 (C-4'), 126,4 (C-2 e C-6), 124,8 (C-2'), 123,4 (C- α), 64,3 (4-CH₃). (Anexos 49–52, p. 64-65).

4.1.14 Substância E.31



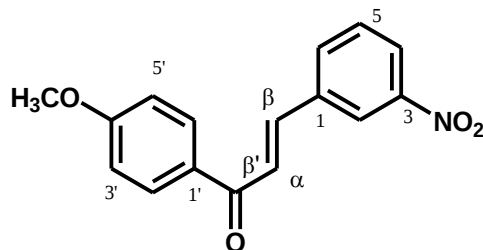
Substância E.31: Rendimento 91%. RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (*mult.*; J em Hz): 8,52 (ddd, $J = 0,5$; 1,9 e 8,7 Hz, H-4'), 8,63 (dd, $J = 8,1$ e 8,1 Hz, H-5'), 7,93 (dd, $J = 1,2$ e 1,2 Hz, H-2'), 8,15 (d, $J = 14,5$ Hz H- β), 7,81 (d, $J = 14,5$ Hz, H- α), 8,34 (d, $J = 9,6$ Hz, H-2), 7,74 (d, $J = 7,2$ Hz, H-5), 7,91 (dd, $J = 8,5$ e 8,5 Hz, H-6). RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 187,8 (C- β'), 148,3 (C-3'), 145,6 (C- β), 143,7 (C-1'), 143,3 (C-6'), 138,7 (C-1), 135,3 (C-3), 135,3 (C-4), 132,2 (C-5'), 131,1 (C-5), 130,9 (C-2), 129,4 (C-4'), 128,9 (C-6), 123,8 (C-2'), 123,4 (C- α). (Anexos 53–56, p. 66-67).

4.1.15 Substância E.32



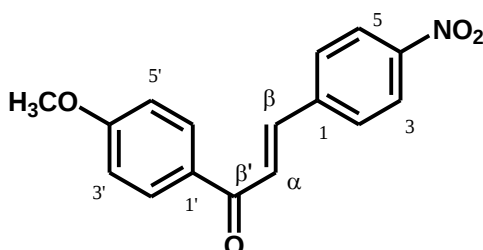
Substância E.32: Rendimento 96%. RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (*mult.*; J em Hz): 8,39 (s, H-3' e H-5'), 8,31 (d, $J = 8,4$ Hz, H-2' e H-6'), 8,06 (d, $J = 14,5$ Hz, H- β), 7,79 (d, $J = 14,5$ Hz, H- α), 7,75 (d, $J = 8,3$ Hz, H-2), 7,74 (d, $J = 1,3$ Hz, H-5), 7,91 (dd, $J = 8,7$ e 8,7 Hz, H-6). RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 188,6 (C- β'), 150,3 (C-4'), 143,8 (C- β), 142,7 (C-1'), 135,3 (C-1), 133,3 (C-3), 132,3 (C-4), 130,8 (C-2' e C-6'), 130,2 (C-5), 128,5 (C-2), 125,4 (C-6), 122,2 (C-3' e C-5'), 119,2 (C- α). (Anexos 57–60, p. 68-69).

4.1.16 Substância E.33



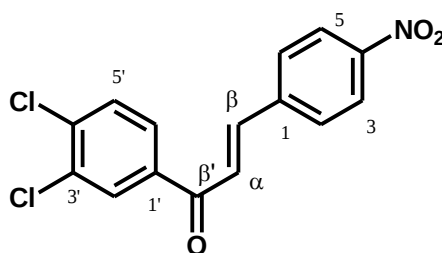
Substância E.33: Rendimento 68%. RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (*mult.*; J em Hz): 8,22 (dd, $J = 7,8$ e $7,8$ Hz, H-2), 8,32 (d, $J = 7,6$ Hz, H-4), 8,15 (d, $J = 15,6$ Hz, H- β), 7,82 (d, $J = 15,6$ Hz, H- α), 8,16 (d, $J = 8,6$ Hz, H-2' e H-6'), 8,27 (dd, $J = 7,9$ e $7,9$ Hz, H-6), 7,73 (dd, $J = 7,6$ e $7,6$ Hz, H-5), 7,11 (d, $J = 7,1$ Hz, H-3' e H-5'), 3,87 (s, 4'- OCH_3). RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 187,7 (C- β'), 163,9 (C-4'), 148,9 (C-3), 141,1 (C- β), 137,1 (C-1), 135,1 (C-6), 131,7 (C-2'), 131,5 (C-6'), 130,1 (C-5), 130,4 (C- α), 125,5, (C-2), 125,3 (C-4), 123,6 (C-3'), 114,0 (C-5'), 56,1 (4'- OCH_3). (Anexos 61–64, p. 70-71).

4.1.17 Substância E.34



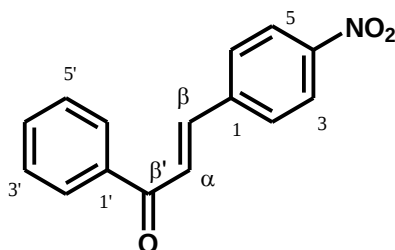
Substância E.34: Rendimento 89%. RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (*mult.*; J em Hz): 8,29 (d, $J = 8,4$ Hz, H-3 e H-5), 8,15 (d, $J = 15,4$ Hz, H- β), 7,79 (d, $J = 15,4$ Hz, H- α), 8,21 (d, $J = 7,9$ Hz, H-2' e H-6'), 8,15 (d, $J = 7,9$ Hz, H-2 e H-6), 7,12 (d, $J = 9,4$ Hz, H-3' e H-5'), 3,73 (s, 4'- OCH_3). RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 187,6 (C- β'), 174,9 (C-4'), 164,0 (C-4), 148,5 (C- β), 141,8 (C-1), 140,8 (C-2'), 131,7 (C-6'), 130,4 (C-1'), 129,5 (C-2), 126,4 (C-6), 124,6 (C- α), 123,0 (C-3), 114,7 (C-5), 112,6 (C-2'), 114,3 (C-5') 66,1 (4'- OCH_3). (Anexos 65–68, p. 72-73).

4.1.18 Substância E.36



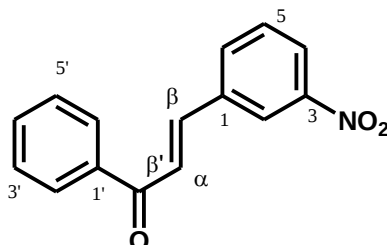
Substância E.36: Rendimento 84%. RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (*mult.*; J em Hz): 8,45 (s, H-5), 8,14 (d, $J = 15,3$ Hz, H- β), 7,85 (d, $J = 15,3$ Hz, H- α), 8,30 (d, $J = 6,9$ Hz, H-2 e H-6), 8,20 (d, $J = 7,5$ Hz, H-2'), 7,88 (dd, $J = 8,8$ e $8,8$ Hz, H-6'), 8,17 (d, $J = 6,8$ Hz, H-5'). RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 189,1 (C- β'), 148,3 (C-4'), 142,7 (C- β), 141,8 (C-1), 141,2 (C-4'), 137,6 (C-1'), 136,5 (C-3'), 131,4 (C-2'), 131,7 (C-5'), 130,3 (C-6'), 129,3 (C-2 e C-6), 125,5 (C- α), 124,0 (C-3 e C-5). (Anexos 69–72, p. 74-75).

4.1.19 Substância E.42



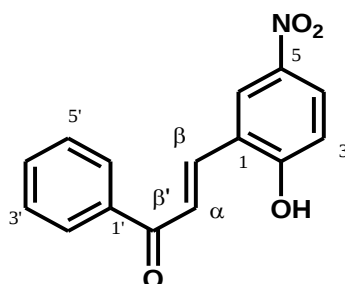
Substância E.42: Rendimento 97%. RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (*mult.*; J em Hz): 8,29 (d, $J = 8,1$ Hz, H-3 e H-5), 8,14 (d, $J = 15,7$ Hz, H- β), 7,83 (d, $J = 15,7$ Hz, H- α), 8,18 (d, $J = 8,2$ Hz, H-2 e H-6), 7,71 (m, H-3' – H-5'), 7,61 (dd, $J = 7,5$ e $7,5$ Hz, H-2 e H-6). RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 189,5 (C- β'), 148,6 (C-4'), 145,2 (C- β), 141,6 (C-1), 141,5 (C-1'), 137,6 (C-4'), 134,9 (C-2' e C-6'), 130,3 (C-2' e C-5'), 129,3 (C-2 e C-6), 126,1 (C- α), 124,0 (C-3 e C-5). (Anexos 73–76, p. 76-77).

4.1.20 Substância E.43



Substância E.43: Rendimento 96%. RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (*mult.*; J em Hz): 8,27 (ddd, $J = 0,9$; 1,9 e 8,6; H-4), 8,21 (dd, $J = 7,8$ e 7,8; H-5), 7,75 (dd, $J = 1,9$ e 1,9; H-2), 8,33 (d, $J = 7,6$ Hz, H-3'), 7,76 (m, H-3' – H-5'), 8,19 (d, $J = 15,6$; H- α), 7,84 (d, $J = 15,6$; H- β), 7,61 (m, H-2' e H-6'). RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 189,5 (C- β'), 148,3 (C-3'), 141,2 (C- β), 137,9 (C-1'), 136,1 (C-1), 135,6 (C-4'), 133,5 (C-6), 130,9 (C-2' e C-6'), 129,6 (C-5), 129,3 (C-2' e C-6'), 125,5 (C- α), 125,4 (C-2), 123,3 (C-4). (Anexos 77–80, p. 78-79).

4.1.21 Substância E.47



Substância E.47: Rendimento 90%. RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (*mult.*; J em Hz): 8,71 (d, $J = 8,1$ Hz, H-6), 7,96 (d, $J = 15,3$ Hz, H- β), 7,13 (d, $J = 15,3$ Hz, H- α), 8,08 (d, $J = 7,5$ Hz, H-2' e H-6'), 7,75 (m, H-4), 7,56 (d, $J = 7,8$ Hz H-4'), 7,08 (d, $J = 7,4$ Hz, H-3). RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 189,7 (C- β'), 164,6 (C-2), 145,6 (C- β), 140,3 (C-5), 137,5 (C-1'), 134,6 (C-4'), 129,7 (C-2' e C-6'), 129,8 (C-3' e C-5'), 122,3 (C-6), 122,1 (C-4), 121,1 (C- α), 117,3 (C-1), 116,2 (C-3). (Anexos 81–84, p.80-81).

4.2 Avaliação da Atividade Anti-HCV

4.2.1 Viabilidade de Hepatócitos Huh 7.5 – Ensaio do MTT

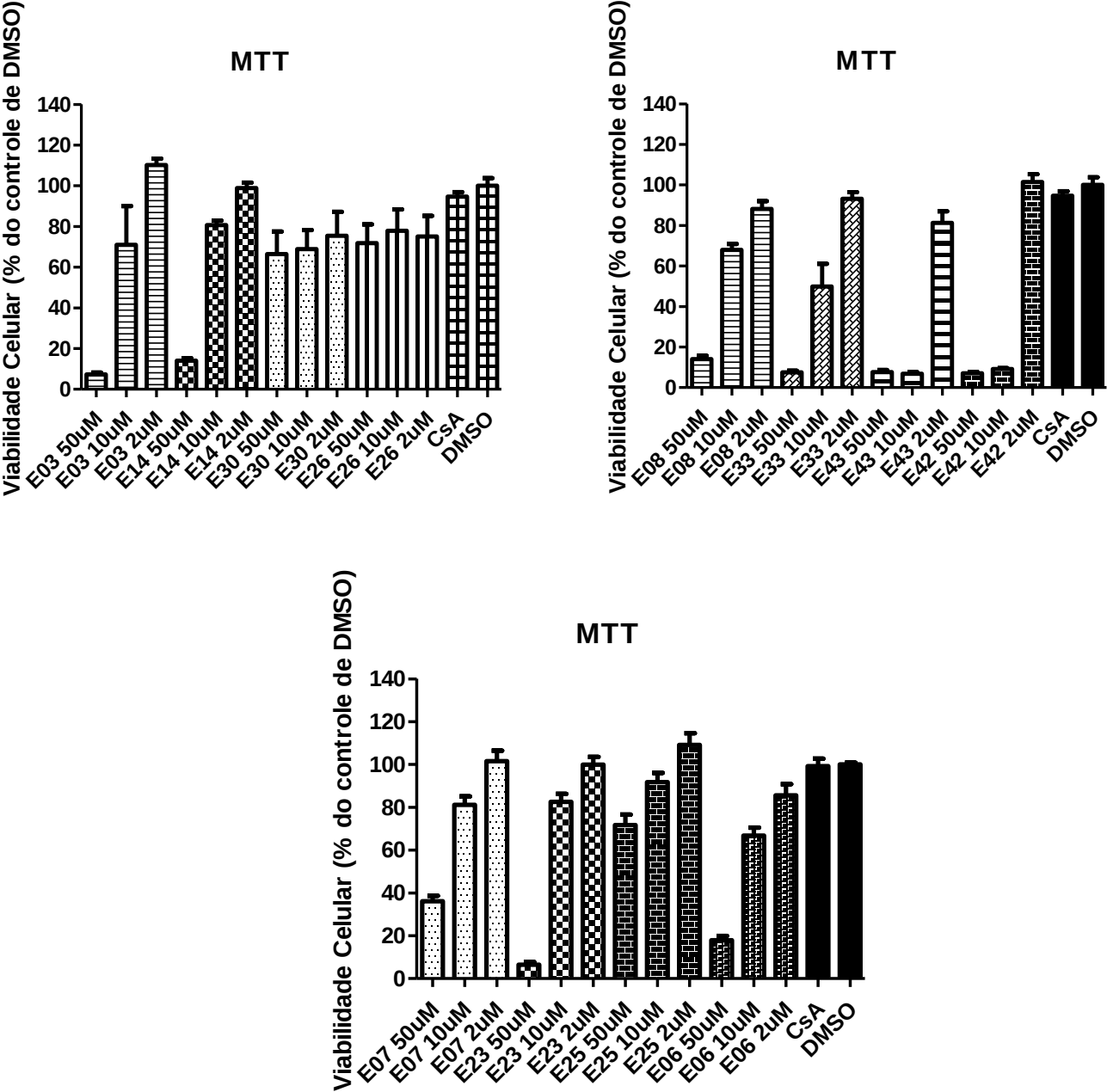
Para a análise de viabilidade dos hepatócitos Huh 7.5 foram testadas 16 nitrochalconas. As substâncias foram ensaiadas em concentrações de 50, 10 e 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

O resultado dos testes de viabilidade dos hepatócitos Huh 7.5 demonstrou que as nitrochalconas a 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ apresentaram efeito citotóxico, exibindo valores de viabilidade celular inferiores a 60%.

Quando os testes foram realizados com as substâncias na concentração de 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$, a viabilidade celular das substâncias **E.06** a **E.08** e **E.23** foram superiores a 80%, sendo assim esta concentração foi selecionada para os ensaios de inibição da replicação do HCV.

Na Figura 5 (p. 29), 12 nitrochalconas (**E.03**, **E.06**, **E.07**, **E.08**, **E.14**, **E.23**, **E.25**, **E.26**, **E.30**, **E.33**, **E.42** e **E.43**) apresentaram viabilidade celular superior a 80%, quando testadas a 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Considerando a elevada viabilidade celular, as concentrações de 2 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foram selecionadas para a realização dos ensaios de inibição da replicação do HCV.

Figura 5. Viabilidade de Hepatócitos Huh 7.5 Expostos as Nitrochalconas e Ciclosporina A (CsA)



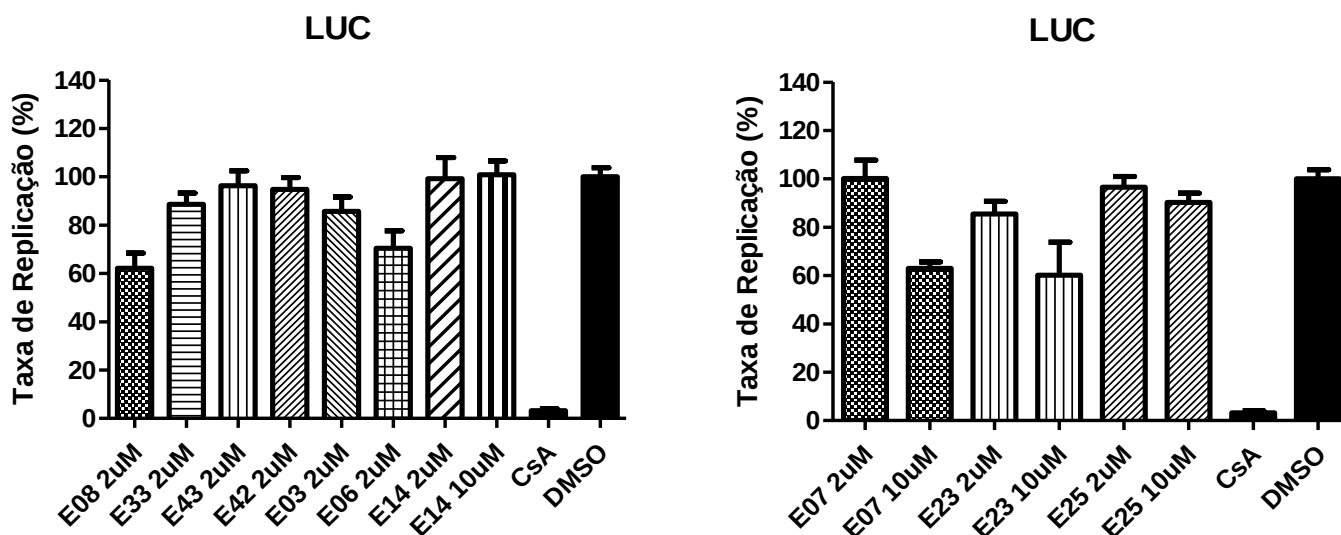
Fonte: Autor (2016)

4.2.2 Inibição da Replicação do HCV - Ensaio de Luciferase

O valor da porcentagem de inibição da replicação do HCV foi mensurado pelo valor da viabilidade celular (Figura 5, p. 29) subtraídos do valor da taxa de replicação (LUC) do HCV, para cada nitrochalcona (Figura 6, p. 30).

Dentre as substâncias testadas na concentração de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, as substâncias **E.03**, **E.14**, **E.25**, **E.33**, **E.42** e **E.43** não demonstraram inibição da replicação do HCV. A Figura 6, (p. 30) demonstrou as taxas da inibição da replicação do HVC.

Figura 6. Atividade Anti-HCV das Nitrochalconas e Ciclosporina A (CsA)



Fonte: Autor, (2016)

As substâncias **E.06** e **E.08** apresentaram inibição da replicação do HCV na concentração de $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ demonstrando uma porcentagem de inibição da replicação de aproximadamente 30%.

As substâncias **E.07** e **E.23** demonstraram uma inibição na replicação do HCV, exibindo taxas de inibição da replicação de 20%, porém apenas em uma concentração mais elevada ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$).

4.3 Avaliação da Atividade Anti-*Candida*

A Tabela 2 (p. 31) sumarizou os resultados dos valores de concentração inibitória mínima (CIM) e valores de concentração fungicida mínima (CFM) para as cinco espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*).

Tabela 2. Atividade Anti-*Candida* das Nitrochalconas Expressa como Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM em $\mu\text{g mL}^{-1}$) e Concentração Fungicida Mínima (CFM em $\mu\text{g mL}^{-1}$).

		Ca 90028	Ca 5314	Cg	Ct	Cp	Ck
Chalconas com nitro na posição 3' (anel A)	E.12	62,5/#	*	62,5/#	62,5/#	>62,5/#	31,25/62,5
	E.13	62,5/>62,5	*	62,5/#	62,5/#	>62,5/#	62,5/>62,5
	E.23	0,97/3,90	3,91/7,81	31,25/62,5	31,25/62,5	31,25/>62,5	31,25/62,5
	E.25	62,5/>62,5	*	62,5/*	62,5/*	62,5/*	62,5/>62,5
	E.31	62,5/*	*	62,5/*	62,5/*	>62,5/#	31,25/62,5
Chalconas com nitro na posição 4' (anel A)	E.02	62,5/#	*	62,5/#	62,5/#	62,5/#	62,5/#
	E.03	31,25/62,5	*	62,5/#	31,25/62,5	31,25/62,5	31,25/62,5
	E.06	62,5/#	*	62,5/#	62,5/#	62,5/>62,5	62,5/#
	E.07	62,5/#	*	>62,5/#	62,5/#	62,5/#	>62,5/#
	E.08	7,81/31,25	7,81/31,25	*	*	*	*
	E.10	62,5/#	*	62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#
	E.11	62,5/#	*	62,5/#		62,5/#	62,5/#
	E.26	>62,5/#	*	>62,5/#	62,5/#	>62,5/#	>62,5/#
	E.30	62,5/#	*	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	62,5/#
	E.32	62,5/#	*	62,5/#	62,5/#	62,5/#	>62,5/#
Chalconas com nitro na posição 3 (anel B)	E.33	62,5/>62,5	*	62,5/>62,5	31,25/>62,5	31,25/>62,5	62,5/#
	E.43	62,5/#	*	62,5/#	15,62/31,25	31,25/>62,5	31,25/>62,5
	E.47	15,62/31,25	15,62/31,25	62,5/#	31,25/#	62,5/#	31,25/#
Chalconas com nitro na posição 4 (anel B)	E.34	62,5/#	*	62,5/#	62,5/#	62,5/#	>62,5/#
	E.36	62,5/#	*	62,5/#	62,5/#	62,5/#	62,5/#
	E.42	31,25/>62,5	*	62,5/#	62,5/#	62,5/>62,5	62,5/#
fluconazol		16	16	2	2	1	32
anfotericina B		0,5	0,5	0,5	0,5	0,25	0,5

* não foi testado ; # CIM = CFM ; **Fonte:** Autor (2016)

Dentre as 21 nitrochalconas testadas, a 3'- nitrochalcona **E.23** apresentou potente atividade anti-*Candida*, exibindo valores de CIM compreendidos entre 0,97 e 31,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Contra *C. albicans* 90028 e *C. albicans* 5314, **E.23** foi cerca de 2 e 8 vezes menos potente que a anfotericina B. Contudo, contra as duas cepas de *C. albicans* foi mais potente que o fluconazol. A segunda nitrochalcona com maior potência anti-*Candida* foi a 4'- nitrochalcona **E.08** (2-OH, 5-F), a qual exibiu valores de CIM de 7,81 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contra as duas cepas de *Candida*. Dentre as chalconas com o grupo nitro no anel B, destaca-se a atividade da 3 – nitrochalcona **E.42**, a qual apresentou CIM de 31,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contra *C.albicans* 90028.

As 3'- nitrochalconas contendo substituintes retiradores de elétrons [**E.12** (4-F), **E.13** (4-Cl), **E.14** (4-Br), **E.31** (3,4 – diCl)], bem comoceptor de elétrons [**E.25** (4-OCH₃)] promoveram significativa redução na atividade antifúngica. A única exceção foi observada para *C. krusei*, contra a qual as 3'- nitrochalconas **E.12** (4-F) e **E.31** (3,4-Cl) exibiram os mesmos valores de CIM e CFM.

Ao contrário das 3'- nitrochalconas, as chalconas com o nitro na posição 4' apresentaram baixa atividade antifúngica. Dentre essas, destacou-se a atividade anti-*Candida* de **E.03**, a qual demonstrou valores de CIM e CFM de 31,25 e 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, contra *C. albicans* 90028, *C.tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*.

Dentre as chalconas com o nitro no anel B, destacaram-se **E.47** e **E.42**. A 3-nitrochalcona hidroxilada **E.47** apresentou potente atividade anti-*Candida*, exibindo valores de CIM e CFM de 15,62 e 31,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente contra *C. albicans* 90028 e *C. albicans* 5413, valores similares àqueles obtidos para o fluconazol. Frente às espécies de *C.tropicalis* e *C. krusei*, **E.47** apresentou atividade moderada, com valores de CIM e CFM de 31,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

4.4 Avaliação da Atividade Antibacteriana

A Tabela 3 (p. 33) sumarizou os resultados dos valores de concentração inibitória mínima (CIM) e valores de concentração bactericida mínima (CBM) para espécies *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* (cepa sensível), *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* MRSA, cepa resistente à meticilina.

Tabela 3. Atividade Antibacteriana das Nitrochalconas Expressa como Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM em $\mu\text{g mL}^{-1}$) e Concentração Bactericida Mínima (CBM em $\mu\text{g mL}^{-1}$).

		Pa	Kp	Sm	La	Sa	Sa MRSA
Chalconas com nitro na posição 3' (anel A)	E.12	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#
	E.13	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#
	E.14	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#
	E.19	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#
	E.23	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#
	E.25	>62,5/#	>62,5/#	31,25/31,25	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#
	E.31	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#
Chalconas com nitro na posição 4' (anel A)	E.02	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#
	E.03	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#
	E.06	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#
	E.07	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#
	E.08	>62,5/#	>62,5/#	*	*	1,95/3,90	1,95/3,90
	E.10	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#
	E.11	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#
	E.22	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#
	E.26	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#
	E.30	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#
	E.32	>62,5/#	>62,5/#	31,25/62,5	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#
Chalconas com nitro na posição 3 (anel B)	E.33	>62,5/#	>62,5/#	62,5/62,5	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#
	E.43	>62,5/#	31,25/62,5	>62,5/	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#
	E.47	3,9/3,9	3,9/3,9	1,95/3,90	1,95/3,90	0,97/0,97	1,95/1,95
Chalconas com nitro na posição 4 (anel B)	E.34	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#
	E.36	>62,5/#	>62,5/#	31,25/31,25	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#
	E.42	>62,5/#	>62,5/#	31,25/62,5	>62,5/#	>62,5/#	>62,5/#
ciprofloxacina		0,625	-	-	-	-	-
cefalosporina		-	1	-	-	-	-
clorexidina		-	-	0,625	0,10	-	-
vancomicina		-	-	-	-	1	2

* não foi testado ; # CIM = CBM ; **Fonte:** Autor (2016)

Dentre as 21 nitrochalconas testadas, a substância **E.47** apresentou potente atividade antibacteriana, exibindo valores de CIM compreendidos entre 1,95 e 3,90 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Contra *Staphylococcus aureus* 25923 e *Staphylococcus aureus* MRSA, **E.47** exibiu CIM e CBM de 0,97 e 1,95 $\mu\text{g mL}^{-1}$, valores similares às concentrações da vancomicina, antibiótico de referência. Contra as cinco espécies bacterianas, **E.47** foi tão potente quanto à vancomicina. Portanto a substância **E.47** apresentou comportamento bactericida contra todas as espécies quando testada em 3,90 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Dessa forma, **E.47** apresenta espectro de ação amplo, atuando sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

A substância **E.43** demonstrou potente atividade contra *Klebsiella pneumoniae*, exibindo uma CIM e CBM de 31,25 e 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

As substâncias **E.25**, **E.32**, **E.36** e **E.42** demonstraram potente atividade contra *Streptococcus mutans* UA 159, exibindo uma CIM de 31,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Contra *Staphylococcus aureus* 25923 e *Staphylococcus aureus* MRSA 33591, a substância **E.08** demonstrou uma CIM e CBM de 1,95 e 3,90 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

Em linhas gerais, salientou-se que dentre as espécies bacterianas testadas, *S. mutans* foi a mais sensível, enquanto *P. aeruginosa* foi a mais resistente ao efeito das nitrochalconas.

5. Conclusões

A série com 24 nitrochalconas foi sintetizada com rendimentos que variaram de 63 a 97%. As substâncias com o grupo nitro na posição 4 (anel B) foram obtidas com os maiores rendimentos, as quais variaram de 84 a 97%. As nitrochalconas **E.07** e **E.08** são substâncias inéditas na literatura.

As substâncias **E.42** e **E.43** foram citotóxicas para hepatócitos Huh-7,5 a 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e a 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, segundo os ensaios de MTT.

A substância **E.08** foi capaz de inibir a replicação do HCV em 30%, a 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$, por meio do ensaio de luciferase, permitindo uma viabilidade celular de aproximadamente 100%, de acordo com o ensaio de MTT.

A substância **E.23** demonstrou atividade anti-*Candida. albicans*, exibindo valores de CIM de $0,97 \mu\text{g mL}^{-1}$, a qual possui uma atividade duas vezes inferior que a anfotericina B.

A substância **E.47** exibiu atividade anti- *Staphylococcus aureus* e anti-*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, demonstrando valores de CIM de 0,97 e $1,95 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente, o qual foi similar à vancomicina.

O grupo nitro está presente em inúmeros fármacos, incluindo metronidazol, nitrofurais, furazolidona e cloranfenicol; os quais possuem atividade antimicrobiana.

O presente estudo indica que o grupo nitro foi importante para a ação biológica, contudo não foi crucial, uma vez que, dependendo da sua localização nos anéis A e B observou-se ou não a atividade biológica.

Nossos estudos químicos e biológicos de nitrochalconas conduziram a descoberta de *hits*, os quais podem ser valiosos protótipos para o desenvolvimento de agentes anti-infecciosos inovadores.

6. Referências

ADDY, M. Hibitane in the treatment of aphtous ulceration. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 4. p. 108–116.1977.

ALBERTON, A.; DAMAZIO, R.; CAZAROLLI, L.; et al. Influence of chalcone analogues on serum glucose levels in hyperglycemic rats. **Chemico-Biological Interactions**, v.171, p. 355–362, 2008.

BANERJEE, A.; KIDD, E. A. M.; WATSON, T. F. *In vitro* evaluation of five alternative methods of carious dentine excavation. **Caries Res**, v. 34, n. 2, p. 144–150, 2000.

BUCKARI, S. N. A.; JASAMAI, M.; JANTAM I.; AHMAD W. Review of methods and various catalytis used for chalcone synthesis. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 10, p. 73–83, 2013.

BUISCHI YP. **Promoção de saúde bucal na clínica odontológica**. São Paulo: Artes médicas, 336p, 2000.

CLSI, **Clinical and Laboratory Standards Institute**. (2008) Protocol M27-A3. Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 3.ed. Pennsylvania: NCCLS, 25 p, 2008.

CLSI, **Clinical and Laboratory Standards Institute**. (2012) Protocol M27-A9. Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of bacterial. 2.ed. Pennsylvania: NCCLS, 70p, 2012.

DALLA VIA, L.; GIA, O.; CHIARELOTTO, G.; FRELIN, M. G. DNA-targeting pyrroloquinoline-linked butenone and chalcones: Synthesis and biological evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 2854–2861, 2009.

EDDARIR, S.; COTELLE N.; BAKKOUR Y.; ROLANDO C. An efficient synthesis of chalcones based on the Suzuki reaction. **Tetrahedron Letters**, v. 44, p. 5359–5363, 2003.

GREENSPAN *et al.* Treatment of oral candidiasis in HIV infection. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**.v 1. p. 211–214. 1994.

HOOFNAGLE, J. H.; FELD, J. J. Mechanism of Action of Interferon and Ribavarin in Treatment of Hepatitis C. **Nature**, v. 436, p. 967–972, 2005.

ILANGO, K.; VALENTINA, P.; SALUJA, G. S. Synthesis and *In vitro* anti-cancer activity of some substituted Chalcone derivatives. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**. v.1, n.2, p. 354–359, 2010.

JAYAPAL, M.R.; SREEDAR N. Y. Anhydrous K₂CO₃ as Catalyst for the synthesis of chalcones under microwave irradiation. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 2, n. 10, p. 644–647.

KATZUNG, B. G.; **Farmacologia Básica e Clínica**, 8^a ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2001, cap. 52.

KOHLI, A.; SHAFFER, A.; SHERMAN, A.; KOTTILIL, S. Treatment of Hepatitis C: A Systematic Review. **Clinical Review & Education**, v. 312, n. 6, p. 631–640, 2014.

LIANG, T. J.; GHANY, M. G. Current and Future Therapies for Hepatitis C Virus Infection. **The New England Journal of Medicine**, v. 368, n. 20, p. 1907–1917, 2013.

LIU, Y.; PETERSON, D.A.; KIMURA, H.; SCHUBERT, D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) – 2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. **Journal of Neurochemistry**, England, v. 69, n. 2, p.581–593, 1997.

MUNIR, S; et al. Hepatitis C Treatment: Current and Future Perspectives. **Virology Journal**, v. 296, n.6, p.1–6, 2010.

PAULA, F.R; SERRANO, S.H.P; TAVARES, L.C. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. **Química Nova**, v. 32, No. 4, 1013–1020, 2009.

PELLEGRINO FL, TEIXEIRA LM, CARVALHO MD MDA G ET AL - Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, **Brazilian Journal of Clinical Microbiology**; 40:2420–2424, 2002.

PRASHAR, H.; CHAWLA, A.; KUMAR, S.; KHARB, R. Chalcone as a versatile moiety for diverse pharmacological activities. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 3, n. 7, p.1913–1927, 2012.

RANG, H. P.; et al. **Rang & Dale: Farmacologia**. 7ª ed. [tradução de Tatiana Ferreira Robaiana, et al. – Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

SANT´ANA PL, MILAN EP, MARTINEZ R, QUEIROZ-TELLES F, FERREIRA MS, ALCÂNTARA AP ET AL. Multicenter Brazilian study of oral *Candida* species isolated from aids patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**; 97 (2): 253–257, 2002.

SMITH MOLAND, E. et al. Plasmid-mediated, carbapenemhydrolysing beta-lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 3, p. 711–4, 2003.

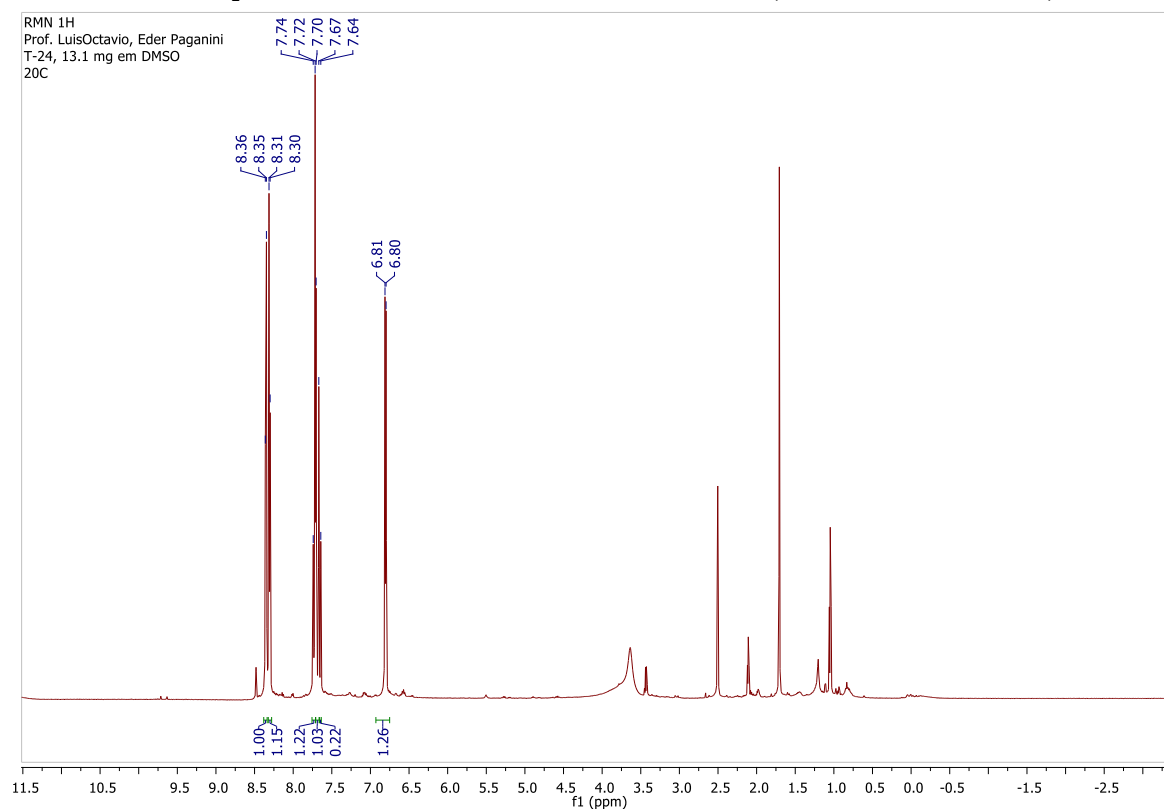
WYLES, D. L.; KAIHARA, K. A.; KORBA, B. E.; et al. The octadecyloxyethyl ester of (S)-9-[3-hydroxy-2-(phosphonomethoxy) propyl]adenine is a potent and selective inhibitor

of hepatitis C virus replication in genotype 1A, 1B, and 2A replicons. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, p. 2660–2662, 2009.

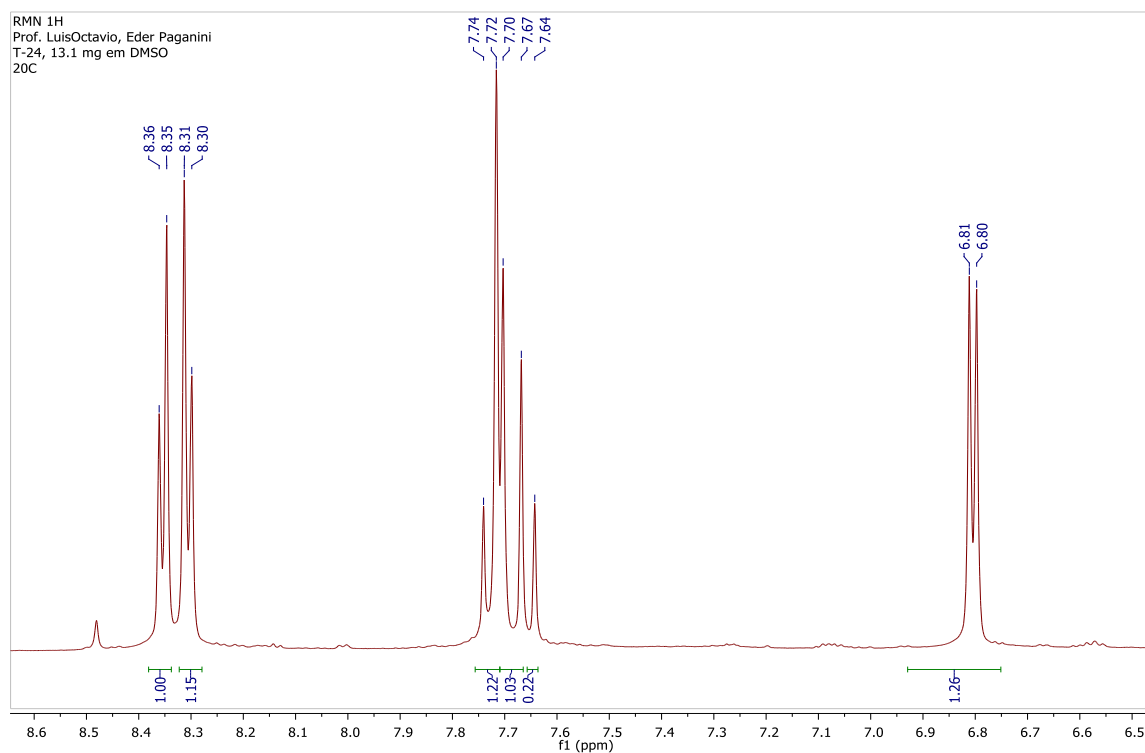
ZANGADE, S.; MOKLE S.; VIBHUTE A.; VIBHUTE Y. An efficient and operationally simple synthesis of some new chalcones by using grinding technique. **Chemical Sciences Journal**, v. 2011, p.1–6, 2011.

ZUANAZZI, J. A. S. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O., et al (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**: Ed. UFSC, 2001, p.499–526.

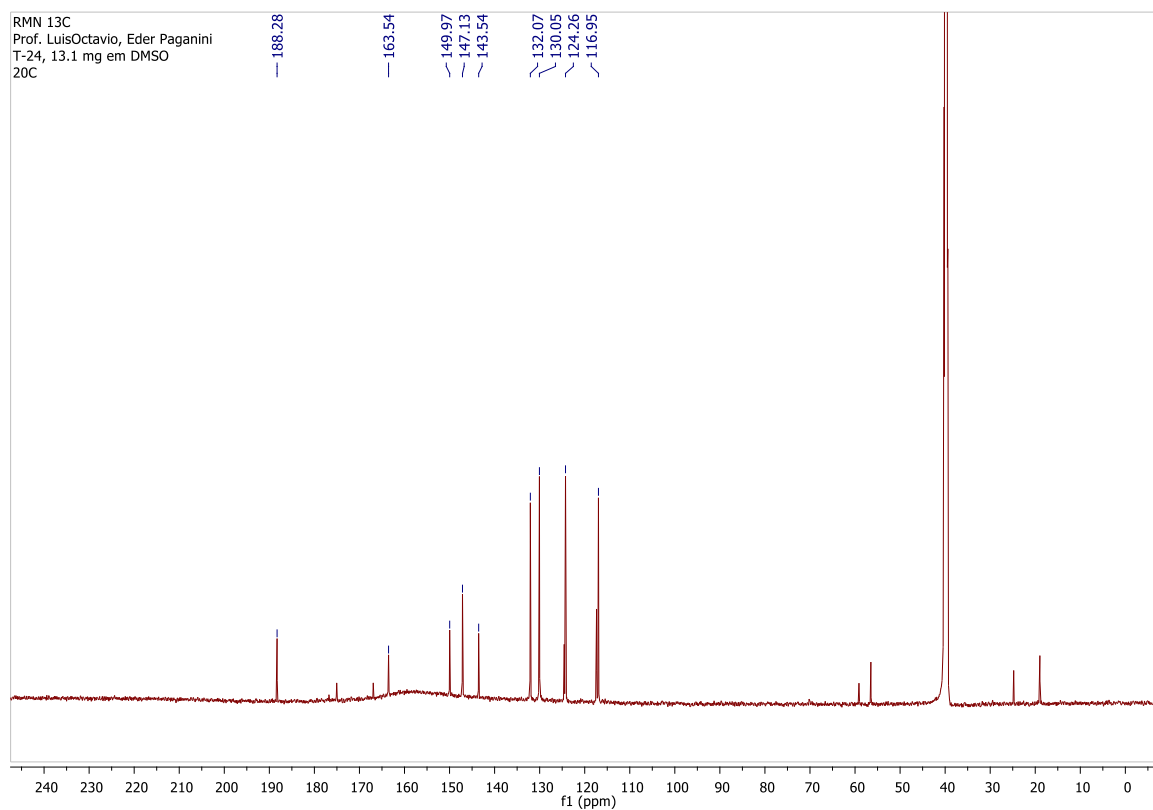
ANEXO 1. Espectro de RMN de ^1H da substância **E.02** (DMSO- d_6 ; 400 MHz)



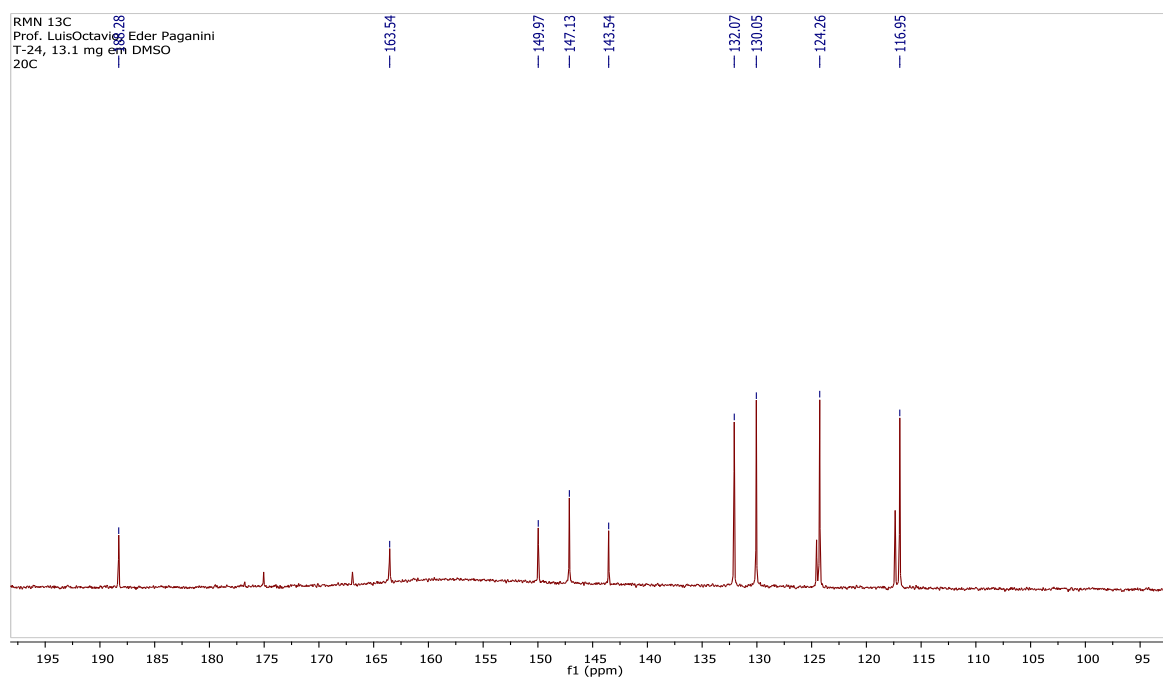
ANEXO 2. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **E.02** (DMSO- d_6 ; 400 MHz).



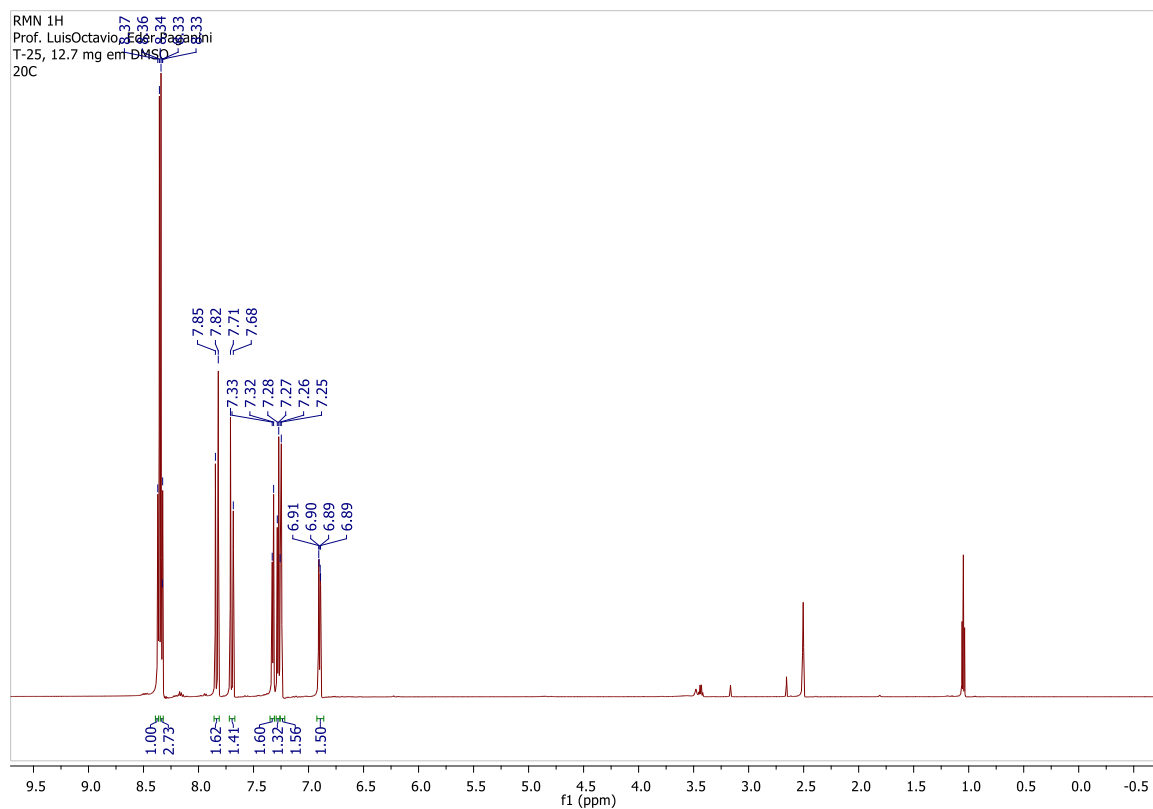
ANEXO 3. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **E.02** (DMSO- d_6 ; 100 MHz).



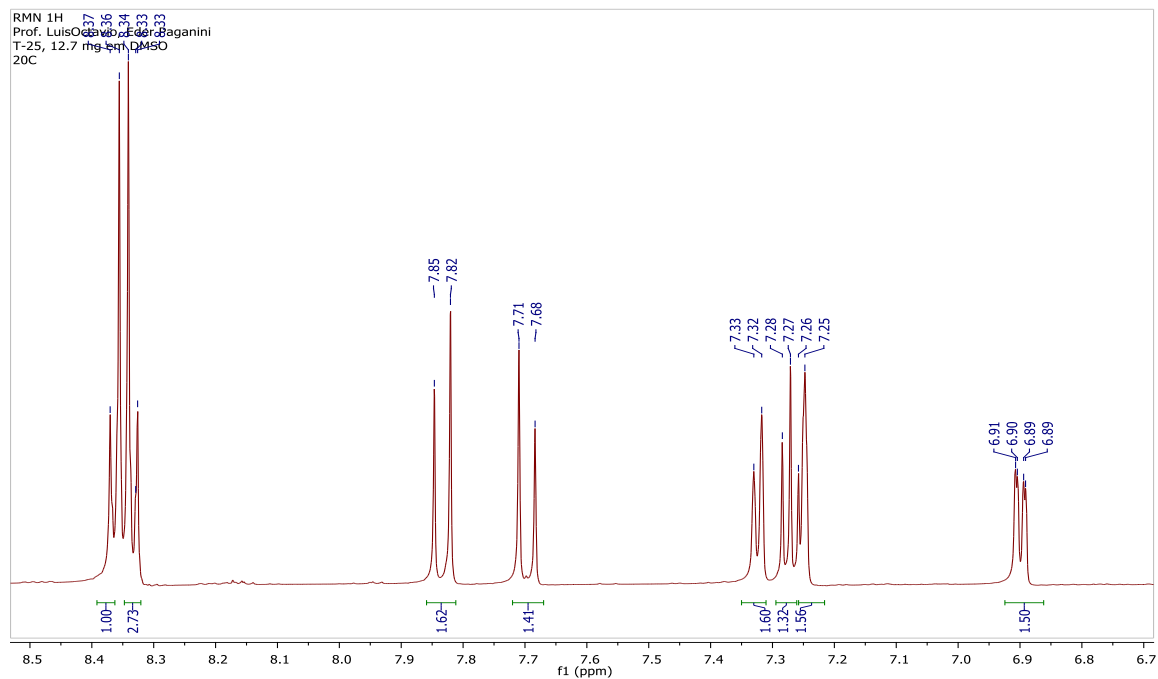
ANEXO 4. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância **E.02** (DMSO- d_6 ; 100 MHz).



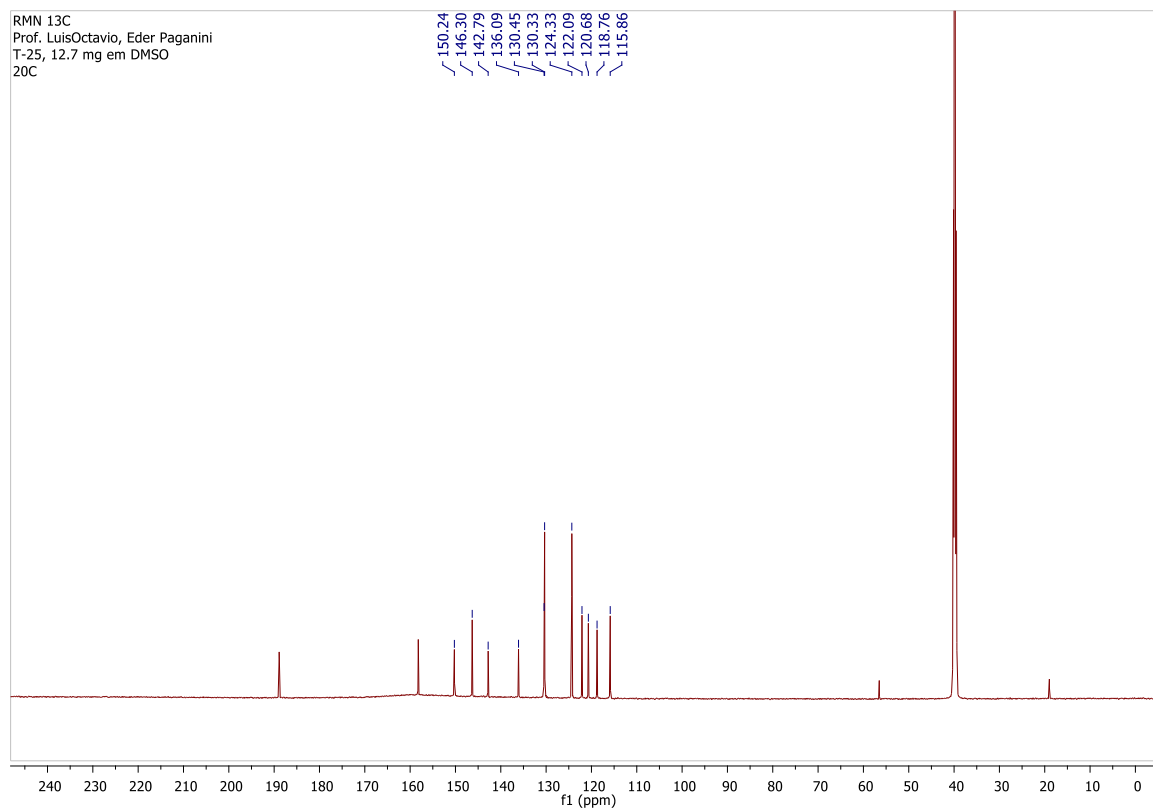
ANEXO 5. Espectro de RMN de ^1H da substância **E.03** ($\text{DMSO-}d_6$; 400 MHz).



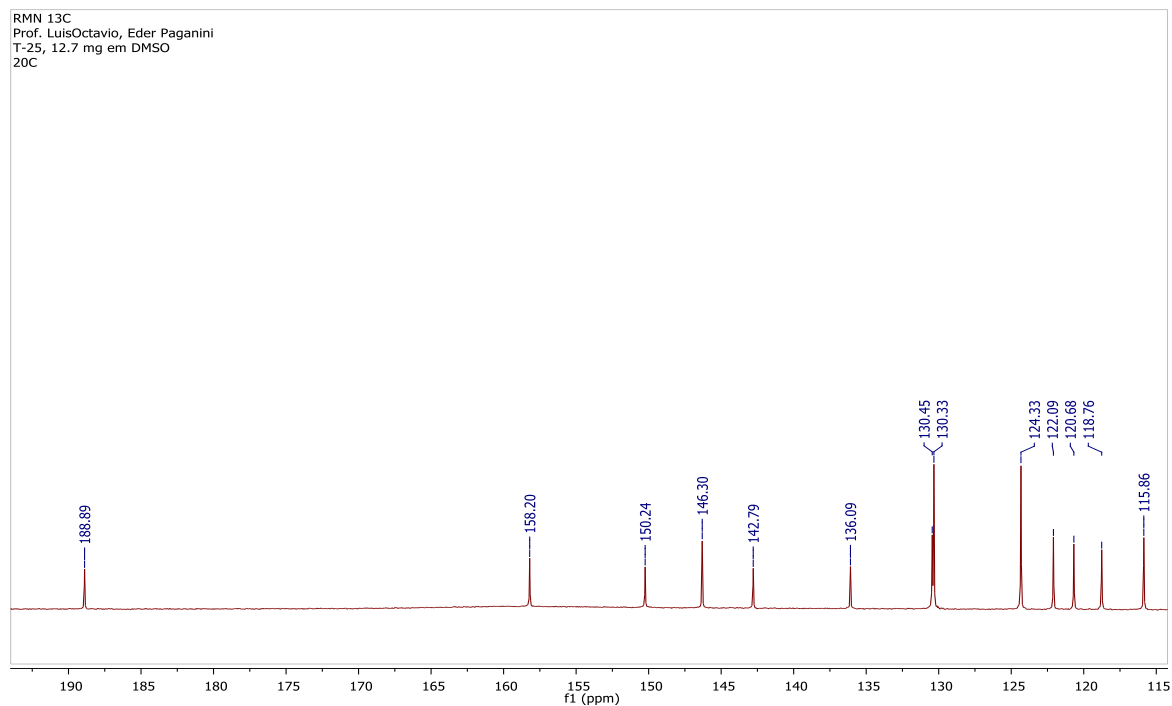
ANEXO 6. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **E.03** ($\text{DMSO-}d_6$; 400 MHz).



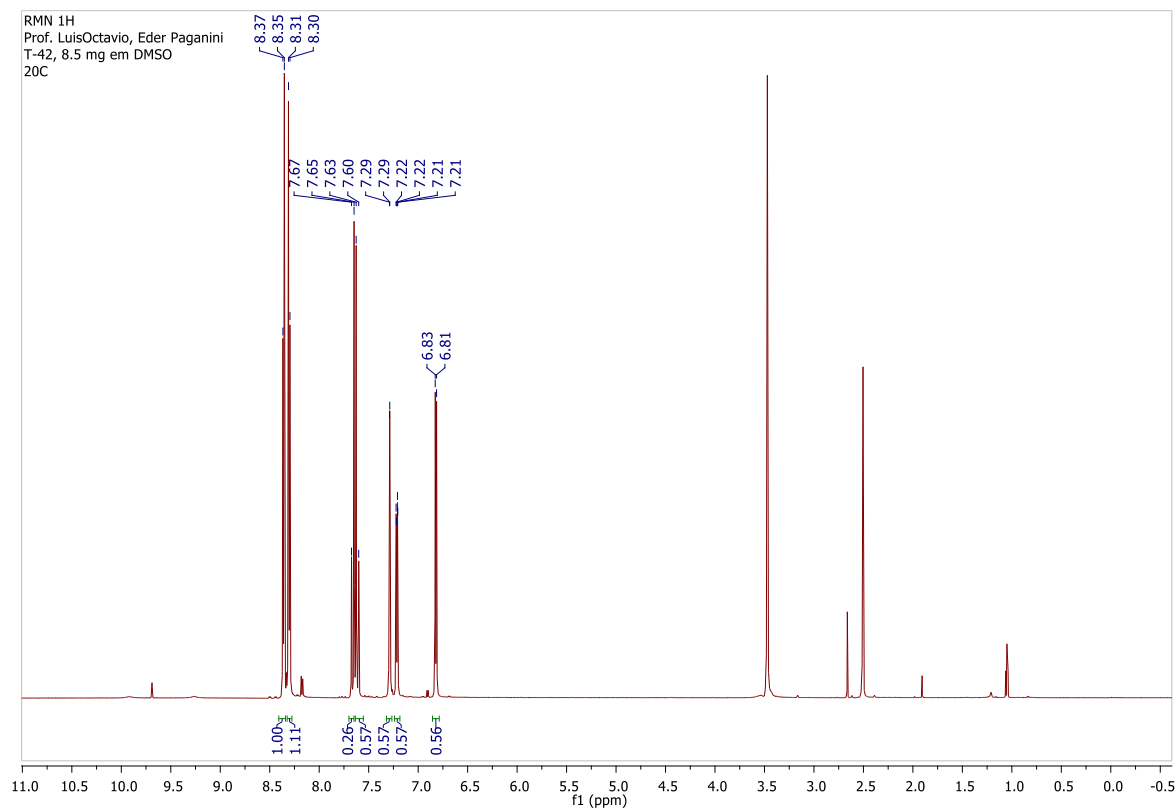
ANEXO 7. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **E.03** (DMSO- d_6 ; 100 MHz).



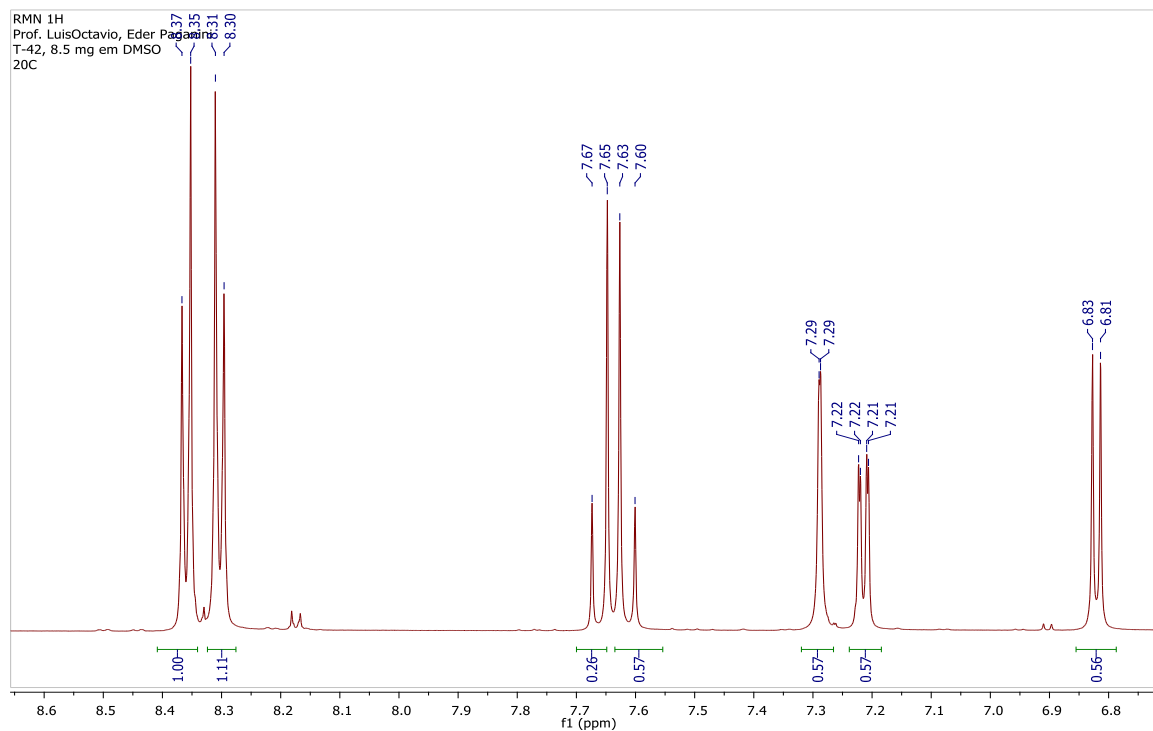
ANEXO 8. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância **E.03** (DMSO- d_6 ; 100 MHz).



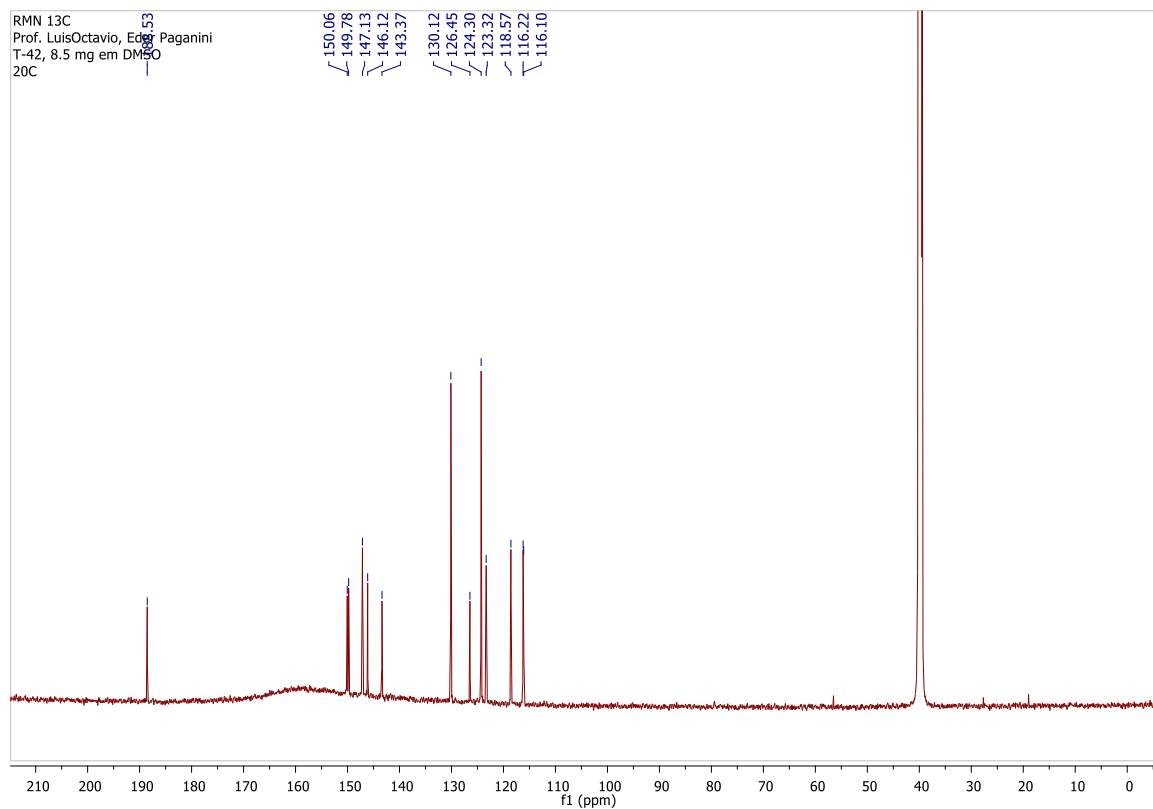
ANEXO 9. Espectro de RMN de ^1H da substância **E.06** (DMSO- d_6 ; 400 MHz).



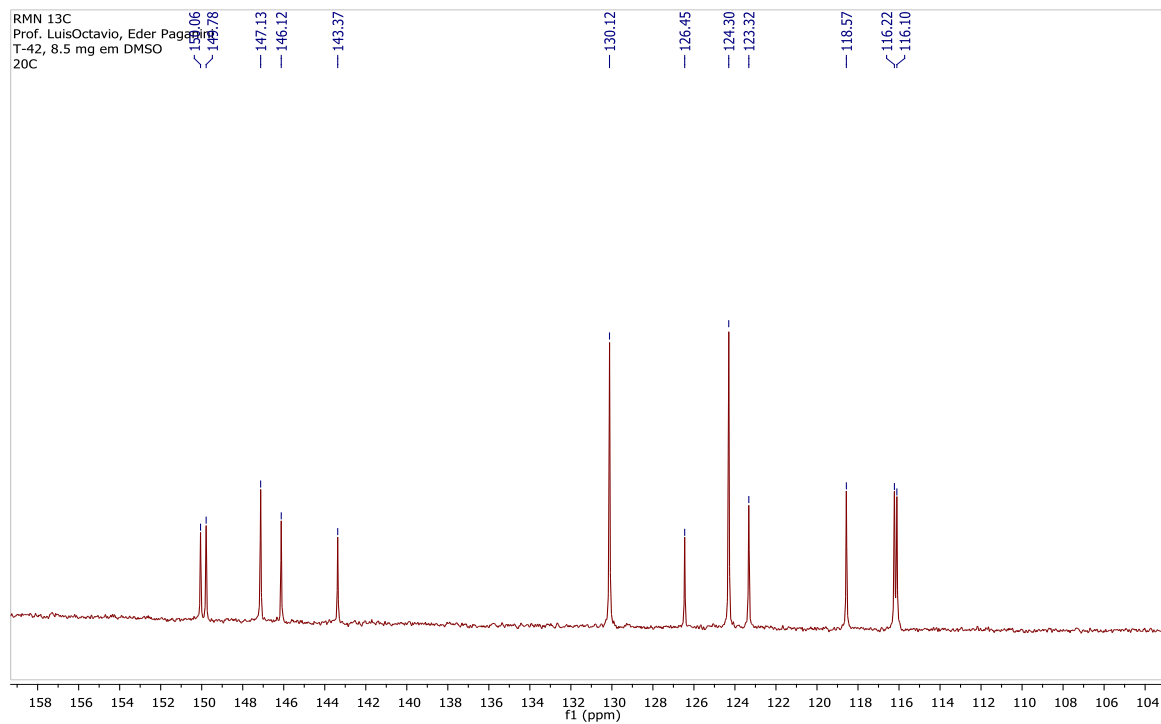
ANEXO 10. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **E.06** (DMSO- d_6 ; 400 MHz).



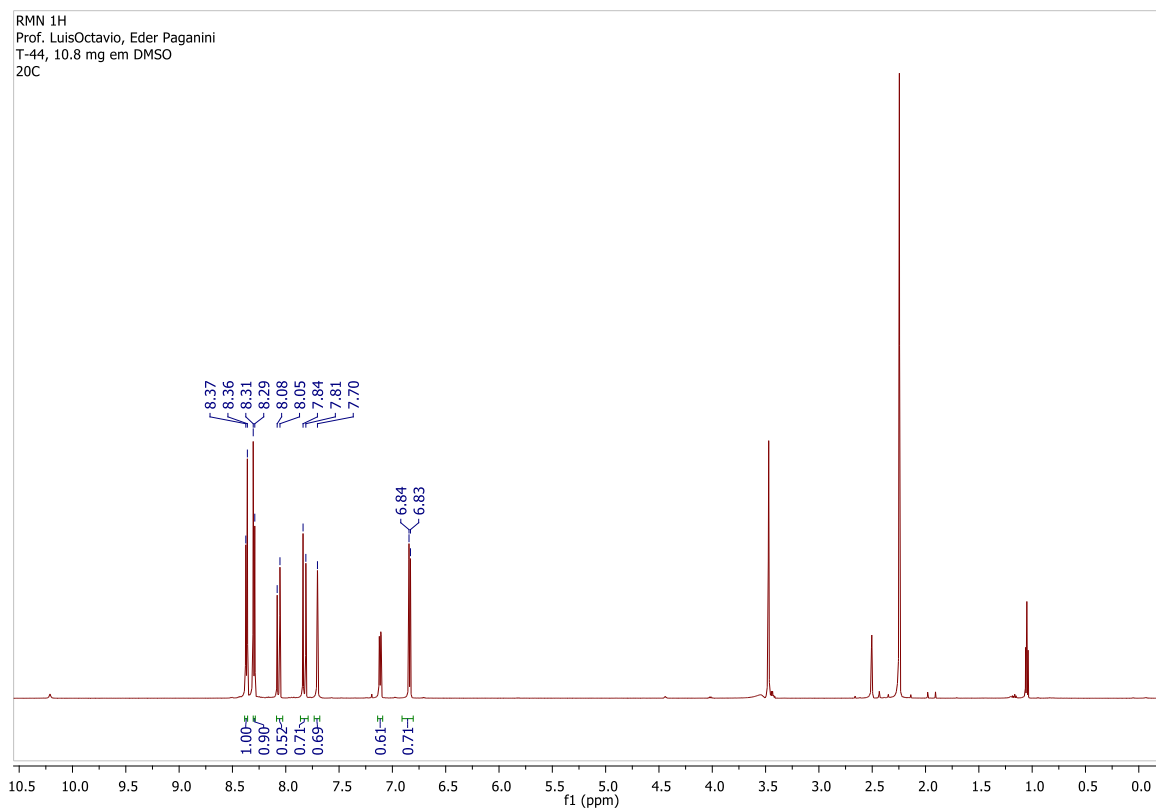
ANEXO 11. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **E.06** (DMSO- d_6 ; 100 MHz).



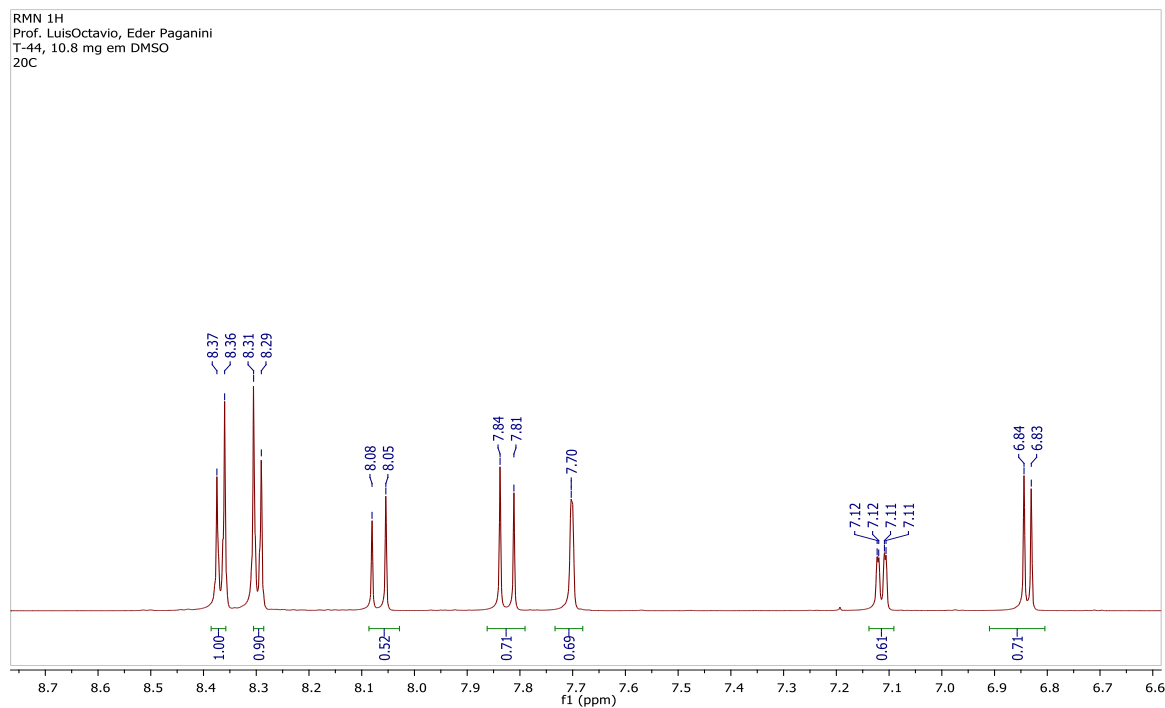
ANEXO 12. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância **E.06** (DMSO- d_6 ; 100 MHz).



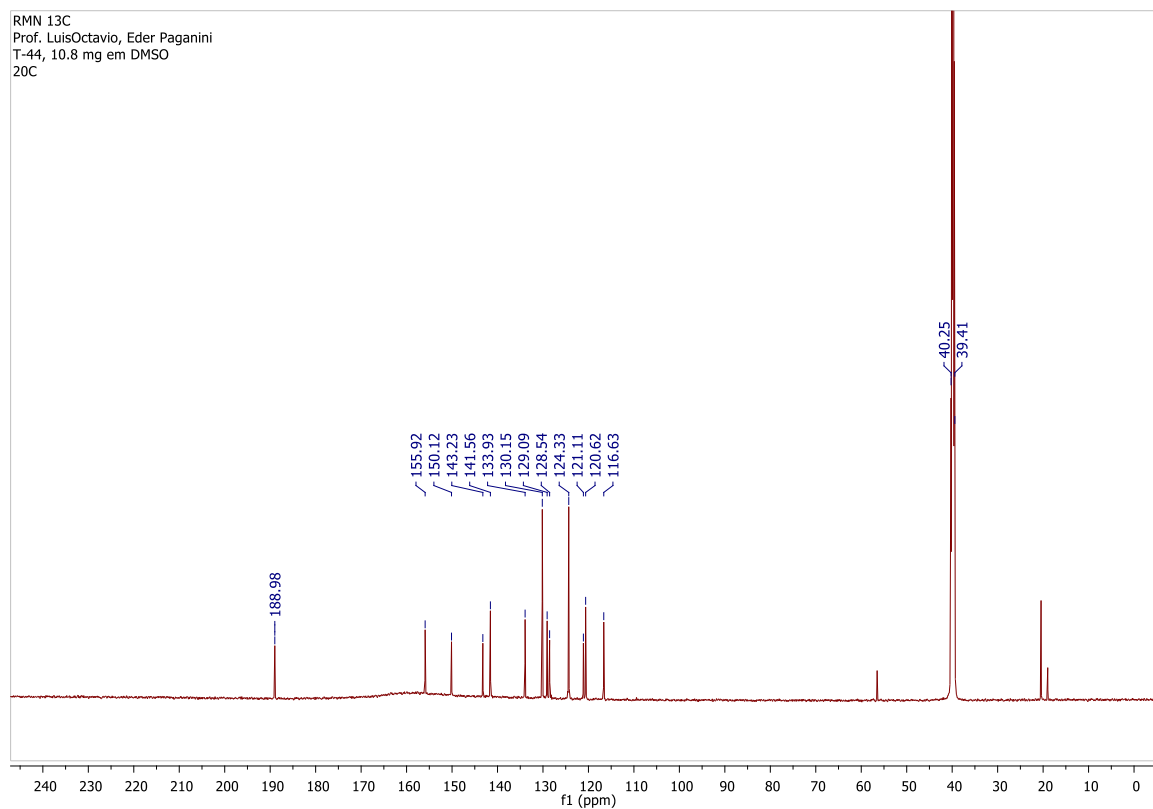
ANEXO 13. Espectro de RMN de ^1H da substância **E.07** ($\text{DMSO-}d_6$; 400 MHz).



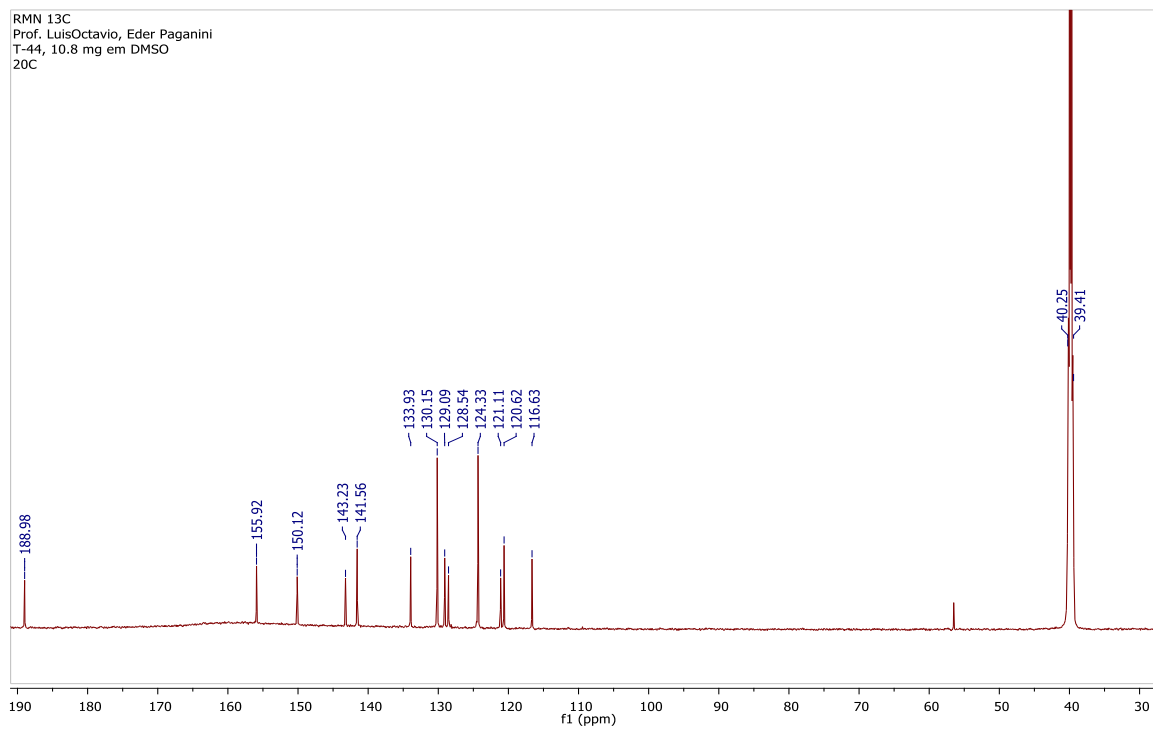
ANEXO 14. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **E.07** ($\text{DMSO-}d_6$; 400 MHz).



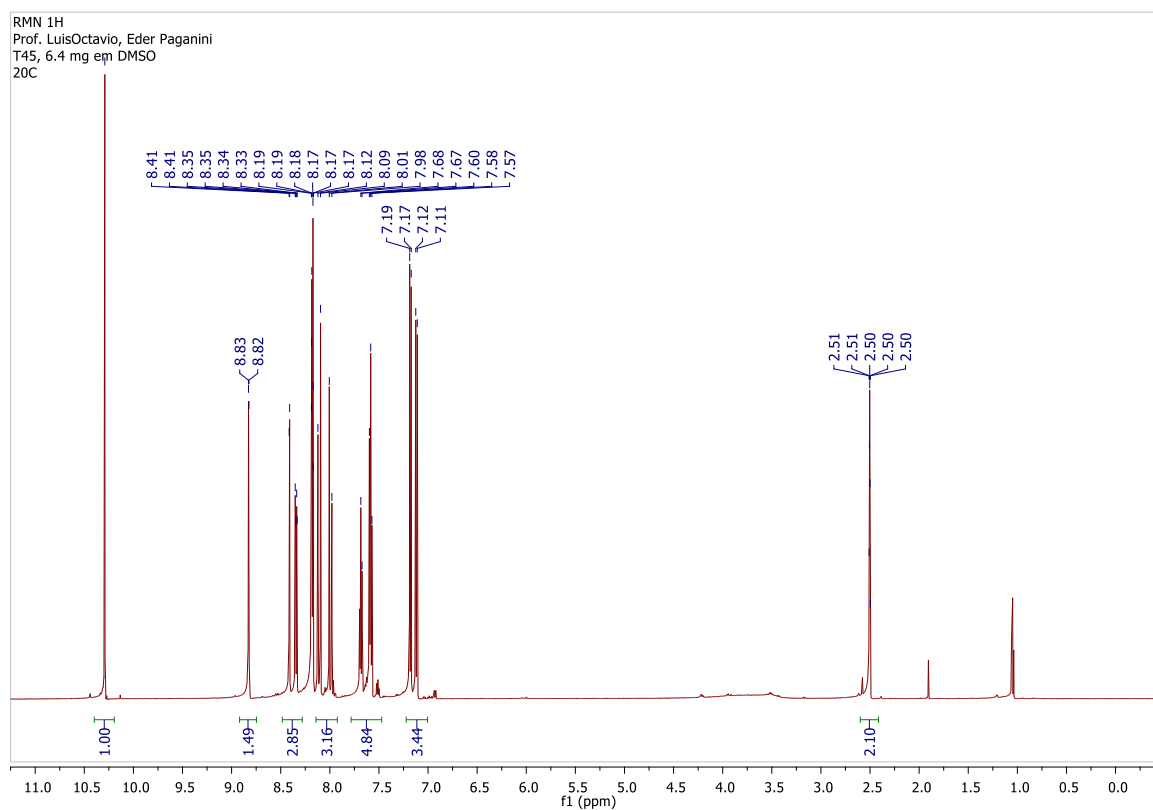
ANEXO 15. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **E.07** (DMSO- d_6 ; 100 MHz).



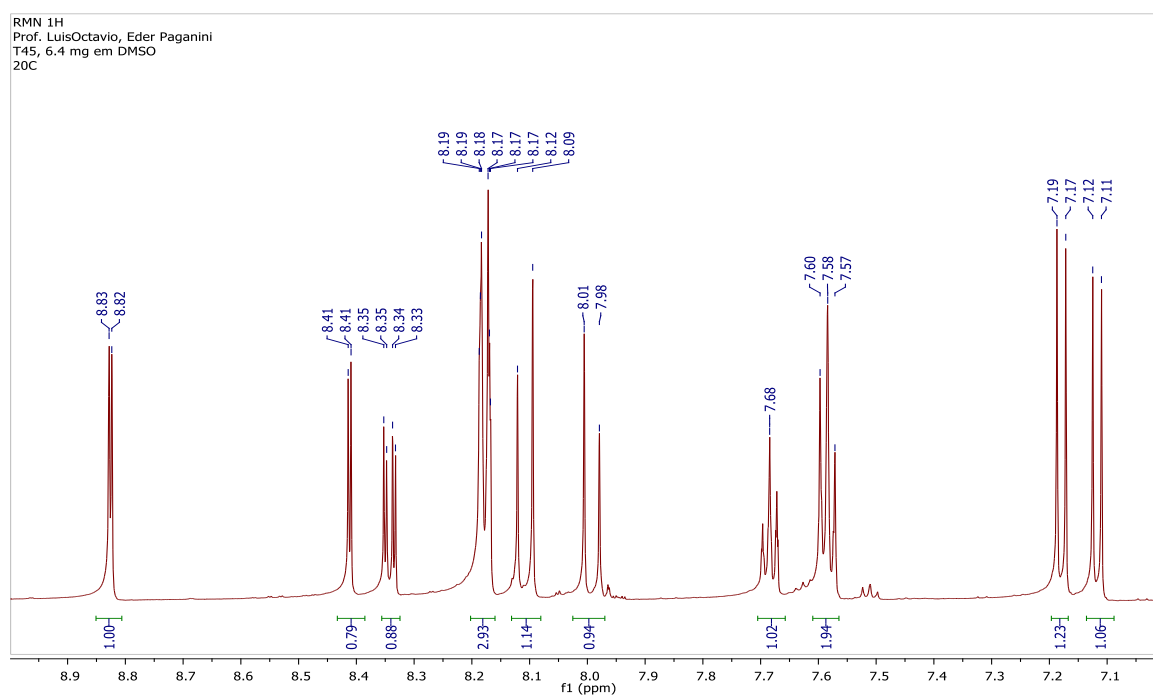
ANEXO 16. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância **E.07** (DMSO- d_6 ; 100 MHz).



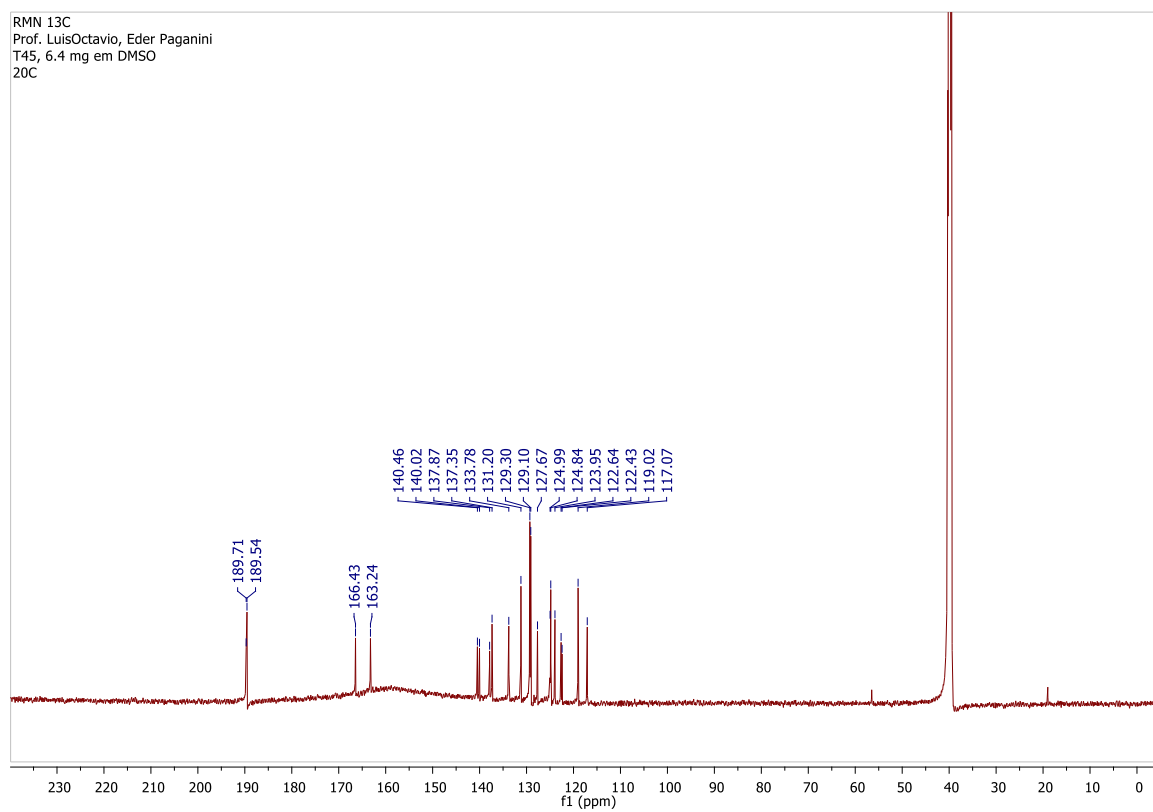
ANEXO 17. Espectro de RMN de ^1H da substância **E.08** (DMSO- d_6 ; 400 MHz).



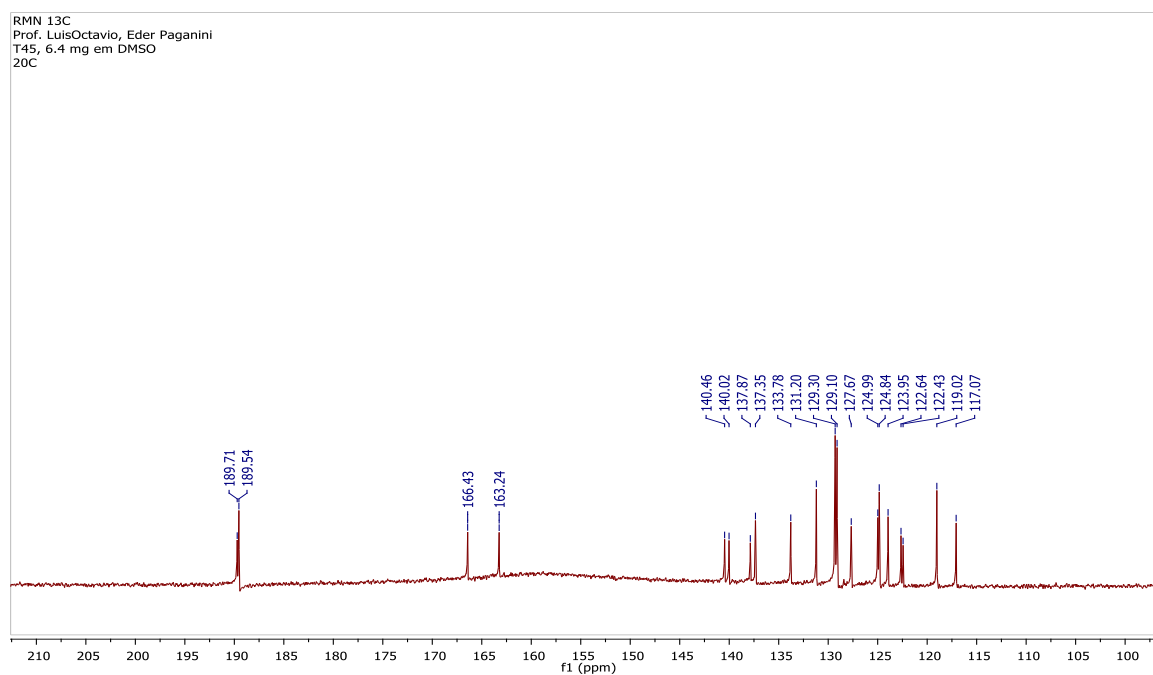
ANEXO 18. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **E.08** (DMSO- d_6 ; 400 MHz).



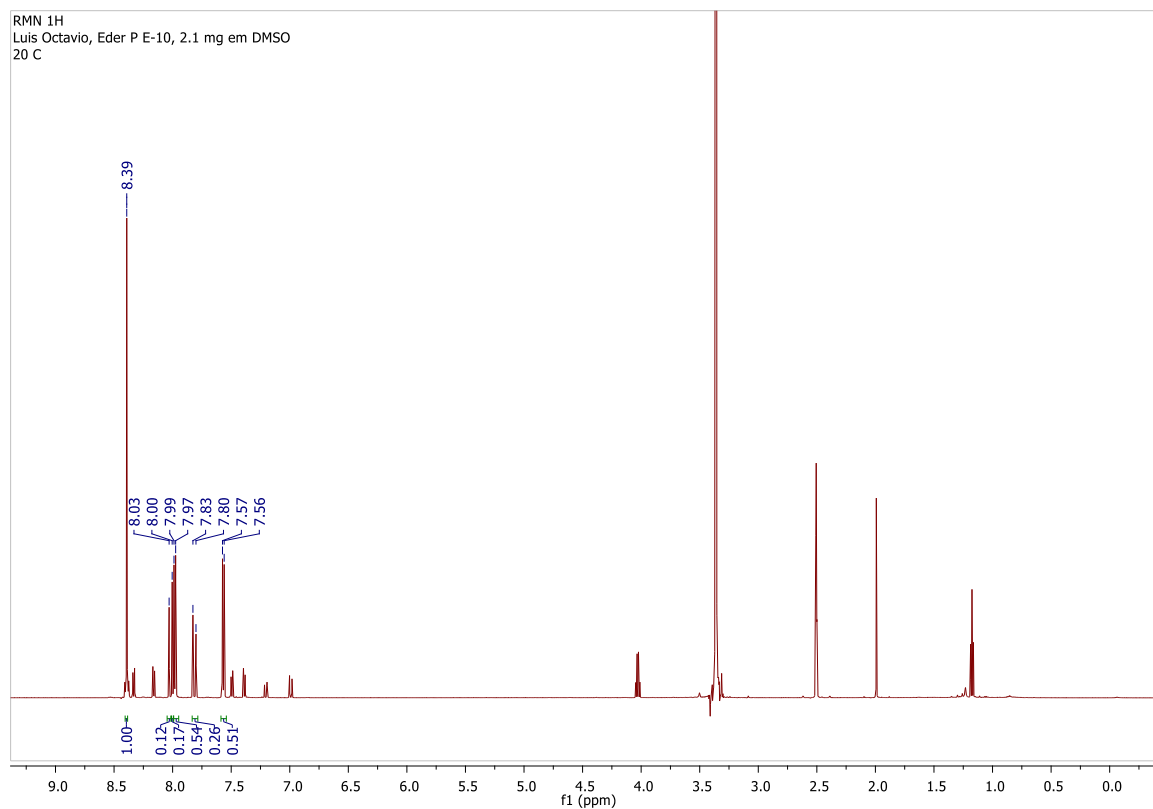
ANEXO 19. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **E.08** (DMSO- d_6 ; 100 MHz).



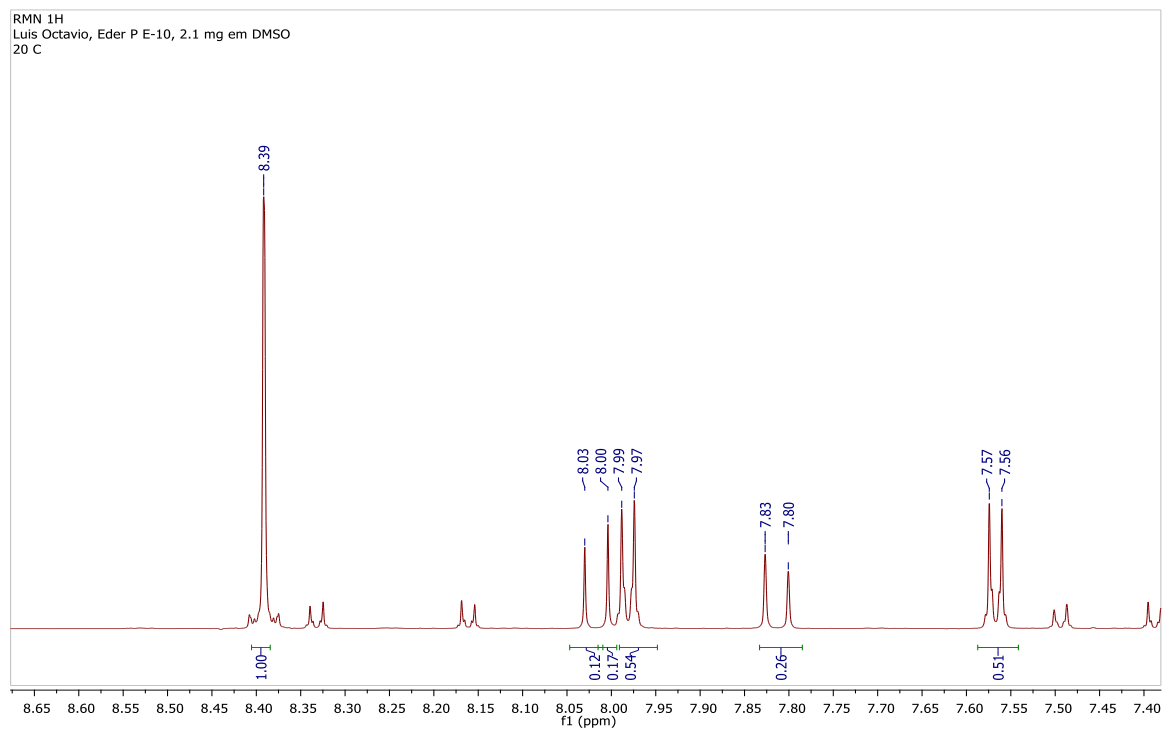
ANEXO 20. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância **E.08** (DMSO- d_6 ; 100 MHz).



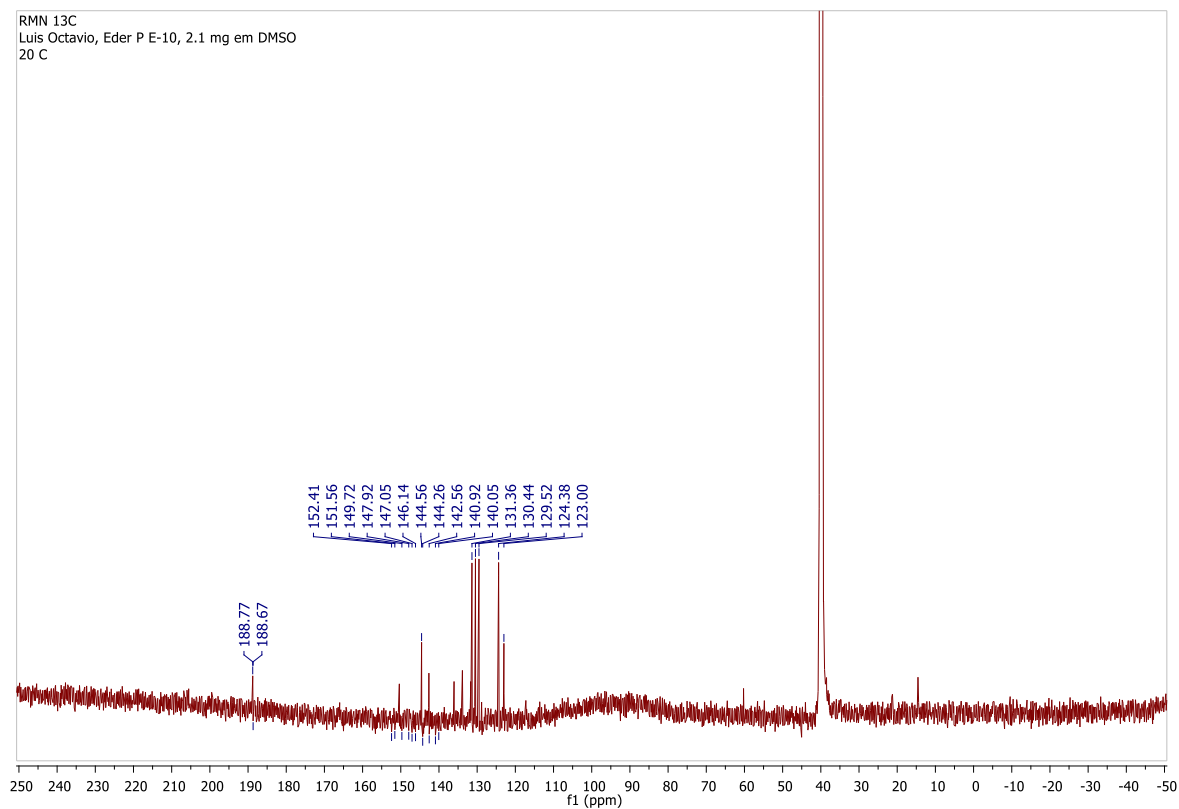
ANEXO 21. Espectro de RMN de ^1H da substância **E.10** (DMSO- d_6 ; 400 MHz).



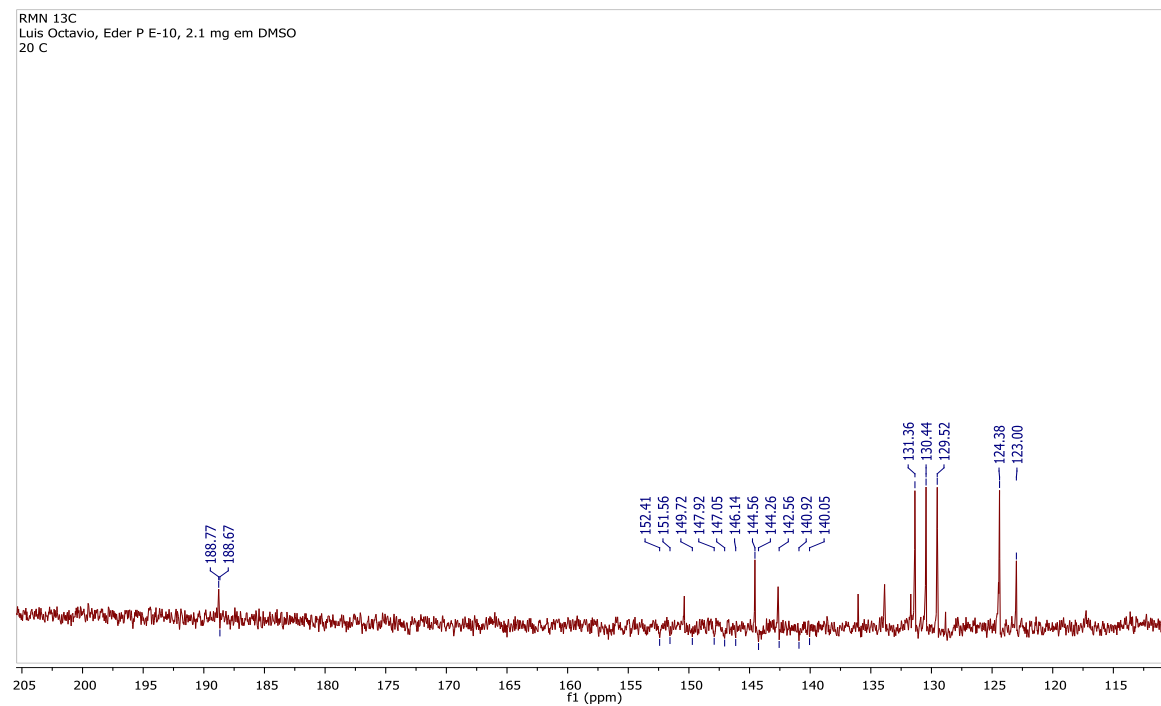
ANEXO 22. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **E.10** (DMSO- d_6 ; 400 MHz).



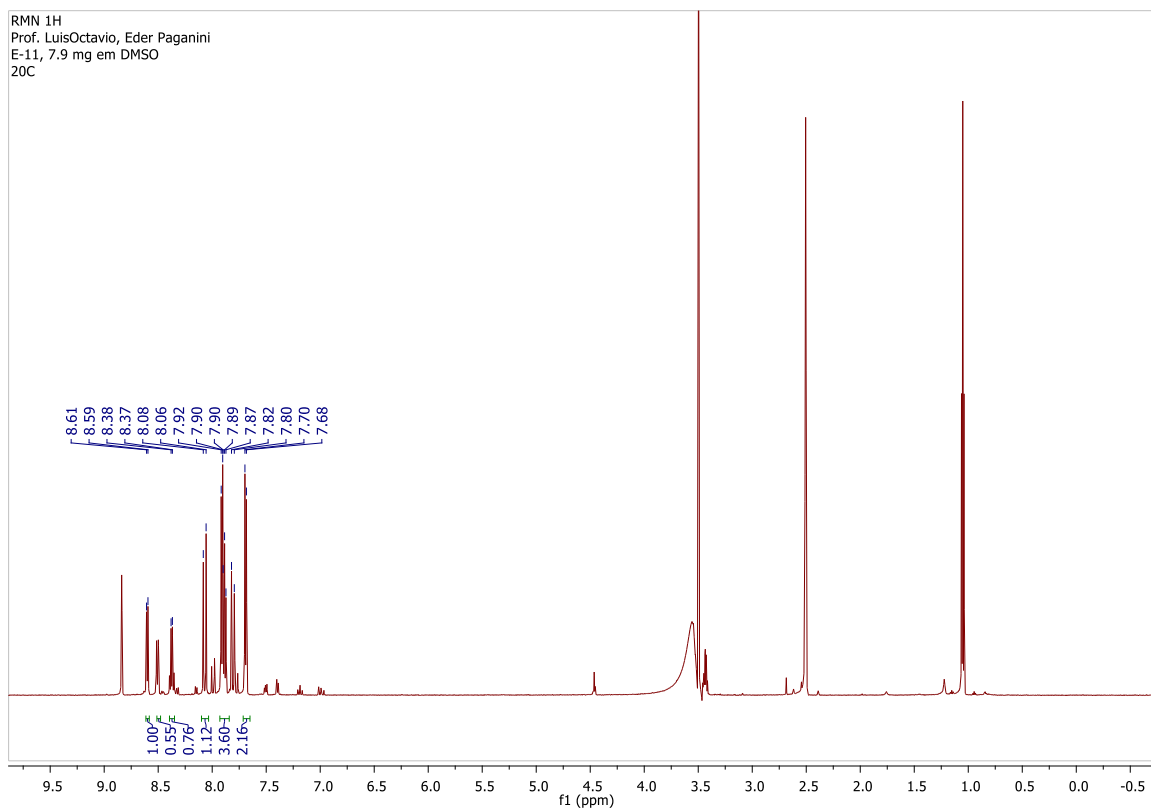
ANEXO 23. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **E.10** (DMSO- d_6 ; 100 MHz).



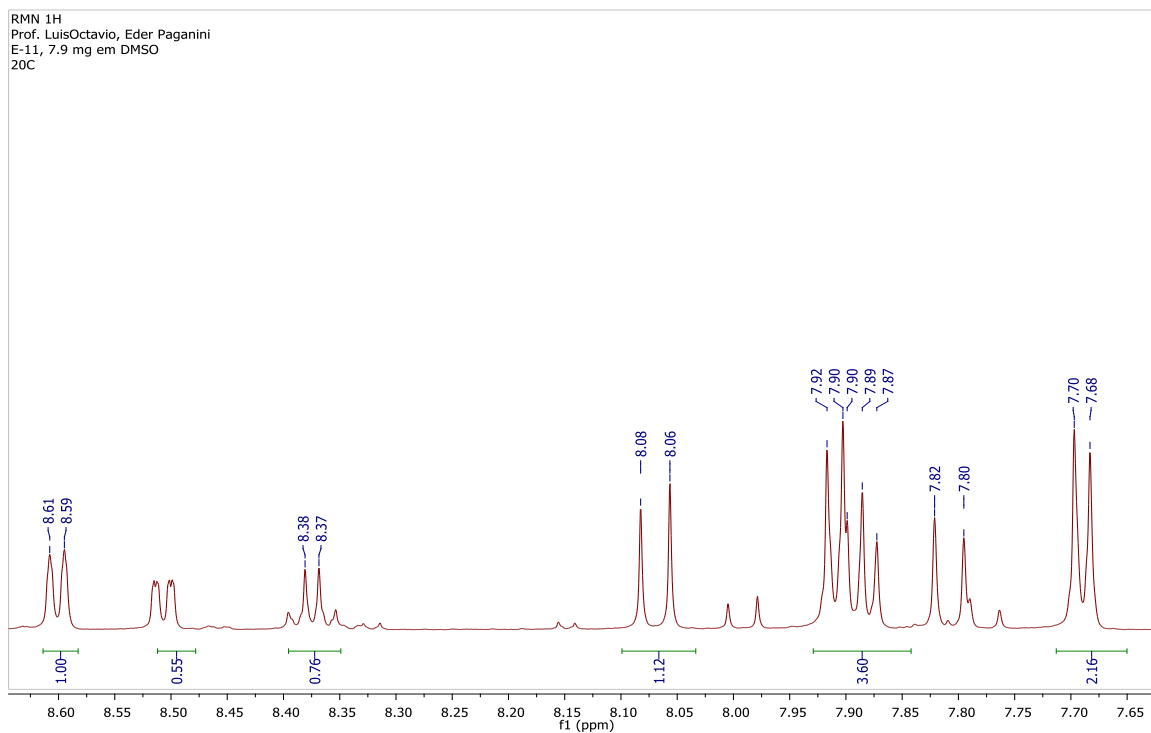
ANEXO 24. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância **E.10** (DMSO- d_6 ; 100 MHz).



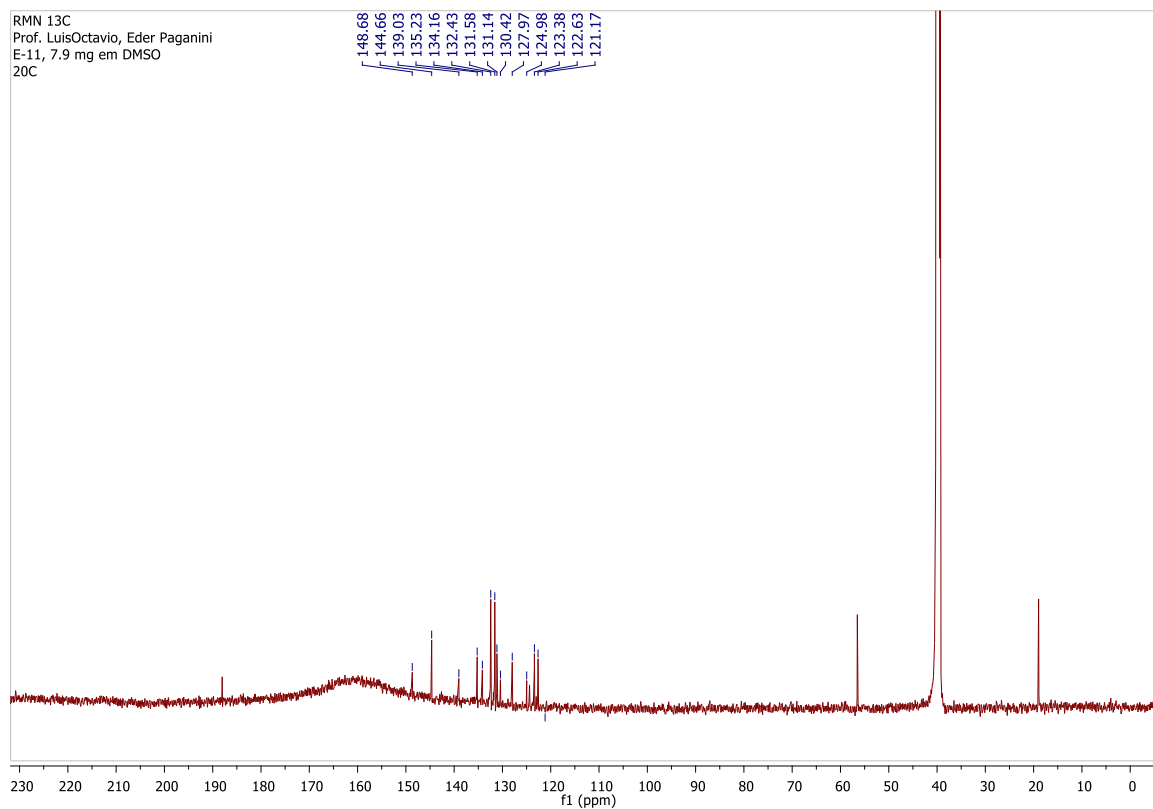
ANEXO 25. Espectro de RMN de ^1H da substância **E.11** ($\text{DMSO-}d_6$; 400 MHz).



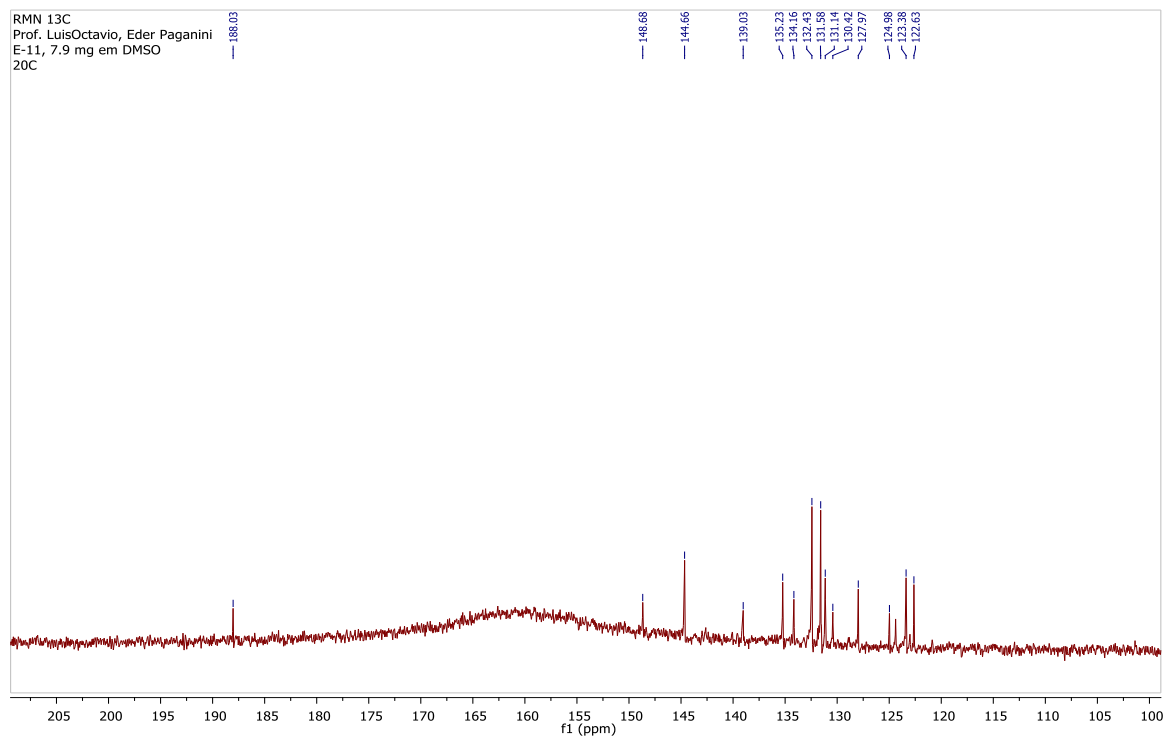
ANEXO 26. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **E.11** ($\text{DMSO-}d_6$; 400 MHz).



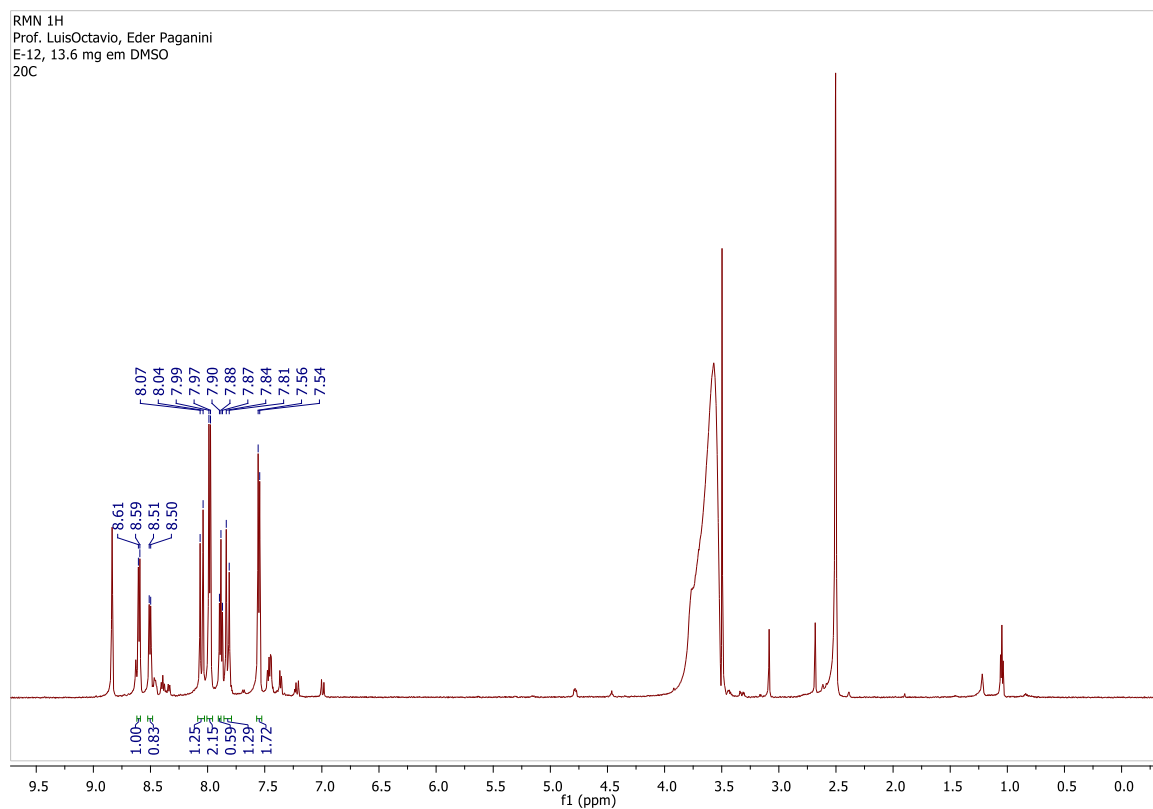
ANEXO 27. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **E.11** (DMSO- d_6 ; 100 MHz).



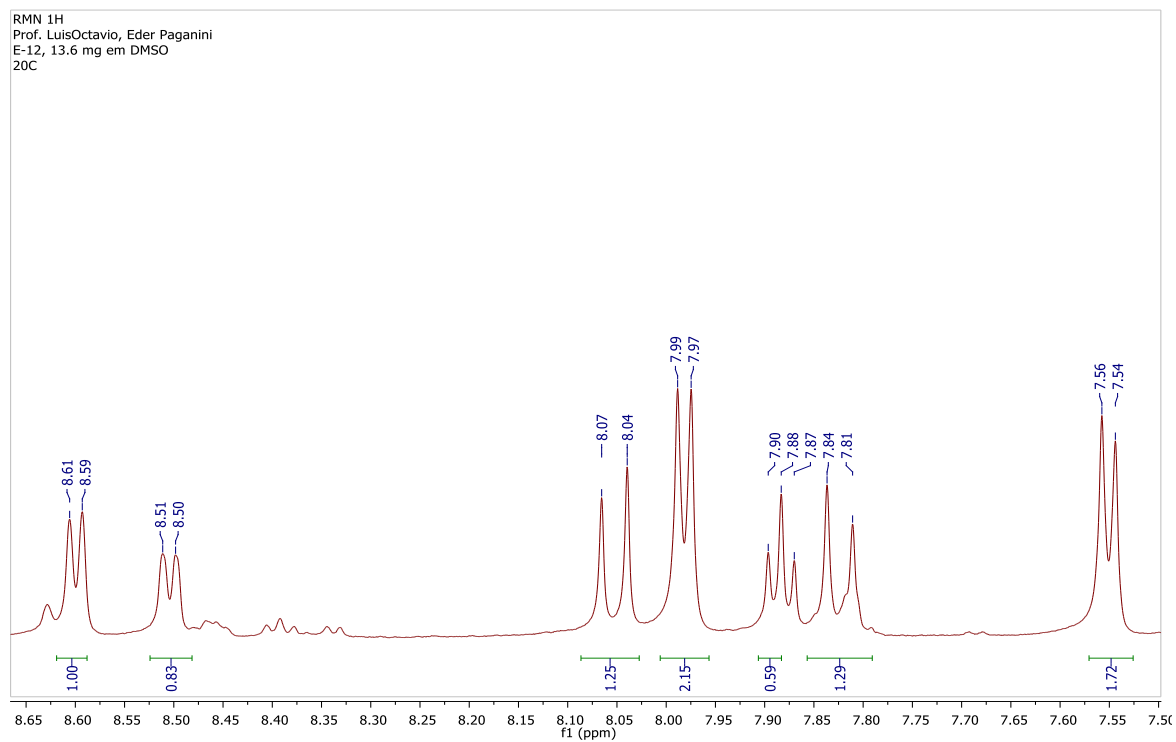
ANEXO 28. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância **E.11** (DMSO- d_6 ; 100 MHz).



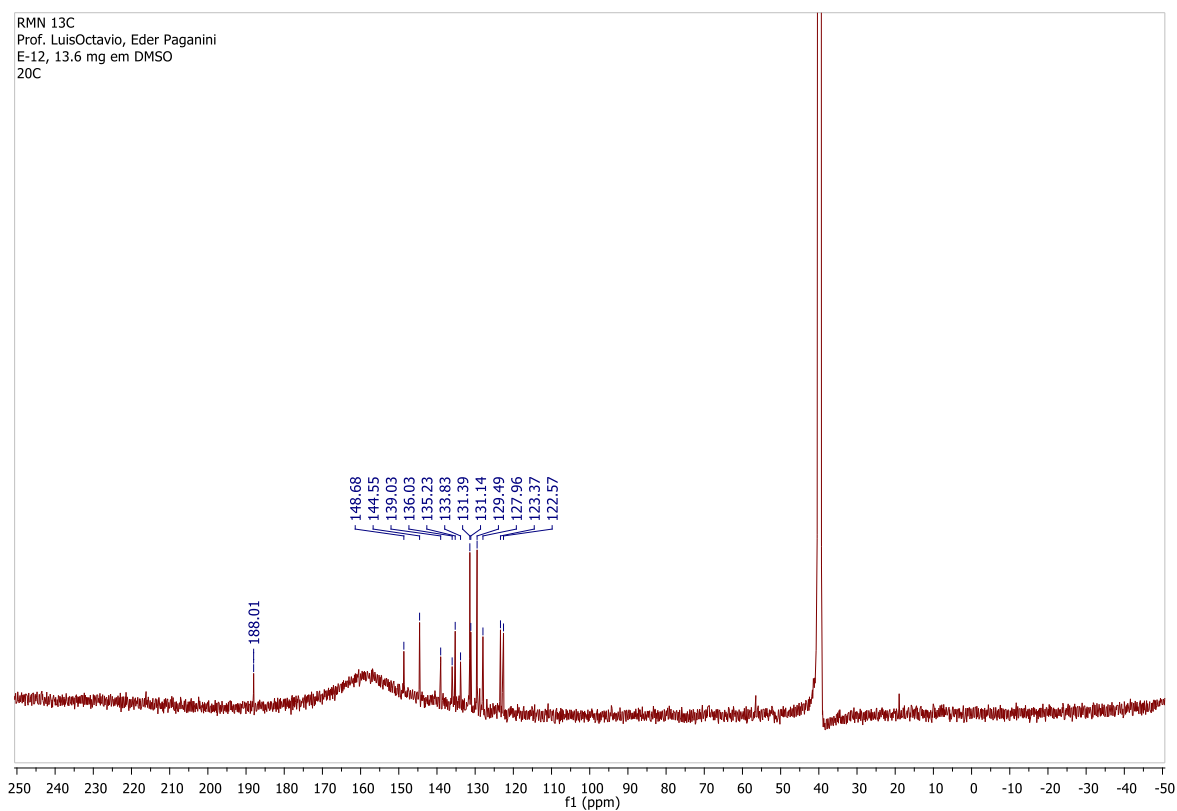
ANEXO 29. Espectro de RMN de ^1H da substância **E.12** (DMSO- d_6 ; 400 MHz).



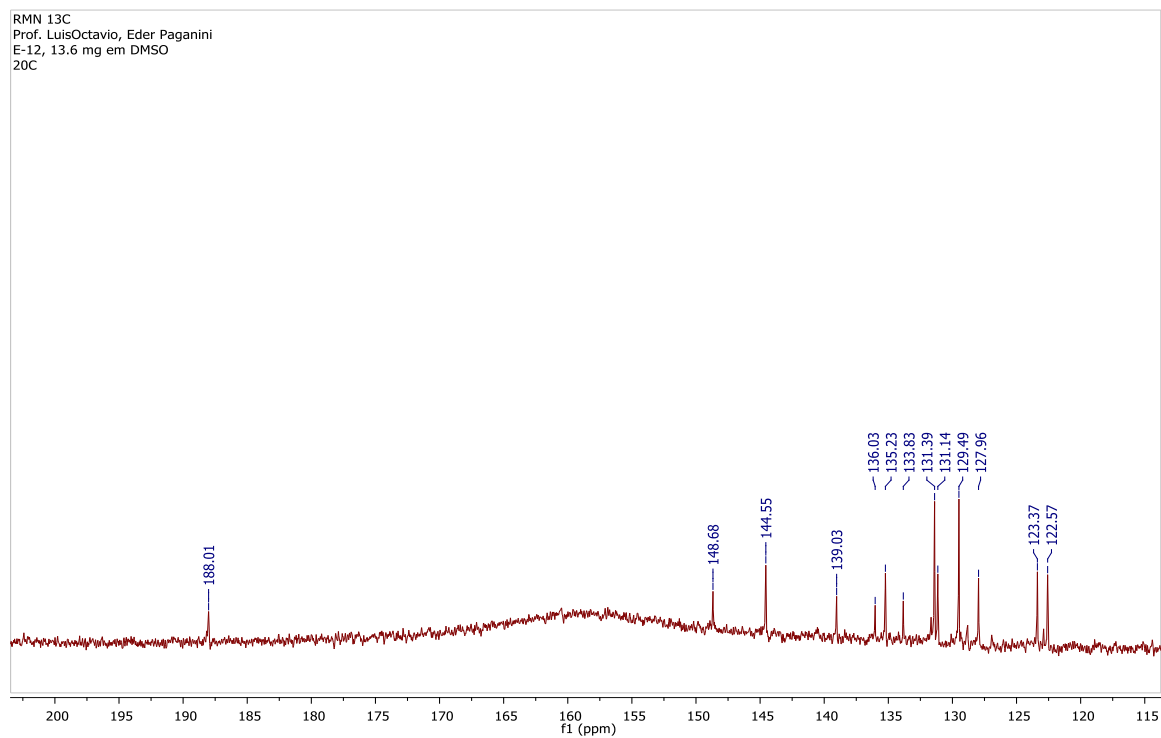
ANEXO 30. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **E.12** (DMSO- d_6 ; 400 MHz).



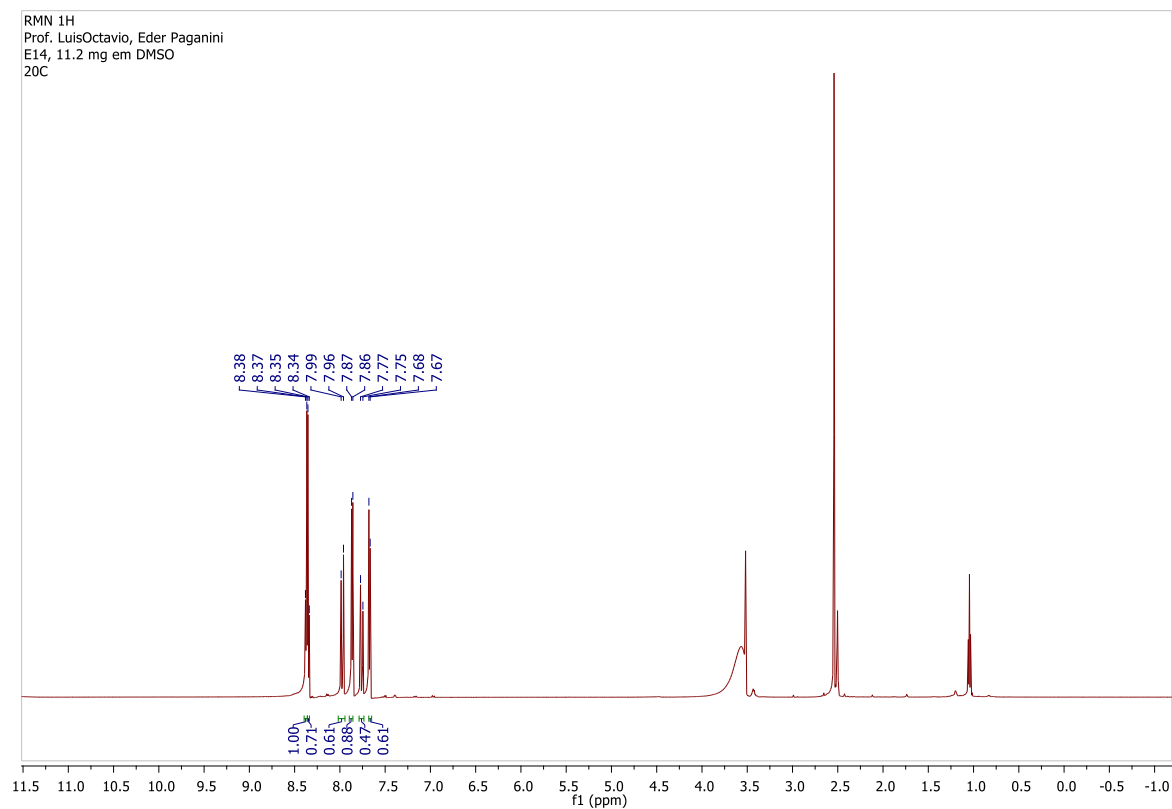
ANEXO 31. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **E.12** (DMSO- d_6 ; 100 MHz).



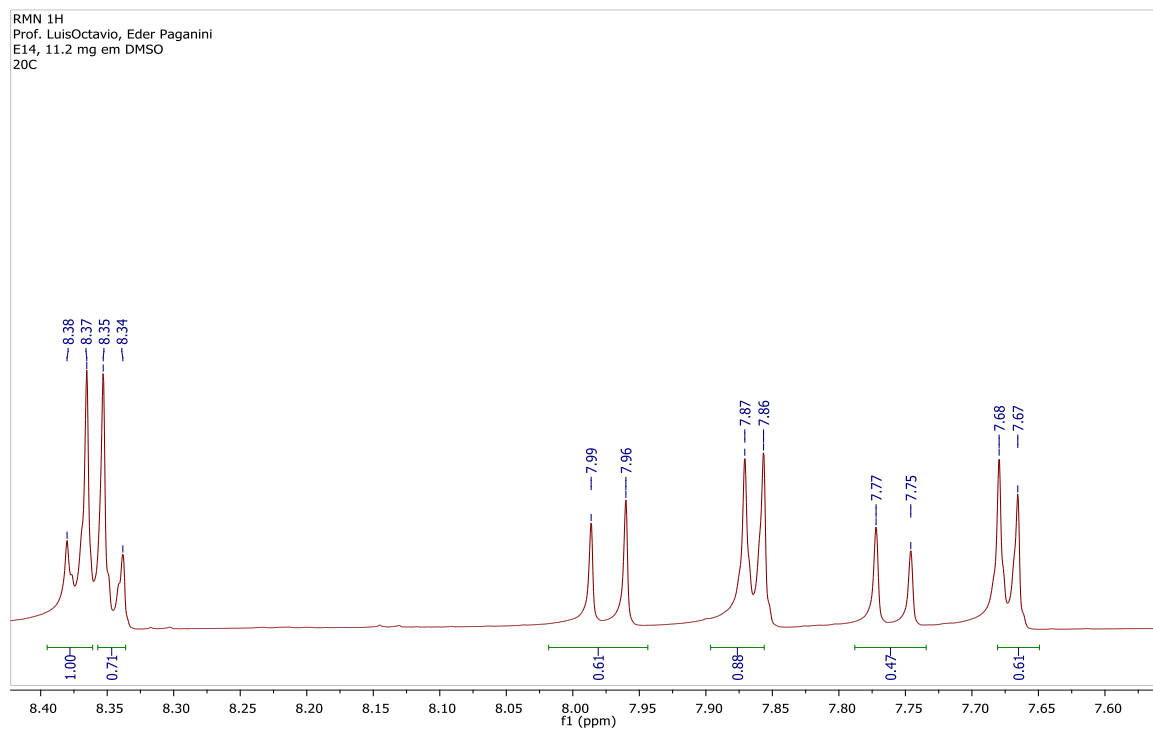
ANEXO 32. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância **E.12** (DMSO- d_6 ; 100 MHz).



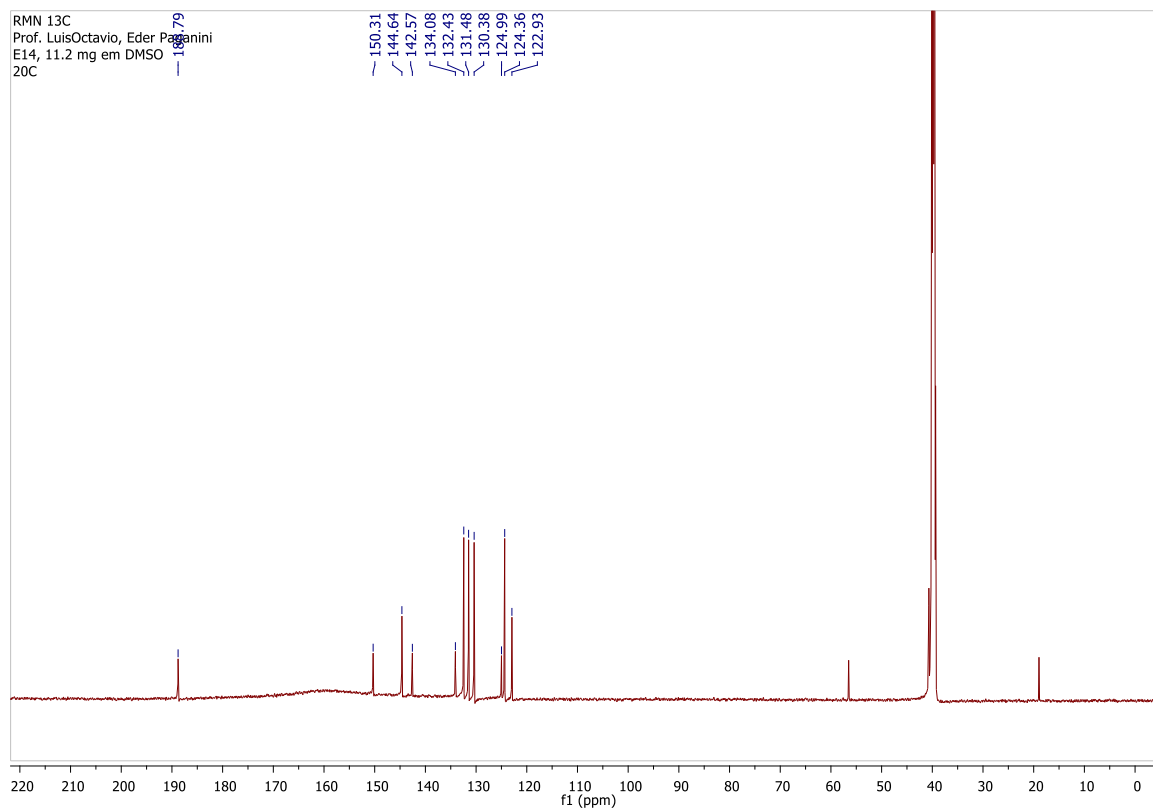
ANEXO 33. Espectro de RMN de ^1H da substância **E.14** (DMSO- d_6 ; 400 MHz).



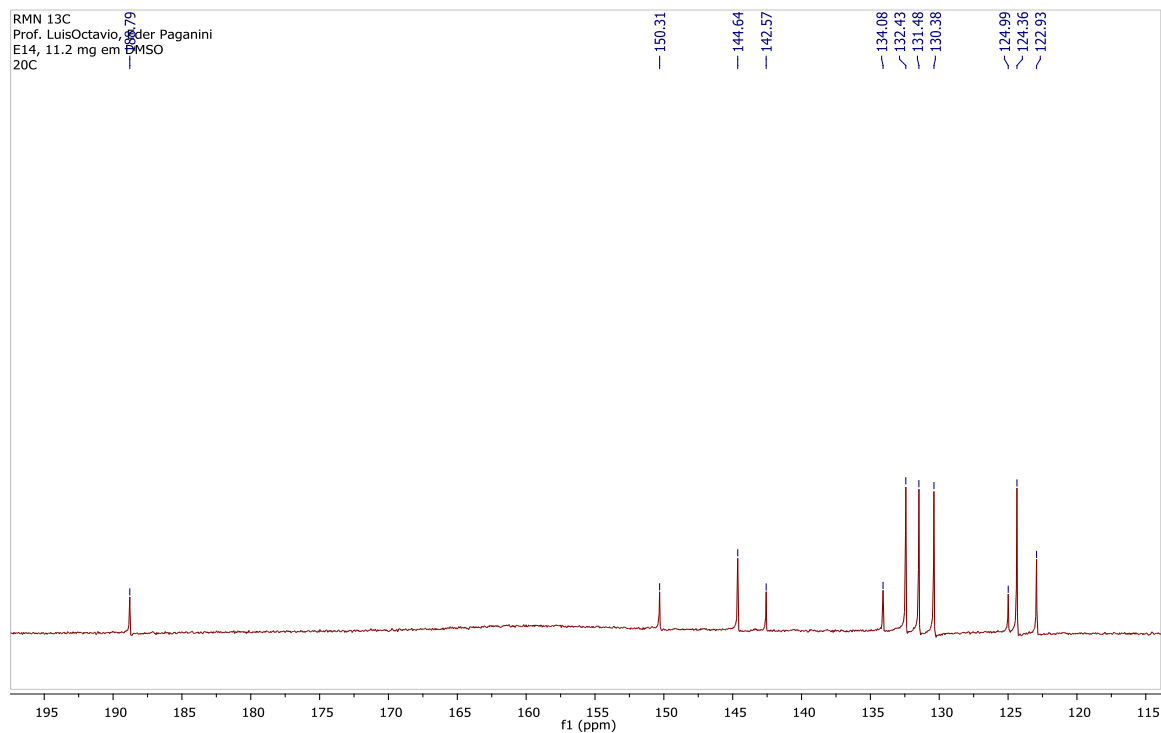
ANEXO 34. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **E.14** (DMSO- d_6 ; 400 MHz).



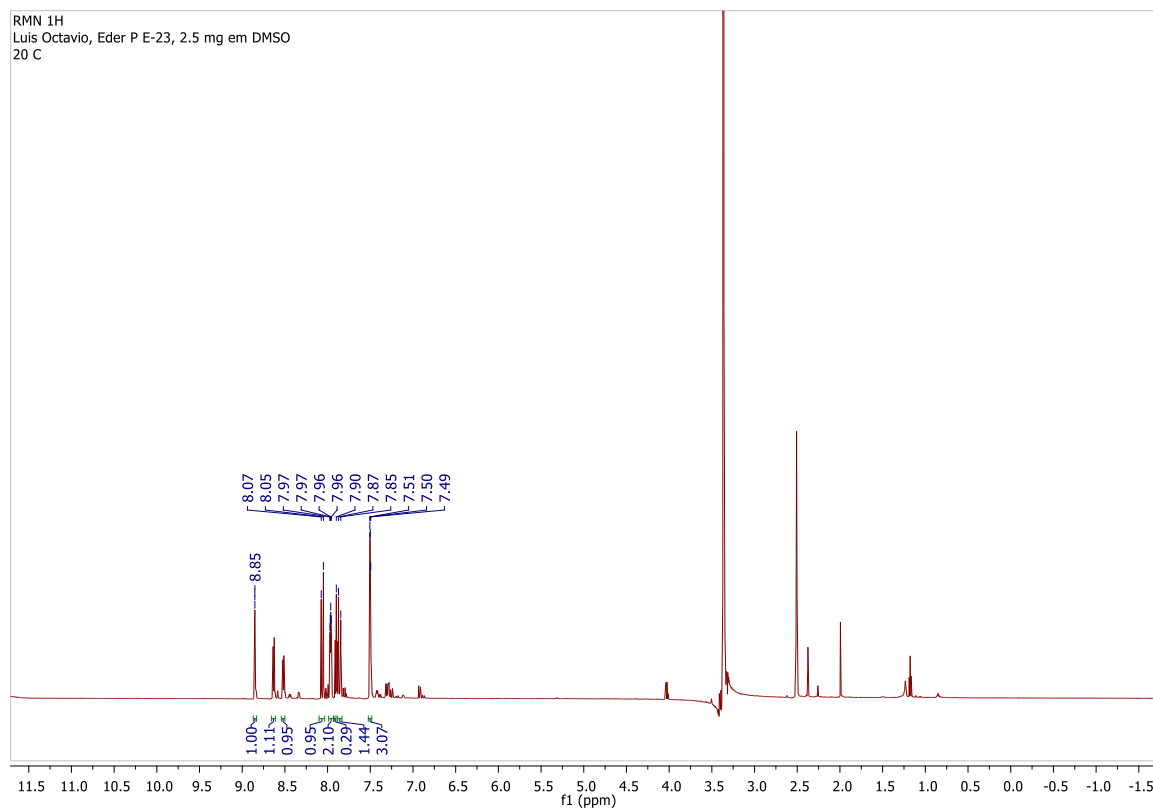
ANEXO 35. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **E.14** (DMSO- d_6 ; 100 MHz).



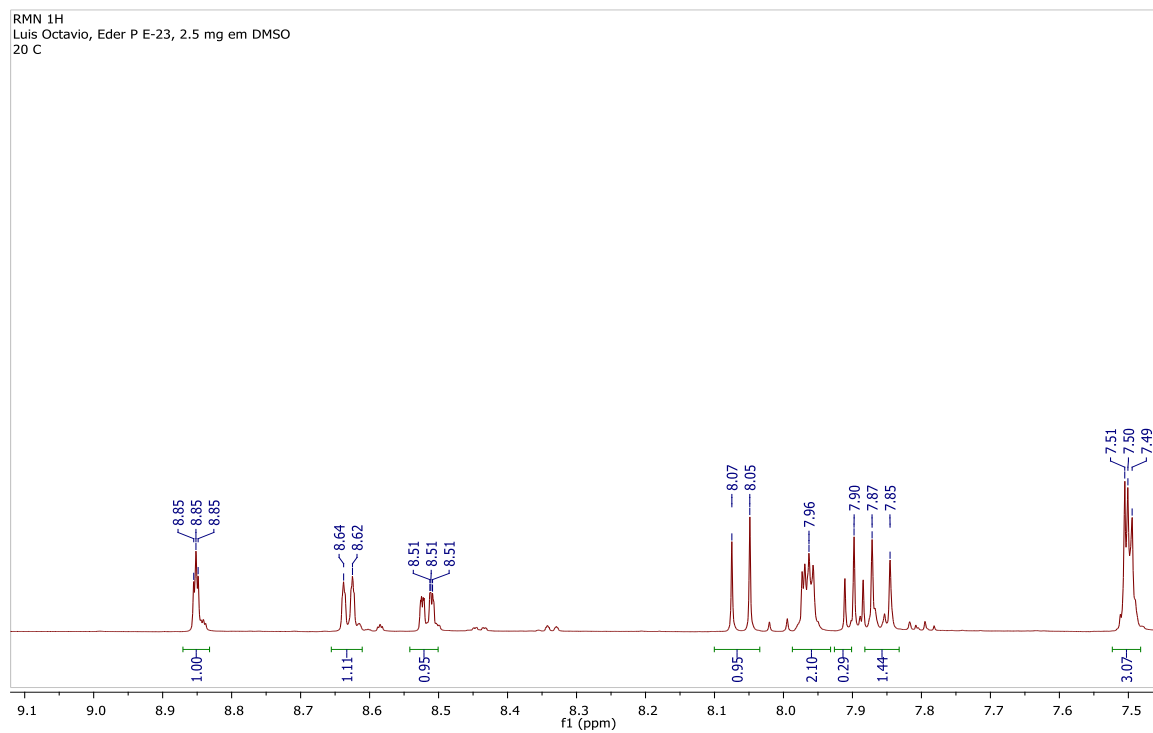
ANEXO 36. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância **E.14** (DMSO- d_6 ; 100 MHz).



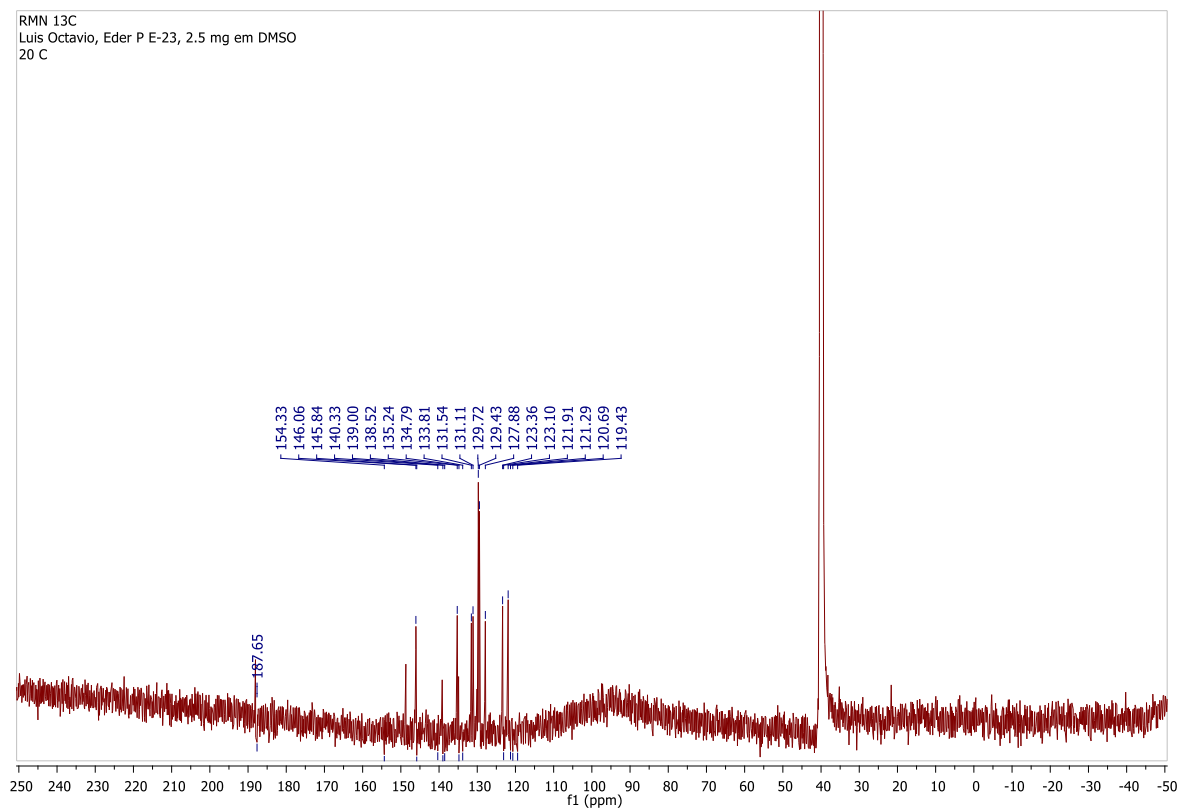
ANEXO 37. Espectro de RMN de ^1H da substância **E.23** (DMSO- d_6 ; 400 MHz).



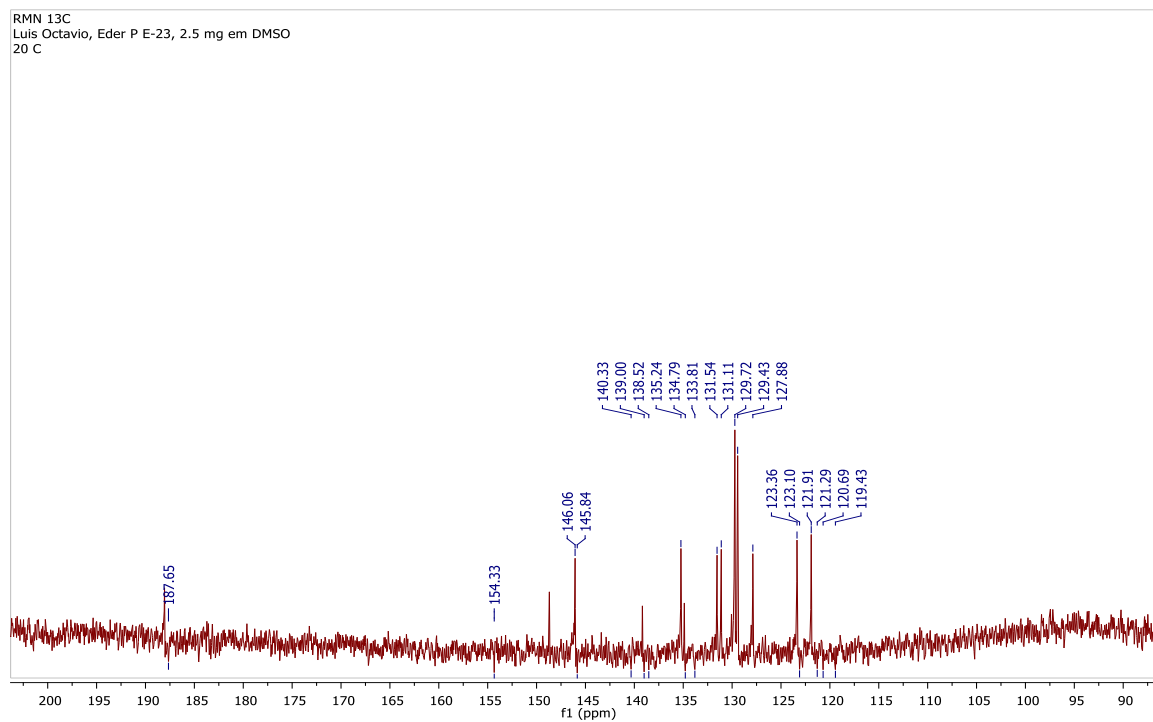
ANEXO 38. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **E.23** (DMSO- d_6 ; 400 MHz).



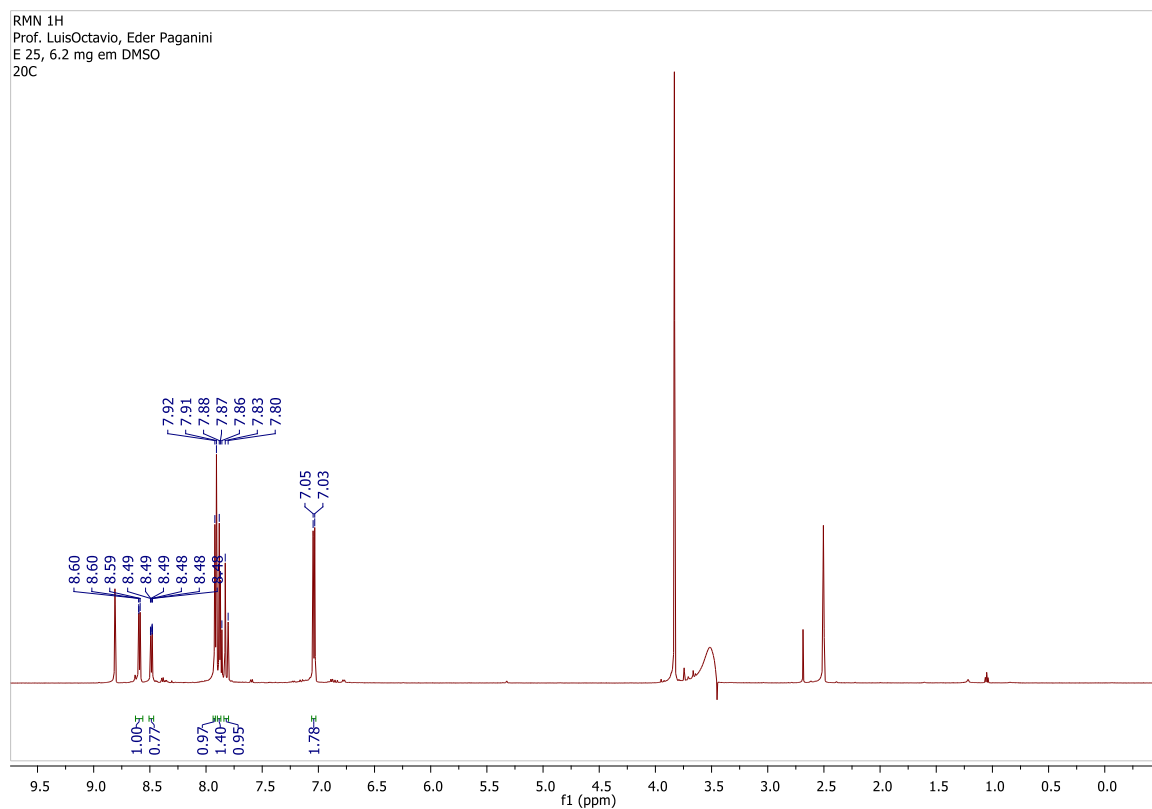
ANEXO 39. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **E.23** (DMSO- d_6 ; 100 MHz).



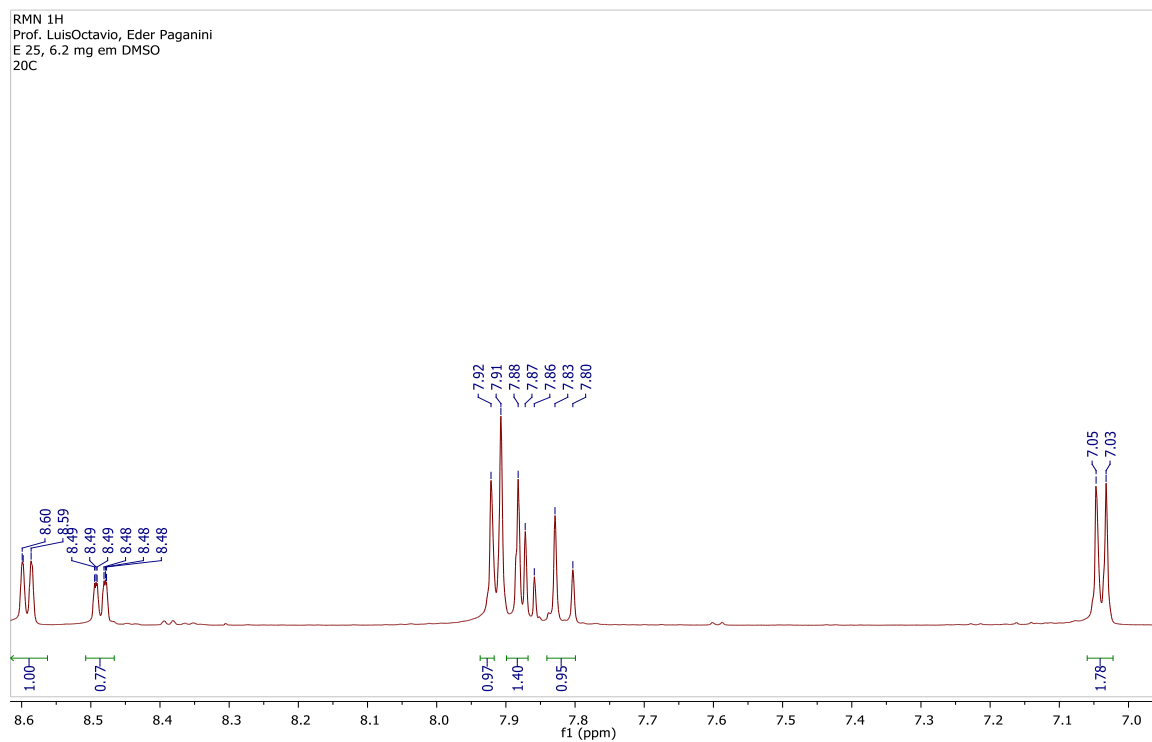
ANEXO 40. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância **E.23** (DMSO- d_6 ; 100 MHz).



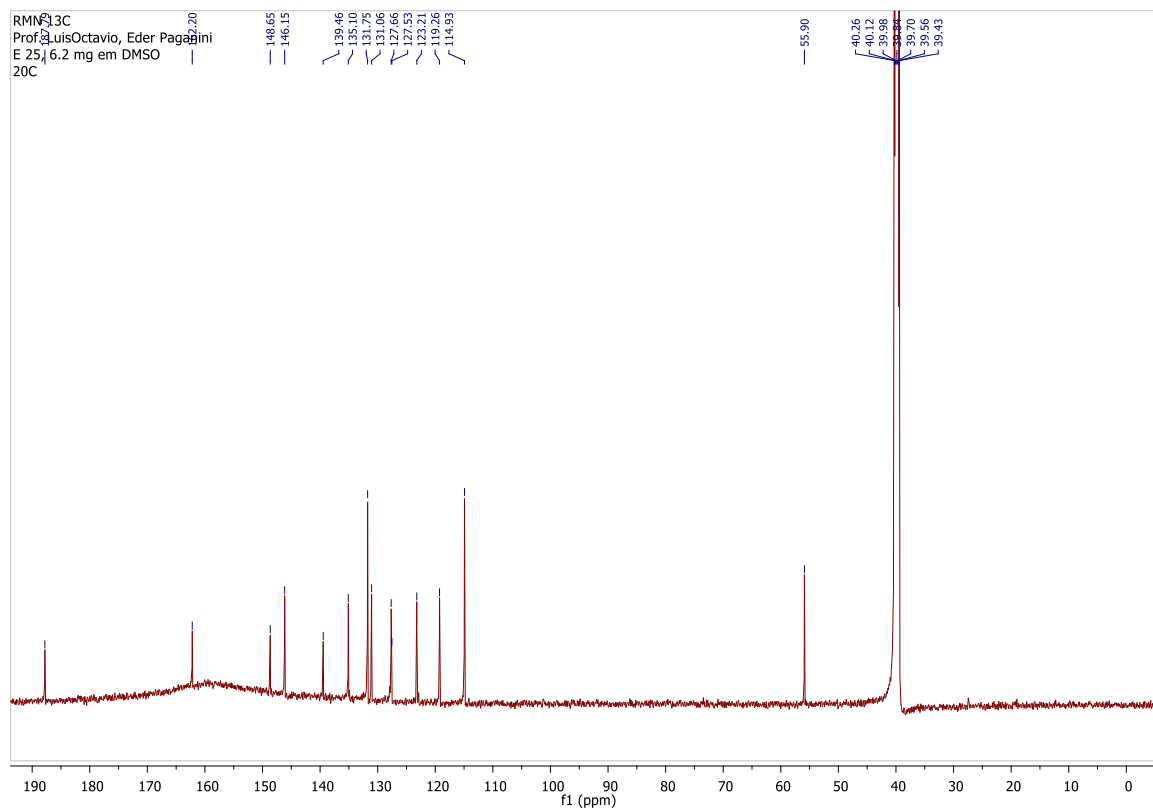
ANEXO 41. Espectro de RMN de ^1H da substância **E.25** (DMSO- d_6 ; 400 MHz).



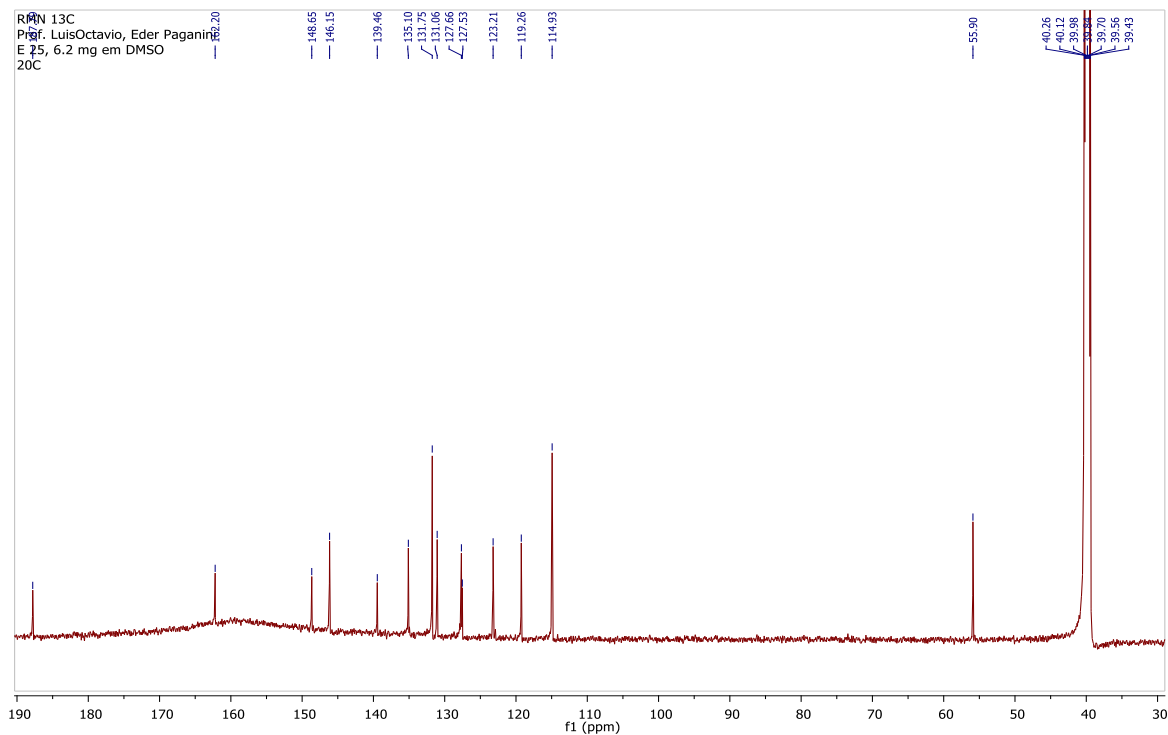
ANEXO 42. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **E.25** (DMSO- d_6 ; 400 MHz).



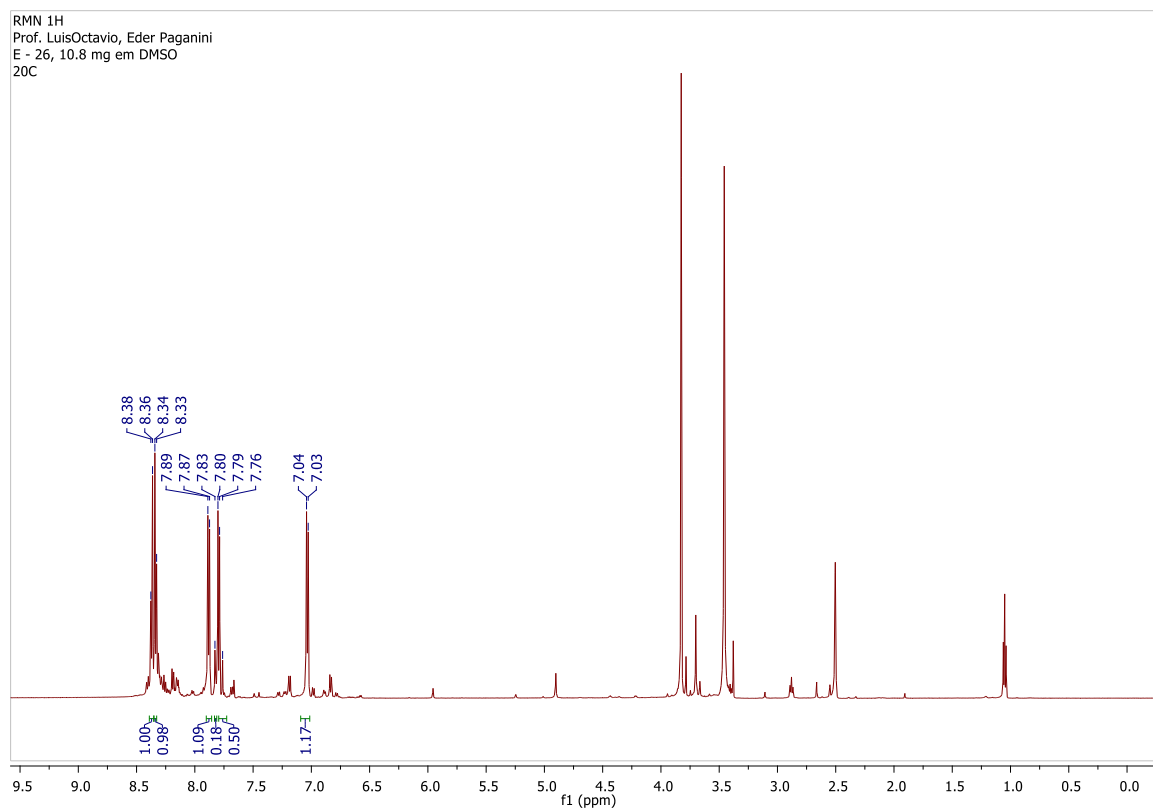
ANEXO 43. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **E.25** (DMSO- d_6 ; 100 MHz).



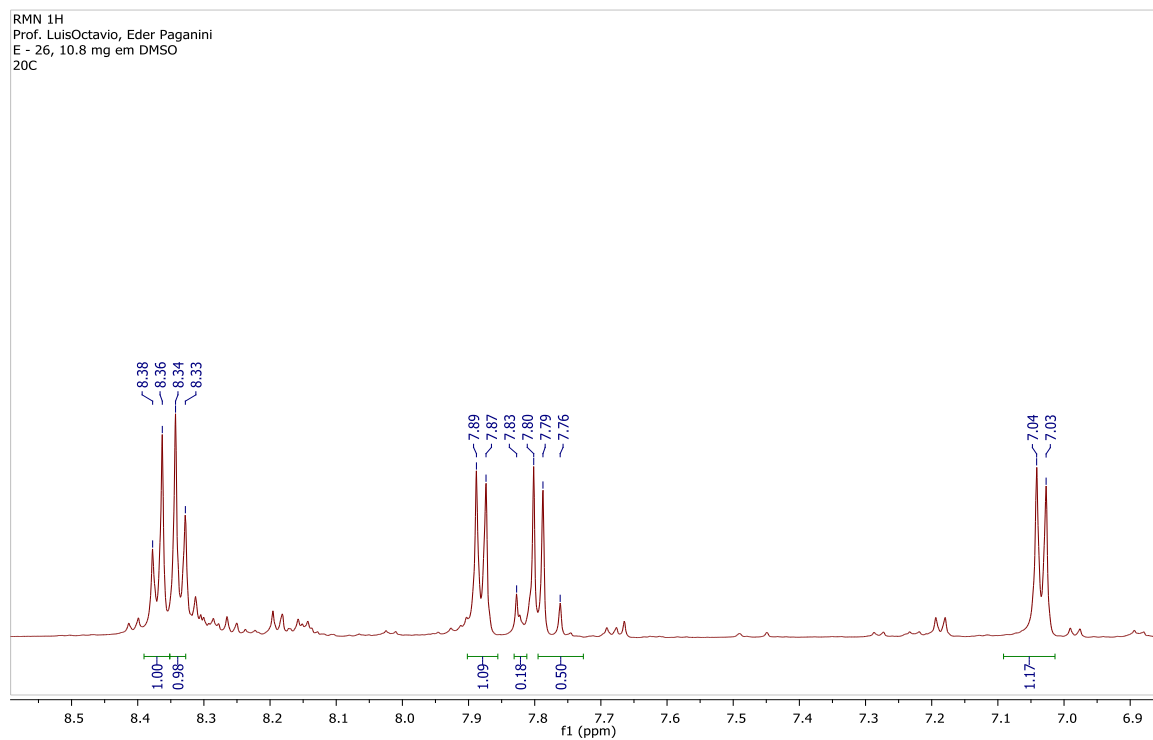
ANEXO 44. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância **E.25** (DMSO- d_6 ; 100 MHz).



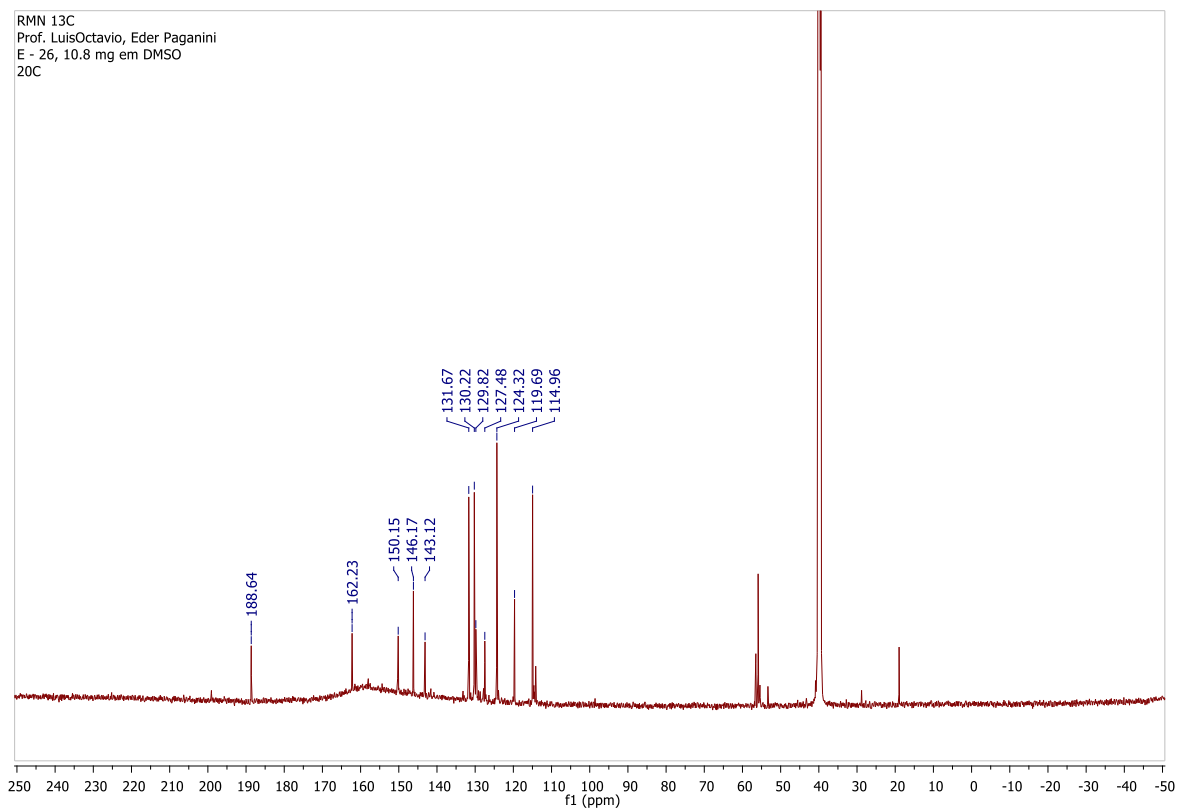
ANEXO 45. Espectro de RMN de ^1H da substância **E.26** ($\text{DMSO-}d_6$; 400 MHz).



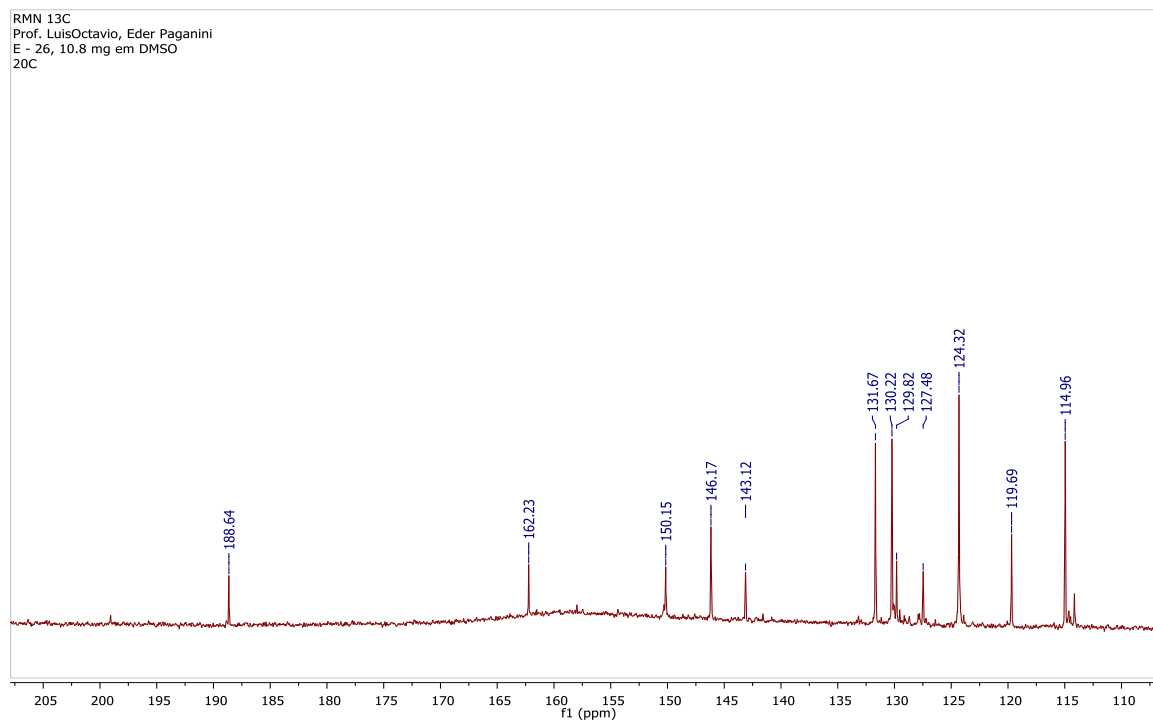
ANEXO 46. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **E.26** ($\text{DMSO-}d_6$; 400 MHz).



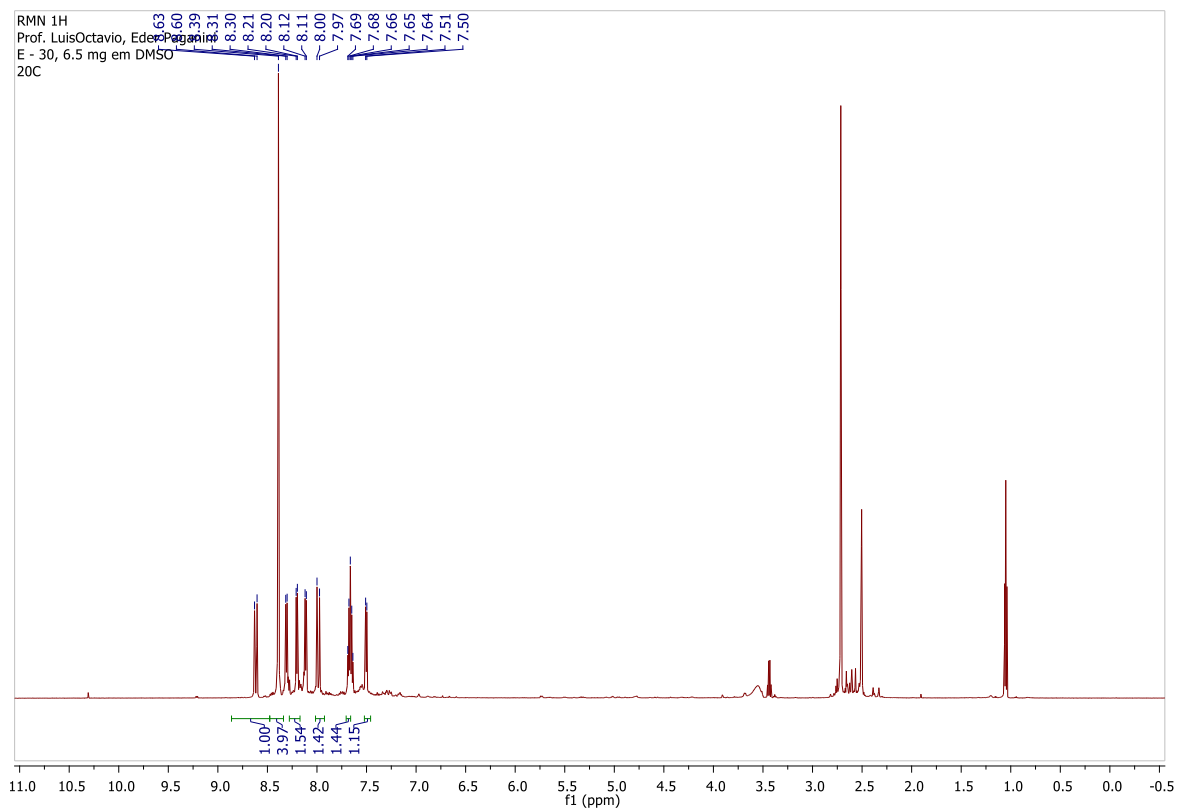
ANEXO 47. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **E.26** (DMSO- d_6 ; 100 MHz).



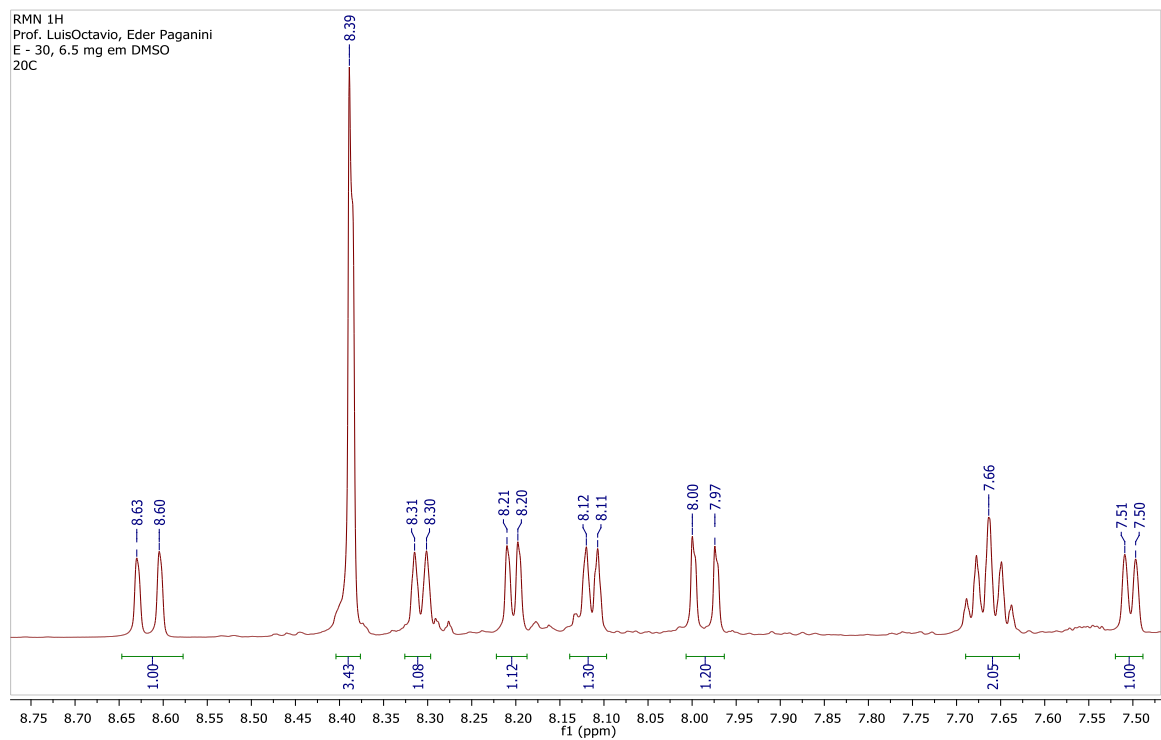
ANEXO 48. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância **E.26** (DMSO- d_6 ; 100 MHz).



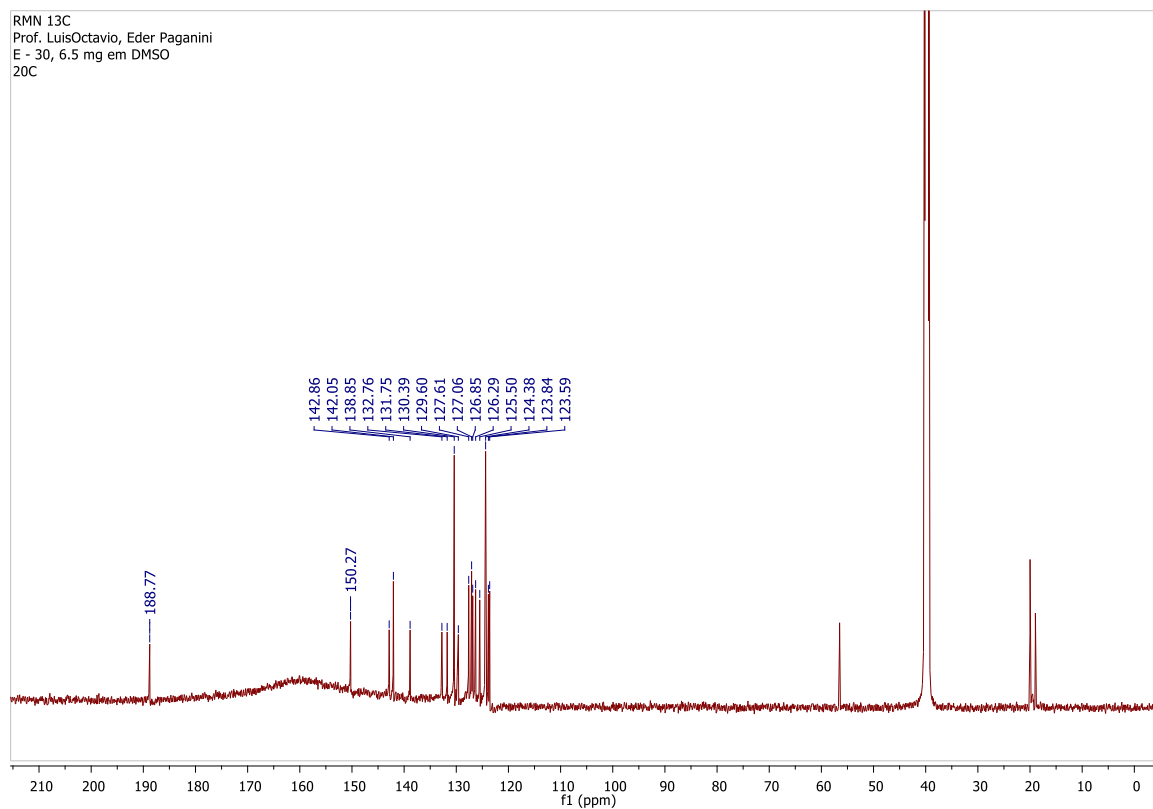
ANEXO 49. Espectro de RMN de ^1H da substância **E.30** ($\text{DMSO-}d_6$; 400 MHz).



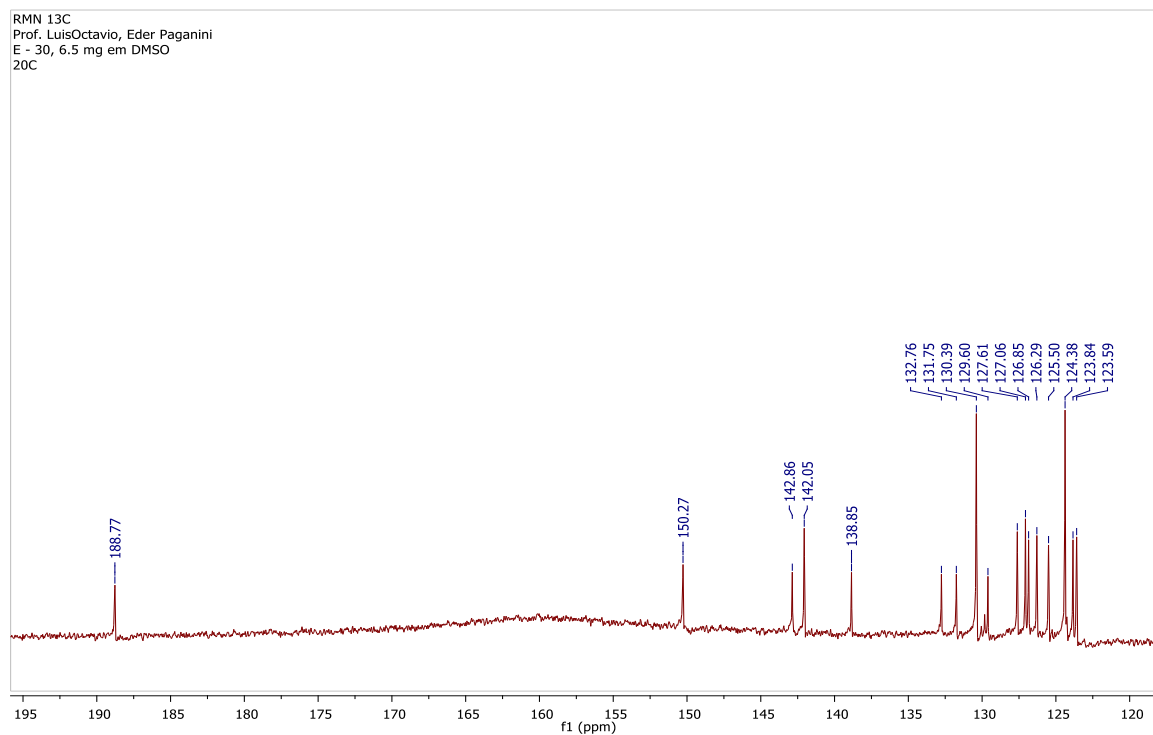
ANEXO 50. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **E.30** ($\text{DMSO-}d_6$; 400 MHz).



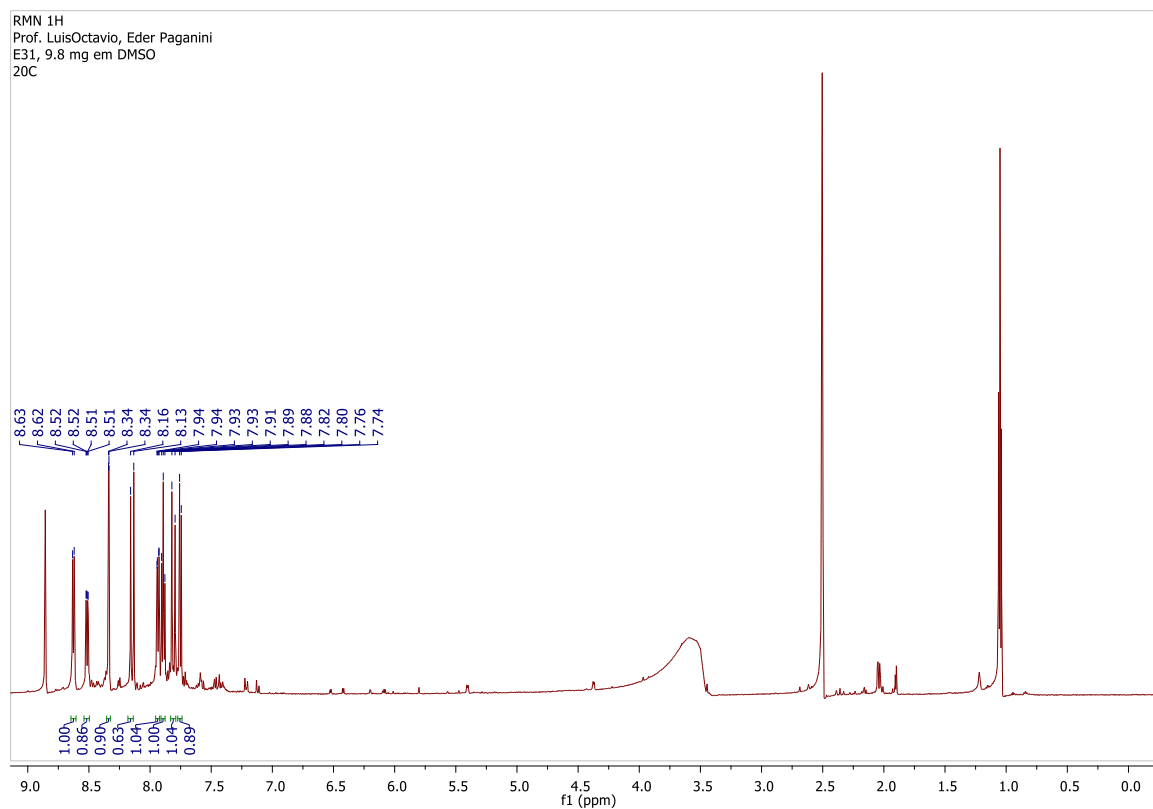
ANEXO 51. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **E.30** (DMSO- d_6 ; 100 MHz).



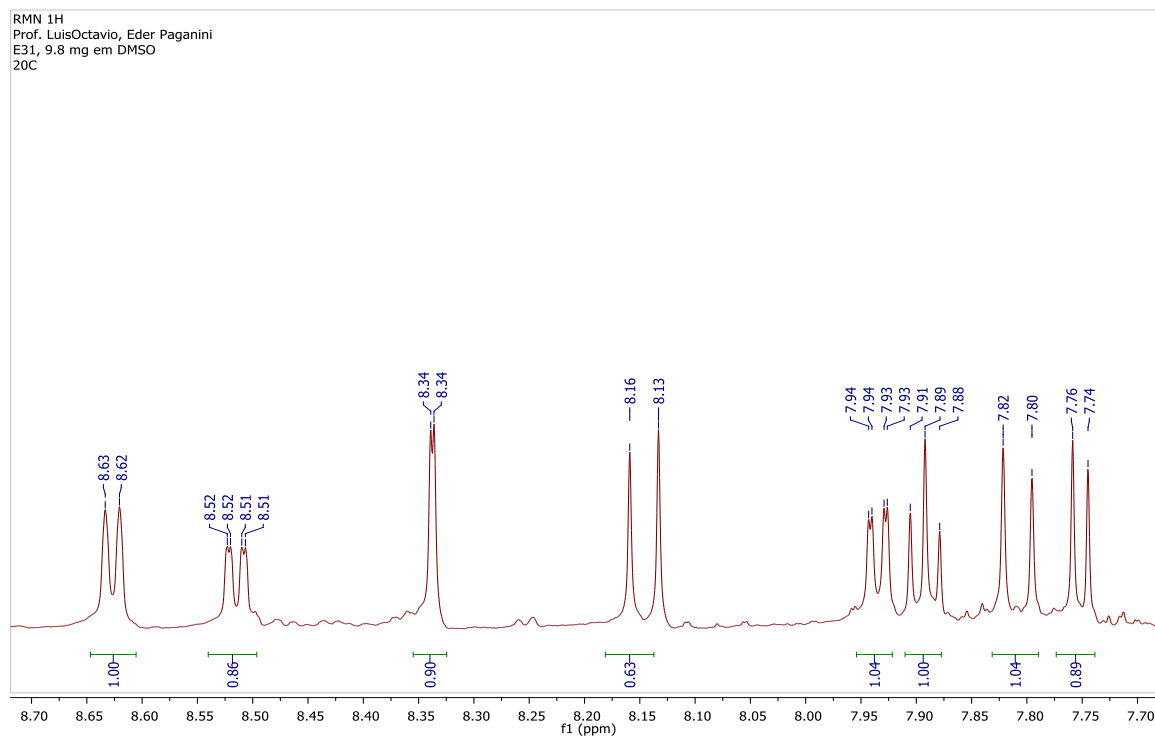
ANEXO 52. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância **E.30** (DMSO- d_6 ; 100 MHz).



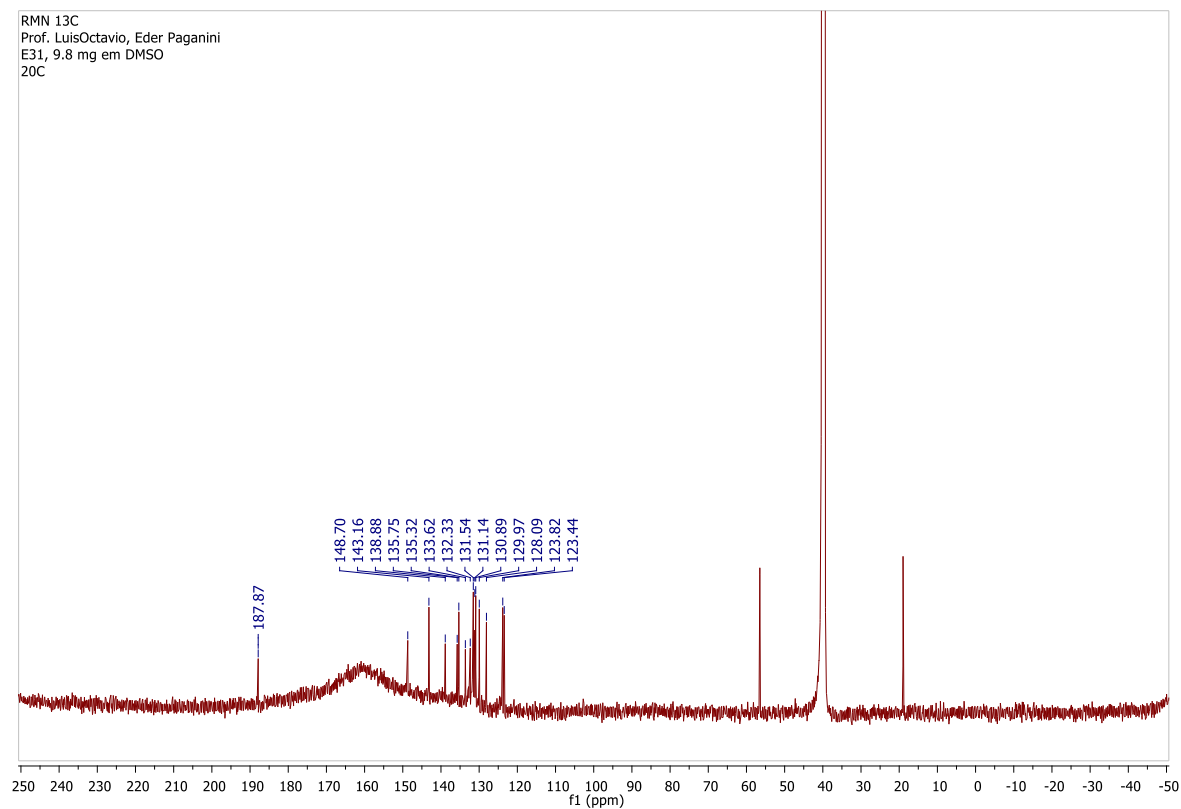
ANEXO 53. Espectro de RMN de ^1H da substância **E.31** ($\text{DMSO-}d_6$; 400 MHz).



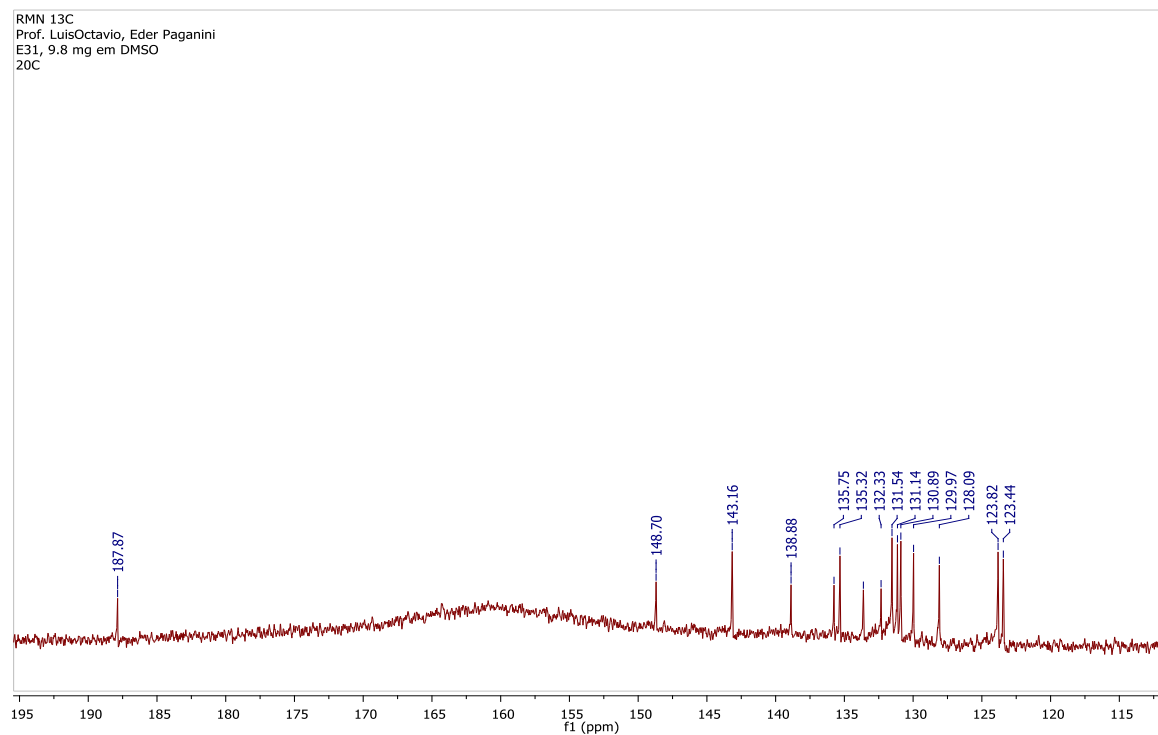
ANEXO 54. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **E.31** ($\text{DMSO-}d_6$; 400 MHz).



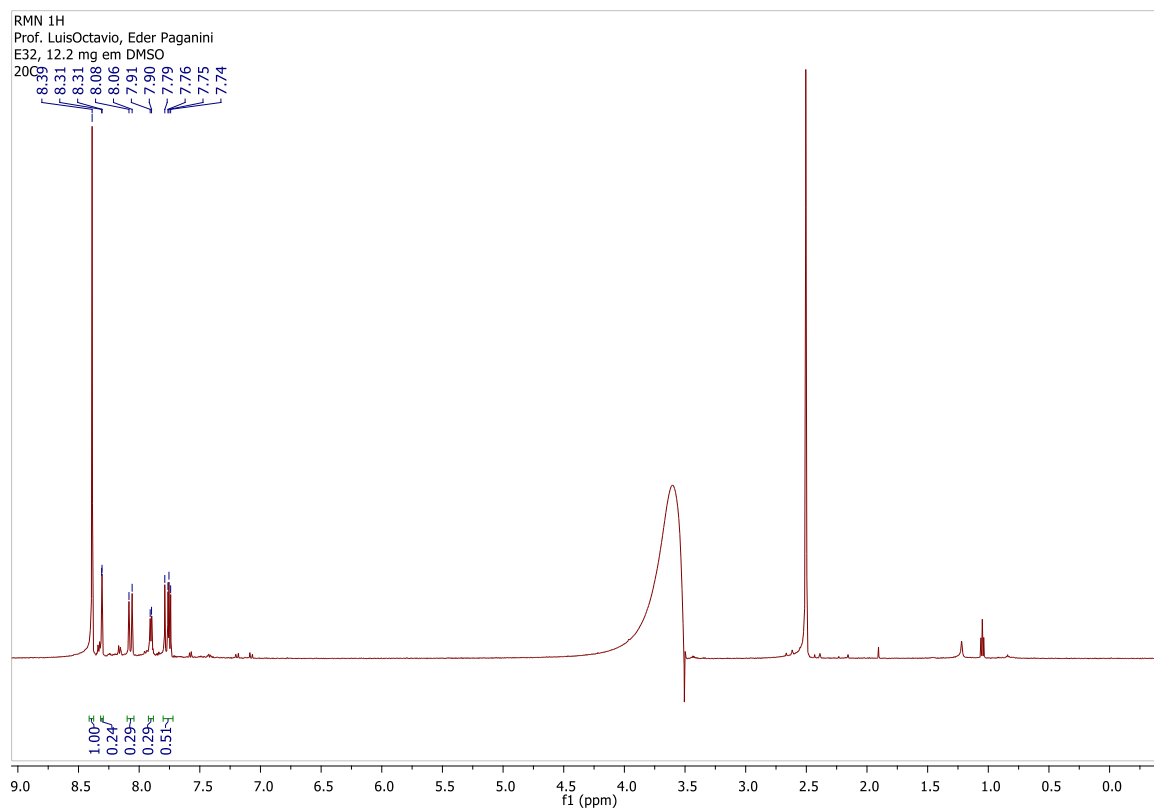
ANEXO 55. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **E.31** (DMSO- d_6 ; 100 MHz).



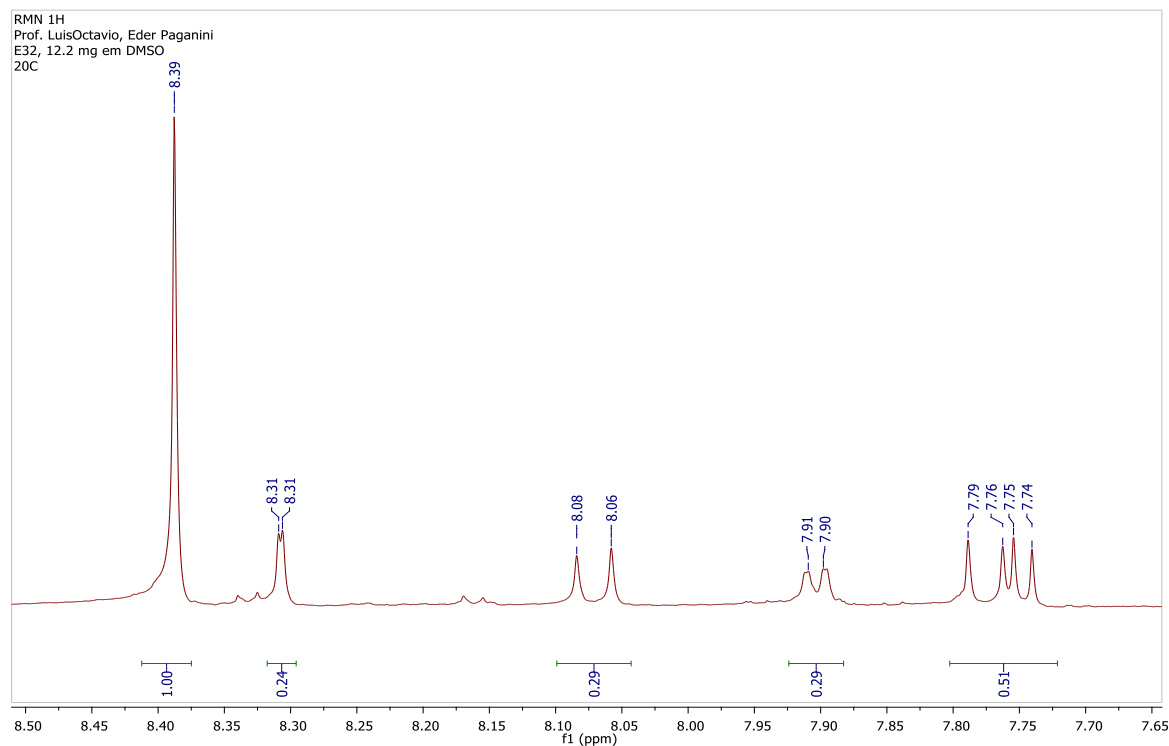
ANEXO 56. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância **E.31** (DMSO- d_6 ; 100 MHz).



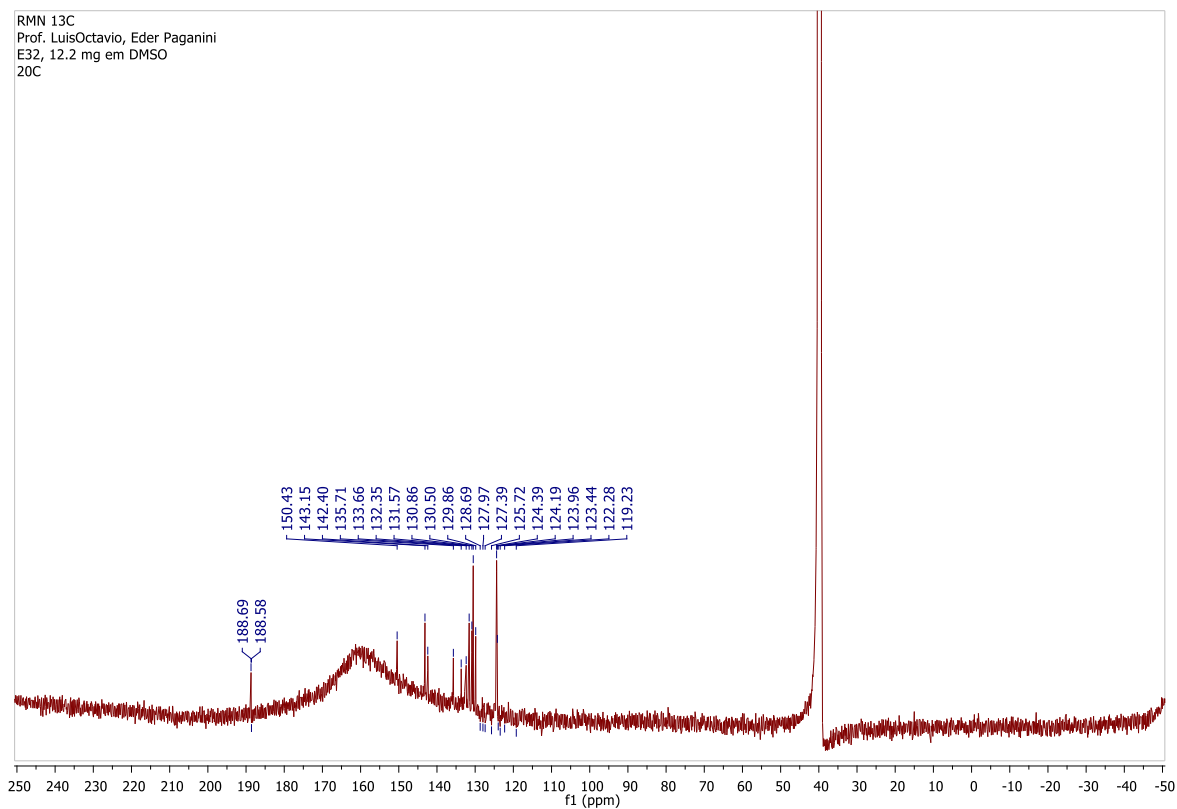
ANEXO 57. Espectro de RMN de ^1H da substância **E.32** ($\text{DMSO-}d_6$; 400 MHz).



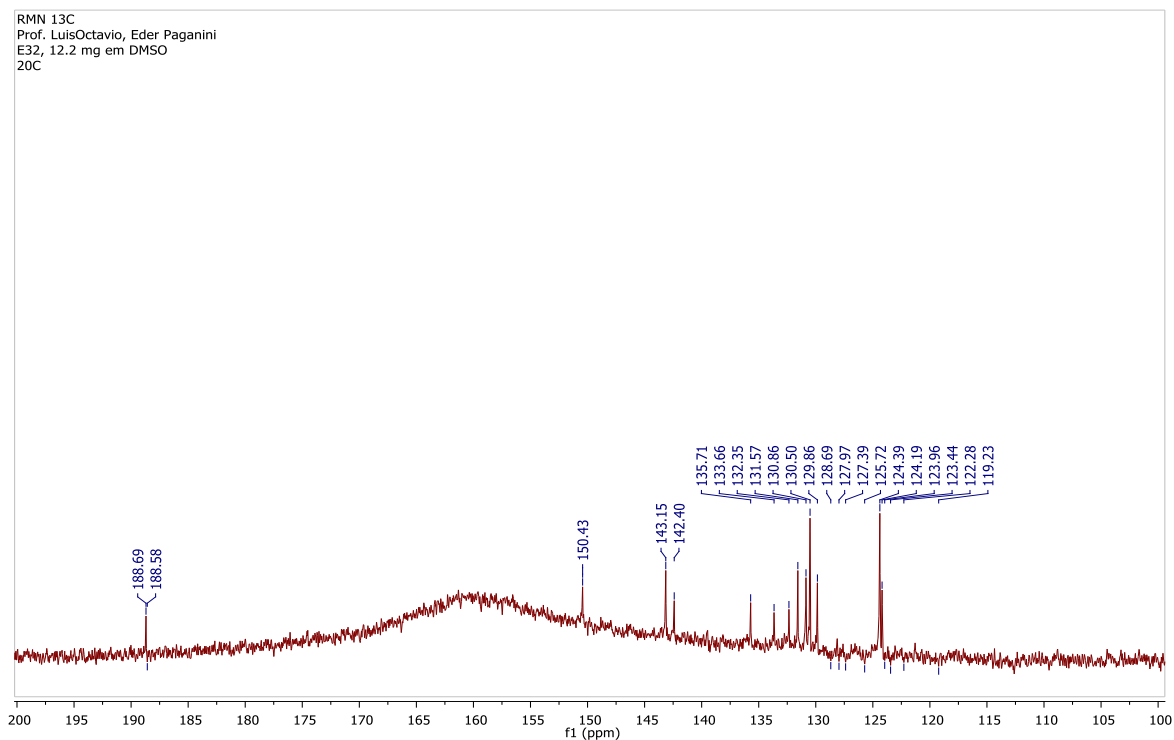
ANEXO 58. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **E.32** ($\text{DMSO-}d_6$; 400 MHz).



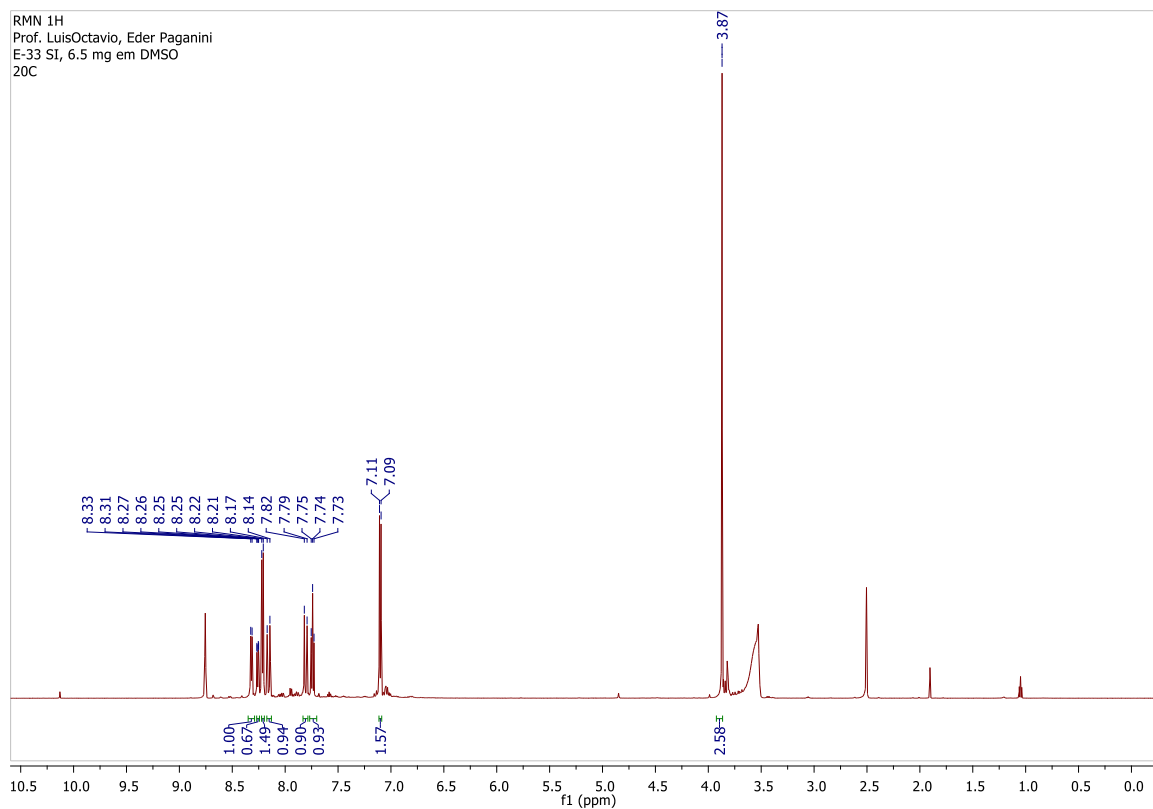
ANEXO 59. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **E.32** (DMSO- d_6 ; 100 MHz).



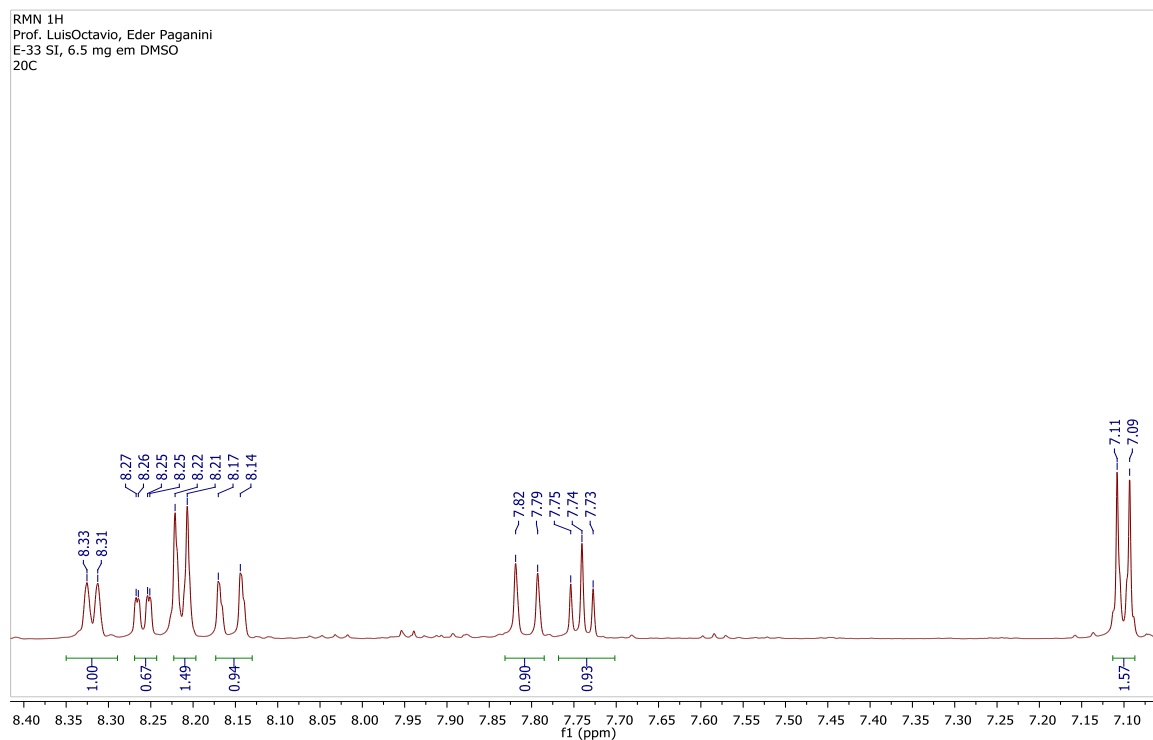
ANEXO 60. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância **E.32** (DMSO- d_6 ; 100 MHz).



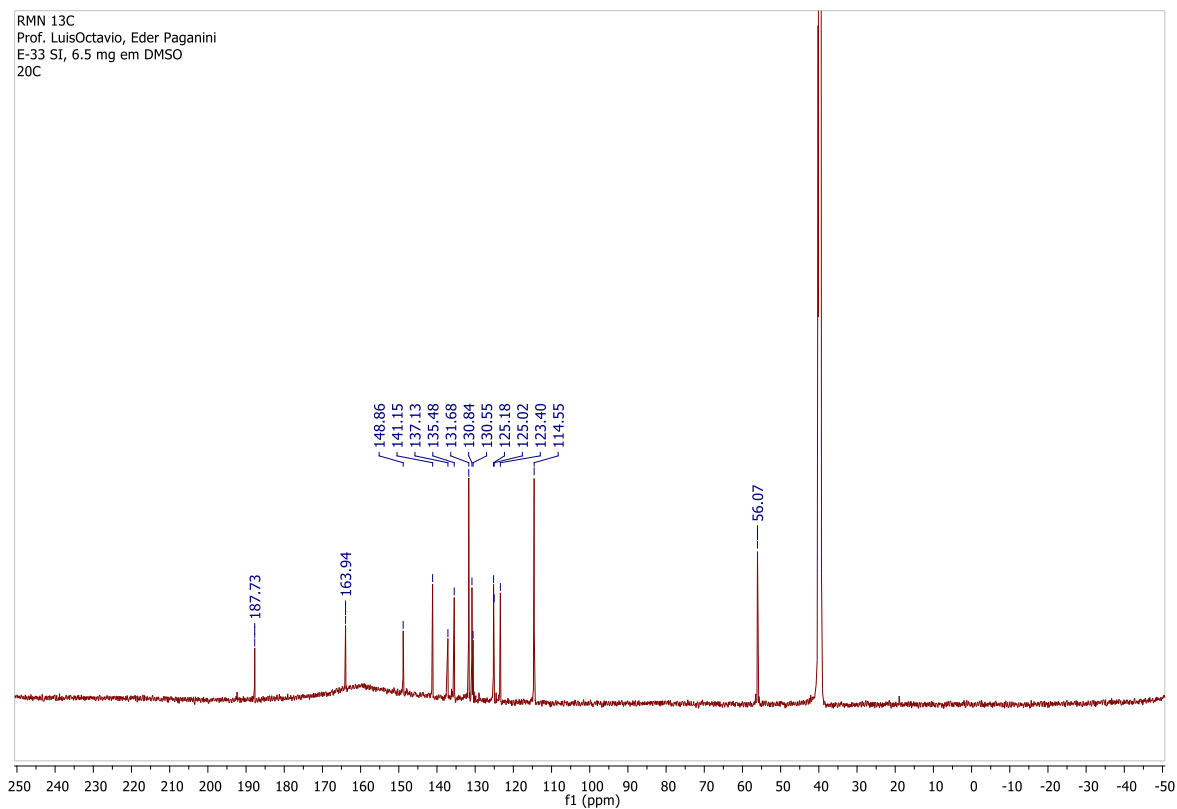
ANEXO 61. Espectro de RMN de ^1H da substância **E.33** ($\text{DMSO-}d_6$; 400 MHz).



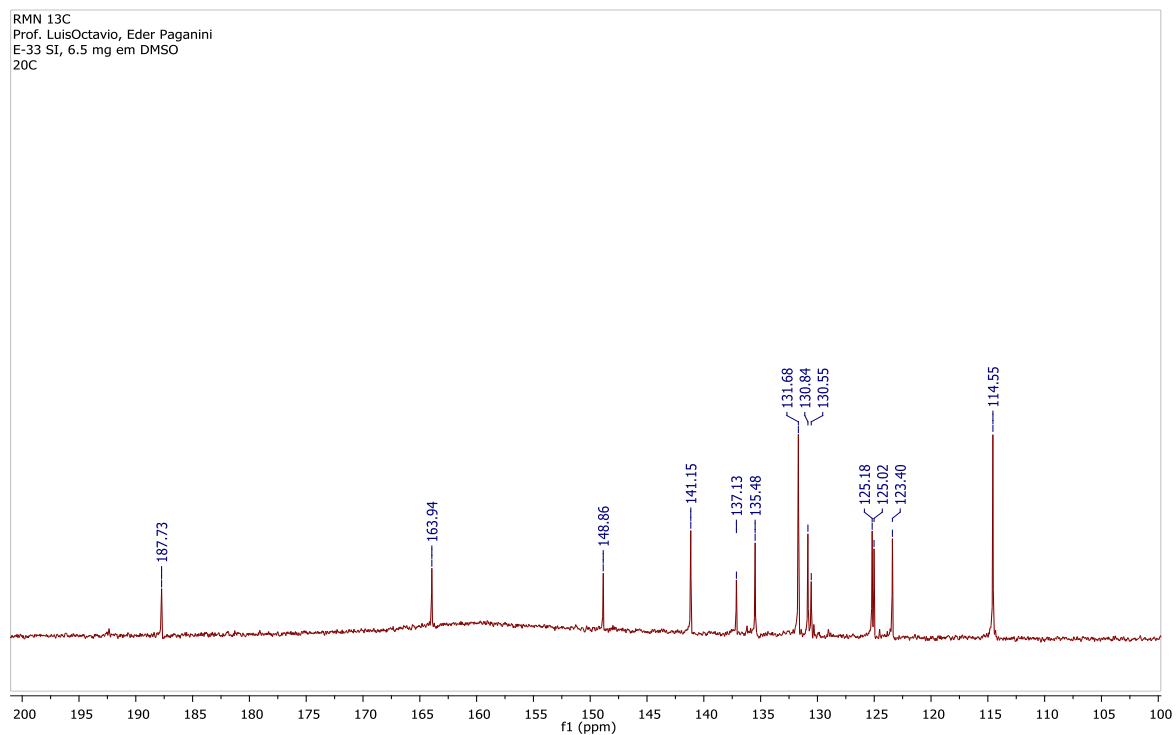
ANEXO 62. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **E.33** ($\text{DMSO-}d_6$; 400 MHz).



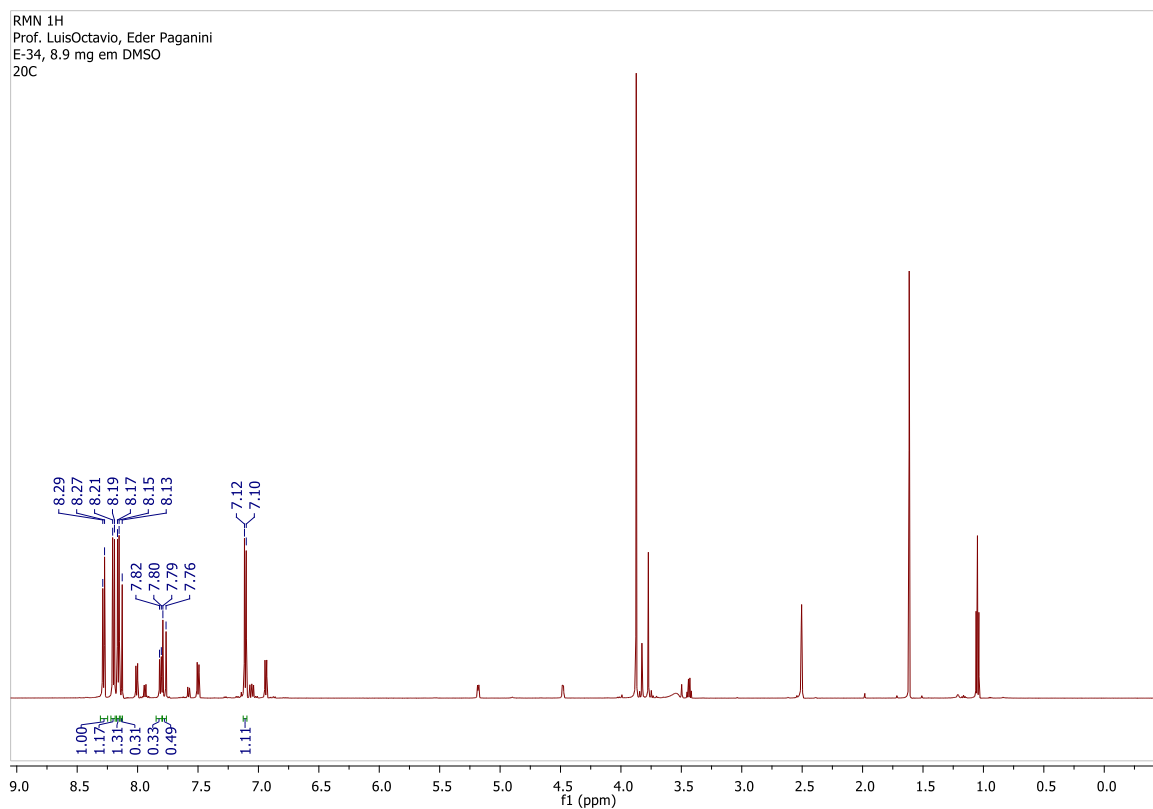
ANEXO 63. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **E.33** (DMSO- d_6 ; 100 MHz).



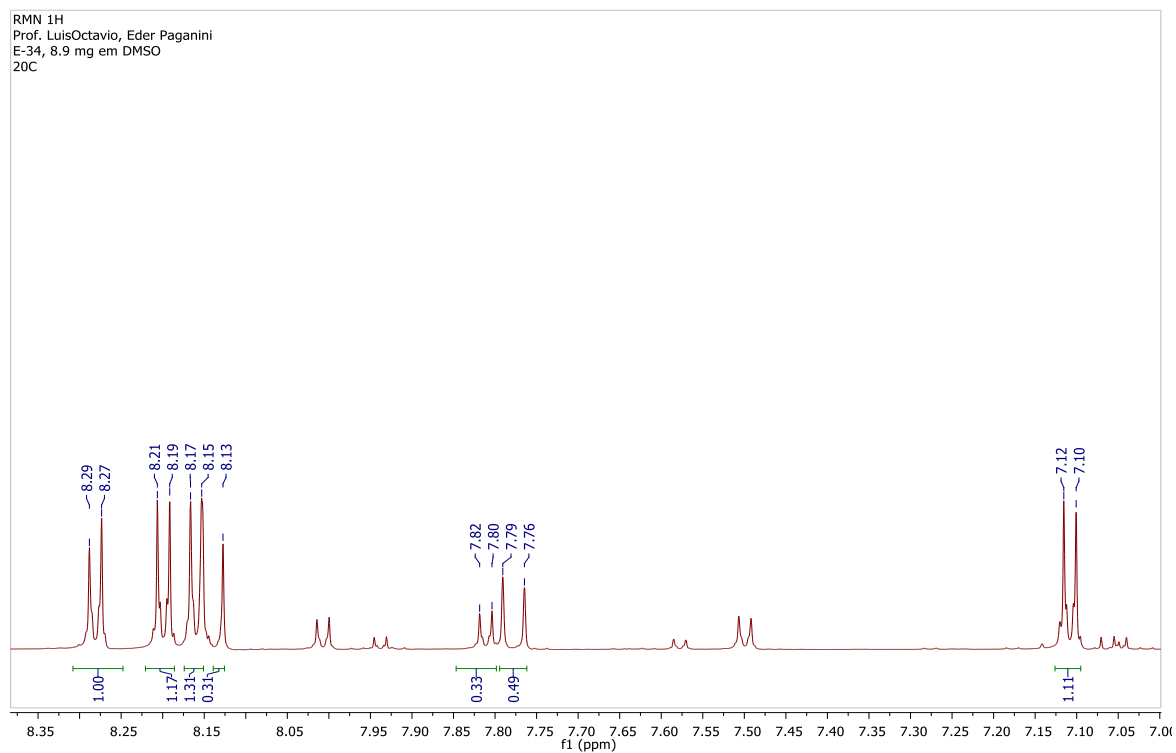
ANEXO 64. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância **E.33** (DMSO- d_6 ; 100 MHz).



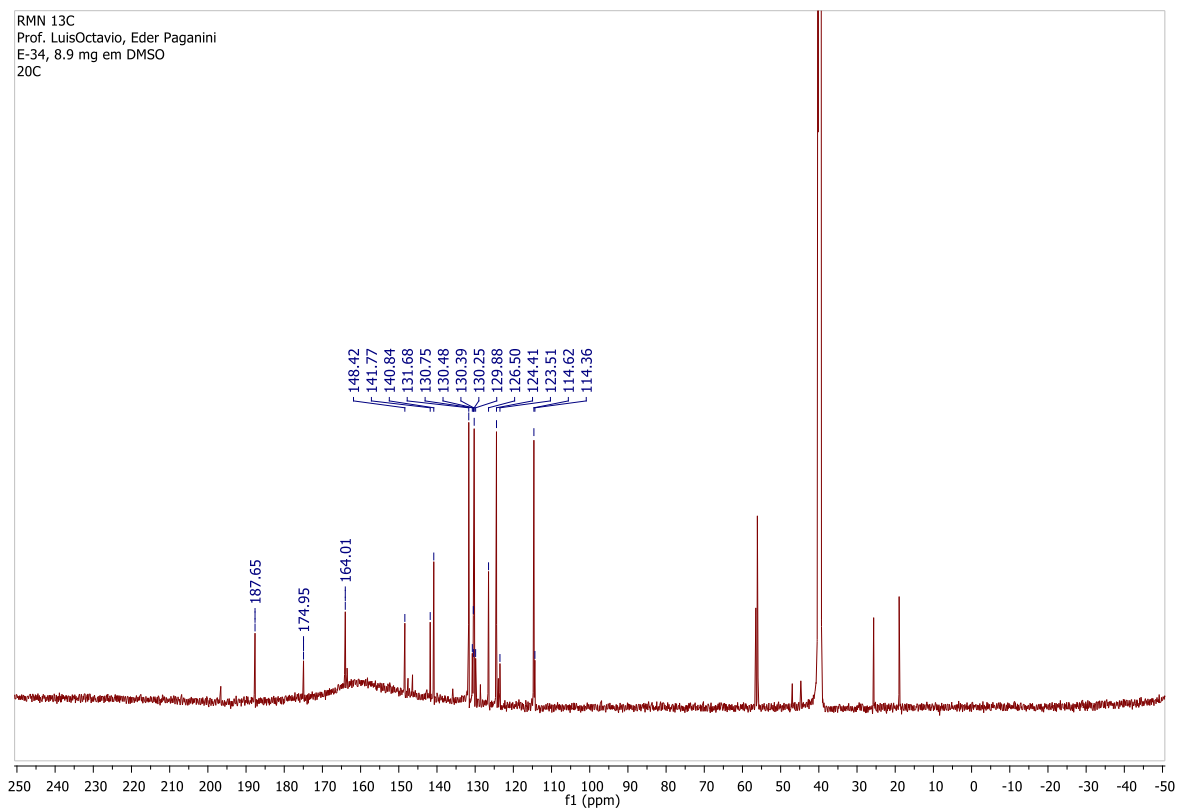
ANEXO 65. Espectro de RMN de ^1H da substância **E.34** ($\text{DMSO-}d_6$; 400 MHz).



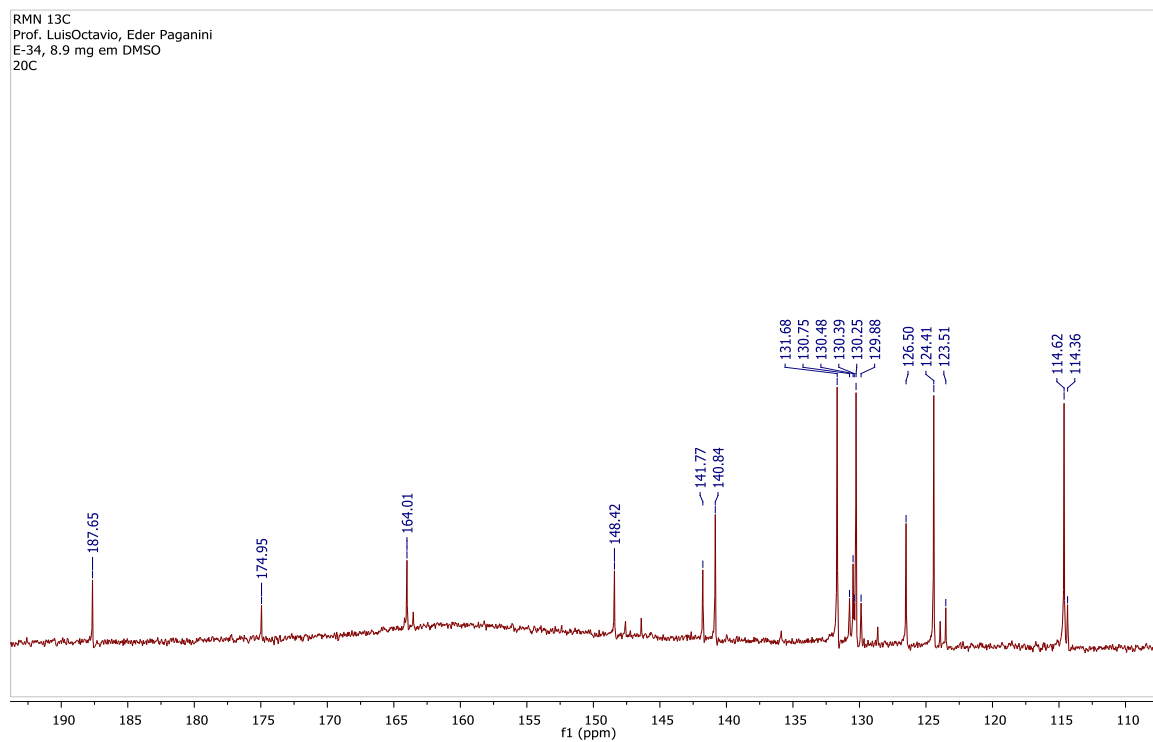
ANEXO 66. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **E.34** ($\text{DMSO-}d_6$; 400 MHz).



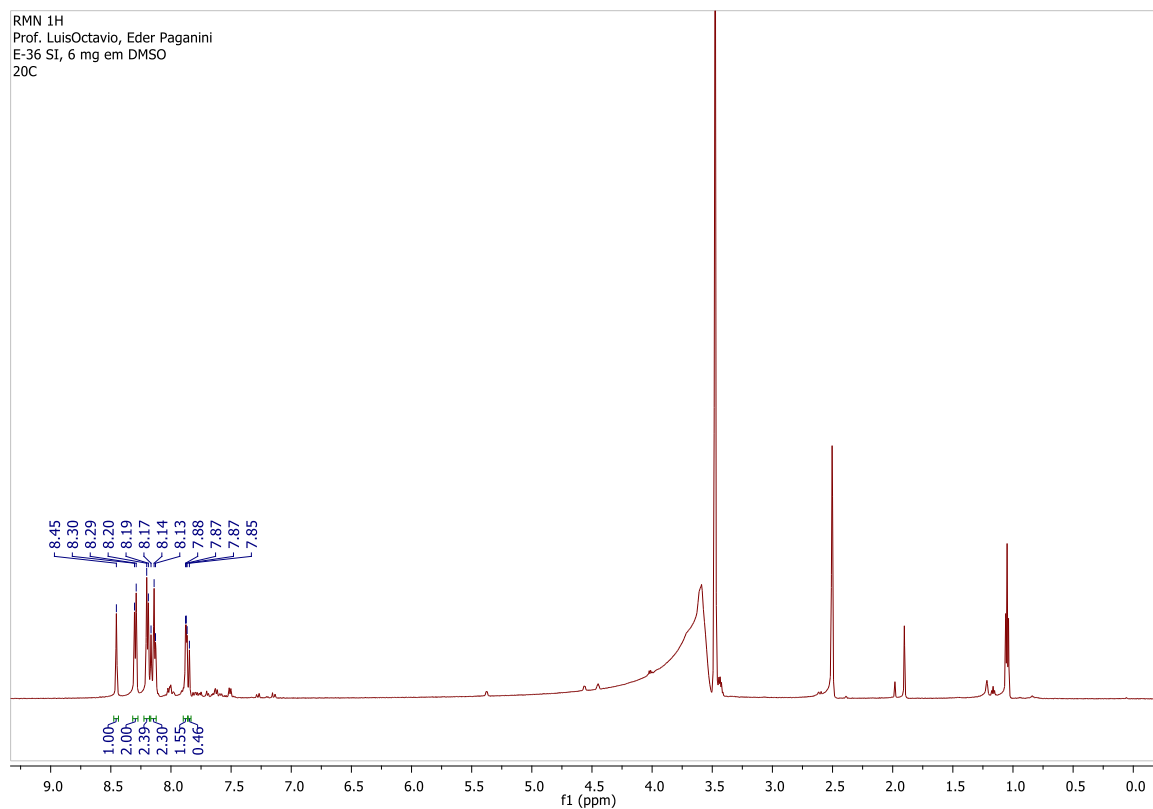
ANEXO 67. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **E.34** (DMSO- d_6 ; 100 MHz).



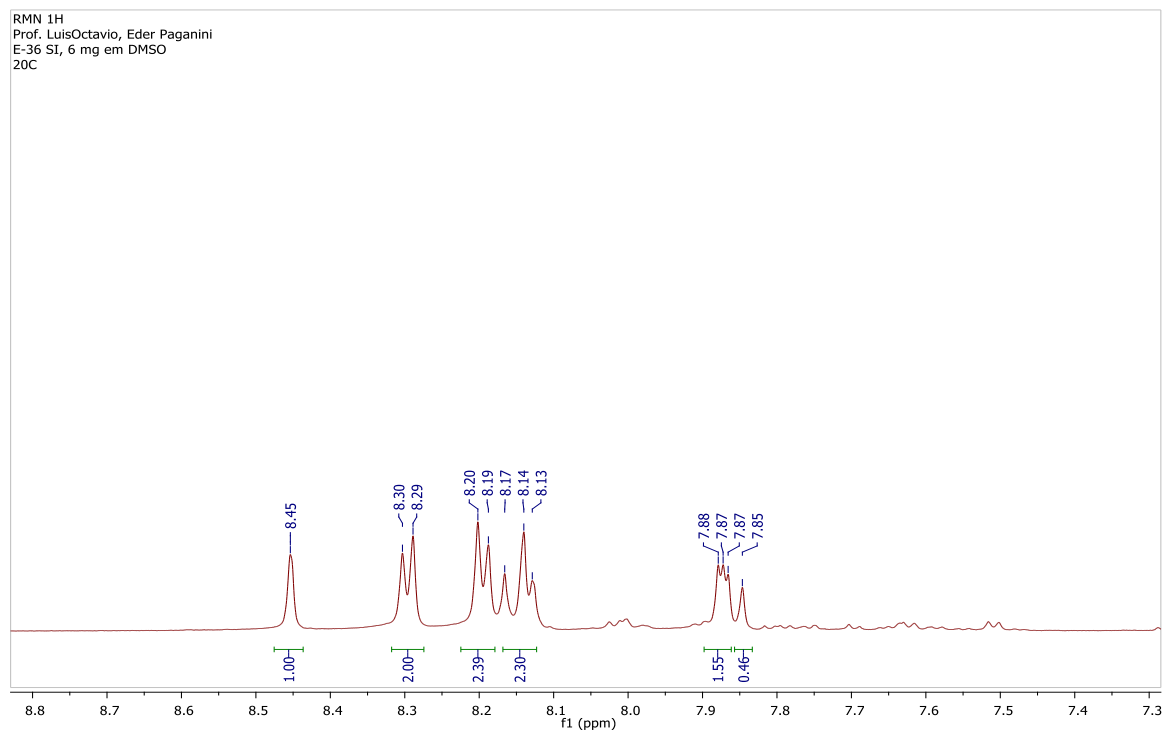
ANEXO 68. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância **E.34** (DMSO- d_6 ; 100 MHz).



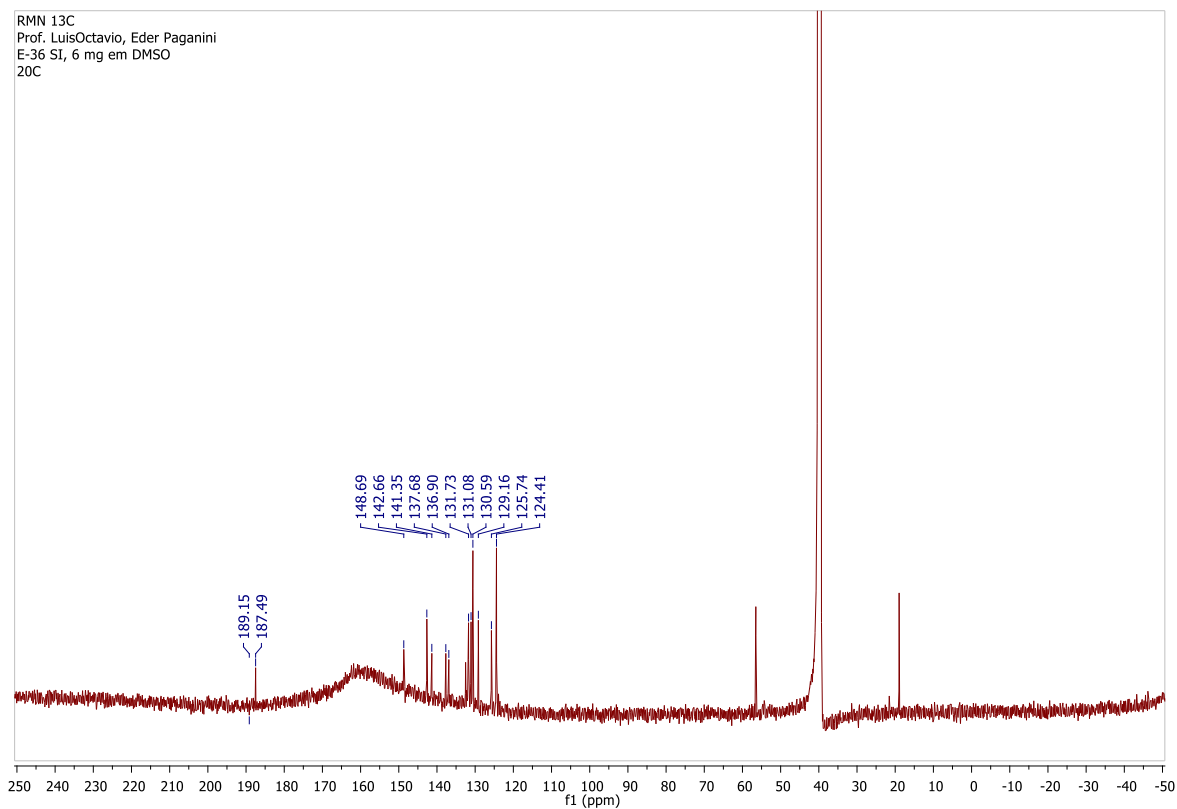
ANEXO 69. Espectro de RMN de ^1H da substância **E.36** ($\text{DMSO-}d_6$; 400 MHz).



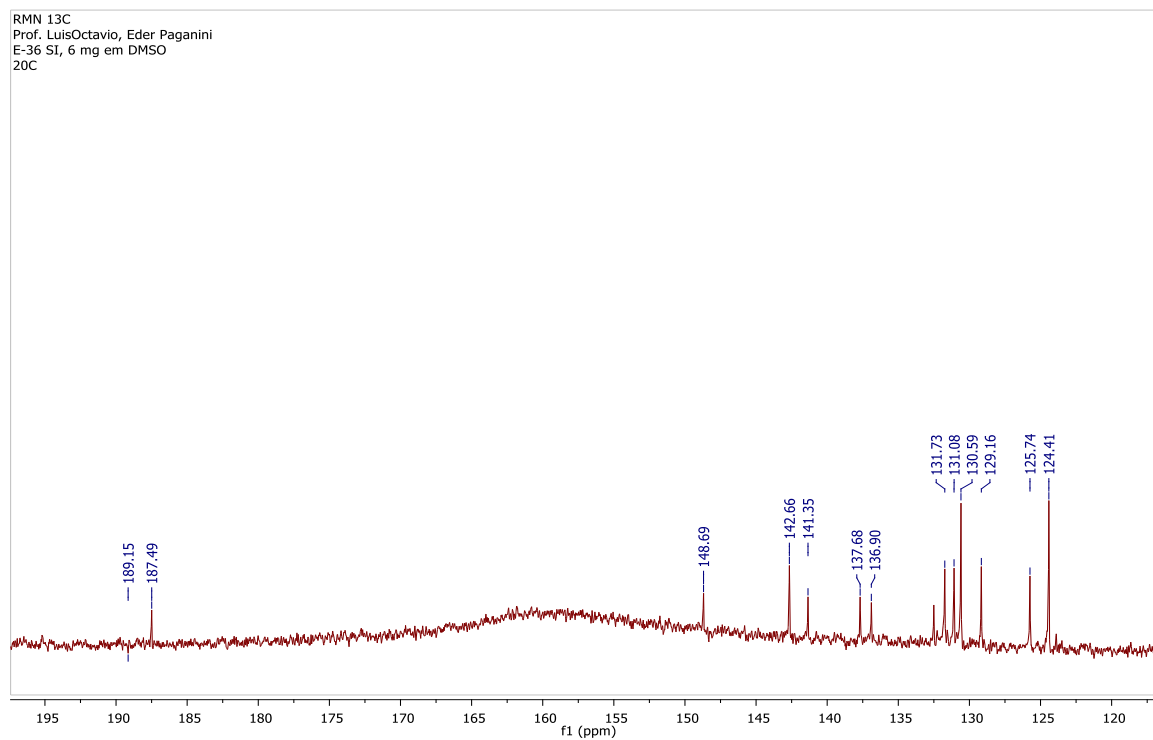
ANEXO 70. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **E.36** ($\text{DMSO-}d_6$; 400 MHz).



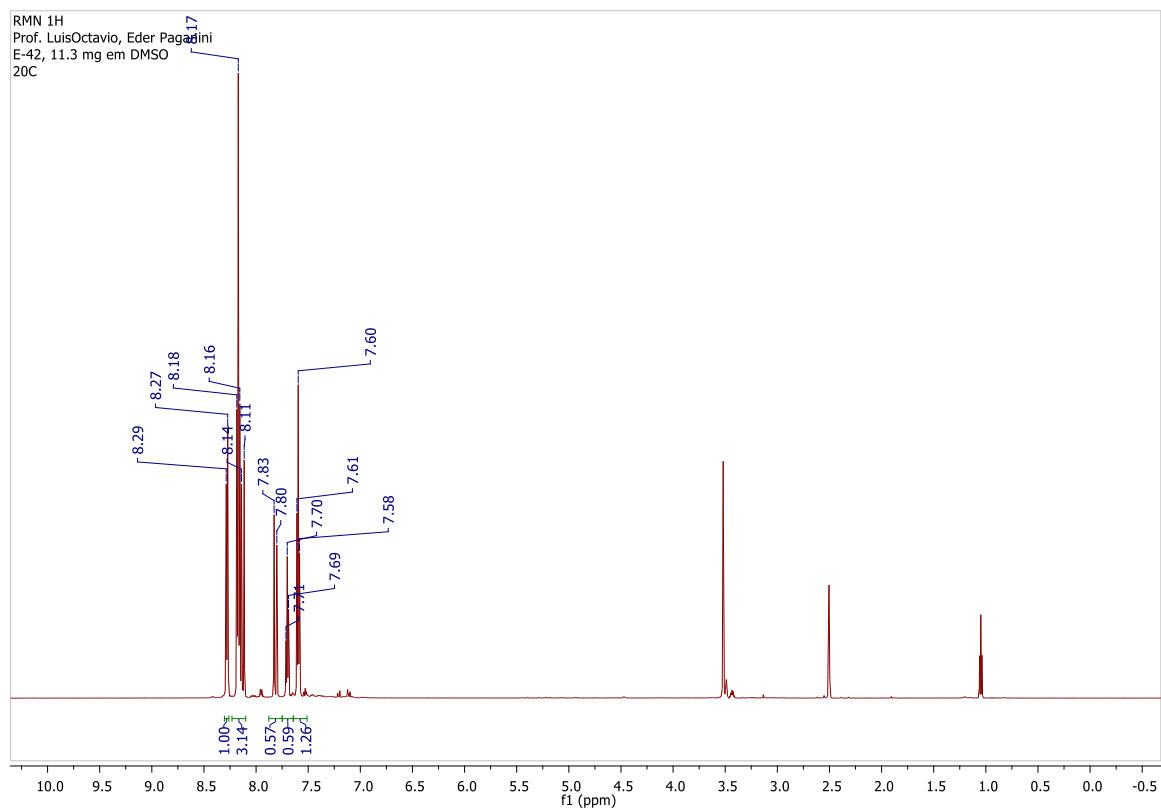
ANEXO 71. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **E.36** (DMSO- d_6 ; 100 MHz).



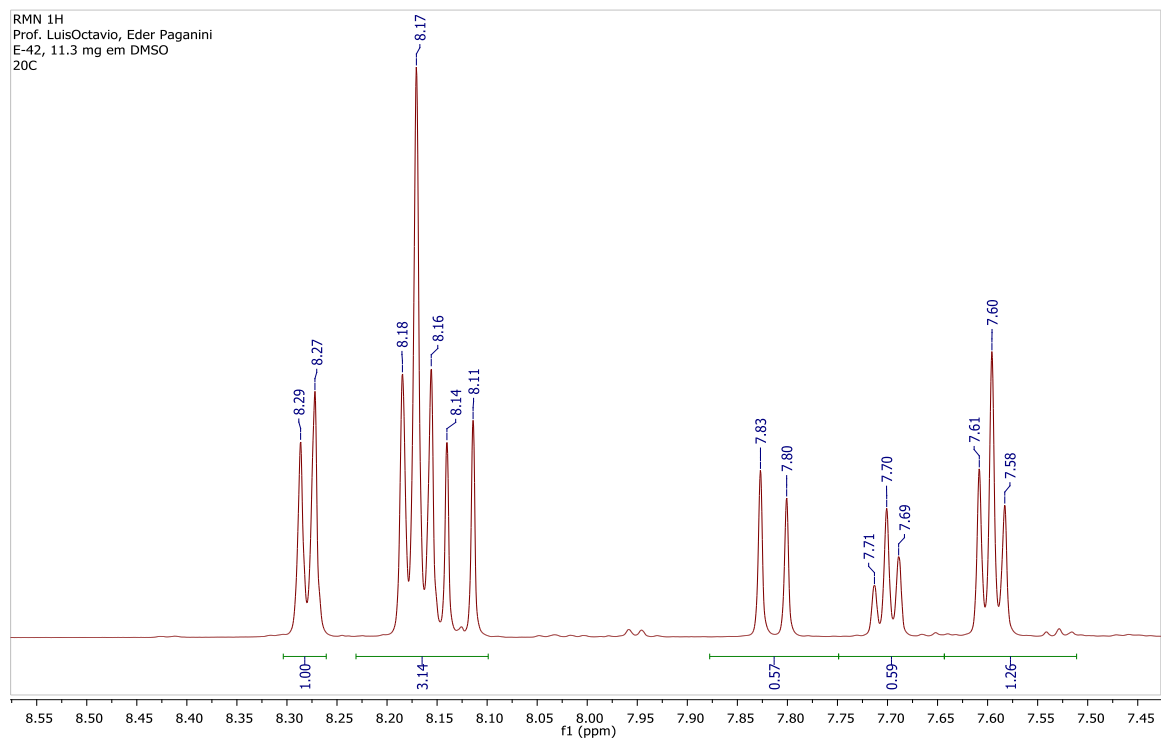
ANEXO 72. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância **E.36** (DMSO- d_6 ; 100 MHz).



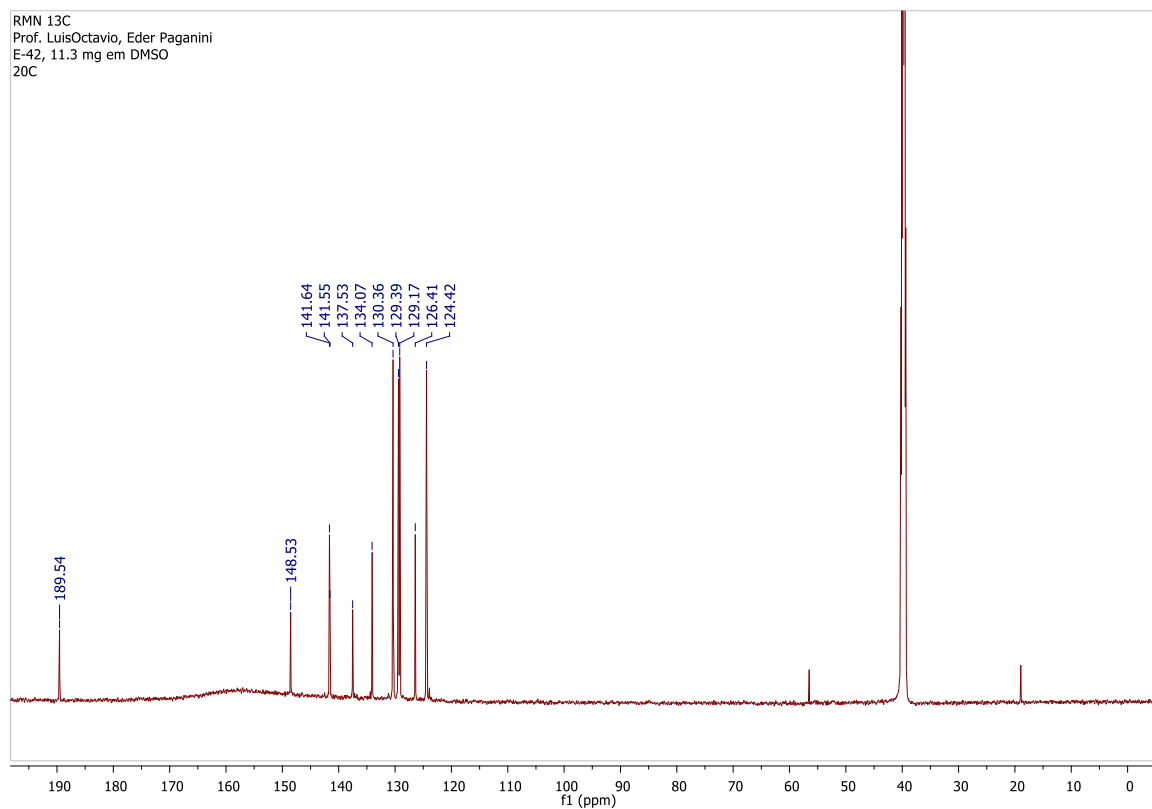
ANEXO 73. Espectro de RMN de ^1H da substância **E.42** ($\text{DMSO-}d_6$; 400 MHz).



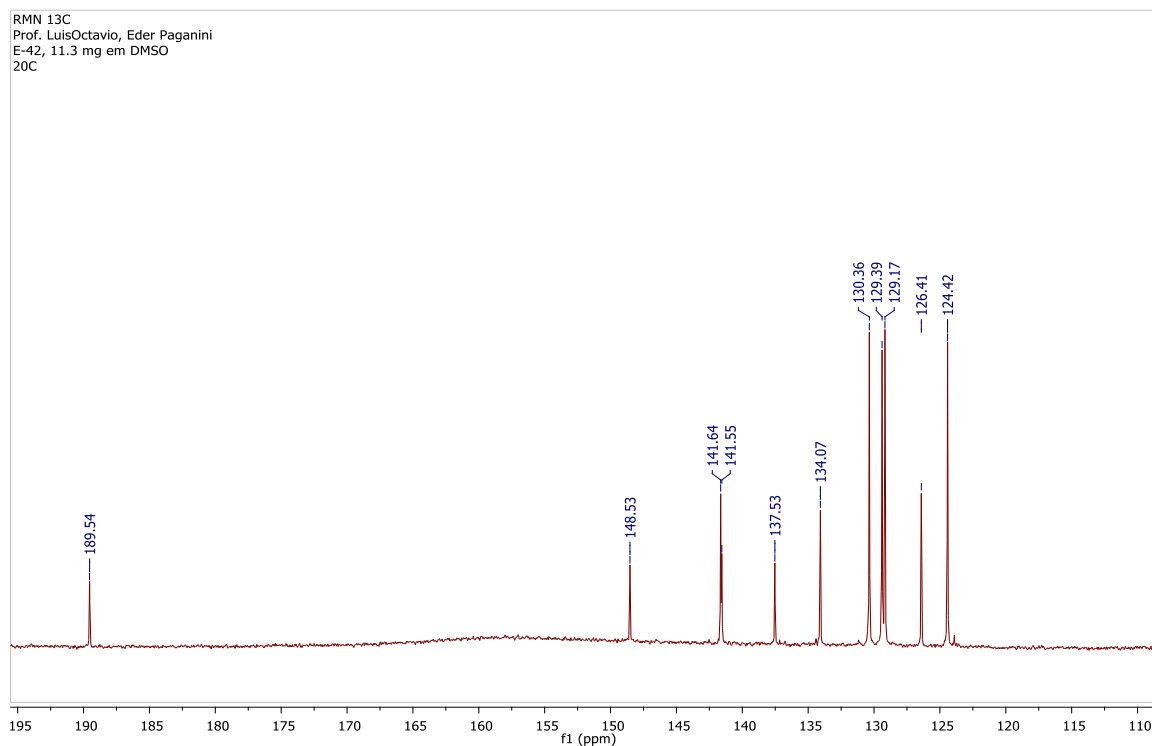
ANEXO 74. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **E.42** ($\text{DMSO-}d_6$; 400 MHz).



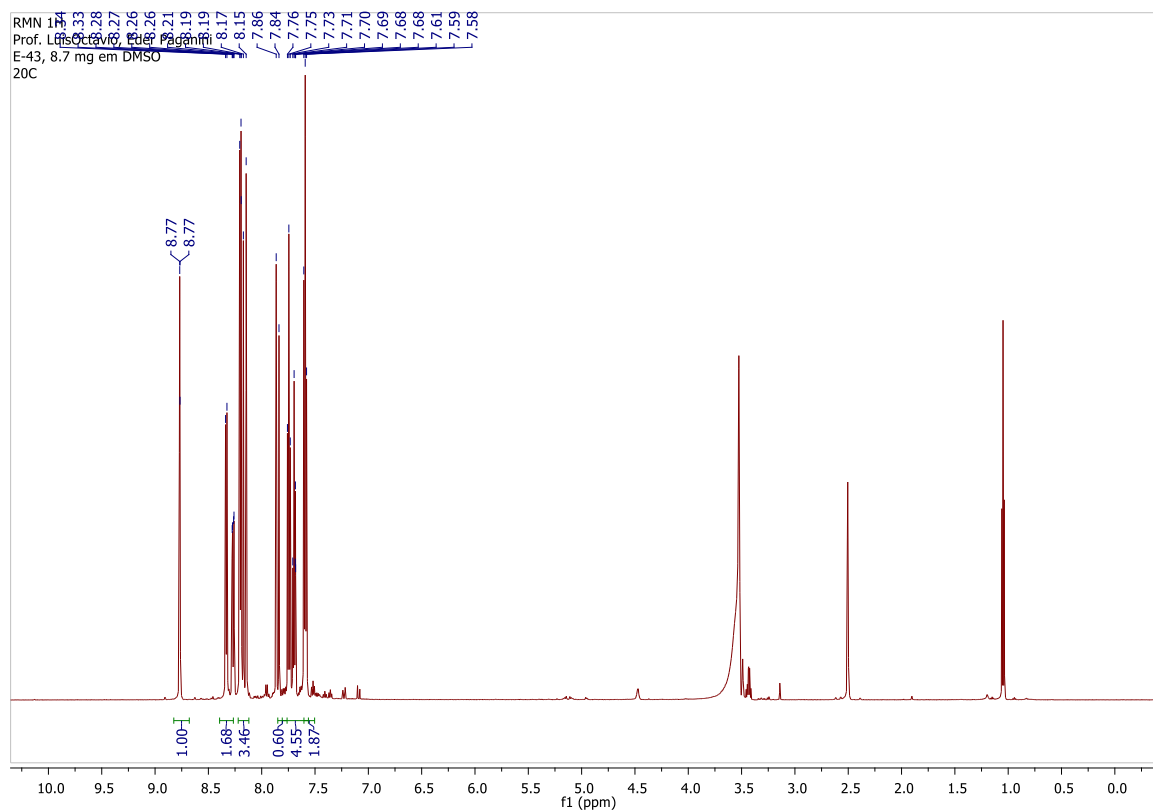
ANEXO 75. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **E.42** (DMSO- d_6 ; 100 MHz).



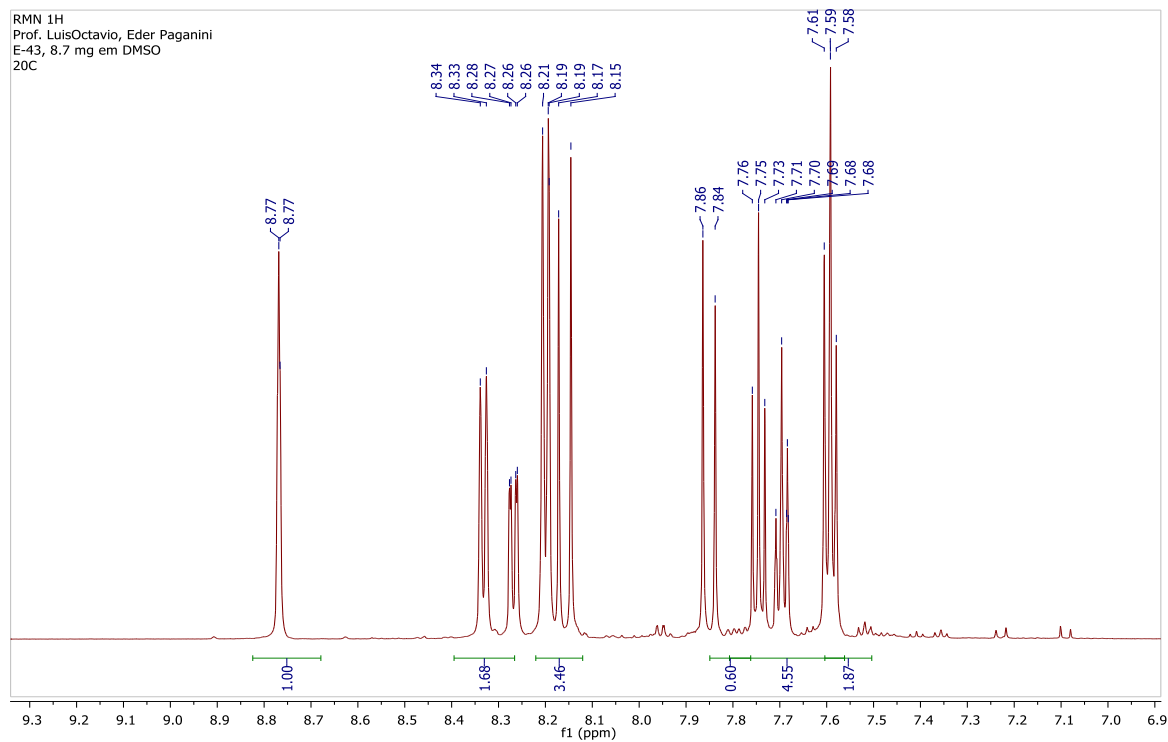
ANEXO 76. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância **E.42** (DMSO- d_6 ; 100 MHz).



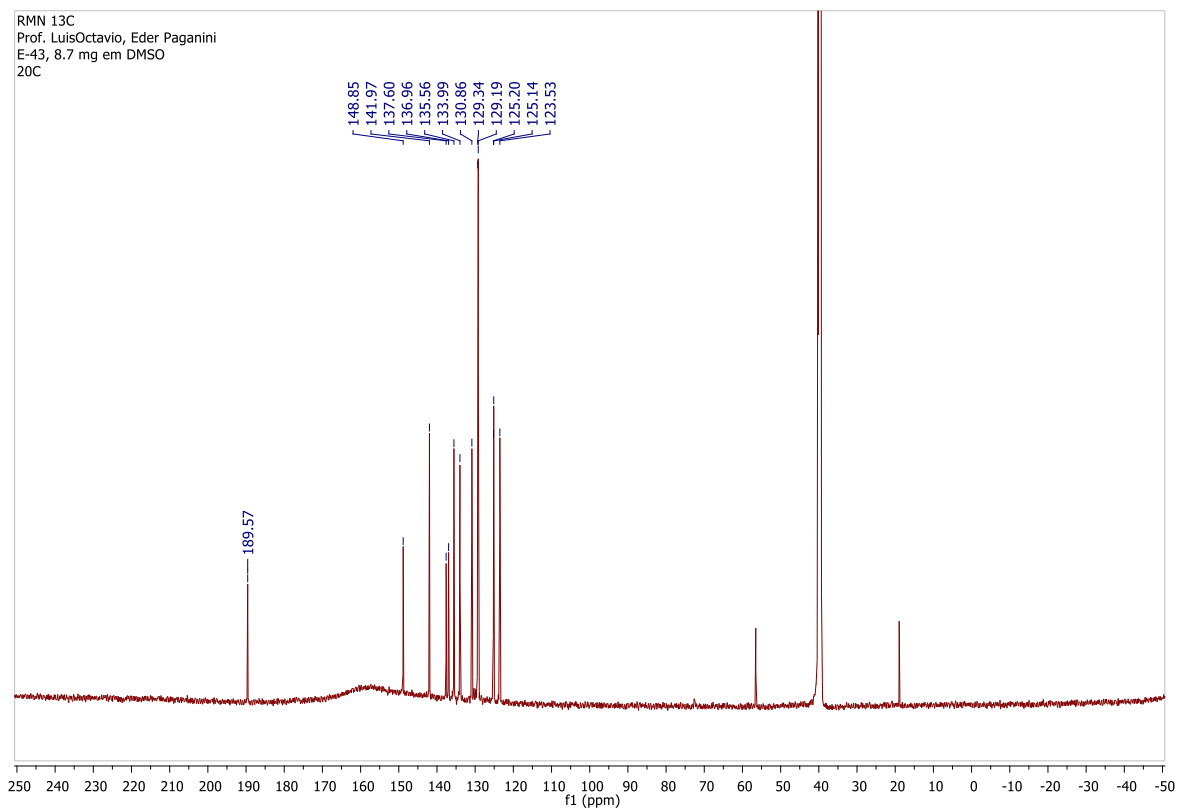
ANEXO 77. Espectro de RMN de ^1H da substância **E.43** (DMSO- d_6 ; 400 MHz).



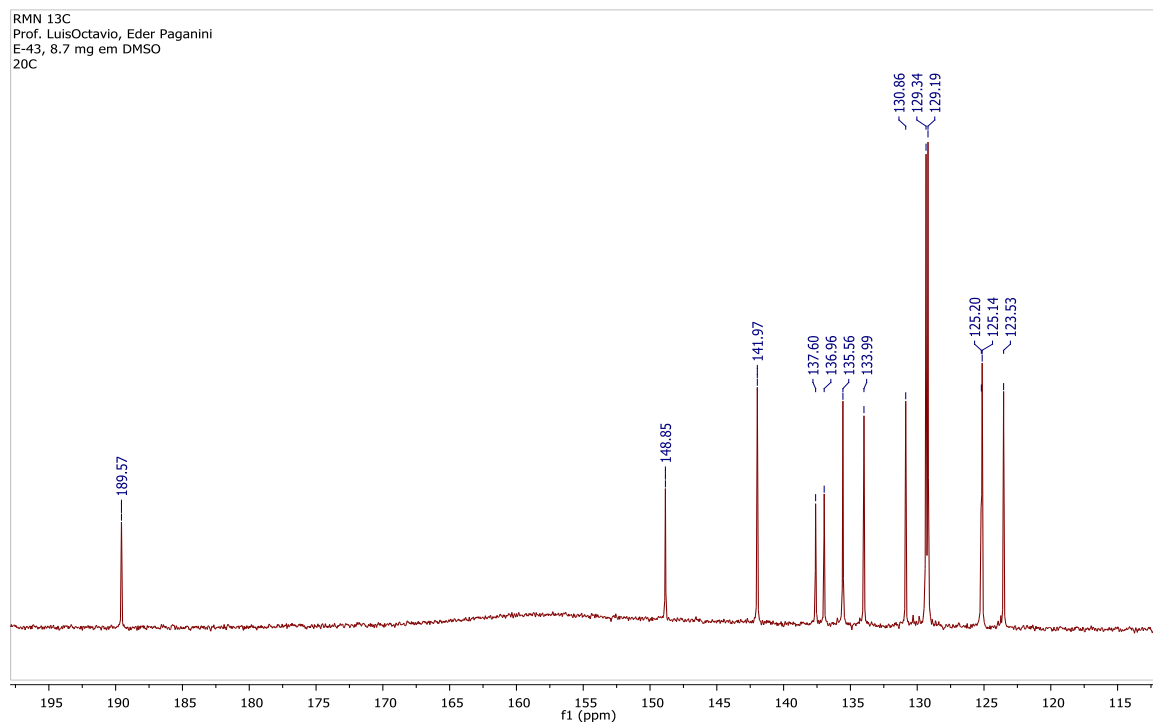
ANEXO 78. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **E.43** (DMSO- d_6 ; 400 MHz).



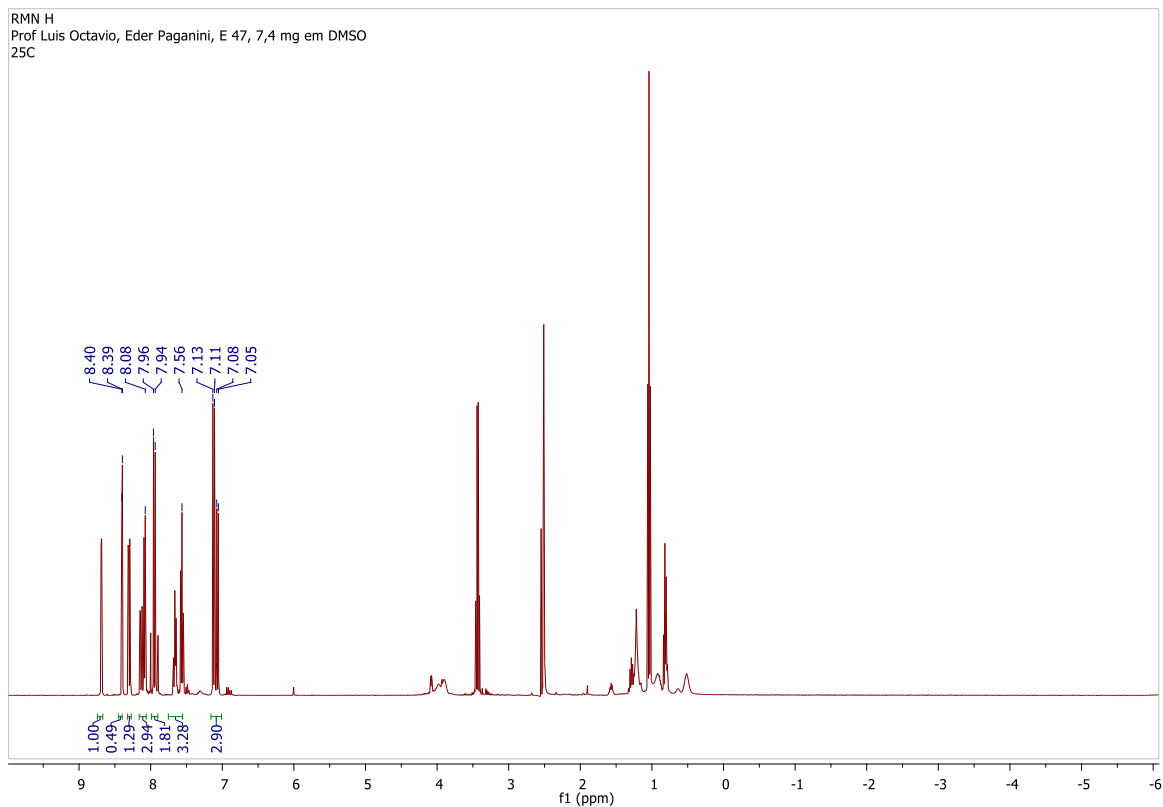
ANEXO 79. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **E.43** (DMSO- d_6 ; 100 MHz).



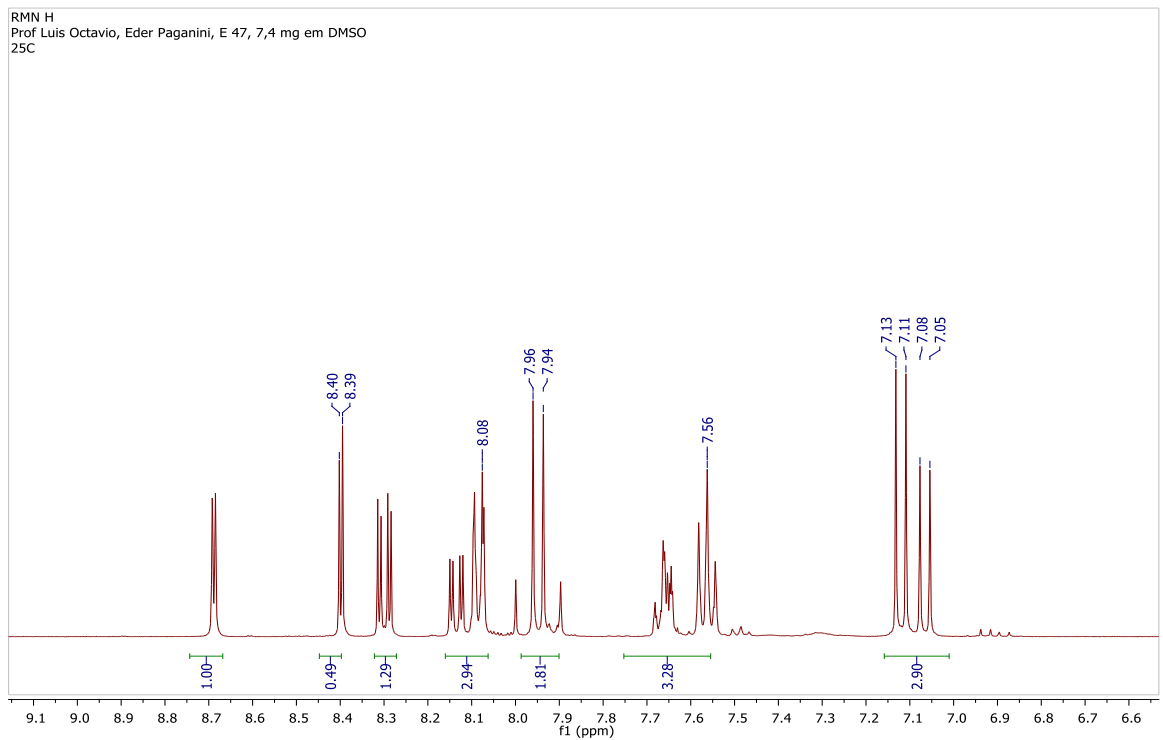
ANEXO 80. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância **E.43** (DMSO- d_6 ; 100 MHz).



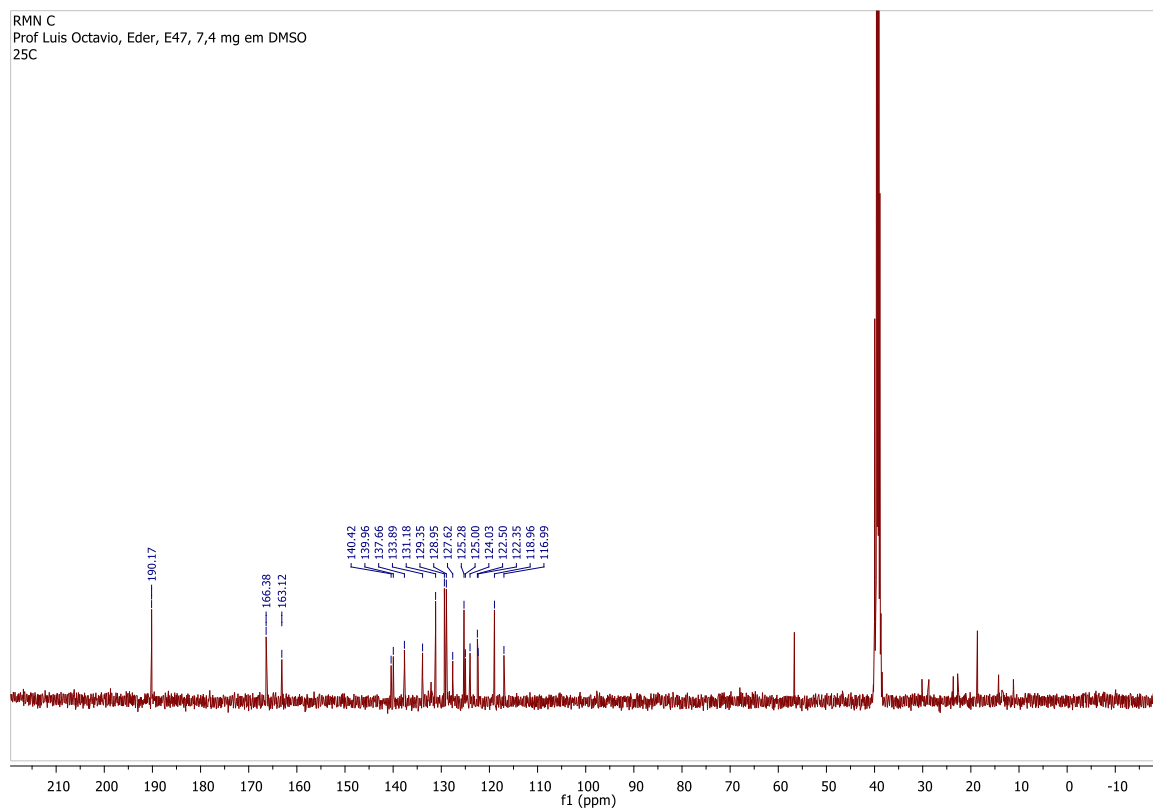
ANEXO 81. Espectro de RMN de ^1H da substância **E.47** (DMSO- d_6 ; 400 MHz).



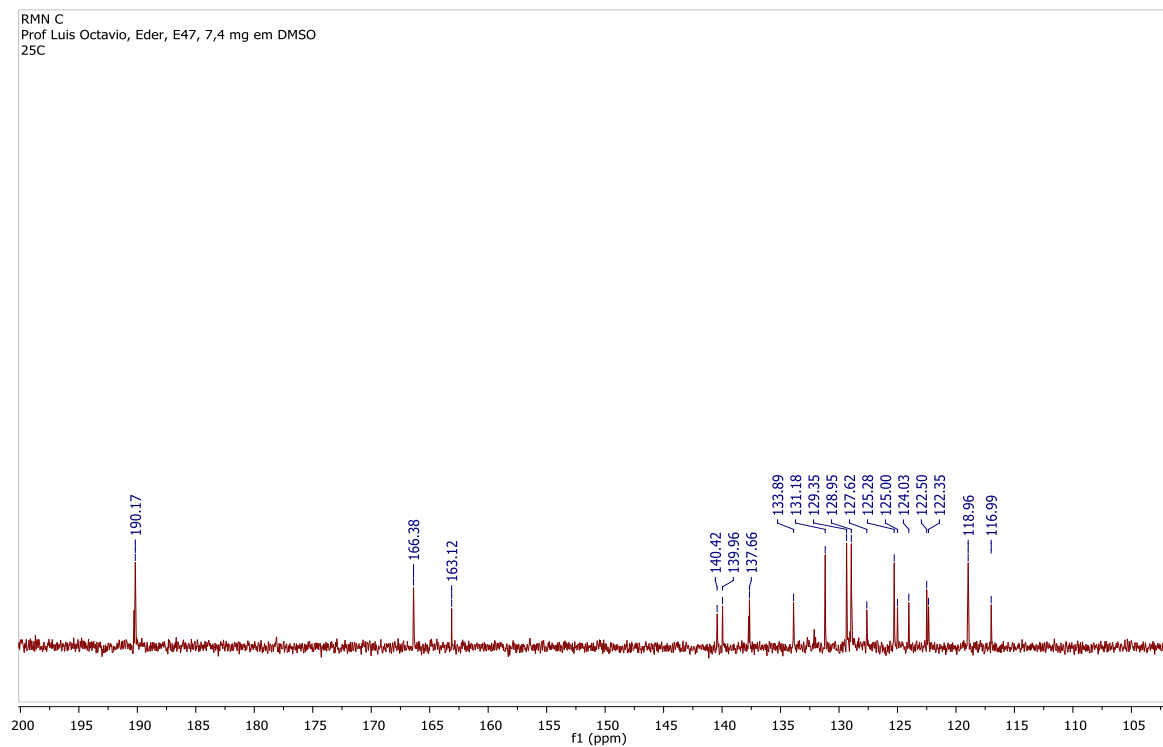
ANEXO 82. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **E.47** (DMSO- d_6 ; 400 MHz).



ANEXO 83. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **E.47** (DMSO- d_6 ; 100 MHz).



ANEXO 84. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância **E.47** (DMSO- d_6 ; 100 MHz).



TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 06/04/2016



Assinatura do autor