



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

Julyanna Andrade Silva Nascentes

Síntese e avaliação de metoxichalconas como agentes antidermatofíticos

São José do Rio Preto

2022

Julyanna Andrade Silva Nascentes

Síntese e avaliação de metoxichalconas como agentes antidermatofíticos

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

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Luis Octavio Regasini
Coorientadoras: Profa. Dra. Ana L. F. Saltoratto e
Profa. Dra. Margarete T. G. de Almeida

São José do Rio Preto

2022

N244s Nascentes, Julyanna Andrade Silva.
Síntese e avaliação de metoxichalconas como agentes
antidermatofíticos / Julyanna Andrade Silva Nascentes. -- São
José do Rio Preto, 2022
133 f. : il., tabs., fotos

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

Orientador: Luis Octavio Regasini

Coorientador: Margarete Teresa Gottardo de Almeida

1. Micoses superficiais. 2. Chalconas. 3. Metoxichalconas. 4.
Dermatófitos. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Julyanna Andrade Silva Nascentes

Síntese e avaliação de metoxichalconas como agentes antidermatofíticos

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

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Luis Octavio Regasini

UNESP - Campus de São José do Rio Preto

Orientador

Prof. Dr. Marcelo Vallim

Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP

Prof. Dra. Jupyracyara Jandyrá de Carvalho Barros

Universidade Federal de Catalão – UFCAT

Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins

Universidade Federal de Uberlândia – UFU Uberlândia

Prof. Dr. João Paulo Zen Siqueira

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP São José do Rio Preto

São José do Rio Preto

18 de agosto de 2022

Pessoas incríveis manifestam o incrível nas pessoas!

Autor Desconhecido

Dedico este trabalho a Deus e à Espiritualidade que sempre estiveram junto a mim, auxiliando-me e amparando em todos os momentos. Aos meus pais, Vicente e Carminha (no meu coração), ao meu marido André, aos meus irmãos Cris e Lu, e aos meus amigos Leticia de Assis e Thiago Lemes.

AGRADECIMENTOS

A construção dessa tese foi uma somatória de esforços de pessoas especiais e Instituições de Fomento à Pesquisa, sem as quais não seria possível a sua realização e conclusão. Serei eternamente grata:

Aos meus pais que de forma única primaram pela minha Educação e dos meus irmãos, colocando nossos sonhos como prioridades! Obrigada Nego e Nega (*in memória*), por estarem sempre presentes, me permitindo viver a vida com Amor! Aos meus queridos irmãos, Cristhiano e Luciana, por sempre me auxiliarem e vivenciarem comigo as melhores histórias. Agradeço aos meus sobrinhos, e as minhas menininhas, Lana, Meg e a minha estrelinha Malu, o amor de vocês facilitaram essa jornada. Aos meus cunhados, principalmente ao Luiz Fernando, obrigada pelo seu cuidado com a minha família.

Em especial, agradeço ao André, meu amigo e marido dedicado e fiel ao que juntos projetamos! Obrigada por estar presente em cada momento dessa jornada, mas principalmente nos momentos de maior crescimento. “*Depois que toda minha força se foi; você foi minha força*” (Whitney Houston). É uma conquista nossa!

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Luis Octavio pela oportunidade, por sua orientação, auxílio e amizade durante esses anos. Agradeço, principalmente, por seu auxílio e “momentos de terapias” nestes últimos meses! Que Deus possa recompensá-lo por todo carinho e atenção dedicados a mim.

As minhas coorientadoras, Profa. Dra. Margarete Almeida, sempre atenciosa e disponível a me auxiliar para a realização desse projeto, e a Profa. Dra. Ana Lúcia Saltoratto, por todo auxílio ofertado no decorrer desses anos.

Ao querido Prof. Dr. Pedro Fernando Romanelli (*in memória*), que abriu as portas para que eu pudesse realizar o sonho da pós-graduação, “Roma” você foi essencial para minha formação.

Aos amigos do Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos - LAQ, Letícia de Assis, Reinaldo Theodoro, Júlio Gabriel, Veridiana Pattini, Dinis Kandjamba, Miguel Divino, Eduarda Cardoso, Anelise Assumpção, Rodrigo Lemos, Ligía Rodrigues, Maria Beatriz, Giovana Martinez, Álvaro Luiz, Carlos Polaquini, Mariana Bastos, Beatriz Marques, obrigada pelo auxílio na realização do projeto e pelos bons momentos que vivenciamos.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Famerp, que me auxiliaram na execução das análises microbiológicas e me proporcionaram muitas risadas e momentos de grandes alegrias. Agradeço ao Thiago Henrique, Natalia Seron, Mariela

Domiciano, Luceli Ferreira, Taiza Maschio, Bianca Gottardo, Maicon Henrique, Emília Cristina, vocês são demais.

Aos meus queridos amigos Mislaine do Vale, Marlon Bussoloti, Márcio do Vale, Dona Julinda do Vale, Iara, Zi, Glória, Dona Antônia, Edson de Paula, Ana Casarim, agradeço por me acolherem e tornarem minha família Paulista.

Aos amigos do Grupo Corrente do Bem, Nilda, Ginaldo, Alvina, Cláudia, Denise, Jean, Selma, Denise, Marcos, Marcelo, obrigada pelas vibrações, carinho e cuidado. Devo parte dessa vitória a vocês!

As minhas amigas de profissão, que sempre me apoiaram e me incentivaram na busca no meu aprimoramento profissional, me mostrando que ser Professora é importar-se com o outro, é cultivar, é amar, é cuidar! Márcia Munhoz, Adriana Guilherme, Adriana Mariano, Marlene Puga, Vanderlice Gomes, Lúcia Peral, Ana Maria Nascimento, Cristiane, Gislaine (Gi), meus sinceros agradecimentos.

À Marines Siqueira, por me ensinar sobre a vida e a importância do Professor e da Educação Pública como meios essenciais para o desenvolvimento do Brasil.

A minha querida amiga que a graduação em Ciências Biológicas me apresentou, Adriane Ribeiro, obrigada pela sua presença constante, por seu amor e cuidado, “estaremos juntas até o céu”.

Ao meu querido primo Raphaell, por todo incentivo, auxílio e por sua amizade!

Aos meus alunos, por serem o meu motivo de buscar sempre mais!

Aos meus amigos da E. E. Voluntários de 32, em especial, Daniel Cardena, Daniela Araújo, Deise, Cláudia, Beatriz, Silvia Leticia, Santa, Tânia, Elaine, Andreia, Antônia, Ingrid, Juliana e Rose, obrigada pela oportunidade de integrar nesse grupo e pelo apoio incondicional no momento que mais aprendi e amadureci nessa minha existência.

As três queridas médicas que sempre primaram pela minha saúde e muito me auxiliaram nesses anos, Dra. Raquel Maciel, Dra. Cláudia Sant’Ana e Dra. Maria Fernanda Bucater.

Aos membros da comissão examinadora desta tese, Prof. Dr. Marcelo Vallim, Prof. Dra. Jupyacyara Jandyra de Carvalho Barros, Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins, Prof. Dr. João Paulo Zen Siqueira, pelo aceite do convite em enriquecer nosso trabalho, agregando experiências e conhecimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Unesp e a todos os professores que se dedicaram na formação de seus alunos.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”.

"A gratidão é a base de toda a felicidade. Todo aquele que é grato à vida está oferecendo a Deus a oblata do seu sentimento mais nobre."

(Franco, 2022)

RESUMO

As chalconas são substâncias de plantas que apresentam inúmeras bioatividades, dentre elas atividade antifúngica, sendo de síntese concisa. Estudos realizados por este grupo de pesquisa demonstraram a ação da 2',4'-dimetoxichalcona (**JA-0**) contra espécies de *Candida*, exibindo Concentração Inibitória Mínima (CIM) entre 15,6 µg/mL e 61,2 µg/mL. Com o objetivo de otimizar a atividade antifúngica dessas dimetoxichalconas, foi proposta uma série de análogos de **JA-0** com modificações no anel B, por meio de substituintes eletrodoadores e eletroatratores. A síntese desses análogos, foi realizada por meio da reação aldólica de Claisen-Schmidt. A avaliação antidermatofítica foi realizada contra *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis* e *Epidermophyton floccosum* incluindo cepas de referência da American Type Culture Collection (ATCC) e isolados oriundos de micoses superficiais. A partir dos valores da CIM, foram selecionados os três compostos mais ativos para avaliação da sua combinação com diferentes fármacos antifúngicos, a avaliação do tempo de morte e a avaliação da toxicidade contra queratinócitos humanos e larvas de *Galleria mellonella*. Foram obtidos trinta e um compostos com rendimentos globais entre 15 e 96%, e pureza entre 90 e 98%. Cinco substâncias são inéditas na literatura, **JA-2F**, **JA-3Br**, **JA-3OMe**, **JA-2OH3F** e **JA-4-terc**. Os ensaios de susceptibilidade fúngica *in vitro* indicaram os valores de CIM e da Concentração Fungicida Mínima (CFM). Os análogos mais ativos contra os dermatófitos exibiram valores de CIM entre 0,9 µg/mL e 31,2 µg/mL. Os compostos **JA-0** e **JA-2F** apresentaram atividade antidermatofítica mais pronunciada sendo selecionadas para estudos mais aprofundados. O composto **JA-4OMe**, é um fármaco chalcônico já em comercialização, nos motivando a continuar com sua avaliação contra os dermatófitos. Os compostos **JA-0**, **JA-2F** **JA-4OMe** provocaram danos a membrana plasmática e na parede celular da célula fúngica, o que pode ser sugestivo para um mecanismo de ação. Ao combinar os análogos metoxilados com os antifúngicos anfotericina B, caspofungina, fluconazol, terbinafina e voriconazol, esses evidenciaram efeito sinérgico em combinação com a maior parte dos fármacos testados. Quanto a toxicidade contra *G. mellonella*, os três análogos não apresentaram toxicidade a 500 µg/mL. Os resultados obtidos indicam uma potencialidade das metoxichalconas para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos, demonstrando potencial aplicabilidade para o tratamento de dermatofitoses.

Palavras-chave: Micoses superficiais. Chalconas. Metoxichalconas. Dermatófitos.

ABSTRACT

Chalcones are plant substances that have numerous bioactivities, including antifungal activity, being concise synthesis. Studies carried out by this research group demonstrated the action of 2',4'-dimethoxyhalcone (JA-0) against *Candida* species, exhibiting Minimum Inhibitory Concentration (MIC) between 15.6 µg/mL and 61.2 µg/mL. With the objective of optimizing the antifungal activity of these dimethoxyhalcones, a series of JA-0 analogues with modifications in the B ring was proposed, through electrodes and electroattractors substituents. The synthesis of these analogues was performed using the Claisen-Schmidt aldol reaction. The antidermatophytic evaluation was performed against *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis* and *Epidermophyton floccosum*, including reference strains from the American Type Culture Collection (ATCC) and isolates from superficial mycoses. From the MIC values, the three most active compounds were selected for the evaluation of their combination with different antifungal drugs, the evaluation of the time of death and the evaluation of toxicity against human keratinocytes and larvae of *Galleria mellonella*. Thirty-one compounds were obtained with overall yields between 15 and 96%, and purity between 90 and 98%. Five substances are unpublished in the literature, JA-2F, JA-3Br, JA-3OMe, JA-2OH3F and JA-4-terc. In vitro fungal susceptibility assays indicated MIC and Minimum Fungicide Concentration (MFC) values. The most active analogues against dermatophytes exhibited MIC values between 0.9 µg/mL and 31.2 µg/mL. Compounds JA-0 and JA-2F showed more pronounced antidermatophytic activity and were selected for further studies. The compound JA-4OMe, is a chalconic drug already in commercialization, motivating us to continue with its evaluation against dermatophytes. Compounds JA-0, JA-2F JA-4OMe caused damage to the plasma membrane and cell wall of the fungal cell, which may be suggestive of a mechanism of action. When combining the methoxylated analogues with the antifungals amphotericin B, caspofungin, fluconazole, terbinafine and voriconazole, these showed a synergistic effect in combination with most of the drugs tested. As for toxicity against *G. mellonella*, the three analogues did not show toxicity at 500 µg/mL. The results obtained indicate the potential of methoxyhalcones for the development of new antifungal agents, demonstrating potential applicability for the treatment of dermatophytosis.

Keywords: Superficial mycoses. Chalcones. Methoxyhalcones. Dermatophytes.

LISTA DE ESQUEMAS

CAPÍTULO II

Esquema 1	Planejamento das séries I e II de análogos chalcônicos 2',4'-dimetoxichalconas	44
Esquema 2	Reação de condensação Aldólica de Claisen-Schmidt para a obtenção das metoxichalconas da Série I e II.....	45
Esquema 3	Fórmula para o cálculo do Índice de Concentração Inibitória Fracionada ICIF.....	62

CAPÍTULO III

Esquema 1	Síntese da 2',4',4'-trimetoxichalcona e seus análogos	69
------------------	---	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1	Estrutura da 2',4'-dimetoxichalcona (1) ativa contra espécies de <i>Candida</i> (MARQUES et al., 2020)	21
Figura 2	<i>Tinea pedis</i> interdigital.....	23
Figura 3	<i>Tinea manuum</i>	24
Figura 4	<i>Tinea capitis</i>	24
Figura 5	Unha com onicomicose devido a infecção por <i>Trichophyton rubrum</i>	25
Figura 6	Macromorfologia e micromorfologia de <i>Microsporum canis</i>	27
Figura7	Colônias de <i>Trichophyton rubrum</i> com produção de pigmentos vermelhos e amarelos	27
Figura 8	Morfologia de <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	28
Figura 9	Alvos moleculares de agentes antifúngicos.....	29
Figura 10	Estrutura química da anfotericina B.....	30
Figura 11	Estrutura dos fármacos usados no tratamento da dermatofitoses.....	32
Figura 12	Núcleo Chalcônico.....	34
Figura 13	Chalconas com atividade antidermatofítica (LÓPEZ et al., 2008)	35
Figura 14	Chalconas com ação sinérgica com o fluconazol contra <i>Candida albicans</i> (WANG et al., 2016)	36
Figura 15.	Estrutura das Metoxichalconas com atividade contra espécies de <i>Candida</i> . CIM = Concentração Inibitória Mínima (MARQUES et al., 2020)	36
Figura 16.	Estrutura dos fármacos chalcônicos	37

CAPÍTULO II

Figura 1.	Tempo de morte de <i>Trichophyton rubrum</i> CBS incubado na presença de JA-0 e JA-2F	55
Figura 2.	Toxicidade das chalconas selecionadas contra as larvas de <i>Galleria mellonella</i>	57
Figura 3.	Fluxograma para avaliação do efeito sinérgico das metoxichalconas e diferentes fármacos antifúngicos	62

CAPÍTULO III

Figura 1	Fármacos chalcônicos.....	68
Figura 2.	Curva do tempo de morte de <i>Trichophyton rubrum</i> CBS118892 na presença de 125 µg/mL de JA-4OMe.....	76
Figura 3.	Representação gráfica do teste de toxicidade da metoxichalcona JA-4OMe em <i>Galleria mellonella</i>	77

CAPÍTULO IV

APÊNDICE A

Figura 1a.	Espectro de RMN de ¹ H da chalcona JA-2F (600 MHz, CDCl ₃)	101
Figura 1b.	Espectro de RMN de ¹³ C da chalcona JA-2F (150 MHz, CDCl ₃)	101
Figura 2a.	Espectro de RMN de ¹ H da chalcona JA-3F (600 MHz, CDCl ₃)	102
Figura 2b.	Espectro de RMN de ¹³ C da chalcona JA-3F (150 MHz, CDCl ₃)	102
Figura 3a.	Espectro de RMN de ¹ H da chalcona JA-4F (600 MHz, CDCl ₃)	103
Figura 3b.	Espectro de RMN de ¹³ C da chalcona JA-4F (150 MHz, CDCl ₃)	103
Figura 4a.	Espectro de RMN de ¹ H da chalcona JA-2Br (600 MHz, CDCl ₃)	104
Figura 4b.	Espectro de RMN de ¹³ C da chalcona JA-2Br (150 MHz, CDCl ₃)	104
Figura 5a.	Espectro de RMN de ¹ H da chalcona JA-3Br (600 MHz, CDCl ₃)	105
Figura 5b.	Espectro de RMN de ¹³ C da chalcona JA-3Br (150 MHz, CDCl ₃)	105
Figura 6a.	Espectro de RMN de ¹ H da chalcona JA-4Br (600 MHz, CDCl ₃)	106
Figura 6b.	Espectro de RMN de ¹³ C da chalcona JA-4Br (150 MHz, CDCl ₃)	106
Figura 7a.	Espectro de RMN de ¹ H da chalcona JA-2Cl (CDCl ₃ , 600 MHz)	107
Figura 7b.	Espectro de RMN de ¹³ C da chalcona JA-2Cl (CDCl ₃ , 150 MHz)	107
Figura 8a.	Espectro de RMN de ¹ H da chalcona JA-3Cl (CDCl ₃ , 600 MHz)	108
Figura 8b.	Espectro de RMN de ¹³ C da chalcona JA-3Cl (CDCl ₃ , 150 MHz)	108
Figura 9a.	Espectro de RMN de ¹ H da chalcona JA-4Cl (CDCl ₃ , 600 MHz)	109
Figura 10a.	Espectro de RMN de ¹ H da chalcona JA-2,4Cl (CDCl ₃ , 600 MHz)	110
Figura 10b.	Espectro de RMN de ¹³ C da chalcona JA-2,4Cl (CDCl ₃ , 150 MHz).....	110
Figura 11a.	Espectro de RMN de ¹ H da chalcona JA-2,6Cl (CDCl ₃ , 600 MHz)	111
Figura 11b.	Espectro de RMN de ¹³ C da chalcona JA-2,6Cl (CDCl ₃ , 150 MHz)	111

Figura 12a.	Espectro de RMN de ^1H da chalcona JA-3,4Cl (CDCl_3 , 600 MHz)	112
Figura 12b.	Espectro de RMN de ^{13}C da chalcona JA-3,4Cl (CDCl_3 , 150 MHz).....	112
Figura 13a.	Espectro de RMN de ^1H da chalcona JA-3CF ₃ (CDCl_3 , 600 MHz)	113
Figura 13b.	Espectro de RMN de ^{13}C da chalcona JA-3CF ₃ (CDCl_3 , 150 MHz)	113
Figura 14a.	Espectro de RMN de ^1H da chalcona JA-4CF ₃ (CDCl_3 , 600 MHz)	114
Figura 14b.	Espectro de RMN de ^{13}C da chalcona JA-4CF ₃ (CDCl_3 , 150 MHz)	114
Figura 15a.	Espectro de RMN de ^1H da chalcona JA-4OCF ₃ (CDCl_3 , 600 MHz)	115
Figura 16a.	Espectro de RMN de ^1H da chalcona JA-2NO ₂ (CDCl_3 , 600 MHz)	116
Figura 16b.	Espectro de RMN de ^{13}C da chalcona JA-2NO ₂ (CDCl_3 , 150 MHz)	116
Figura 17a.	Espectro de RMN de ^1H da chalcona JA-3NO ₂ (CDCl_3 , 600 MHz)	117
Figura 17b.	Espectro de RMN de ^{13}C da chalcona JA-3NO ₂ (CDCl_3 , 150 MHz)	117
Figura 18a.	Espectro de RMN de ^1H da chalcona JA-1Naftila (CDCl_3 , 600 MHz)	118
Figura 18b.	Espectro de RMN de ^{13}C da chalcona JA-1Naftila (CDCl_3 , 150 MHz)	118
Figura 19a.	Espectro de RMN de ^1H da chalcona JA-2Naftila (CDCl_3 , 600 MHz)	119
Figura 19b.	Espectro de RMN de ^{13}C da chalcona JA-2Naftila (CDCl_3 , 150 MHz)	119
Figura 20a.	Espectro de RMN de ^1H da chalcona JA-2Tienila (CDCl_3 , 600 MHz)	120
Figura 20b.	Espectro de RMN de ^{13}C da chalcona JA-2Tienila (CDCl_3 , 150 MHz)	120
Figura 21a.	Espectro de RMN de ^1H da chalcona JA-2furanila (CDCl_3 , 600 MHz)	121
Figura 21b.	Espectro de RMN de ^{13}C da chalcona JA-2furanila (CDCl_3 , 150 MHz)	121
Figura 22a.	Espectro de RMN de ^1H da chalcona JA-2OH3F (CDCl_3 , 600 MHz)	121

CAPÍTULO IV

APÊNDICE B

Figura 1a. Espectro de RMN de ^1H da chalcona JA-4OMe (DMSO- d_6 , 600 MHz)	127
Figura 1b. Espectro de RMN de ^{13}C da chalcona JA-4OMe (DMSO- d_6 , 150 MHz)	127
Figura 2a. Espectro de RMN de ^1H da chalcona JA-3OH (DMSO- d_6 , 600 MHz)	128
Figura 2b. Espectro de RMN de ^{13}C da chalcona JA-3OH (DMSO- d_6 , 150 MHz)	128
Figura 3a. Espectro de RMN de ^1H da chalcona JA-4OH (CDCl $_3$, 600 MHz)	129
Figura 4a. Espectro de RMN de ^1H da chalcona JA-3Me (CDCl $_3$, 600 MHz)	130
Figura 4b. Espectro de RMN de ^{13}C da chalcona JA-3Me (CDCl $_3$, 150 MHz)	130
Figura 5a. Espectro de RMN de ^1H da chalcona JA-2OMe (DMSO- d_6 , 600 MHz)	131
Figura 5b. Espectro de RMN de ^{13}C da chalcona JA-2OMe (DMSO- d_6 , 150 MHz)	131
Figura 6a. Espectro de RMN de ^1H da chalcona JA-4terc (CDCl $_3$, 600 MHz)	132
Figura 7a. Espectro de RMN de ^1H da chalcona JA4etil (CDCl $_3$, 600 MHz)	133
Figura 7b. Espectro de RMN de ^{13}C da chalcona JA-4etil (CDCl $_3$, 150 MHz)	133

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1.	Atividade de metoxichalconas selecionadas contra <i>Trichophyton rubrum</i> CBS118892 expressa em µg/mL	43
Tabela 2.	Atividade Antifúngica de metoxichalconas contra <i>Trichophyton mentagrophytes</i> TM ¹ (ATCC11481 e isolados clínicos) expressa em µg/mL.....	46
Tabela 3.	Atividade antifúngica de metoxichalconas contra <i>Trichophyton rubrum</i> ¹ TR expressa em µg/mL	48
Tabela 4.	Atividade Antifúngica de metoxichalconas contra <i>Microsporum canis</i> ¹ MC e <i>Epidermophyton floccosum</i> ² EF	50
Tabela 5.	Efeito sinérgico entre JA-0 e diferentes fármacos contra <i>Trichophyton rubrum</i> TRCBS118892	52
Tabela 6.	Efeito sinérgico entre JA-2F e diferentes fármacos contra <i>Trichophyton rubrum</i> TRCBS118892	52
Tabela 7	Valores de CIM das metoxichalconas JA-0 e JA-2F na presença e ausência de ergosterol	54
Tabela 8.	Valores de CIM das metoxichalconas JA-0 e JA-2F na presença e ausência de sorbitol	54
Tabela 9.	Toxicidade contra fibroblastos de pele (HDFa) e índice de seletividade (IS)	56
Tabela 10.	Origem clínica dos isolados utilizados neste estudo.....	60

CAPÍTULO III

Tabela 1	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) das chalconas contra <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , expressa em µg/mL.	69
Tabela 2	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) das chalconas contra <i>Trichophyton rubrum</i> , expressa em µg/mL	70

	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida	
Tabela 3	Mínima (CFM) das chalconas contra <i>Microsporum canis</i> e <i>Epidermophyton floccosum</i> , expressa em µg/mL	71
Tabela 4.	Valores de Índice de Concentração Inibitória Fracionária (ICIF) e efeito da combinação de chalconas contra <i>Trichophyton rubrum</i>	73
Tabela 5.	Mecanismo de ação da JA-4OMe na membrana celular de <i>Trichophyton rubrum</i> expresso em valores de CIM em µg/mL	74
Tabela 6.	Mecanismo de ação da JA-4OMe na parede celular de <i>Trichophyton rubrum</i> expresso em valor de CIM em µg/mL	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABD	Agar Batata Dextrose
AmfB	anfotericina B
ASD	Agar Sabouraud Dextrose
ATCC	American Type Culture Collection
Br	Bromo
CBS	Fungal Biodiversity Center
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CH3	Metila
CIM	Concentração Inibitória Mínima
Cl	Cloro
CSD	Caldo Sabouraud Dextrose
d	duplete
dd	Duplo duplete
ddd	Duplo duplo duplete
DMSO	Dimetilsulfóxido
EF	<i>Epidermophyton floccosum</i>
F	Flúor
HDFa	Fibroblasto de pele
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HPLC-PAD	detector de matriz de fotodiodos
Hz	Hertz
IC50	Concentração
ICIF	Índice de Concentração Inibitória Fracionária
IS	Índice de seletividade
J	Constante de acoplamento
KOH	Hidróxido de potássio
MC	<i>Microsporum canis</i>
mg	Miligrama
mL	mililitro
mmol	Milimol

N	Nitrogênio
NaHSO ₃	bissulfito de sódio
nm	nanômetro
O	Oxigênio
OCH ₃ (OMe)	metoxila
OH	Hidroxila
PDA	ágar Batata Dextrose
pH	potencial hidrogeniônico
ppm	parte por milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s	simpleto
S	enxofre
t	triplete
TM	Trichophyton mentagrophytes
TR	Trichophyton rubrum
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
µg/mL	microgramas por mililitro
δC:	deslocamento químico de carbono treze
δH:	deslocamento químico de hidrogênio
π	número Pi
°C	graus Celsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1 Considerações iniciais	20
1.2 Revisão de literatura	22
1.2.1 Dermatofitoses	22
1.2.2 Agentes etiológicos	25
1.2.3 Tratamento antifúngico	28
1.2.4 Mecanismos de resistências aos antifúngicos	32
1.2.5 Chalconas	33
1.2.6 Metoxichalconas	35
1.3 Objetivos	38
1.3.1 Objetivo geral	38
1.3.2 Objetivos específicos	38
2 ARTIGO 1 - SÍNTESE E ATIVIDADE ANTIDERMATOFÍTICA DE 2',4'-DIMETOXICHALCONA E SEUS ANÁLOGOS	40
Resumo	41
1 Introdução	41
2 Resultados e Discussão	43
2.1 Planejamento.....	43
2.2 Síntese dos análogos da 2',4'-dimetoxichalconas	44
2.3 Atividade antifúngica das 2',4'-dimetoxichalconas	45
2.3.1 Atividade antifúngica contra <i>Trichophyton mentagrophytes</i> e <i>Trichophyton rubrum</i>	45
2.3.2 Atividade antifúngica contra <i>Microsporum canis</i> e <i>Epidermophyton floccosum</i>	49
2.4 Efeito da combinação de metoxichalconas e fármacos antifúngicos	51
2.5 Efeito das chalconas na membrana e parede celular fúngicas	53
2.6 Tempo de morte de <i>Trichophyton rubrum</i>	54
2.7 Toxicidade contra fibroblastos cutâneos	55
2.8 Toxicidade contra as larvas de <i>Galleria mellonella</i>	56
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
4 EXPERIMENTAL	59
4.1 Procedimentos químicos gerais	59
4.1.1 Síntese	59
4.2 Microrganismos	60
4.3 Preparo dos inóculos e diluição das substâncias	61
4.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM)	61
4.5 Análise do efeito sinérgico das metoxichalconas com fármacos antifúngicos.	61
4.6 Efeito contra a membrana e parede celular fúngica	63
4.7 Tempo de morte	63
4.8 Toxicidade contra células de pele	64
4.9 Toxicidade contra larvas de <i>Galleria mellonella</i>	64
3 Artigo 2 - AVALIAÇÃO DE 2',4',4-TRIMETOXICHALCONA (METOCHALCONA, VESIDRYL) E ANÁLOGOS CONTRA FUNGOS DERMATÓFITOS	65
Resumo	66
1 Introdução	66
2 Resultados e Discussão	68
2.1 Química.....	68

2.2	Atividade antidermatofítica de análogos de 2',4'-dimetoxichalconas .	69
2.3	Avaliação da combinação entre a metoxichalcona JA-4OMe e fármacos antifúngicos	73
2.4	Efeito sobre a membrana e parede celular fúngica	74
2.5	Ensaio de tempo de morte de <i>Trichophyton rubrum</i> exposto a metochalcona.	75
2.6	Ensaio de toxicidade contra larvas de <i>Galleria mellonella</i>	76
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	78
4	EXPERIMENTAL	79
4.1	Química	79
4.1.1	Síntese	79
4.2	Microrganismos e culturas	79
4.3	Avaliação da atividade antifúngica	79
4.3.1	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)	79
4.3.2	Atividade sinérgica - Método de tabuleiro de xadrez	79
4.3.3	Time-kill	79
4.3.4	Ensaio de toxicidade com modelo experimental <i>Galleria mellonella</i>	79
4	CONCLUSÕES GERAIS	80
	REFERÊNCIAS	81
	APÊNDICE A: MATERIAL COMPLEMENTAR DO CAPÍTULO II [artigo 1]	90
	APÊNDICE B: Material complementar do Capítulo III [artigo 2]	123

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações iniciais

As infecções fúngicas se apresentam como um problema de saúde pública no cenário global, devido ao número crescente de indivíduos imunossuprimidos (SARDI et al., 2013). Essas infecções geram constante preocupação por estarem amplamente difundidas e devido a seleção de linhagens multirresistentes a terapia fúngica convencional (HSIEH et al., 2019; PERFECT 2017).

Dentre as infecções geradas pelos fungos, as dermatofitoses se constituem como uma das infecções fúngicas mais prevalente

s, afetando em torno de 20 a 25% da população mundial e representando em torno de 30% das infecções fúngicas. Os principais agentes etiológicos das dermatofitoses são os fungos filamentosos, pertencentes aos gêneros *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton*, sendo *Trichophyton rubrum* a espécie de maior incidência, seguida por *Trichophyton mentagrophytes*. Segundo Al-Khikani (2020) a prevalência das dermatofitoses pode variar dentro de um mesmo país e entre países diferentes.

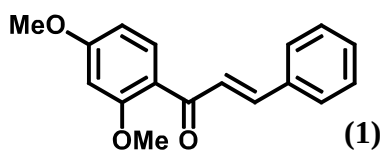
Os fungos dermatófitos são organismos queratinofílicos, ou seja, apresentam a capacidade de utilizar a queratina da pele, unhas e cabelos como fonte de aminoácidos, causando danos dermatológicos. Esses microrganismos produzem enzimas que irão auxiliá-los na invasão dos tecidos queratinizados e causar o processo infeccioso (AL SHEIKH, 2009; AL-JANABI, 2014).

O aumento na incidência de dermatofitoses tem gerado alerta na comunidade científica, pois a terapia antifúngica convencional apresenta sérias limitações, incluindo a necessidade de longos períodos de tratamentos, efeitos adversos severos e recrudescimento da resistência. Neste sentido, é urgente a busca por substâncias que tenham atividades antifúngicas para compor um arsenal terapêutico contra a ação destes patógenos (JIN, 2019; ROBBINS, CAPLAN, COWEN, 2017).

Diante do rápido acesso sintético e espectro de bioatividades apresentados pelas chalconas, incluindo resultados obtidos pelo Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos, advém nosso interesse pelas chalconas substituídas pelo grupo metoxila, as quais apresentaram ação contra fungos, bactérias e células tumorais (NASCENTES et al., 2018; MARQUES et al., 2020).

Esses dados nos motivaram a sintetizar uma série de análogos de chalconas metoxiladas, a partir da 2',4'-dimetoxichalcona (**1**) e pesquisar a ação desta substância e seus análogos contra as espécies de dermatófitos, uma vez que esta substância já foi ativa contra espécies de *Candida* (MARQUES et al., 2020) (Figura 1).

Figura 1. Estrutura da 2',4'-dimetoxichalcona (**1**) ativa contra espécies de *Candida* (MARQUES et al., 2020)



Para melhor entendimento, os dados dessa tese foram organizados em quatro capítulos. No capítulo I, foi realizada uma revisão bibliográfica sobre as dermatofitoses, os agentes dermatofíticos, incidência dessa infecção e uma descrição dos compostos chalcônicos metoxilados.

No capítulo II, foi apresentado o manuscrito da caracterização antifúngica de análogos da 2',4'-dimetoxichalcona com diferentes substituintes eletroatratores. A partir dessa triagem, foram selecionados dois compostos mais ativos para uma avaliação mais detalhada da atividade antidermatofítica. No capítulo III foi elucidada a atividade antidermatofítica de oito análogos da 2',4'-dimetoxichalcona contra as três espécies principais de fungos dermatofíticos, seguido da avaliação da combinação de uma chalcona selecionada com vários agentes antifúngicos, avaliação de possíveis mecanismos de ação e avaliação do perfil de toxicidade.

Por fim, no capítulo IV foram apresentadas as conclusões gerais dos estudos das metoxichalconas contra os fungos dermatofitos, além das referências, e os apêndices dos Capítulos II e III.

1.2 Revisão de literatura

1.2.1 Dermatofitoses

As dermatofitoses são infecções provocadas por fungos dermatófitos, grupo especializado em hidrolisar a queratina durante o processo de infecção por meio da secreção de enzimas proteolíticas, como proteases e queratinases, que promovem danos a pele, unhas e cabelos. A distribuição dos fungos dermatófitos é ampla, sendo diretamente relacionada a fatores climáticos e sociais (SAHOOS; MAHAJAN, 2016; PERES et al., 2010).

No Brasil, nas regiões Sul e Sudeste, há uma maior incidência das espécies *T. rubrum*, *M. canis* e *T. mentagrophytes* e, na região Nordeste, *Trichophyton tonsurans*, *T. rubrum* e *M. canis* (GNAT; NOWAKIEWICZ; ZIEZBA, 2019; SAHOO; MAHAJAN, 2016; PERES et al., 2010).

As dermatofitoses são enfermidades que não apresentam letalidade como ponto crítico. Porém, o caráter crônico dessas infecções gera grandes preocupações, pois as condições socioeconômicas, a ocupação laboral, e as condições climáticas estão entre os principais fatores que contribuem drasticamente para a prevalência e consequentemente, para o avanço destas doenças (LLADÓ et al., 2016).

As condições clínicas dessas infecções podem variar de acordo com a eficiência do sistema imune do hospedeiro, o agente etiológico e a localização anatômica do processo infeccioso. Mas os sintomas mais relatados são coceira, descamação da região afetada, dor, e possível formação de eritema e vesículas (TAINWALA; SHARMA, 2011).

A infecção ocasionada por dermatófitos pode ser transmitida por meio de uso de objetos contaminados como tesouras, alicates, ou por meio da transmissão entre humanos ou entre humanos e animais por contato direto com as células epidérmicas infectadas (SAHOO; MAHAJAN, 2016; SHALABY et al., 2016; TABART et al., 2007).

A instalação da infecção se inicia pela inoculação de conídios ou artroconídios, estrutura responsável pela propagação dos fungos. Estes expressam adesinas e enzimas hidrolíticas, incluindo nucleases, lipases, queratinases, serinoproteases e metaloproteínases, que permitem a adesão do fungo ao tecido epitelial, possibilitando a quebra das barreiras cutâneas (MARTINEZ-ROSSI et al., 2018).

As dermatofitoses são classificadas de acordo com o local de infecção, utilizando o termo em latim *tinea*, seguida pela área afetada no organismo: *tinea pedis* (região dos pés), *tinea cruris* (região ungueal), *tinea capitis* (região do couro cabeludo), *tinea unguium* (unha

das mãos e pés), *tinea corporis* (região do corpo pele glabra), *tinea manuum* (região das mãos) (ILYAS; SHARMA, 2017).

A *tinea pedis* é conhecida como pé-de-atleta, ocorrendo nos pés, sendo mais comum em adolescentes (Figura 2). Nesta infecção há quatro tipos de manifestações clínicas: a mocassim ou também chamada de crônica plantar, provoca eritema difuso e descamação nas solas dos pés; a interdigital que é a mais comum, e ocorre entre os dedos; a inflamatória, que provoca o aparecimento de vesículas e pústulas e, por fim a ulcerativa que é a forma mais grave. Este tipo de *tinea*, é provocada principalmente pelas espécies dermatofíticas *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e *Epidermophyton floccosum* (YOSHIKAWA, 2016).

Figura 2. *Tinea pedis* interdigital



Fonte: Pfeil et al., 2017.

A *tinea manuum* (Figura 3) afeta as mãos geralmente de forma unilateral, e podem ocorrer concomitantemente com a *tinea pedis*, sendo *T. rubrum* a espécie mais prevalente dessa infecção. As características consistem no surgimento de placas vermelhas com borda vesicular e escamosa, acompanhada de pele seca (CHAMORRO; HOUSE, 2020).

Figura 3. *Tinea manuum*



Fonte: CHAMORRO, HOUSE (2020).

A *tinea cruris* é provocada pelas espécies *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *E. floccosum*, geralmente acometendo mais os homens, ocorrendo na virilha com placas eritematosas e contorno delimitado. A *tinea faciei* acomete a face e se assemelha a *tinea corporis*, provocando hipo- ou hiperpigmentação da região infectada (DALLA LANA, et al., 2016).

A *tinea capitis* é provocada por várias espécies dos gêneros *Trichophyton* e *Microsporum*, ocorrendo no couro cabeludo, causando alopecia e provocando a quebra dos fios de cabelo (Figura 4). Geralmente, este tipo de infecção ocorre em crianças, visto que a composição do sebo do couro cabeludo de adolescentes possui propriedades fungistática. A manifestação clínica mais comum ocorre na forma seborreica e provoca a descamação difusa e as vezes, até mesmo perda de cabelos na região afetada (AL-JANABI, 2014).

Figura 4. *Tinea capitis*



Fonte: Pfeil et al., 2017.

A *tinea unguium* (onicomicose), é causada principalmente por *T. rubrum*, acometendo mais adultos, sendo esta responsável por 33% de todas dermatomicoses. Neste tipo de infecção, pode ocorrer o amarelamento das unhas acompanhada de quebra, dor e coceira (Figura 5) e o tratamento é feito com terbinafina ou itraconazol por um período de até quatro meses (ILYAS; SHARMA, 2017; ROTTA et al., 2012).

Figura 5. Unha com onicomicose devido a infecção por *Trichophyton rubrum*



Fonte: ILYAS; SHARMA, 2017

1.2.2 Agentes Etiológicos

O termo dermatófito deriva do grego *derma* (pele) e *phyto* (planta), devido à classificação primitiva dos fungos que os colocava no Reino Plantae. Acredita-se que fungos dermatófitos evoluíram de fungos sapróbios que habitavam os solos. Com pressão do ambiente e a crescente migração humana, conseguiram colonizar e infectar homens e animais (FROTA, 2011).

O primeiro estudo sobre a classificação sistemática deste grupo de fungos foi realizado por Raymond Sabouraud, o qual propôs quatro gêneros *Achorion*, *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton*. Posteriormente, por meio do estudo sistemático das estruturas de reprodução, os conídios, o gênero *Achorion* foi retirado, permanecendo somente os três últimos. Com o uso de técnicas moleculares, novos gêneros têm sido descritos nos últimos anos. Recentemente esse grupo compreende sete gêneros dentre eles, tem-se *Trichophyton*, *Microsporum*, *Nannizzia*, *Epidermophyton*, *Paraphyton*, *Lophophyton* (CARRASCAL-CORREA; ZULUAGA; GONZALEZ, 2020; HOOG et al., 2017).

Os dermatófitos podem ser classificados de acordo com o seu principal habitat, sendo assim caracterizados em três grupos; geofílicos, zoofílicos e antropofílicos. Cada um destes

gêneros apresenta espécies que causam diferentes lesões em humanos e animais, contribuindo para a cronicidade das dermatofitoses. As espécies antropofílicas provocam baixa inflamação enquanto, os representantes zoofílicos e geofílicos causam inflamações mais severas (DALLA LANA et al., 2016).

Os dermatófitos geofílicos são seres sapróbios, como *Microsporum gypseum* e, estão presentes no solo, utilizando dos substratos queratinizados, como cabelos, pele, unhas, chifres, conchas, carapaças de insetos. Devido a frequente associação com penas e pelos de animais, sugere-se que esses fungos facilmente adaptaram-se aos hospedeiros animais e humanos, permitindo o surgimento dos fungos antropofílicos e zoofílicos (AL-JANABI, 2014; WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995).

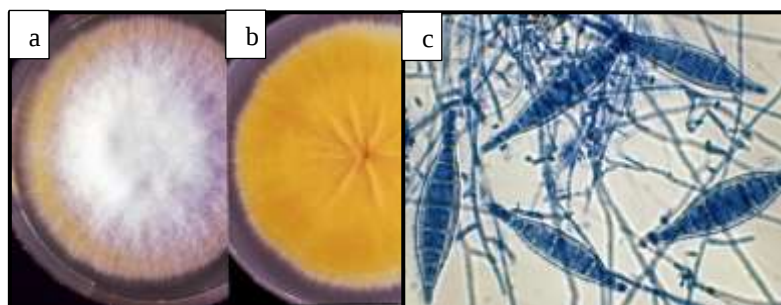
Os dermatófitos zoofílicos diferem dos geofílicos no tipo de associação que realizam com o seu hospedeiro, sendo prevalentemente parasitas de animais e, algumas vezes do homem. A incidência em humanos irá depender de fatores como o estilo de vida, contato direto com animais e distribuição geográfica. Dentre os dermatófitos zoofílicos, a espécie *M. canis* possui maior incidência em cães e gatos, e quando infecta humanos acomete principalmente crianças, causando *tinea capitis*, *tinea corporis* e *tinea faciei*. A espécie *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* provoca comumente dermatofitoses em adultos, como *tinea pedis*, *tinea corporis* e *tinea cruris* (AL-JANABI, 2014; FROTA, 2011).

O grupo dos dermatófitos antropofílicos incluem parasitas específicos de humanos estando amplamente distribuídos pelo mundo, comumente infectando humanos adultos, e podem causar infecção em algumas espécies de animais. Como representante *T. rubrum* é o principal agente etiológico ocorrendo comumente em comunidades, espaços recreativos e no ambiente doméstico (MARTO et al., 2010).

A espécie patogênica *E. floccosum* é classificado como antropofílico com distribuição mundial. Apresenta crescimento lento e suas culturas exibem uma textura cotonosa, com coloração amarelo esverdeado. A sua morfologia é caracterizada pela presença de aglomerados de macroconídios, com ausência de microconídios (KHEDMATI et al., 2020; SIDRIM; MOREIRA, 1999).

O gênero *Microsporum* apresenta distribuição mundial, sendo uma causa frequente de infecções em crianças. As colônias apresentam características cotonosas ou glabras, coloridas ou brancas. Apresentam macroconídios, multiseptados, fusiformes e parede celular espessa e rugosa. Os microconídios são mais raros, unicelulares, hialinos, lisos ovóides (Figura 6) (DALLA LANA et al., 2016).

Figura 6. Macromorfologia e micromorfologia de *Microsporum canis*



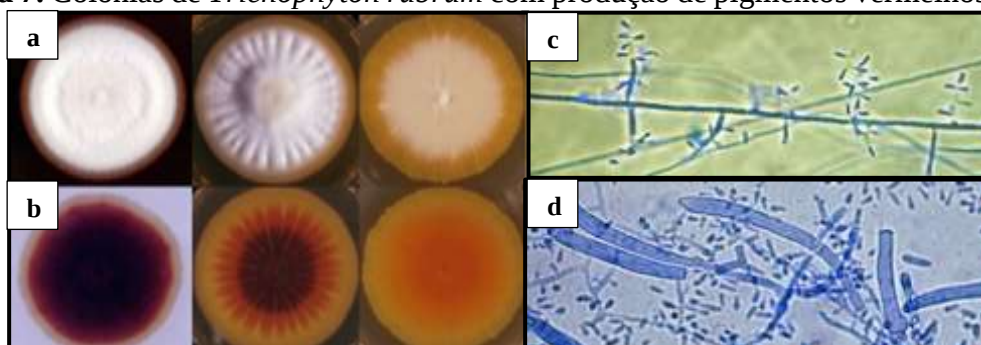
a. Colônia cultivada em ágar batata dextrose, de coloração branca a creme e superfície algodoadosa. b. Reverso amarelo brilhante. c. Macroconídios com paredes espessas e extremidades agudas, corante azul algodão, objetiva 40x.

Fonte: <https://mycology.adelaide.edu.au/descriptions/dermatophytes/trichophyton/>

O gênero *Trichophyton* compreende espécies que transmitem as infecções homem a homem, ou animal para animal, e sua prevalência é mundial, abarcando espécies antropofílicas, zoofílicas e geofílicas. Seu principal fator de virulência é a secreção de enzimas proteolíticas, contudo precisam de pH adequado (FUENTEFRÍA et al., 2019).

A espécie de *T. rubrum* é a espécie mais prevalente nas micoses superficiais, apresentam crescimento lento, com colônias de coloração brancas, e reverso de coloração avermelhado ou amarelo. As texturas das colônias apresentam características algodoadosa ou aveludada, com pregas radiais (Figura 7) (ROCHA; VIEIRA, 2014). A morfologia dessa espécie pode apresentar superfície pungente e a pigmentação da cultura pode variar entre o branco e vermelho escuro (FUENTEFRÍA et al., 2019).

Figura 7. Colônias de *Trichophyton rubrum* com produção de pigmentos vermelhos e amarelos



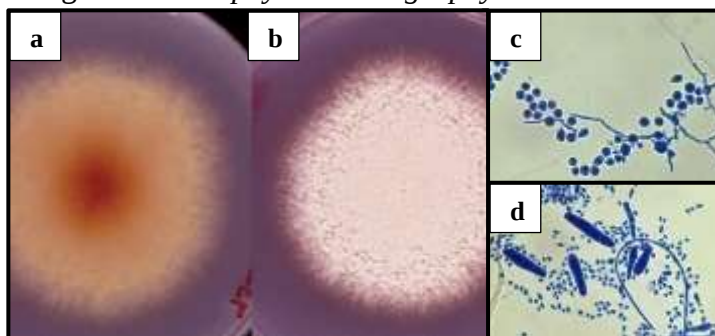
a. Morfologia da cultura de *T. rubrum*, colônia algodoadosa branca e colônia agranular. b. Reverso da colônia com pigmentação avermelhada. c. Microconídios clavados típicos. d. Macroconídios em forma de charuto.

Fonte: <https://mycology.adelaide.edu.au/descriptions/dermatophytes/trichophyton/>

A espécie de *T. mentagrophytes* pode estar organizada em um complexo que compreende cinco espécies *T. mentagrophytes*, *T. interdigitale*, *T. erinacei*, *T. quinckeanum* e *T. benhamie*. As colônias de *T. mentagrophytes* são planas, com coloração branca a creme, seu

reverso apresenta coloração marrom e textura pulverulenta. A microscopia de *T. mentagrophytes* é caracterizada pela presença de microconídios agrupados em um arranjo semelhante a um cacho de uva (Figura 8) (FUENTEFRÍA et al., 2019; FRÍAS-DE-LÉON et al., 2020).

Figura 8. Morfologia de *Trichophyton mentagrophytes*



a. Reverso de colônia de *T. mentagrophytes* coloração creme amarronzado. **b.** Colônia cultivada em ágar batata dextrose, de colação branca algodonosa **b.** Microconídios em cachos. **c.** Macroconídios em forma de charuto.

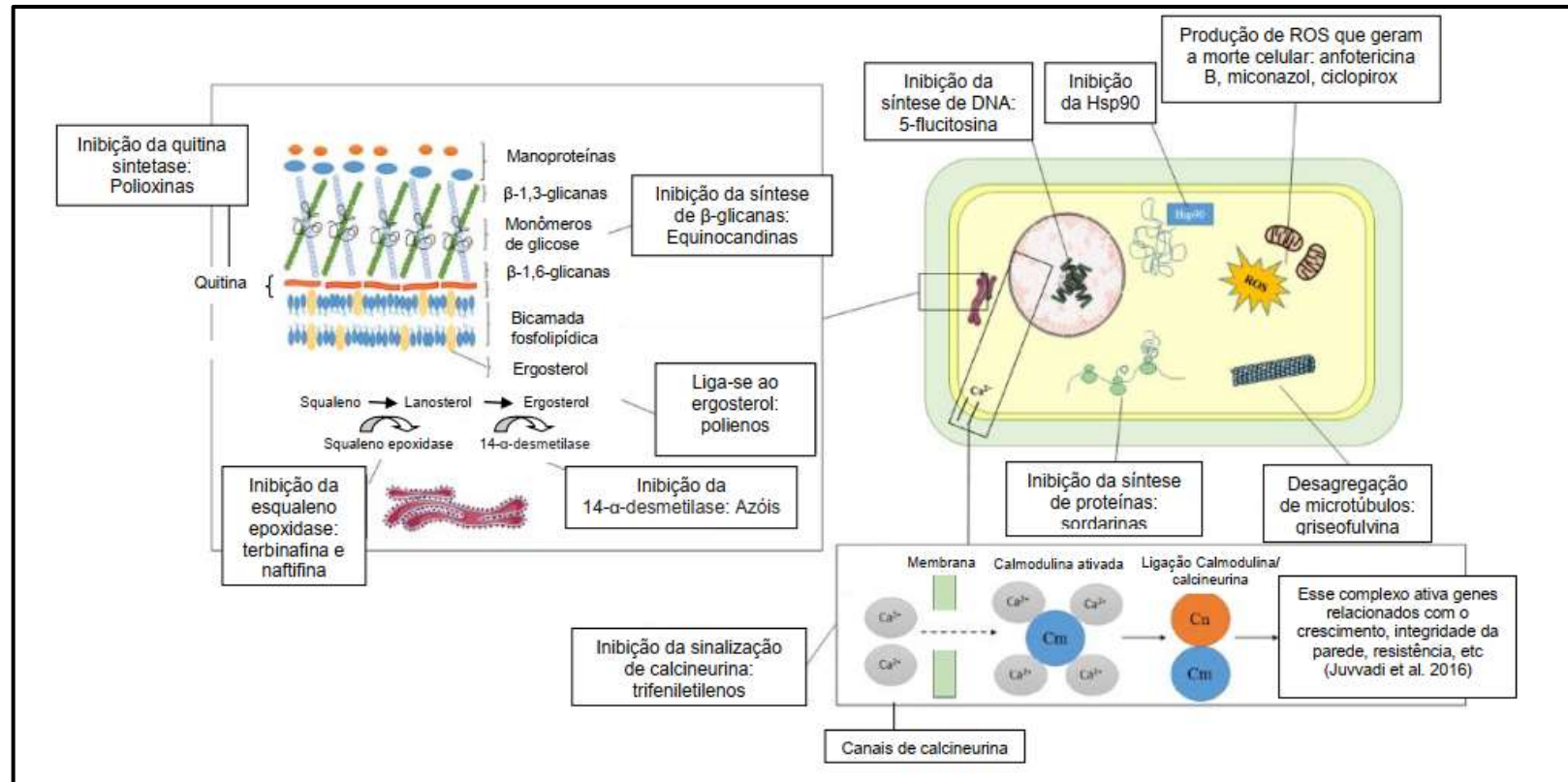
Fonte: <https://mycology.adelaide.edu.au/descriptions/dermatophytes/trichophyton/>

1.2.3 Tratamento antifúngico

A seleção do tratamento antifúngico é baseada no estado de saúde do indivíduo acometido pela infecção, o tipo, o grau de comprometimento, local e extensão da infecção. Um dos maiores desafios para o tratamento dessas infecções consiste nas semelhanças metabólicas entre os seres eucariotos, como fungos e humanos (TOSTI; ELEWSKI, 2016; ROTTA et al., 2012). Torna-se imperioso a busca por agentes antifúngicos que sejam capazes de interagir com estruturas celulares distintas nos patógenos, atuando de forma a inibi-los seletivamente sem causar efeitos colaterais severos ao hospedeiro.

Os alvos mais comuns para agentes antifúngicos são síntese de RNA fúngico, componentes de parede celular e componentes de membrana (Figura 9) (ALSPAUGH, 2020).

Figura 9. Alvos moleculares de agentes antifúngicos



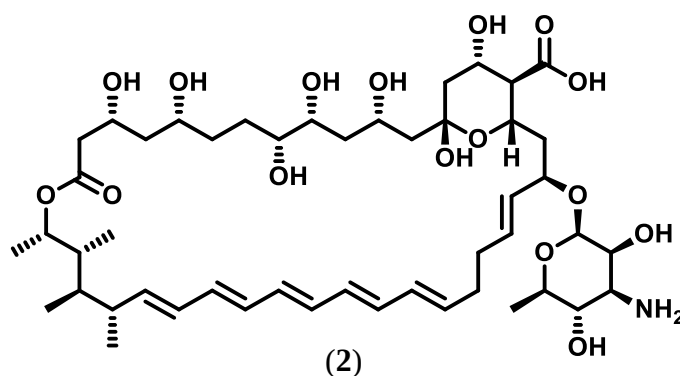
Fonte: Scorzoni et al. (2017)

O tratamento das dermatofitoses é feito com antifúngicos tópicos e sistêmico, ou combinados. Existem quatro classes de agentes antifúngicos que apresentam como alvos moleculares a membrana plasmática, parede celular e a biossíntese de proteínas de ácido desoxirribonucleico. São elas polienos representados pela anfotericina B; azóis (fluconazol, itraconazol, voriconazol); as equinocandinas (caspofungina, micafungina) e alilaminas (terbinafina e naftifina) (CARMONA; LIMPER, 2017; SCORZONI et al., 2017; COLLELLA et al., 2006).

Os polienos atuam ligando no ergosterol, esterol específico presente na célula fúngica. A ligação forma um complexo polieno-ergosterol que gera canais na membrana, causando sua ruptura, permitindo o extravasamento do conteúdo celular. Dessa forma, há uma desestabilização da membrana com consequente efeito letal para o fungo (VLAHOVIC, 2016; FUENTEFRI et al., 2019).

A anfotericina B (AmfB) é um representante dessa classe que foi desenvolvida em 1955 (Figura 10). Segundo Carmona, Limper (2017) há evidências que este fármaco atua na extração do ergosterol presente nas bicamadas lipídicas. Porém, a AmfB apresenta como limitações baixa absorção intestinal, sendo administrada por via intravenosa, e seu uso pode gerar nefrotoxicidade severa (CARMONA, LIMPER, 2017).

Figura 10. Estrutura química da anfotericina B



Os azóis agem impedindo a biossíntese do ergosterol por meio da inibição da 14- α -desmetilase, na etapa de desmetilação do lanosterol. O ergosterol, auxilia na manutenção da permeabilidade da membrana plasmática e a sua ausência acarreta uma instabilidade da membrana plasmática fúngica e na absorção de nutrientes. Os azóis são divididos em imidazóis (1ª geração miconazol, 2ª geração cetoconazol) e triazóis (1ª

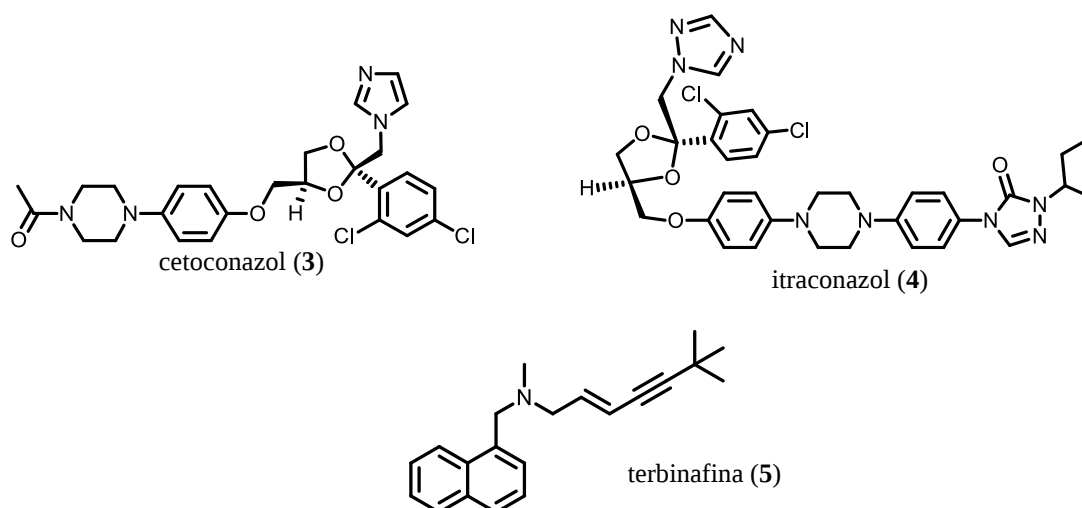
geração fluconazol, 2ª geração voriconazol, 3ª geração ravuconazol) (HOKKEN et al., 2019).

Para o tratamento de dermatofitoses se utiliza formulações tópicas, porém, o tratamento de infecções mais graves, são administrados as capsulas de itraconazol e fluconazol. A utilização dos azóis e polienos de forma irracional pode ocasionar hepatotoxicidade (FUENTEFRÍ et al., 2019; FERNÁNDEZ-TORRES et al., 2003).

Os danos hepatóxicos é uma das principais desvantagens do uso de fármacos azóis e devido a sua capacidade de interação com isoenzimas CYP450, podendo apresentar numerosas interações medicamentosas com outros fármacos que usam essas isoenzimas para o seu metabolismo (GEISSEL et al., 2018; SARDANA et al., 2017).

A classe das alilaminas tem como principal representante a terbinafina, que age inibido a esqualeno-epoxidase, que participa da via de biossíntese do ergosterol. Esses fármacos, atuam, interrompendo essa via biossintética, por meio da inativação desta enzima, sendo utilizados contra dermatófitos. Os possíveis efeitos adversos leves incluem os efeitos cutâneos e no trato gastrointestinal, porém são contraindicados para indivíduos que apresentam insuficiências hepática e renal (DALLA-LANA et al., 2016).

No ano de 1980, o cetoconazol foi selecionado como uma das primeiras escolhas para o tratamento de dermatofitoses. Após uma década, o itraconazol e a terbinafina, passaram a serem prescritos para esse tipo de infecção, exceto para *tinea capitis*, que continua a ser tratado com a griseofulvina. Os fármacos cetoconazol (3), itraconazol (4) e a terbinafina (5) são os três primeiros fármacos a serem prescritos para o tratamento de dermatofitoses (Figura 11) (SARNADA et al., 2017; KHURANA; SARDANA; CHOWDHARY, 2019).

Figura 11. Estrutura dos fármacos usados no tratamento da dermatofitoses

Contudo, a terapia medicamentosa, encontra limitações como custo econômico elevado, potenciais interações medicamentosas, biodisponibilidade insuficiente, recrudescência de cepas resistentes, combinados ainda, a longos períodos de tratamento, que culmina na perda de adesão do paciente ao tratamento e reforçando os mecanismos de resistência destes patógenos (PERES et al., 2010; DALLA LANA et al., 2016; WIEDERHOLD, 2018).

A falta de um tratamento adequado, muitas vezes negligenciado pelo próprio paciente, pode gerar sequelas, dores, afetando processos sociais, prejudicando em todos os aspectos sociais da vida do indivíduo. O uso indiscriminado e inadequado de fármacos antifúngicos consiste em uma das principais preocupações na prática clínica anti-infecciosa. Tais fatores contribuem para que os tratamentos das dermatofitoses sejam limitados, apresente reações adversas, resistência e atividades fungistática e não fungicidas (CEILLEY, 2015).

1.2.4 Mecanismos de resistências aos antifúngicos

A pressão seletiva do ambiente de infecção ocasionada pelos dermatófitos combinada com a limitação de fármacos convencionais com mecanismos de ação similares podem ter contribuído de forma favorável para que os fungos patogênicos evoluíssem e apresentassem resistência.

O desenvolvimento da resistência pode ocorrer devido a cinco fatores principais, são eles (1) superexpressão de alvos terapêuticos, (2) substituição de aminoácidos que podem impedir a ligação do alvo com o fármaco; (3) sinalização pelas vias de respostas ao estresse; (4) regulação de bombas de efluxo e (5) alteração nas vias celulares (REVIE et al., 2018).

Os biofilmes são células estruturadas que podem aumentar a resistência a terapia fúngica (COSTA-ORLANDI et al., 2014). A estrutura dos biofilmes em dermatófitos foram evidenciadas a primeira vez por Burkhart et al. (2002) e em 2014, Costa-Orlandi e colaboradores, confirmaram a presença de biofilme em *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*.

O biofilme é uma importante estrutura para o processo de infecção, confere aos dermatófitos propriedades como a tolerância aos agentes antifúngicos. Na infecção provocada por dermatófitos, acredita-se que a presença de biofilme é fator que justifica a presença de hifas e artroconídios que permitem sua adesão fortemente a estrutura infectada. Contribuindo para o surgimento de células resistentes e capazes de tolerar concentrações mais elevadas dos fármacos (COSTA-ORLANDI et al., 2014; DOS SANTOS et al. 2015; ROBBINS; CAPLAN; COWEN, 2017).

1.2.5 Chalconas

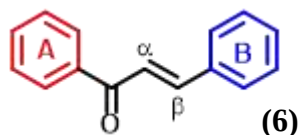
A biodiversidade da flora brasileira é imensa, o que proporciona inúmeras possibilidades para o uso das plantas como um horizonte para a comunidade científica no que tange a descoberta de fármacos. O Brasil, por sua vez, possui uma das principais florestas tropicais úmida e equatorial, e aproximadamente, 20% das espécies de plantas conhecidas em todo o planeta (HENRIQUE et al., 2015).

De acordo com Ramos et al. (2016), o uso de plantas medicinais é realizado pela sociedade desde os tempos primórdios. As substâncias ativas presentes nas plantas, possuem diferentes esqueletos, incluindo os flavonoides, alcaloides e taninos, os quais fazem parte da proteção antimicrobiana vegetal, sendo potenciais fármacos anti-infecciosos (CRAGG E NEWMAN 2020; RAMOS et al., 2016).

Neste sentido, as chalconas são flavonoides de cadeia aberta com grande potencial para a exploração pela Química Medicinal devido a sua síntese concisa e por sua versatilidade de interagir com alvos biológicos aliada a alta tolerabilidade pelos humanos. Quimicamente, o núcleo chalcônico (**6**) apresenta estrutura simples, sendo formado pela união de dois anéis aromáticos (A e B), os quais são unidos por uma ponte cetônica α , β -

insaturada (Figura 12) (LEON-GONZALEZ et al., 2015; MAHAPATRA; BHARTI &ASATI, 2015; NOWASKA, 2007).

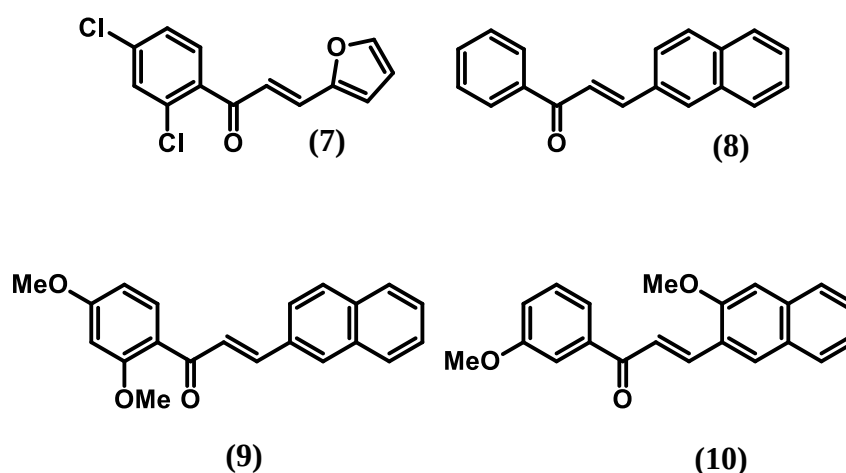
FIGURA 12. Núcleo Chalcônico



A diversidade estrutural de compostos chalcônicos conferem a estas substâncias um amplo espectro de atividade biológicas, incluindo antifúngica (NASCENTES et al., 2018; NASCENTES et al., 2020; MIGUEL et al., 2016), anti-inflamatória (VENTURA et al., 2015), antioxidante (DOAN; TRAN, 2011), anti-HIV (SHARMA et al., 2011), antimalárica (YADAV et al., 2012), antibacteriana (MARQUES et al., 2020; NOWASKA, 2007) e antiproliferativa (KUCEROVA-CHLUPACOVA et al., 2015).

As chalconas podem atuar na biossíntese da parede celular fúngica, por meio da inibição de enzimas, como a 1,3-β-D-glucanase. Ao se ligarem nesta proteína, ocorre uma ruptura da membrana plasmática, devido à perda de resistência da pressão osmótica, provocando a morte fúngica (LAHTCHEV et al., 2008; SIVAKUMAR, KUMAR, DOBLE, 2009).

López e colaboradores (2008) avaliaram 41 chalconas testadas contra vários fungos patogênicos humanos. Neste estudo, foi avaliada a capacidade das chalconas em inibir, *in vitro*, a enzima β-(1,3)-glucano-sintase e a quitina-sintase, que são enzimas responsáveis por catalisar a síntese de β-(1,3)-glucano e quitina, respectivamente. Esses polissacarídeos são os dois polímeros mais abundantes na parede celular fúngica. Os compostos chalcônicos tiveram ação contra *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* e *E. floccosum*, tendo efeito inibitório em concentrações entre 50 µg/mL a 12,5 µg/mL (Figura 13) (LÓPEZ et al., 2008).

Figura 13. Chalconas com atividade antidermatofítica (LÓPEZ et al., 2008)

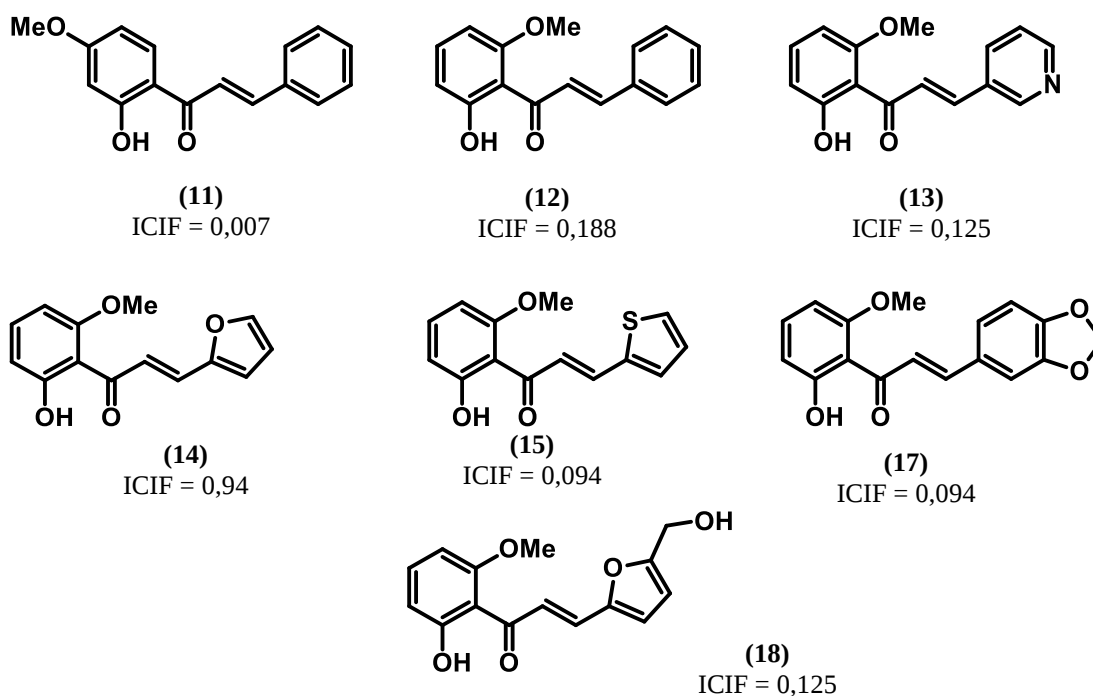
2.4.1 Metoxichalconas

As metoxichalconas são chalconas substituídas por grupo metoxila ($-\text{OCH}_3$ ou $-\text{OMe}$). Este grupo está presente em chalconas naturais e sintéticas com diferentes bioatividades, incluindo antimicobacteriana (GAUR et al., 2015), antiviral (YAEGHOBI et al., 2016) e antiprotozoária (MESSIER et al., 2011; AN; BOECK et al. 2005; WANG et al., 2016).

A atividade antifúngica de metoxichalconas foi descrita por Messier e colaboradores (2011). A licochalcona A, uma metoxichalcona natural, inibiu a formação de biofilmes e impediu a transição hifal de *Candida albicans*. Boeck et al. (2007) em seus estudos, confirmaram o efeito das metoxichalconas contra um amplo painel de leveduras, hialohifomicetos e dermatófitos.

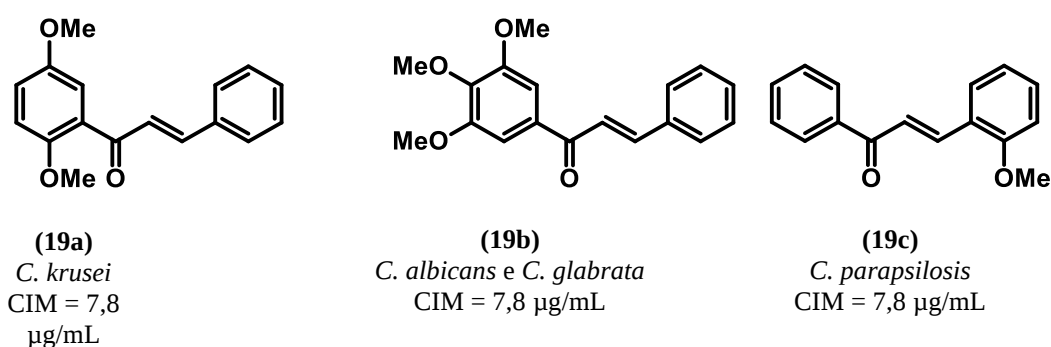
Wang e colaboradores (2016) estudaram o efeito de sinergismo de 24 chalconas com o fluconazol. Dentre essas, sete metoxichalconas (**11-18**) mostraram efeito sinérgico com fluconazol apresentando valores de ICIF (Índice de Concentração Inibitória Fracionada) variando entre 0,007 e 0,188 (Figura 14). Estes dados evidenciam o interessante efeito sinérgico dos análogos de chalconas com o fluconazol contra *C. albicans* resistente (WANG et al., 2016).

Figura 14. Chalconas com ação sinérgica com o fluconazol contra *Candida albicans* (WANG et al., 2016)



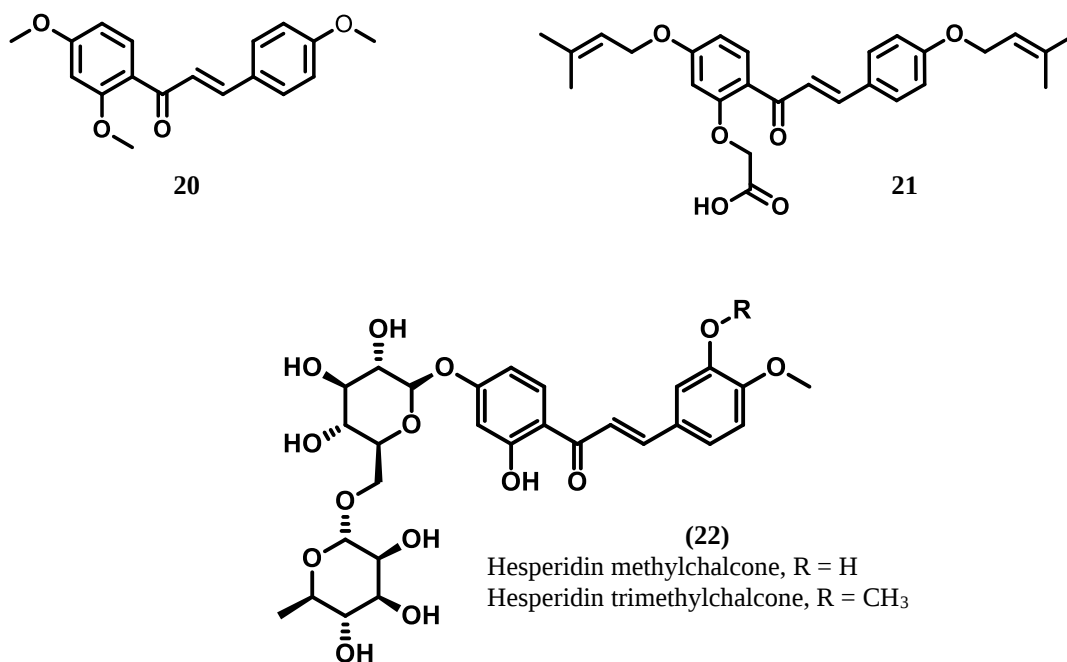
Em trabalho realizado pelo Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos, foi possível verificar a relevância das metoxilas sobre a atividade antifúngica de chalconas. As metoxichalconas **19a–19c** (figura 15) foram ativas contra *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*, exibindo valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 7,8 µg/mL). Estes autores indicaram que o número e a posição das metoxilas nos anéis A e B influenciaram, fortemente, a atividade anti-*Candida*, sugerindo que o efeito de eletrodoação desse grupo pode apresentar contribuição farmacofórica para a fungitoxicidades (MARQUES et al., 2020).

Figura 15. Estrutura das Metoxichalconas com atividade contra espécies de *Candida*. CIM = Concentração Inibitória Mínima (MARQUES et al., 2020)



Atualmente, há três fármacos chalcônicos aprovados para uso clínico, que são comercializados na Itália e Espanha, sob o nome de metochalcona (**20**), apresenta ação colerética, sofalcona (**21**), que atua como anti-ulcerogenico e mucoprotetor e a mistura dos fitofármacos, hesperidina metilchalcona e hesperidina trimetilchalcona (**22**) (Figura 16), os quais apresentam ação contra insuficiência linfática venosa e vericose do tronco, respectivamente (BELTRAMINO; PENENORY; BUCETA, 2000; GOMES et al., 2019; ZHUANG et al., 2017).

Figura 16. Estrutura dos fármacos chalcônicos



Diante do potencial terapêutico, da versatilidade das chalconas como modelos para substâncias bioativas, bem como das dificuldades na obtenção de novos tratamentos para infecções fúngicas, as metoxichalconas podem ser agentes promissores para o desenvolvimento de antifúngicos inovadores que apresentem segurança, eficácia e que atuem em novos alvos moleculares.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi investigar a características químicas e avaliar a atividade antifúngica de metoxichalconas contra dermatófitos.

3.2 Objetivos específicos

- Sintetizar, purificar e identificar uma série de chalconas 2',4'-dimetoxiladas no anel A com modificações no anel B;
- Determinar a atividade antifúngica de chalconas 2',4'-dimetoxiladas (substâncias **0-31**) contra *Trichophyton rubrum* (isolados clínicos e CBS, TR), *Trichophyton mentagrophytes* (isolados clínicos e ATCC, TM), *Epidermophyton* (isolados clínicos EF) e *Microsporum canis* (isolados clínicos e ATCC, MC);
- Avaliar a ação do fármaco metochalcona contra *Trichophyton* spp., *Epidermophyton* spp. e *Microsporum* spp., visando o seu reposicionamento;
- Avaliar a atividade antifúngica da combinação de metoxichalconas selecionadas com anfotericina B, caspofungina, fluconazol, terbinafina e voriconazol utilizando a metodologia tabuleiro de xadrez;
- Analisar atividade antifúngica da metoxichalcona selecionada na presença de sorbitol para avaliar sua ação na parede celular fúngica;
- Analisar atividade antifúngica de metoxichalconas selecionadas na presença de ergosterol para inferir sobre seu efeito na membrana celular fúngica;
- Determinar a toxicidade das metoxichalconas selecionadas contra fibroblasto de pele (HDFa);

- Avaliar a toxicidade *in vivo* das metoxichalconas selecionadas em larvas de *Galleria mellonella*.

2 ARTIGO 1 - SÍNTESE E ATIVIDADE ANTIDERMATOFÍTICA DE 2',4-DIMETOXICHALCONA E SEUS ANÁLOGOS

Julyanna Andrade S. Nascentes¹, Leticia Ribeiro de Assis¹, Natalia Seron Brizzotti²,
Thiago Henrique Lemes², Miguel Divino da Rosa¹, Reinaldo Theodoro¹, Veridiana
Camilo Pattini¹, Mariela Domiciano Ribeiro², Carolina Vaso³, Márcia Regina von Zeska
Kress⁴, Ana Marisa Fusco³, Margarete Teresa Gottardo de Almeida², Luis Octavio
Regasini^{1, *}

¹ Departamento de Química e Ciências Ambientais, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Rua Cristóvão Colombo, 2265 - Jardim Nazareth - São José do Rio Preto/SP - CEP 15054-000, SP, Brasil.

² Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (Famerp), Brasil. Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416 - Vila 12 São Pedro, São José do Rio Preto - SP, 15090-000.

³ Universidade Estadual Paulista, Campus de Araraquara. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, UNESP - R. Expedicionários do Brasil, 1621 - Centro, Araraquara - SP, 14801-902

⁴ Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Av. 15 do Café - Vila Monte Alegre, Ribeirão Preto - SP, 14040-903, Telefone: +55 (16) 3315-

* Autor correspondente, e-mail: luis.regasini@unesp.br

Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos, IBILCE - UNESP, São José do Rio Preto
Tel.: +55 17 3221-2362

RESUMO

As dermatofitoses são infecções causadas por fungos dermatófitos que apresentam ampla prevalência mundial. Diante de dificuldades da erradicação, toxicidade dos fármacos e elevadas taxas de recorrência desta doença, foi investigada a atividade antidermatofítica de metoxichalconas contra *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis* e *Epidermophyton floccosum*. Duas séries de chalconas 2',4'-dimetoxiladas com anéis B fenílicos substituídos por eletroatratores e anéis B homo- e heteroarílicos foram sintetizadas por condensação aldólica de Claisen-Schmidt com rendimentos que variaram de 15 e 95%. Dentre os análogos obtidos, as chalconas **JA-2F**, **JA-3Br**, **JA-tiofenila**, **JA-furanila** e **JA-2OH3F**, foram identificados como novas identidades químicas. A dimetoxichalcona não-substituída no anel B (**JA-0**) (Concentração Inibitória Mínima - CIM - 1,3 µg/mL e 15,6 µg/mL) e seu análogo **JA-2F** (CIM – 0,9 µg/mL e 15,6 µg/mL) foram os mais ativos, sendo selecionados para outros bioensaios, como avaliação do efeito sinérgico, efeito na membrana e parede celular fúngica, avaliação do tempo de morte, toxicidade contra fibroblastos cutâneos e avaliação da toxicidade no modelo de *Galleria mellonella*. As duas chalconas tiveram seus efeitos potencializados quando associados aos fármacos anfotericina B, terbinafina e voriconazol. Os testes de tempo de morte, indicam que a atividade fungicida para os dois compostos ocorreu após 48 h. **JA-0** e **JA-2F** não apresentaram toxicidade contra as larvas de *Galleria mellonella*, com LD₅₀ de 500 µg/mL. Esses resultados sugerem que os compostos **JA-0** e **JA-2F**, podem ser alternativas eficazes e seguras para o tratamento de dermatofitoses.

PALAVRAS-CHAVE: Metoxichalconas; Dermatófitos; Chalconas; Micoses superficiais.

1. INTRODUÇÃO

As dermatofitoses são infecções causadas por fungos filamentosos e queratinofílicos, que apresentam a capacidade de invadir nichos queratinizados como os cabelos, pele e unhas (GNAT et al., 2019; KHURANA et al., 2019). As dermatofitoses afetam grande parte da população mundial, em todas as faixas etárias, contudo, os maiores índices podem ser observados nos países tropicais (AL-KHIKANI, 2021).

Os fungos dermatófitos são divididos em nove gêneros, *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*, *Arthroderma*, *Lophophyton*, *Nannizzia*, *Ctenomyces*, *Guarromyces* e *Paraphyton* (MERCER; STEWART, 2019). Estes gêneros apresentam diversas espécies, sendo *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Microsporum canis*, as espécies que causam maior índice de infecções superficiais em pés, unhas e pele. Fatores como a idade, sexo, a estação do ano, localização geográfica, e condições socioeconômicas e culturais são fatores que influenciam o desenvolvimento das dermatofitoses (AL-KHIKANI, 2020; LOPES; PINTO; SALGUEIRO, 2017)

O tratamento das dermatofitoses envolve fármacos com algumas barreiras terapêuticas, incluindo toxicidade, interações medicamentosas, alto custo econômico e uso prolongado. Todos esses fatores dificultam a adesão do paciente, conduzindo a um tratamento ineficaz que pode resultar em um aumento da resistência fúngica. Assim, torna-se premente o investimento na descoberta e desenvolvimento de novos agentes antifúngicos que sejam mais seguros e eficazes (WIEDERHOLD, 2018).

As chalconas são substâncias que podem se constituir como potenciais agentes antifúngicos, colaborando para a eficiência no tratamento das dermatomicoses. Essas substâncias são precursores da biossíntese de flavonoides, sendo encontradas em abundância em diversas plantas. Elas podem ser sintetizadas de forma relativamente rápida, simples e com baixo custo econômico, o que permite a obtenção de uma ampla variedade de análogos contendo diversas funcionalizações (GOMES et al., 2017; SOARES et al., 2014; KIM et al., 2012). Dentre elas, as metoxichalconas, que são chalconas substituídas por um grupo metoxila (-OCH₃ ou -OMe), apresentam um amplo espectro de bioatividades, como antimalárica (DOMINGUEZ et al. 2005), antiprotozoária (PASSALACQUA et al., 2015) e antifúngia (MARQUES et al., 2020).

Kaveri e colaboradores (2005) avaliaram a atividade antifúngica de chalconas, com grupo retirador de elétrons (bromo) no anel A e grupo metoxila na posição *meta* no anel B contra *Candida albicans* (CIM₅₀ = 6,75 µg/mL), *C. krusei* (CIM₅₀ = 18,56 µg/mL) e *A. fumigatus* (CIM₅₀ = 7,17 µg/mL). A adição de um grupo volumoso feito por Lopez e colaboradores (2008), no anel A da chalcona gerou um efeito contra espécies de dermatófitos com valores de CIM entre 25 µg/mL e 0,5 µg/mL.

Nosso grupo identificou diversas chalconas mono-, di- e trimetoxiladas com atividade antifúngica contra *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* com valores de CIM variando entre 15,6 µg/mL a 62,5 µg/mL (MARQUES et al., 2020). No presente trabalho, os dados obtidos por Marques e colaboradores nos

encorajaram a planejar e sintetizar duas séries de chalconas 2',4'-dimetoxiladas no anel A chalcônico, e testá-las contra *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *Microsporum* spp. e *Epidermophyton* spp., incluindo cepas da American Type Culture Collection (ATCC) e isolados clínicos.

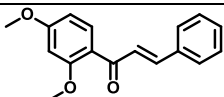
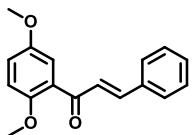
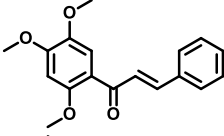
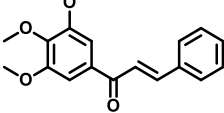
2. RESULTADOS e DISCUSSÃO

2.1 Planejamento

O planejamento das metoxichalconas do presente trabalho foi baseado nos resultados previamente obtidos pelo nosso grupo de pesquisa (MARQUES et al., 2020). Marques e colaboradores investigaram a relevância do número e posição do grupo metoxila nos anéis chalcônicos A e B para a atividade contra cinco espécies de *Candida*. Dentre os 17 análogos avaliados, quatro demonstraram atividade anti-*Candida*, com valores de CIM variando de 15,6 a 62,5 µg/mL, os quais foram similares ao fluconazol (CIM = 1,0 µg/mL a 32 µg/mL) utilizado como fármaco antifúngico de referência.

No presente trabalho, também apresentaram atividade contra *T. rubrum* (CBS 118892), com CIM variando de 1,9 a 25 µg/mL (Tabela 01). Dentre essas substâncias, a chalcona 2',4'-dimetoxilada (**JA-0**) foi selecionada como protótipo para o planejamento de novos análogos contra *R. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. canis*. e *E. floccosum*.

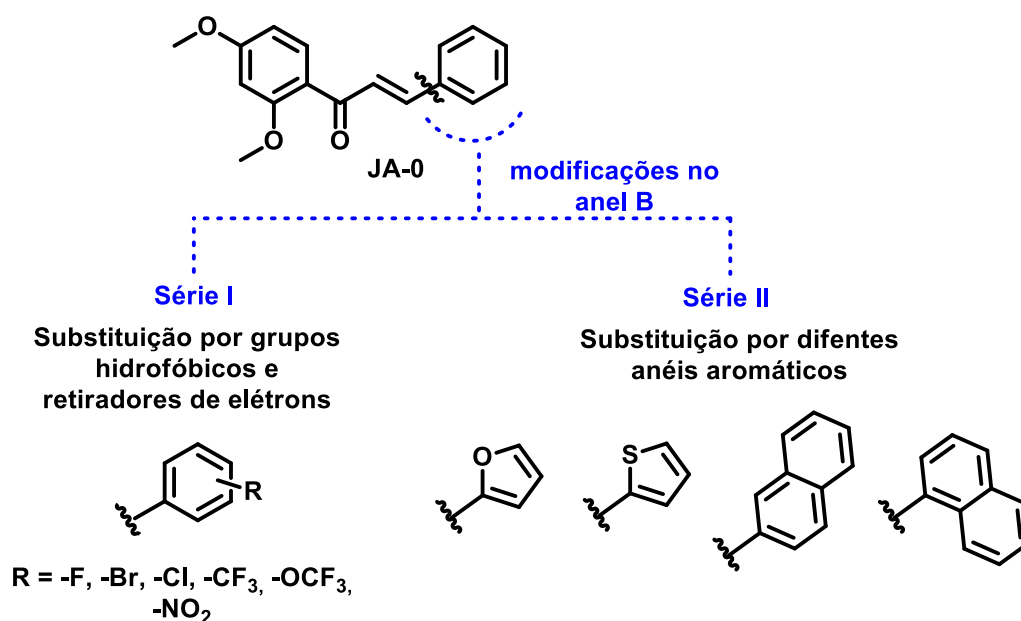
Tabela 01. Atividade de metoxichalconas selecionadas contra *Trichophyton rubrum* CBS118892 expressa em µg/mL

Chalconas	Código	CIM	CFM
	JA-0	1,9	1,9
	JA -2',5'-OCH₃	1,9	3,9
	JA-2',4',5'-OCH₃	12,5	>25,0
	JA - 3'4',5'-OCH₃	25,0	>25,0

*CIM: Concentração Inibitória Mínima; CFM: Concentração Fungicida Mínima.

Com base na atividade contra *T. rubrum* foi selecionada a chalcona **JA-0** contendo dois grupos metoxilas no anel fenílico A (2',4'-OCH₃) para o prosseguimento da avaliação contra outras espécies de dermatófitos. Utilizando a chalcona **JA-0** como protótipo, foram planejados 23 análogos com modificações no anel B, os quais foram subdivididos em duas séries (I e II). Para a série I, foram propostos 19 análogos substituídos no anel B por grupos substituintes eletroatratores (Esquema 1). Para a série II, foi proposto quatros análogos, com a permuta do anel B fenílico por anéis isostéricos da fenila contendo 6 elétrons π (2-furanila e 2-tiofenila) e anéis homoarílicos expandidos contendo 10 elétrons π (α -naftila e β -naftila).

Esquema 1. Planejamento das séries I e II de análogos chalcônicos 2',4'-dimetoxichalconas



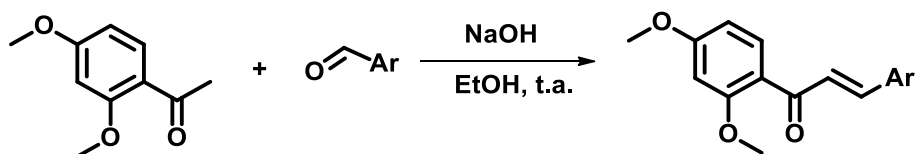
Dentre os 23 análogos planejados, **JA-2F**, **JA-3Br**, **JA-tiofenila**, **JA-furanila** e **JA-2OH3F**, conforme a plataforma SCIFINDER, são compostos inéditos na literatura.

2.2 Síntese dos análogos da 2',4'-dimetoxichalconas

Por meio da reação de condensação aldólica de Claisen-Schmidt (Esquema 2) foram obtidas 23 chalconas, com rendimentos que variaram de 15 a 96%, sendo os menores e maiores rendimentos observados para as chalconas **JA-2F** (15%) e **JA-2,6Cl**

(96%), respectivamente. Seis chalconas apresentaram rendimentos variando de 20 a 49%. A maioria das chalconas apresentou rendimento maior que 50%.

Esquema 2. Reação de condensação aldólica de Claisen-Schmidt para a obtenção das metoxichalconas das séries I e II



As estruturas das metoxichalconas (Esquema 1) foram confirmadas por análise de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-Treze ^{13}C (APÊNDICE I).

2.3 Atividade antifúngica das 2',4'-dimetoxichalconas

Para este estudo, foi determinada a atividade antifúngica de 23 chalconas análogas de **JA-0** contra *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. canis* e *E. floccosum*. Inicialmente, os derivados chalcônicos foram analisados em uma concentração de 31,2 $\mu\text{g/mL}$ para a seleção dos compostos mais ativos. Aqueles que apresentaram inibição igual ou inferior a 31,2 $\mu\text{g/mL}$ inibindo 99% do crescimento fúngico tiveram a CIM₉₉ determinada por meio de microdiluição seriada.

2.3.1. Atividade antifúngica contra *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum*

Na triagem a 31,2 $\mu\text{g/mL}$ dos 23 análogos de **JA-0** contra *T. mentagrophytes*, incluindo seis cepas da ATCC11481 e isolados clínicos. Foram identificadas 15 chalconas que inibiram 99% do crescimento de no mínimo uma cepa na concentração única.

As chalconas que apresentaram concentração igual ou menor que 31,2 $\mu\text{g/mL}$ tiveram os valores de CIM determinados contra as cepas de *T. mentagrophytes*, apresentando valores que variaram de 0,9 e 31,2 $\mu\text{g/mL}$. Dentre essas, **JA-0** ($1,9 \mu\text{g/mL} \leq \text{CIM} \leq 15,6 \mu\text{g/mL}$) **JA-2F** ($1,9 \mu\text{g/mL} \leq \text{CIM} \leq 15,6 \mu\text{g/mL}$), **JA-3F** ($3,9 \text{ mL} \leq \text{CIM} \text{ mL} \leq \mu\text{g/mL}$), **JA-4F** ($3,9 \leq \text{CIM} \leq 31,2 \mu\text{g/mL}$), **JA-3Cl** ($1,9 \leq \text{CIM} \leq 31,2$) e **JA-**

2tiofenila ($15,6 \leq \text{CIM} \leq 31,2$) demonstraram atividade contra as seis cepas. As demais chalconas exibiram valores de $\text{CIM} > 31,2 \mu\text{g/mL}$, sendo consideradas inativas (Tabela 2). Contra a cepa da ATCC, **JA-0**, **JA-2F** e **JA-4CF₃**, exibiram valores de CIM entre 0,9 e $3,9 \mu\text{g/mL}$, sendo sete vezes menores que o observado para o fluconazol ($\text{CIM} = 8,0 \mu\text{g/mL}$). Em relação aos isolados clínicos, a CIM variou de 1,9 a $31,2 \mu\text{g/mL}$, sendo todos menores que os valores registrados para o fluconazol ($\text{CIM} = 32$ a $64 \mu\text{g/mL}$). Destaca-se que as metoxichalconas não-substituída (**JA-0**), fluoradas (**JA-2F**, **JA-3F**, **JA-4F**) e clorada (**JA-3Cl**) no anel B, apresentaram CIM igual ou inferior a $15,6 \mu\text{g/mL}$ contra a maioria das espécies clínicas avaliadas.

Tabela 02. Atividade Antifúngica de metoxichalconas contra *Trichophyton mentagrophytes* TM¹ (ATCC11481 e isolados clínicos) expressa em $\mu\text{g/mL}$

Compostos	TMATCC1 1481		TM 1		TM 2		TM 3		TM 4		TM 5	
	CI M	CF M	CI M	CF M	CI M	CF M	CI M	CF M	CI M	CF M	CI M	CFM
JA-0	1,9	7,8	15,6	*	7,8	31,2	3,9	3,9	3,9	15,6	7,8	*
JA-2F	3,9	15,6	15,6	*	3,9	31,2	3,9	15,6	1,9	15,6	7,8	*
JA-3F	15,6	*	3,9	*	7,8	*	7,8	*	3,9	*	15,6	*
JA-4F	31,2	*	3,9	31,2	3,9	7,8	31,2	*	31,2	*	15,6	*
JA-2Br	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
JA-3Br	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
JA-4Br	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	31,2	*
JA-2Cl	*	*	*	*	3,9	31,2	*	*	*	*	31,2	*
JA-3Cl	1,9	*	31,2	*	31,2	*	3,9	*	3,9	*	31,2	*
JA-4Cl	31,2	*	3,9	*	*	*	31,2	*	15,6	*	*	*
JA-2,4diCl	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
JA-2,6diCl	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
JA-3,4diCl	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
JA-3CF₃	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
JA-4CF₃	0,9	*	7,8	*	*	*	*	*	31,2	*	15,6	*
JA-4OCF₃	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
JA-2NO₂	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
JA-3NO₂	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
JA-1Naftila	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
JA-2Naftila	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
JA-2Tiofenila	15,6	*	31,2	*	15,6	*	15,6	*	15,6	*	31,2	*
JA-2Furanila	15,6	*	*	*	*	*	31,2	*	3,9	*	7,8	*
JA-2OH3F	15,6	*	*	*	*	*	*	*	*	*	31,2	*
fluconazol	8	8	64	*	*	*	64	*	64	*	32	32

¹TM: *Trichophyton mentagrophytes*; * Valores de CIM maior que $31,2 \mu\text{g/mL}$.

Os resultados obtidos contra *T. mentagrophytes* permitiu derivar alguns dados preliminares de relação entre a estrutura química e a atividade antifúngica. Primeiro investigamos os efeitos das *para*-substituições no anel B, por grupos eletroatratores e hidrofóbicos, como -F, -Cl, Br, -CF₃ e 4-OCF₃. Contra a cepa ATCC11481, apenas o grupo CF₃ potencializou a atividade antifúngica em 2×, enquanto substituições por -Cl, -Br, e -OCF₃ levaram a diminuição de 2 a 16× ou a perda completa da atividade antifúngica. No desenvolvimento de um fármaco almeja por uma molécula que apresentem características farmacocinéticas e farmacodinâmicas ideais, assim, ao adicionar um grupo halogênico em uma molécula, busca-se melhorar as características de absorção pelas membranas lipídicas. A introdução dos grupos cloro, bromo e flúor tem como objetivo tornar a molécula do composto menos hidrossolúvel e mais lipofílica (BARREIRO; FRAGA, 2008).

Contra os 5 isolados clínicos, a *para*-substituição por flúor potencializou de 2 a 4× a atividade antifúngica contra TM1 e TM2, sendo essa substituição desfavorável para os demais isolados clínicos. O análogo *p*-clorado (**JA-4Cl**) demonstrou maior potência contra o isolado clínico TM1, sendo 4× mais potente que o análogo não-substituído (**JA-4Cl**) e 16× mais potente que o fluconazol (CIM = 64 µg/mL).

Investigou-se a variação da posição dos aceptores de elétrons nas posições *orto* e *meta* do anel fenílico B. A *meta*-substituição por flúor potencializou a atividade antifúngica em 4× contra TM1 em relação ao análogo não substituído e em 16× contra o fluconazol, enquanto a *orto*-substituição por flúor proporcionou uma potência de 2× contra os isolados clínicos TM2 e TM4, e em comparação ao fármaco de referência foi 32× e 16× mais potente, respectivamente. Substituições por *orto*-Cl aumentou 2× a atividade contra TM2. As demais substituições em *orto* por bromo, cloro e nitro levaram a diminuição ou perda completa da atividade antifúngica. Da mesma forma, os análogos dissustituídos por cloro (**JA-2,4diCl**, **JA-2,6diCl**, e **JA-2,4diCl**), e aqueles com o anel B permutados por 2-furanila, α -naftila e β -naftila, foram menos potentes ou inativos contra *T. mentagrophytes*.

De maneira geral, dos 23 análogos, 6 (**JA-0**, **JA-2F**, **JA-3F**, **JA-4F** e **JA-2OH3F**) foram ativos contra todo o painel de *T. rubrum* com valores de CIM entre 0,9 µg/mL e 31,2 µg/mL (Tabela 3).

Tabela 3. Atividade antifúngica de metoxichalconas contra *Trichophyton rubrum* CBS118892 ¹TR expressa em µg/mL

	TRCBS118 892		TR1		TR2		TR3		TR4		TR5	
	CIM	CF M	CIM	CF M	CIM	CF M	CIM	CF M	CIM	CF M	CIM	CFM
JA-0	3,9	7,8	7,8	31,2	3,9	7,8	0,9	7,8	15,6	7,8	1,9	3,9
JA-2F	1,9	15,6	15,6	15,6	3,9	7,8	0,9	15,6	7,8	7,8	1,9	3,9
JA-3F	7,8	*	7,8	15,6	7,8	15,6	7,8	*	7,8	15,6	3,9	7,8
JA-4F	15,6	*	3,9	15,6	15,6	*	15,6	*	3,9	3,9	15,6	15,6
JA-2Br	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
JA-3Br	*	*	*	*	*	*	*	*	31,2	*	*	*
JA-4Br	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
JA-2Cl	31,2	*	*	*	31,2	*	31,2	*	31,2	*	31,2	*
JA-3Cl	1,9	*	7,8	*	15,6	*	0,9	*	15,6	*	7,8	*
JA-4Cl	31,2	*	*	*	*	*	31,2	*	31,2	*	31,2	*
JA-2,4diCl	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
JA-2,6diCl	*	*	*	*	*	*	*	*	31,2	*	*	*
JA-3,4diCl	*	*	*	*	*	*	*	*	31,2	*	*	*
JA-3CF₃	31,2	*	*	*	31,2	*	15,6	*	*	*	31,2	*
JA-4CF₃	31,2	*	*	*	*	*	7,8	*	31,2	*	31,2	*
JA-4OCF₃	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
JA-2NO₂	*	*	*	*	*	*	*	*	31,2	*	*	*
JA-3NO₂	*	*	*	*	*	*	*	*	31,2	*	*	*
JA-1Naftila	31,2	*	*	*	*	*	31,2	*	31,2	*	*	*
JA-2Naftila	*	*	*	*	*	*	*	*	31,2	*	*	*
JA-2Tienila	*	*	*	*	*	*	*	*	15,6	*	7,8	*
JA-2Furanil	*	*	*	*	*	*	*	*	15,6	*	15,6	*
JA-2OH3F	15,6	*	31,2	31,2	15,6	*	15,6	*	15,6	31,2	15,6	*
fluconazol	16	16	64	128	128	128	16	16	32	64	4	4

¹TR: *T. rubrum*; * Valores de CIM maiores que 31,2 µg/mL

As chalconas **JA-0**, **JA-2F** e **JA-3Cl** também apresentaram valores de inibição de 99% do crescimento fúngico a 0,9 µg/mL contra TR3. Os compostos **JA-0** e **JA-2F** demonstraram ação fungicida contra a cepa TRCBS118892 e isolados clínicos, com CIM variando de 3,9 a 15,6 µg/mL. A adição do substituinte flúor na posição *orto* do anel B, **JA-2F**, potencializou a ação desse composto entre 2× e 32,8× a ação antidermatofítica comparada ao fluconazol.

Boeck et al. (2007) afirmou em seu estudo que a presença do cloro na posição *orto* do anel B (**JA-2Cl**) foi determinante para o aumento da atividade antifúngica contra espécies de *T. rubrum*, quando comparada ao análogo não-substituído. No nosso estudo, a chalcona **JA-2Cl** foi 2 a 34× menos ativa que a chalcona **JA-0**.

T. mentagrophytes demonstrou ser mais susceptível às metoxichalconas do que as *T. rubrum* uma vez que dentre 6 compostos mais ativos inibiram 99% o crescimento fúngico de ao menos da cepa TMatCC11481 ou isolados clínicos, com valores de CIM variando de 1,9 e 15,6 µg/mL.

De maneira geral, reitera-se que os grupos metoxilas presente no protótipo (**JA-0**), foram relevantes para uma atividade antifúngica potente contra espécies de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*. Contudo, substituições por flúor e cloro no anel B, nas posições *orto* e *meta*, foram determinantes no incremento da atividade antidermatofítica.

2.3.2. Atividade antifúngica contra *Microsporum canis* e *Epidermophyton floccosum*

Nós testamos a avaliação da atividade antidermatofítica contra outros dermatófitos, sendo uma cepa da ATCC9865 e três isolados clínicos de *M. canis* e quatro isolados clínicos de *E. floccosum* (Tabela 4).

Tabela 04. Atividade Antifúngica de metoxichalconas contra *Microsporium canis* ¹MC e *Epidermophyton floccosum* ²EF

	MCATCC 9865		MC1		MC2		MC3		EF1		EF2		EF3		EF4	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
JA-0	7,8	31,2	3,9	3,9	7,8	7,8	7,8	7,8	1,9	31,2	7,8	15,6	15,6	31,2	7,8	15,6
JA-2F	7,8	7,8	7,8	15,6	1,9	1,9	3,9	3,9	0,9	15,6	7,8	*	7,8	15,6	7,8	15,6
JA-3F	3,9	7,8	3,9	31,2	7,8	7,8	3,9	3,9	1,9	31,2	3,9	*	3,9	15,6	7,8	15,6
JA-4F	31,2	31,2	15,6	*	1,9	1,9	7,8	31,2	0,9	1,9	3,9	31,2	31,2	*	31,2	31,2
JA-2Br	*	*	*	*	*	*	*	*	31,2	*	*	*	*	*	*	*
JA-3Br	31,2	31,2	*	*	15,6	15,6	3,9	15,6	15,6	15,6	7,8	*	31,2	*	3,9	31,2
JA-4Br	*	*	*	*	*	*	*	*	31,2	*	*	*	*	*	*	*
JA-2Cl	31,2	*	31,2	*	*	*	*	*	31,2	*	*	*	1,9	*	*	*
JA-3Cl	*	*	31,2	*	3,9	7,8	31,2	31,2	3,9	7,8	15,6	15,6	31,2	*	15,6	*
JA-4Cl	*	*	31,2	*	*	*	*	*	31,2	*	*	*	*	*	*	*
JA-2,4diCl	*	*	*	*	*	*	*	*	31,2	*	*	*	*	*	*	*
JA-2,6diCl	*	*	*	*	*	*	*	*	31,2	*	*	*	*	*	*	*
JA-3,4diCl	*	*	*	*	*	*	*	*	31,2	*	*	*	*	*	*	*
JA-3CF ₃	*	*	*	*	15,6	15,6	31,2	31,2	15,6	15,6	15,6	15,6	*	*	15,6	15,6
JA-4CF ₃	*	*	15,6	*	31,2	31,2	31,2	*	31,2	*	*	*	*	*	*	*
JA-4OCF ₃	*	*	31,2	*	*	*	*	*	31,2	*	*	*	*	*	*	*
JA-2NO ₂	31,2	*	*	*	31,2	*	*	*	15,6	*	*	*	31,2	*	31,2	*
JA-3NO ₂	*	*	*	*	*	*	15,6	*	*	*	15,6	*	*	*	*	*
JA-1Naftila	15,6	*	*	*	15,6	*	*	*	15,6	*	*	*	31,2	*	15,6	*
JA-2Naftila	31,2	*	*	*	*	*	*	*	31,2	*	*	*	*	*	*	*
JA-2Tienila	*	*	*	*	*	*	*	*	31,2	*	*	*	*	*	*	*
JA-2Furanil	7,8	*	*	*	*	*	*	*	31,2	*	*	*	1,9	*	31,2	*
JA-2OH3F	*	*	*	*	*	*	15,6	*	*	*	31,2	*	*	*	*	*
fluconazol	64	128	8	32	8	128	64	64	8	64	2	128	8	128	64	128

¹MC: *Microsporium canis*; ²EF: *Epidermophyton floccosum*, *Valores de CIM maiores que 31,2 µg/mL

Todas as 23 metoxichalconas inibiram o crescimento fúngico de ao menos uma cepa MCATCC9865 ou isolado clínico de *M. canis* e *E. floccosum*, com CIM variando de 0,9 a 31,2 µg/mL. A substância **JA-0** e os análogos fluorados **JA-2F**, **JA-3F** e **JA-4F** foram capazes de inibir o crescimento fúngico com valores de CIM entre 0,9 e 31,2 µg/mL, sendo de 2 a 16× inferiores que o fluconazol (CIM= 2 µg/mL e 64 µg/mL). A maior potência das chalconas halogenadas pode estar relacionada ao incremento da lipofilicidade promovida pelos halogênios o que favorece a passagem da substância por difusão passiva pelas biomembranas fúngicas (BOZZUTO e MOLINARI, 2015).

Outro fator que pode incrementar a atividade devido ao aumento da hidrofobicidade, é a permuta do anel fenílico por anéis homoarílicos expandidos (α -naftila e β -naftila). O análogo **JA-1naftila**, contra duas cepas de *M. canis* e duas cepas de *E. floccosum*, demonstrou uma CIM de 15,6 µg/mL. Contudo, o regioisômero de **JA-1naftila** (**JA-2naftila**) desfavoreceu a atividade antifúngica (CIM $\geq$ 31,2 µg/mL).

Foi observada a relação bioisostérica de anel para a atividade antifúngica, de **JÁ-2tienila** com o análogo **JA-2-furanil**. Este demonstrou contra a cepa de referência da MCATCC9865 um valor de CIM = 7,8 µg/mL, 8× menor que o fluconazol (CIM=64 µg/mL). Contra o isolado clínico EF3, a atividade de **JA-2-furanil** foi 4× menor (CIM=1,9 µg/mL) que o composto não-substituído (**JA-0**, CIM=15,6 µg/mL) e 4× menor que o fluconazol (CIM=8 µg/mL).

2.4 Efeito sinérgico de metoxichalconas e fármacos antifúngicos

A terapia antifúngica tem como finalidade explorar diferentes alvos bioquímicos das células fúngicas, por meio da associação de fármacos, o que pode aumentar a eficiência, diminuir a toxicidade e o surgimento de resistência (SHRESTHA et al., 2014).

A avaliação do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) foi realizada a partir da associação entre os compostos **JA-0** e **JA-2F**, com os fármacos antifúngicos anfotericina B, caspofungina, fluconazol, terbinafina e voriconazol (Tabelas 5 e 6) contra a cepa da CBS118892 de *T. rubrum*.

Tabela 5. Efeito sinérgico entre **JA-0** e diferentes fármacos contra *Trichophyton rubrum* TRCBS118892

Fármacos	CIM ₉₉			ICI F JA- 0	Modo de interação JA-0
	Fármac o*	JA- 0*	Combinação fármaco/compo sto**		
anfotericina B	4	3,9	2/0,01	0,5	Sinérgico
caspofungina	0,5	3,9	0,25/3,9	1,5	Indiferente
fluconazol	2	3,9	2/3,9	2,0	Indiferente
terbinafina	0,06	3,9	0,007/0,03	0,1	Sinérgico
voriconazol	0,06	3,9	0,03/0,001	0,5	Sinérgico

*CIM₉₉: expresso em µg/mL; ** CIM Combinação fármaco e o produto expresso em µg/mL.

O ICIF foi calculado pela adição das razões (CIM₉₉ na combinação/CIM₉₉ isolado) dos fármacos e das metoxichalconas. A metoxichalcona **JA-0** em combinação com anfotericina B, terbinafina e voriconazol apresentou efeito sinérgico (ICIF = 0,1–0,5), diminuindo os valores de concentração inibitória em média 80% em relação as CIM individuais (Tabela 5). Enquanto a combinação de **JA-0** com caspofungina e fluconazol foram indiferentes (ICIF = 1,5 e 2,0, respectivamente).

Tabela 6. Efeito sinérgico entre **JA-2F** e diferentes fármacos contra *Trichophyton rubrum* TRCBS118892

Fármacos	CIM ₉₉			ICI F JA- 0	Modo de interação JA-0
	Fármac o*	JA- 0*	Combinação fármaco/compo sto**		
Anfotericina B	4	1,9	2/0,03	0,5	Sinérgico
Caspofungina	0,5	1,9	0,25/3,9	2,5	Antagônica
Fluconazol	2	1,9	2/3,9	3,0	Antagônica
Terbinafina	0,06	1,9	0,003/0,01	0,1	Sinérgico
Voriconazol	0,06	1,9	0,03/0,001	0,5	Sinérgico

*CIM₉₉: expresso em µg/mL; ** CIM Combinação fármaco e o produto expresso em µg/mL.

A metoxichalcona **JA-2F** apresentou ação sinérgica com a maioria dos fármacos (ICIF = 0,2–0,5), contudo apresentou efeito antagônica com a caspofungina e o fluconazol (ICIF = 2,5 e 3,0, respectivamente) (Tabela 6).

A combinação das metoxichalconas **JA-0** e **JA-2F** com terbinafina (ICIF = 0,1) mostrou-se mais sinérgica do que os demais fármacos, podendo este dado estar relacionado com um possível modo de ação desse composto.

2.5 Efeito das metoxichalconas na membrana e parede celular fúngicas

Foi avaliado o efeito dos compostos selecionados **JA-0** e **JA-2F** sobre a membrana e a parede celular fúngica de *T. rubrum*. Para avaliar o possível modo de ação antifúngica das chalconas selecionadas, o meio RPMI foi suplementado com ergosterol ou sorbitol em dois experimentos separados.

O ergosterol é um esterol que atua regulando a fluidez e a integridade da membrana celular de fungos e protozoários (CARMONA, LIMPER, 2017). Enquanto o sorbitol é um protetor osmótico atuando somente no meio externo. Se o modo de ação dos compostos **JA-0** e **JA-2F** envolver a complexação com ergosterol, o valor de CIM aumentará com a presença do ergosterol, devido à adição de ergosterol exógeno no meio. Se a adição de sorbitol ao meio levar ao aumento de valores de CIM, indica uma possível ação sobre a parede celular fúngica (ESCALANTE et al., 2008).

Na presença de ergosterol, as chalconas **JA-0** e **JA-2F** tiveram os valores de CIM aumentados em até 4× em relação ao meio não-suplementado (Tabela 7). Esses resultados indicam que o modo de ação dessas chalconas está relacionado a um possível dano que essas chalconas podem provocar sobre a membrana fúngica, como o observado para a anfotericina B. A anfotericina B interage com o ergosterol presente na membrana e, consequentemente, provoca a ruptura da membrana plasmática (CARMONA, LIMPER, 2017).

Tabela 7. Valores de CIM das metoxichalconas **JA-0** e **JA-2F** na presença e ausência de ergosterol

<i>Trichophyton rubrum</i> CBS118892						
Ergosterol – CIM (µg/mL)						
TRCBS 118892	RPMI Suplementado			RPMI sem suplementação		
	AmfB	JA-0	JA – 2F	AmfB	JA-0	JA – 2F
	16,0	15,6	15,6	4	3,9	3,9

A caspofungina é um antifúngico que inibe a enzima β -1,3-glucano-sintase provocando a interrupção da síntese da parede e, consequentemente, uma perda da resistência mecânica levando o fungo a morte (BERGOLD, GEORGIADS, 2004; LEWIS, 2011).

A adição de sorbitol ao meio aumentou em uma vez o valor de CIM para as duas metoxichalconas (Tabela 8), pode-se observar que a adição do grupo substituinte flúor não incrementou a atividade da chalcona não-substituída.

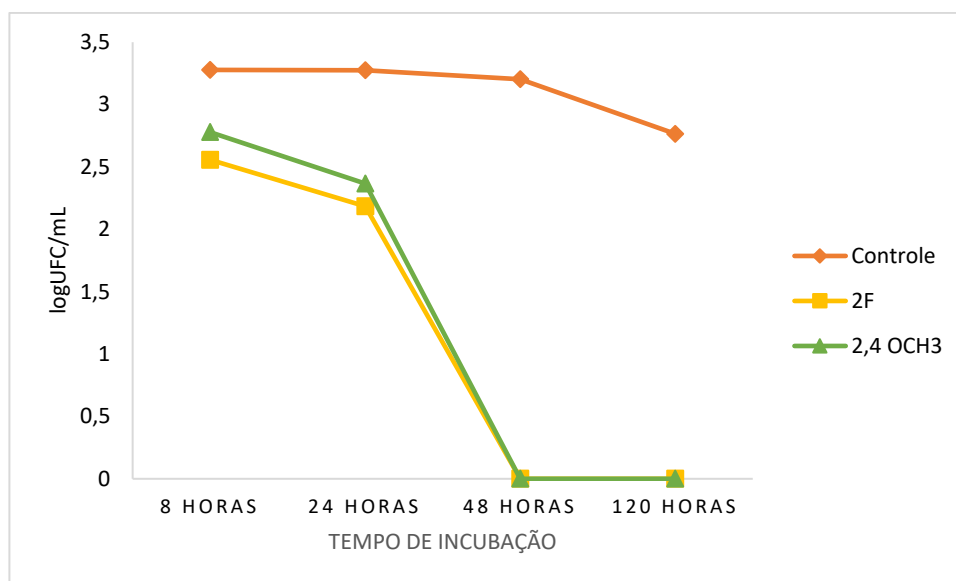
Tabela 8. Valores de CIM das metoxichalconas **JA-0** e **JA-2F** na presença e ausência de sorbitol

<i>Trichophyton rubrum</i> CBS118892						
Sorbitol – CIM (µg/mL)						
TRCBS 118892	RPMI Suplementado			RPMI sem suplementação		
	Caspofungina	JA-0	JA – 2F	Caspofungina	JA-0	JA - 2F
	>32	7,8	7,8	0,5	3,9	3,9

2.6 Tempo de morte de *Trichophyton rubrum*

O ensaio de tempo de morte foi realizado ao longo de um período de 120 h, com exposição de *T. rubrum* CBS118892 às chalconas **JA-0** e **JA-2F** em 15.6 µg/mL e 7.8 µg/mL, respectivamente. Um gráfico foi traçado entre o número logarítmico de UFC/mL e o tempo (Figura 1). A redução máxima de UFC/mL de *T. rubrum* CBS118892 foi observada em 48 h, com taxa de inibição de 100%, em comparação ao controle de crescimento.

Figura 1. Tempo de morte de *Trichophyton rubrum* CBS118892 incubado na presença de JA-0 e JA-2F



O ensaio de tempo de morte sugere assertivas acerca da dinâmica do efeito letal das chalconas, experimento útil para compostos candidatos a fármacos antifúngicos (BAX et al., 2017). Partindo do pressuposto que o comportamento fungicida de um composto é a sua capacidade de eliminar todo o crescimento do microrganismo no meio de cultura, comprometendo sua viabilidade, pode se confirmar o efeito fungicida das chalconas frente a *T. rubrum* CBS118892 nas concentrações testadas.

2.7 Toxicidade contra fibroblastos cutâneos

Um dos maiores desafios no desenvolvimento de fármacos, consiste em aliar os valores ideais da atividade terapêutica, baixa toxicidade combinados a sua via de administração, bem como de uma alta seletividade (DOS SANTOS RAMOS et al., 2019).

A atividade tóxica das chalconas foi avaliada contra células de fibroblasto de pele (HDFa - Normal Adult Human Primary Dermal Fibroblasts (HDFa - PCS-201-012), nas concentrações de 0,48 µg/mL e 250 µg/mL. Os valores foram expressos em concentração inibitória mínima capaz de inibir 50% do crescimento celular (CI₅₀). Para esse ensaio, foram selecionadas as chalconas JA-0, JA-2F, JA-3F, JA-4F, JA-3Cl e JA-4CF₃, as quais exibiram os menores valores de CIM contra ao menos uma das espécies de dermatófitos avaliados.

Os resultados indicam que os derivados selecionados demonstraram valores de CI_{50} entre 4,19 e 122,1 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 9). Nota-se que o análogo **JA-4CF₃** foi relativamente menos tóxico em relação as demais chalconas, apresentando CI_{50} de 122,1 $\mu\text{g/mL}$. Enquanto as chalconas **JA-0**, **JA-2F**, **JA-3F**, **JA-4F** e **JA-3Cl** apresentaram CI_{50} de 4,2 a 8,4 $\mu\text{g/mL}$.

Utilizando a razão entre os valores de CI_{50} e CIM foram calculados os respectivos índices de seletividade (IS). As chalconas foram mais seletivas para suas atividades antidermatofítica contra *E. floccosum* (IS = 3,9–7,5), com exceção da **JA-3Cl** (IS = 1,1). Em relação as demais espécies, as chalconas **JA-2F** e **JA-0**, que possuem ampla ação antifúngica apresentaram IS que variaram de 0,7 a 7,0 sendo o maior valor registrado para a chalcona **JA-2F** em relação sua atividade contra *E. floccosum*. Enquanto as chalconas **JA-4F** e **JA-3F** apresentam baixos valores de IS para *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e *M. canis*. A chalcona **JA-4CF₃**, que apresentou o menor valor de CIM contra *T. mentagrophytes*, também foi considerada a menos citotóxica, apresentando um IS = 122,1.

Tabela 9. Toxicidade contra fibroblastos de pele (HDFa) e índice de seletividade (IS)

	CI_{50} HDFa	CIM TM	IS	CIM TR	IS	CIM MC	IS	CIM EF	IS
JA-0	5,3	1,9	2,8	3,9	1,3	7,8	0,7	1,9	2,8
JA-2F	6,3	3,9	1,6	1,9	3,3	7,8	0,8	0,9	7,0
JA-3F	8,4	15,6	0,5	7,8	1,1	3,9	2,1	1,9	4,4
JA-4F	6,7	31,2	0,2	15,6	0,4	31,2	0,2	0,9	7,5
JA-4CF₃	122,1	0,9	135	31,2	3,9	>31,2	ND	31,2	3,9

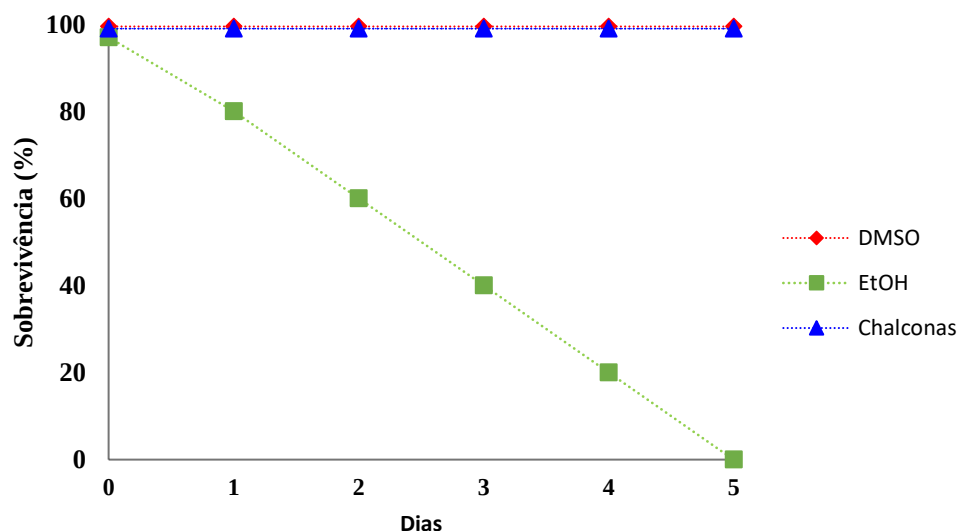
TMATCC11481 = *T. mentagrophytes*; TRCBS118892 = *T. rubrum*;
MCATCC9865 = *M. canis*; EF1 = *E. floccosum*

2.8 Toxicidade contra as larvas de *Galleria mellonella*

Os ensaios de toxicidade contra as larvas de *G. mellonella* avaliaram a toxicidade das chalconas de 500 – 2000 $\mu\text{g/mL}$, com sobrevivência de 100% das larvas injetadas

com os compostos, sugerindo a ausência de toxicidade nas concentrações testadas (Figura 2).

Figura 2. Toxicidade das chalconas selecionadas contra as larvas de *Galleria mellonella*



Chalconas = JA-0 e JA-2F

O uso de modelos experimentais alternativos ao uso de mamíferos para ensaios de toxicidade tem ganhado atenção da comunidade científica nos últimos anos. Quando comparado aos modelos mamíferos convencionais, o artrópode *G. mellonella* apresenta algumas vantagens, como fácil obtenção para experimentos em larga escala, são de simples e fácil manuseio, sem necessidade de biotérios complexos, além da isenção de aprovação de comitês de ética em pesquisa (JUNQUEIRA; MYLONAKIS; BORGHI, 2021). Outra vantagem é a similaridade com a resposta imunológica inata dos mamíferos possuindo defesas celulares e humorais. Usando esse modelo de estudo é possível estabelecer rapidamente o biomonitoramento da toxicidade de um conjunto grande de substâncias, facilitando a síntese de congêneres menos tóxicos e corroborando a predição da dose de candidatos a fármacos (LEMES et al., 2021; PEREIRA et al., 2018).

No presente estudo as chalconas não foram tóxicas *in vivo*, possibilitando o uso desses compostos como opção para novas abordagens terapêuticas no controle das dermatofitoses.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em uma etapa sintética, foram obtidas vinte e três chalconas 2',4'-dimetoxiladas, com modificações no anel B, sendo 3 inéditas, **JA-2F**, **JA-3Br** e **JA-2OH3F**. Os análogos foram avaliados contra espécies de *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *M. canis* e *E. floccosum*. Todas as chalconas foram capazes de inibir o crescimento fúngico dessas espécies, com destaques para **JA-0** e seus análogos fluorados, **JA-2F** e **JA-3F**, que apresentaram CIM igual ou inferior a 15 µg/mL contra todas as espécies estudadas. Dentre as chalconas ativas e inéditas, a **JA-2F** foi identificada como um potente análogo antifúngico, sendo ativo contra todas as espécies estudadas. A avaliação dos compostos **JA-0** e **JA-2F** combinados aos fármacos antifúngicos anfotericina B, terbinafina e voriconazol mostraram uma ação sinérgica. Os ensaios de suplementação do meio com ergosterol e sorbitol, indicaram que estes dois compostos podem atuar na parede celular e membrana de *T. rubrum*. O teste de toxicidade *in vivo* mostrou que **JA-0** e **JA2F** não foram tóxicas. A partir dos resultados apresentados sugerimos a continuidade dos estudos com estes compostos para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos.

4. EXPERIMENTAL

4.1. Procedimentos químicos gerais

Os reagentes e solventes foram obtidos comercialmente da Merck®. Para o acompanhamento das reações foi realizada cromatografia em camada delgada em placas de gel de sílica sob base de alumínio da marca Supelco®. As purificações foram realizadas por meio de filtração, recristalização com etanol e água, cromatografia em gel de sílica (100–200 Mesh, Merck®) ou cromatografia por exclusão de tamanho (Sephadex LH-20, Merck®). Para as técnicas cromatográficas, utilizando gel de sílica como fase estacionária, foram utilizadas diferentes combinações dos solventes hexano, acetato de etila, acetona, e diclorometano, de acordo com a polaridade dos analitos. O etanol foi empregado como solvente para cromatografia por exclusão de tamanho.

O ponto de fusão (mp) das chalconas foi medido em tubos capilares abertos utilizando o equipamento MS Tecnopon PFM-II. Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram registrados no espectrômetro Bruker Avance III, operando a 600 e 150 MHz para os núcleos de hidrogênio e carbono-treze, respectivamente. Os deslocamentos químicos (δ) foram referenciados aos sinais residuais dos respectivos solvente não-deuterados. As multiplicidades foram descritas como singlete (s), duplete (d), duplo duplete (dd), duplo duplo duplete (ddd), e multiplete (m). As constantes de acoplamento (J) foram expressas em Hz. Os cromatogramas foram obtidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Fotodiodos (CLAE-DAD) equipamento Agilent Technologies® 1220 Infinity LC, sistema de matriz de fotodiodos (Agilent Technologies® Modelo 1260 Infinity) e Agilent Zorbax Eclipse Plus C -18® coluna (250 mm $\times$ 4,6 mm, 5 μ m) usando metanol: água (3:1) com 0,5% de ácido acético como fase móvel (1,0 mL/min). A pureza das chalconas foi estabelecida por meio da área da banda obtida a 254 e 365 nm

4.1.1 Síntese

Em uma solução etanólica (5 mL) de 2',4'-dimetoxiacetofenona (2 mmol) e respectivos benzaldeídos (2,2 mmol) sob agitação, foi adicionado gota a gota uma solução aquosa de KOH (60% m/v, 2 mL) a 0 °C (SANTOS et al., 2019; SANTOS et al., 2017). O meio reacional foi mantido sob agitação 2 a 6 horas à temperatura ambiente. Após o

término da reação, a mistura foi vertida sob gelo triturado, a qual foi filtrada ou extraída com acetato de etila (3×25 mL). As três fases orgânicas foram combinadas e lavadas com solução aquosa saturada de NaHSO (2×10 mL), secas em MgSO_4 , filtradas, e concentradas sob pressão reduzida. Após etapas de filtração, recristalização ou separações cromatográficas, as chalconas foram obtidas com rendimentos variando de 15 a 95% após purificação. Os dados de caracterização foram detalhados no material complementar, incluindo espectros de RMN e cromatogramas (Capítulo 3)

4.2 Microrganismos

O painel de isolados clínicos e as cepas de referência dos fungos dermatófitos foi constituído por: *T. rubrum* (TRCBS118892, TR1, TR2, TR3, TR4, TR5), *T. mentagrophytes* (TMATCC11481, TM1, TM2, TM3, TM4, TM5), *M. canis* (MCATCC9865, MC1, MC2, MC3, MC4) e *E. floccosum* (EF1, EF2, EF3, EF4). Os isolados clínicos são provenientes de uma biblioteca pertencentes a trabalhos anteriores que estão armazenados no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP (tabela 10). As linhagens foram mantidas em ágar Sabouraud dextrose e incubados a 28 °C por até 15 dias.

Tabela 10. Origem clínica dos isolados utilizados neste estudo

Isolados	Origem
TM1	Pele de pés
TM2	Unha hálux direito
TM3	Unha de pés
TM5	Pele de pés
TR1	Unha mãos
TR2	Unha de pés
TR3	Unha de pés
TR4	Unha pé direito
TR5	Unha de mãos
MC1	Couro cabeludo
MC2	Couro cabeludo
MC3	Couro cabeludo
EF1	Unha de pés
EF2	Pele de pé direito
EF3	Pele de pé direito
EF4	Pele de pé esquerdo

TM: *T. mentagrophytes*; TR: *T. rubrum*; MC: *M. canis*; EF: *E. floccosum*.

4.3 Preparo dos inóculos e diluição das substâncias

Para o preparo dos inóculos, utilizou-se o cultivo fúngico de 11 dias de crescimento em ágar Batata Dextrose (PDA), incubadas a 28 °C para a indução de esporulação. Após este período, as superfícies das colônias foram cobertas com salina estéril (0,85%), e removidas, superficialmente, com o auxílio de alças estéreis. As soluções foram ajustadas para 68% a 70% de transmitância em espectrofotômetro (Biospectro 1) para leitura em comprimento de onda de 530 nm. Os compostos foram preparados a partir de soluções estoque em DMSO preparadas nas concentrações de 31,2 a 0,9 µg/mL.

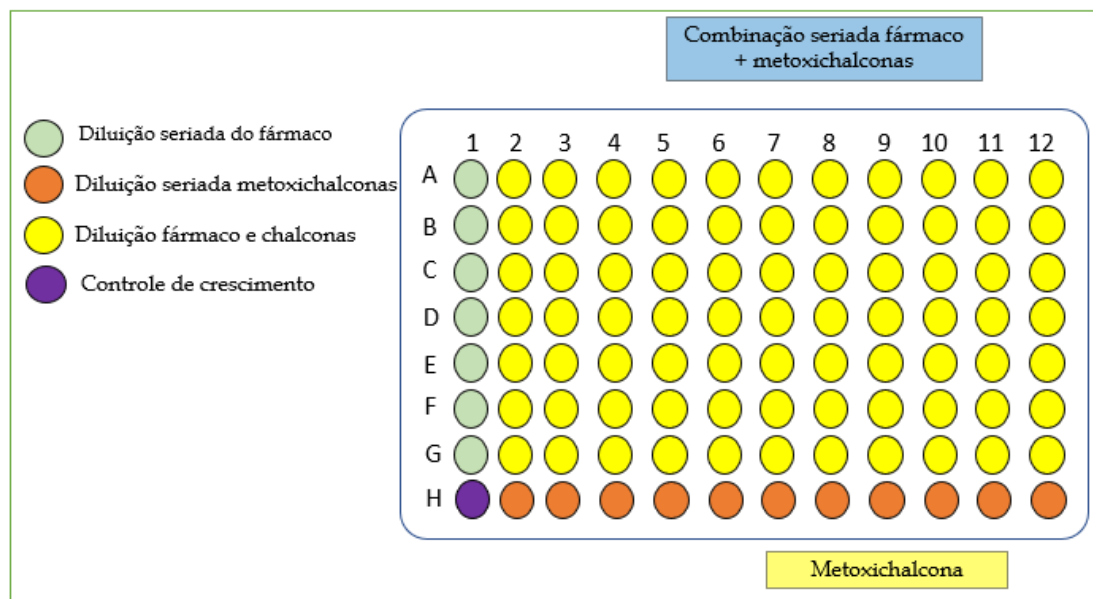
4.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A triagem dos compostos para determinação da atividade antifúngica foi realizada conforme o método de microdiluição em placas seguindo os protocolos M38-A2 (2017) apresentado pelo manual Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI, com modificações (CLSI, 2017). As placas foram incubadas a 35 °C e realizou-se a leitura após 7 dias, sendo realizada a determinação da CIM por análise visual e por análise de absorbância a 530 nm. Para este estudo, a CIM foi estabelecida como a concentração que produziu 99 % de inibição de crescimento fúngico. Para a determinação da CFM foi observada a menor concentração da substância na qual não houve crescimento de colônias fúngicas, em meio sólido, após o período de incubação a 35 °C por 5 dias, sendo realizada leitura visual. Utilizou-se fluconazol como fármaco antifúngico de referência, e as substâncias foram testadas em concentrações variando entre 128 µg/mL a 2 µg/mL.

4.5 Análise do efeito sinérgico das metoxichalconas com fármacos antifúngicos

O efeito da combinação dos compostos **JA-0** e **JA-2F** com os fármacos anfotericina B, caspofungina, fluconazol, terbinafina e voriconazol contra *T. rubrum*, foi avaliado por meio do método de checkerboard em caldo de microdiluição (Figura 3).

Figura 3. Fluxograma para avaliação do efeito sinérgico das metoxichalconas e diferentes fármacos antifúngicos



As combinações testadas foram **JA-0** e **JA-2F** (de 31,2 a 0,03µg/mL) com anfotericina B (de 2 µg/mL a 0,03 µg/mL), caspofungina (de 8 µg/mL a 0,03 µg/mL), fluconazol (de 8 µg/mL a 0,12 µg/mL), terbinafina (de 0,5 µg/mL a 0,005 µg/mL) e voriconazol (de 1 µg/mL a 0,01 µg/mL). As placas foram incubadas a 37 °C com leitura a 490 nm após 5 dias.

Para determinar a interação entre os diferentes os compostos selecionados com os fármacos antifúngicos foram calculados o índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) (Esquema 3).

Esquema 3. Fórmula para o cálculo do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF)

$$ICIF = \frac{CIM \text{ fluconazol mix}}{CIM \text{ fluconazol isolado}} + \frac{CIM \text{ metoxichalcona mix}}{CIM \text{ metoxichalcona isolada}}$$

Uma combinação sinérgica foi definida como $ICIF \leq 0,5$; combinação aditiva o valor de $ICIF$ foi $0,5 \leq 1,0$, combinação indiferente $1 \leq 2$ e uma combinação antagônica como $ICIF > 2$ (KUMAR et al., 2012).

4.6 Efeito contra a membrana e parede celular fúngica

A determinação dos valores de CIM dos compostos **JA-0** e **JA-2F**, na presença de ergosterol e sorbitol foi realizada por microdiluição em placas conforme descrito (SARDI et al., 2017) contra *T. rubrum* (CBS118892). Foram realizados em três ensaios independentes, utilizados os antifúngicos padrões anfotericina B e caspofungina como controles positivos. Os valores de CIM foram determinados visualmente como a concentração mais baixa que não produziu qualquer turbidez.

4.7 Tempo de morte

O ensaio foi conduzido usando uma modificação do método descrito por Klepser et al. (1998), com a linhagem CBS de *T. rubrum*. Valores duas vezes superiores a CIM obtidas por microdiluição em caldo (**JA-0** = 15,2 µg/mL e **JA-2F** = 7,8 µg/mL) foram utilizados para o ensaio de tempo de morte. O inóculo do dermatófito foi preparado a partir de cultura de 7 dias em Ágar Batata Dextrose (ABD) para indução da esporulação. Suspensões de 0,1 mL de conídios foram adicionadas em 4,9 mL de Caldo Sabouraud Dextrose (CSD) obtendo se uma concentração final correspondente a 0,4 a 5×10^4 unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Após a preparação dos inóculos, realizou-se diluição 1:1 (0,2 mL da solução do composto na concentração $3 \times$ CIM com 0,2 mL do inóculo). Tubos contendo apenas inóculo foram incluídos para avaliação do controle de crescimento. Em pontos de tempo predeterminados (8, 24, 48 e 120 h) uma alíquota de 30 µL foi retirada de cada amostra, semeada em placas de Agar Sabouraud Dextrose (ASD), com auxílio de alça Drigalski e incubadas a 35 °C por 120 h. Posteriormente, seguiu se para a contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL). A porcentagem de inibição foi calculada por comparação com o controle de crescimento usando o método de contagem de colônias.

4.8 Toxicidade contra células de pele

Para este ensaio, foi utilizada a linhagem celular de fibroblasto de pele (Normal Adult Human Primary Dermal Fibroblasts - HDFa – PCS-201-012). As células HDFa, foram mantidas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) contendo soro fetal bovino sem vermelho fenol, e incubadas a 37 °C, 5% CO₂, por 24 horas. As suspensões celulares apresentaram concentração final de 2×10^4 células/poço em placas de microdiluição. Após a incubação, removeu-se o meio de cultura com posterior adição das substâncias em diferentes concentrações, incubando as placas por 72 h. Transcorrido esse período, foi adicionado resazurina, e a viabilidade foi avaliada com base em análise espectrofluorimétrica em comprimentos de onda 570 nm e 600 nm (BILLA et al., 2021).

4.9 Toxicidade contra larvas de *Galleria mellonella*

O ensaio de toxicidade de **JA-0**, **JA-2F**, foi realizado em larvas de *G. mellonella* de acordo com protocolo descrito por Ignasiak e Maxwell, 2017 (IGNASIAK; MAXWELL, 2017). Para cada condição, foram separadas 5 larvas de *G. mellonella* (275 ± 25 mg) no sexto instar de desenvolvimento em placas de Petri (90 × 15 mm). Alíquotas de 5 µL do composto foram injetadas na última prólega direita das larvas utilizando micro seringa de Hamilton modelo 7000.5KH de 10 µL nas concentrações de 500 – 2000 µg/mL. Os controles do experimento foram larvas intocadas (naïve), larvas inoculadas com 10% etanol (controle positivo de toxicidade) e DMSO 10% (controle negativo de toxicidade). As larvas foram incubadas a 37 °C, privadas de alimentação e iluminação direta. Foram feitas avaliações da sobrevivência das larvas a cada 24 h, durante 5 dias e foram retiradas diariamente as formações de pré-pupas para retardar a metamorfose. A confecção dos gráficos e análises estatística foi realizada por meio do método Log-rank (Mantel-COX) no software GraphPad Prism 5.

3. ARTIGO 2 - AVALIAÇÃO DE 2',4',4-TRIMETOXICHALCONA (METOCHALCONA, VESIDRYL) E ANÁLOGOS CONTRA FUNGOS DERMATÓFITOS

Julyanna Andrade S. Nascentes¹, Leticia Ribeiro de Assis¹, Natalia Seron Brizzotti²,
Thiago Henrique Lemes², Miguel Divino da Rosa¹, Reinaldo Theodoro¹, Veridiana
Camilo Pattini¹, Mariela Domiciano Ribeiro², Carolina Vaso³, Márcia Regina von Zeska
Kress⁴, Ana Marisa Fusco³, Margarete Teresa Gottardo de Almeida², Luis Octavio
Regasini^{1,*}

¹ Departamento de Química e Ciências Ambientais, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Rua Cristóvão Colombo, 2265 - Jardim Nazareth - São José do Rio Preto/SP - CEP 15054-000, SP, Brasil.

² Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (Famerp), Brasil. Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416 - Vila 12 São Pedro, São José do Rio Preto - SP, 15090-000.

³ Universidade Estadual Paulista, Campus de Araraquara. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, UNESP - R. Expedicionários do Brasil, 1621 - Centro, Araraquara - SP, 14801-902

⁴ Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Av. 15 do Café - Vila Monte Alegre, Ribeirão Preto - SP, 14040-903, Telephone: +55 (16) 3315-

* Autor correspondente, e-mail: luis.regasini@unesp.br

Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos, IBILCE - UNESP, São José do Rio Preto
Tel.: +55 17 3221-2362

RESUMO

O aumento no número de casos de infecções de origem fúngica tem motivado a prospecção de novas substâncias mais eficientes e que apresentem efeitos adversos mitigados. Assim, a estratégia de reposicionamento de fármacos pode ser uma alternativa interessante para minimizar a limitação de antifúngicos disponíveis. Neste trabalho, sintetizamos a 2',4',4'-trimetoxichalcona (vesidryl) e uma série de oito análogos chalcônicos 2',4'- dimetoxilados no anel A e com anel B substituído por grupos eletrodadores de elétrons. Todos os compostos foram avaliados contra *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis* e *Epidermophyton floccosum*. Vesidryl (**JA-4OMe**) e seu análogo **JA-3Me** apresentaram considerável fungitoxicidade com valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 0,9 µg/mL e 31,2 µg/mL. A associação de **JA-4OMe** com a terbinafina demonstrou efeito sinérgico com um Índice de Concentração de Inibição Fracionada (ICIF) de 0,1 contra *T. rubrum*. Em ensaios fenotípicos, **JA-4OMe** apresentou ação dual contra a membrana e parede celular de *T. rubrum*. Por fim, o composto **JA-4OMe** demonstrou baixa toxicidade contra as larvas de *Galleria mellonella*. Esses resultados abrem novos caminhos para o fármaco vesidryl apresentando-se um potencial agente antifúngico.

Palavras-chave: Vesidryl; Reposicionamento; Chalconas.

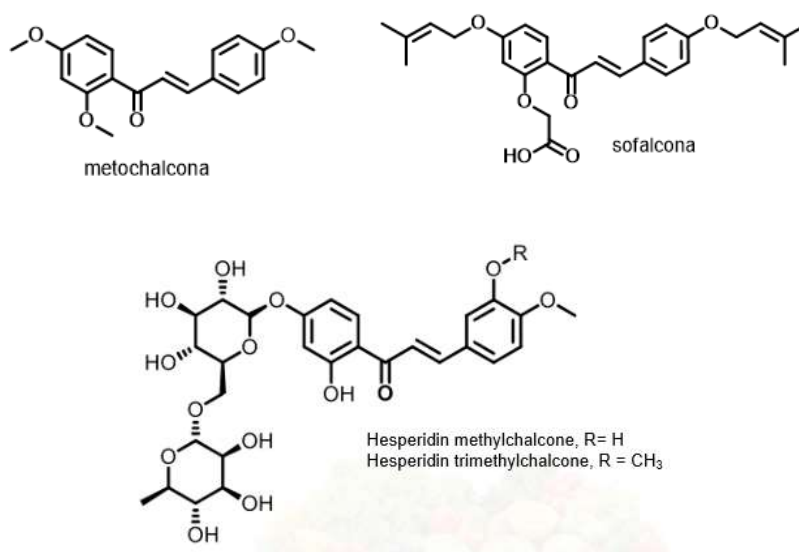
1. INTRODUÇÃO

Os dermatófitos são fungos que causam infecções fúngicas em nichos queratinizados como unhas, pele e cabelos. As dermatofitoses são infecções superficiais e uma causa de um problema de saúde pública mundial que tem aumentado consideravelmente nos últimos anos (GNAT; NOWAKIEWCIZ; ZIEZBA, 2019). Os principais agentes etiológicos destas infecções humanas são espécies dos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*. *Trichophyton rubrum* é o agente etiológico causador dessa infecção mais comum, seguido por *T. interdigitale*, *T. mentagrophytes*, *E. floccosum* e *M. canis* (HOOG et al., 2017).

Um dos grandes impasses no enfrentamento dessas infecções é a limitação do arsenal de fármacos antifúngicos convencionais, sugerindo uma necessidade premente no desenvolvimento de classes antifúngicas inovadoras (HOOKEN et al., 2019). Nesse

contexto, as chalconas ocupam lugar de destaque na descoberta de novos agentes terapêuticos diante das inúmeras propriedades farmacológicas, síntese concisa e versatilidade na construção de bibliotecas de congêneres (NARWALL; KUMAR; VERMA, 2021). Quimicamente, as chalconas são substâncias de cadeia aberta com dois anéis aromáticos (A e B), unidos por uma carbonila α - β insaturada, existindo em duas formas *cis* e *trans*, sendo a forma *trans* mais estável e abundante na natureza (GOMES et al., 2017; SOARES et al., 2014; KIM et al., 2012). Uma das vantagens da exploração do esqueleto chalcônicos é o número de hidrogênios nos anéis A e B que são podem ser substituídos, conferindo um amplo espectro de bioatividades incluindo, atividade antiproliferativa (RUPARELIA et al., 2018; CHOI et al., 2016), tuberculostática (GAUR et al., 2015), antifúngica (MARQUES et al., 2020), antiviral (YAEGHOBI et al., 2016; VILAR; SANTANA; URIARTE, 2006; GONZÁLEZ-DÍAZ et al., 2005), antidiabética (GAUR et al., 2014), anti-*Leishmania* (GOODARZI et al., 2014), anti-úlceras e colerética (KANG et al., 2018).

Atualmente, há quatro fármacos que têm esqueleto chalcônico. A sofalcona apresenta como mecanismo de ação o aumento nos níveis de prostaglandinas da mucosa, atuando como um gastroprotetor (HIGUCHI et al., 2010). A hesperidina metil-chalcona é utilizada contra a insuficiência linfática venosa e a hesperidina trimetilchalcona foi testada contra varicose do tronco (BELTRAMINO; PENENORY; BUCETA, 2000). O vesidryl (metochalcona) é fármaco que está em comercialização na Itália (Megalip®) e na Espanha (Neocolan®), atuando como um agente colerético, agindo na estimulação de secreção de bile (MARAVALHO, 2019; BUZZI, 2007).

Figura 1. Fármacos chalcônicos

Fonte: HIGUCHI et al., 2010; BELTRAMINO; BUZZI, 2007; BEKTRAMINO; PENENORY; BUCETA, 2000.

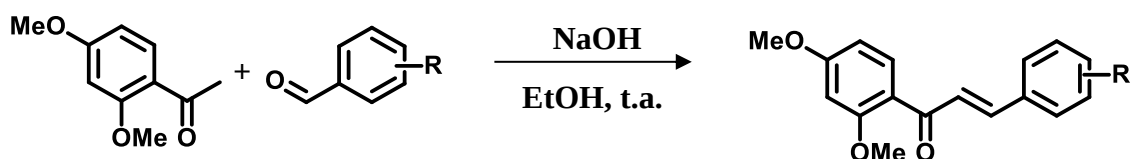
O reposicionamento de fármaco é uma alternativa que permite agilizar o processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos e, conseqüentemente, pode acarretar a redução dos custos econômicos (EKINS et al., 2011). Essa estratégia é relativamente nova e vem apresentando resultados satisfatórios (ASHBURN; THOR, 2004) como reduzir os custos e riscos que há na descoberta e no desenvolvimento de novos fármacos, além de ser uma alternativa para recuperar fármacos que fracassaram para doenças as quais foram propostas (NOSENGO, 2016).

Em estudos anteriores, descrevemos a atividade antidermatofítica de chalconas metoxiladas com diferentes grupos eletroatratores. Nesse estudo, sintetizamos a metochalcona e uma série de análogos com grupos eletrodoadores de elétrons para avaliar a atividade contra fungos dermatófitos.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 Química

A 2',4',4'-timetoxichalcona e análogos foram sintetizados por meio da reação de condensação aldólica de Claisen-Schmidt (Esquema 1) (MARQUES et al., 2020; GOMES et al., 2017), obtendo rendimentos entre 30% e 96%.

Esquema 1. Síntese da 2',4',4'-trimetoxichalcona e seus análogos

As estruturas das metoxichalconas foram confirmadas por meio das análises dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e ponto de fusão estão apresentados no Capítulo IV, Apêndice.

2.2 Atividade antidermatofítica de análogos de 2',4'-dimetoxichalconas

Avaliamos a atividade antidermatofítica de **JA-4OMe** e sete análogos contra *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. canis* e *E. floccosum*, estabelecendo valores de CIM e CFM (Tabelas 1, 2 e 3). O fluconazol foi utilizado como fármaco antifúngico de referência.

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) das chalconas contra *Trichophyton mentagrophytes* ¹TMATCC11481, expressa em $\mu\text{g/mL}$.

	TMATCC 11481		TM1		TM2		TM3		TM4		TM5	
Compostos	CI M	CF M	CI M	CF M	CI M	CF M	CI M	CF M	CI M	CF M	CI M	CFM
JA-3OH	*	*	*	*	*	*	*	*	**	*	*	*
JA-4OH	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
JA-3Me	15,6	*	15,6	*	15,6	*	1,9	*	7,8	15,6	3,9	31,2
JA-4Me	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
JA-2OMe	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
JA-4OMe	15,6	31,2	15,6	31,2	31,2	31,2	15,6	31,2	31,2	31,2	15,6	31,2
JA-4-terc	31,2	*	*	*	*	*	31,2	*	31,2	*	31,2	*
JA-4etilfenil	31,2	*	*	*	*	*	31,2	*	31,2	*	31,2	*
fluconazol	8	8	64	128	128	128	64	128	64	128	32	32

¹TM: *Trichophyton mentagrophytes*; * Valores de CIM maior que 31,2 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) das chalconas contra *Trichophyton rubrum*, expressa em µg/mL

	TRCBS118 892		TR1		TR2		TR3		TR4		TR5	
	CIM	CF M	CIM	CF M	CIM	CF M	CIM	CF M	CIM	CF M	CIM	CFM
JA-3OH	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
JA-4OH	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
JA-2Me	*	*	*	*	1,9	*	*	*	*	*	31,2	*
JA-3Me	0,9	*	15,6	*	*	*	0,9	*	31,2	31,2	1,9	1,9
JA-4Me	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
JA-2OMe	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
JA-4OMe	7,8	31,2	31,2	31,2	31,2	31,2	15,6	15,6	15,6	31,2	15,6	31,2
JA-4-terc	*	*	*	*	*	*	*	*	31,2	*	*	*
JA-4etilfenil	*	*	*	*	31,2	*	*	*	31,2	*	*	*
fluconazol	16	16	64	*	128	128	16	16	32	64	4	4

¹TR: *T. rubrum*; * Valores de CIM maior que 31,2 µg/mL.

Tabela 3. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) das chalconas contra *Microsporium canis* e *Epidermophyton floccosum*, expressa em µg/mL

	MCATCC 9865		¹ MC1		MC2		MC3		² EF1		EF2		EF3		EF4	
	CIM	CF M	CIM	CF M	CIM	CF M	CIM	CF M	CIM	CF M	CIM	CF M	CIM	CF M	CIM	CF M
JA-3OH	31,2	*	*	*	*	*	*	*	31,2	*	*	*	31,2	*	*	*
JA-4OH	*	*	*	*	15,6	*	15,6	*	15,6	*	15,6	*	*	*	15,6	*
JA-2Me	1,9	*	*	*	*	*	*	*	31,2	*	15,6	*	0,9	*	15,6	*
JA-3Me	15,6	*	*	*	*	*	15,6	*	15,6	*	15,6	*	31,2	*	15,6	*
JA-4Me	*	*	*	*	31,2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
JA-2OMe	31,2	*	*	*	31,2	*	*	*	*	*	*	*	15,6	*	15,6	*
JA-4OMe	1,9	7,8	1,9	31,2	0,9	31,2	15,6	31,2	7,8	7,8	3,9	7,8	31,2	31,2	7,8	31,2
JA-4-terc	*	*	*	*	31,2	*	*	*	15,6	*	*	*	*	*	15,6	*
JA-4etilfenil	31,2	*	*	*	31,2	*	15,6	*	15,6	*	*	*	*	*	15,6	*
fluconazol	64	128	8	32	8	128	64	64	8	64	2	128	8	128	64	128

¹MC: *M. canis*; ²EF: *E. floccosum*. * Valores de CIM maior que 31,2 µg/mL.

A substituição de um hidrogênio por uma hidroxila no anel benzeno, tende a afetar a atividade biológica de um composto uma vez que pode modificar suas propriedades físicas, conferindo um aumento da hidrossolubilidade e uma interação com o receptor biológico por meio de ligações de hidrogênio (MAHAPATRA; ASATI; BHARTI, 2015).

A adição do substituinte hidroxila no anel B nas posições *meta* e *para* não corroborou a atividade antifúngica dos análogos fenólicos contra *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* e *E. floccosum* (CIM > 31,2 µg/mL) (Tabelas 1, 2 e 3). Por outro lado, a adição de uma hidroxila na posição *para* exibiu atividade contra isolados clínicos de *M. canis* (MC2, MC3) e *E. floccosum* (EF1 e EF2) com valores de CIM de 15,6 µg/mL.

Para investigar a influência do grupo metila, investigamos este substituinte nas posições *meta* e *para* do anel B da chalconas. O grupo metila altera o parâmetro de solubilidade, deixando o composto mais lipofílico, o que pode facilitar a permeação do composto pela membrana fúngica, atingindo em uma maior concentração receptores intracelulares.

A metila na posição *para* (**JA-4Me**) não favoreceu a atividade antifúngica, apresentando valores de CIM de 31,2 µg/mL contra *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*. Porém, a metila na posição *meta* (**JA-3Me**) promoveu uma melhora na atividade antifúngica contra as espécies de *Trichophyton* com intervalos de CIM contra *T. mentagrophytes* entre 1,9 µg/mL e 31,2 µg/mL; *T. rubrum* 0,9 µg/mL e 31,2 µg/mL, 33× menor que o fluconazol (CIM=64 µg/mL). Em contrapartida, a presença deste grupo não favoreceu a atividade contra *M. canis* e *E. floccosum*, visto que o intervalo de CIM foi de 15,6 µg/mL e 31,2 µg/mL. Mas ao compararmos com o fármaco de referência, para a cepa de *M. canis* da MCATCC9865 e isolados clínicos, MC3 e EF4 a metoxichalcona apresentou valor de CIM 4× menor.

Para testarmos a substituição por uma metoxila no anel B, avaliamos análogos com a metoxila nas posições *orto* e *para*. A adição de uma metoxila na posição *para* (**JA-4OMe**) favoreceu a atividade contra as espécies de *T. rubrum* cepa CBS118892 (CIM = 7,8 µg/mL), *M. canis* (CIM = 0,9 µg/mL e 15,6 µg/mL) e *E. floccosum* cepas EF1, EF2 e EF4 (CIM = 3,9 µg/mL e 31,2 µg/mL). O composto **JA-4OMe** (CIM=1,9 µg/mL) apresentou uma ação 33× vezes superior que o fluconazol (128 µg/mL) para a cepa MCATCC9865.

A adição dos grupos *terc*butila e *etil*fenil na posição *para* do anel B não favoreceu a atividade antifúngica dos análogos de metoxichalconas contra todas as cepas de *Trichophyton*, com valores de CIM igual ou maior que 31,2 µg/mL. Para as cepas de *M.*

canis e *E. floccosum*, houve uma discreta melhora, apresentando atividade duas a quatro vezes maior que o fluconazol.

2.3 Avaliação da combinação entre a metoxichalcona JA-4OMe e fármacos antifúngicos

Foi avaliado o efeito da combinação da metoxichalcona **JA-4OMe** com anfotericina B, caspofungina, fluconazol, terbinafina e voriconazol, por meio do ensaio de tabuleiro de xadrez, determinando assim os valores do Índice de Concentração Inibitória Fracionária (ICIF) contra *T. rubrum* CBS. Estes valores, foram utilizados para classificar o efeito entre as substâncias, sendo classificados como sinérgico (ICIF $\leq 0,5$), aditivo (ICIF $> 0,5$ a 1), indiferente (ICIF > 1 a <2) ou antagônico (ICIF > 2) (Tabela 4) (KUMAR et al., 2012).

Tabela 4. Valores de Índice de Concentração Inibitória Fracionária (ICIF) e efeito da combinação de chalconas contra *Trichophyton rubrum*.

<i>Trichophyton rubrum</i> CBS118892					
Fármacos	CIM ($\mu\text{g/mL}$) fármaco	CIM ($\mu\text{g/mL}$) JA-4OMe	CIM combinação ($\mu\text{g/mL}$) Fármaco/ composto	ICIF	Efeito
anfotericina B	4	31,2	2/0,06	0,5	Sinérgico
caspofungina	0,5	31,2	0,25/62,5	2,5	Antagônico
fluconazol	16	31,2	1/3,9	0,2	Sinérgico
terbinafina	0,01	31,2	0,003/0,06	0,3	Sinérgico
voriconazol	0,06	31,2	0,03/7,8	0,5	Sinérgico

sinérgicos (ICIF $\leq 0,5$), aditivos (ICIF $> 0,5$ a 1), indiferentes (ICIF > 1 a <2) ou antagônico (ICIF > 2)

A metoxichalcona **JA-4OMe** quando testada individualmente, exibiu valor CIM de 31,2 $\mu\text{g/mL}$ contra *T. rubrum*. Ao testá-la simultaneamente com o fluconazol, o efeito foi potencializado para **JA-4OMe** (CIM=3,9 $\mu\text{g/mL}$), sendo oito vezes menor que o valor do CIM da substância isolada. O fluconazol isolado apresentou valor de CIM de 16 $\mu\text{g/mL}$, ao combiná-lo com a metoxichalcona, teve uma redução no valor de CIM de 16 vezes menor, apresentando efeito sinérgico (ICIF=0,2).

A combinação entre a metoxichalcona e a terbinafina reduziu em 3 vezes o valor da CIM deste fármaco. A combinação da terbinafina com substâncias que sejam capazes

de reduzir o valor do CIM pode levar a administração de doses mais baixas desse fármaco. A terbinafina é um dos três fármacos indicados para o tratamento da dermatofitoses, sendo lipofílico e queratofílico, o que possibilita seu acúmulo no tecido adiposo e nicho queratinoso, respectivamente (SARNADA et al., 2017).

Uma forma de aumentar a eficácia, reduzir os efeitos adversos da terapia fúngica e evitar os mecanismos de resistência, é a combinação entre fármacos, tornando-se uma alternativa para o tratamento convencional. Assim, o sinergismo entre fármacos tem se mostrado como uma importante estratégia para auxiliar na terapia fúngica (MENDONÇA et al., 2020).

2.4 Efeito sobre a membrana e parede celular fúngica

Realizamos o ensaio de interação entre a metoxichalcona **JA-4OMe** com o ergosterol em meio de cultura de *T. rubrum* CBS. O aumento do valor da CIM de **JA-4OMe** evidencia que ocorreu uma ligação entre o composto e o ergosterol exógeno (Tabela 5).

Tabela 5. Mecanismo de ação da **JA-4OMe** na membrana celular de *Trichophyton rubrum* expresso em valores de CIM em µg/mL

TRCBS 118892	ERGOSTEROL – CIM (µg/mL)			
	RPMI Suplementado		RPMI sem suplementação	
	Anfotericina B	JA-4OMe	Anfotericina B	A-4OMe
	16	>62,5	4	7,8

A membrana plasmática fúngica possui ergosterol, que garante a fluidez e dinâmica da permeabilidade dessa ultraestrutura (BOWMAN; FREE, 2006), sendo um alvo atraente para compostos antifúngicos, uma vez que é vital para a homeostase da célula fúngica. Como fármaco controle utilizamos a anfotericina B, esse fármaco apresenta como mecanismo de ação a membrana celular formando canais que permitem a saída do conteúdo intracelular causando a morte do fungo (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2008).

O valor de CIM da metochalcona (**JA-4OMe**) aumentou de 7,8 µg/mL para um valor superior a 62,5 µg/mL no meio suplementado com ergosterol. A anfotericina B apresentou a mesma magnitude de aumento, indicando a eficácia do teste.

Para prosseguimento da avaliação antidermatofítica do composto **JA-4OMe**, foi analisada a interação de **JA-4OMe** com o sorbitol. O sorbitol atua como um protetor osmótico da célula, e na sua presença crescem mesmo na presença de inibidores da biossíntese da parede celular. A metoxichalcona (**JA-4OMe**) apresentou alteração no valor da CIM (7,8 µg/mL) quando o meio foi suplementado com sorbitol 0,8 mol/L (>62,5 µg/mL) (Tabela 6).

Tabela 6. Mecanismo de ação da **JA-4OMe** na parede celular de *Trichophyton rubrum* expresso em valor de CIM em µg/mL

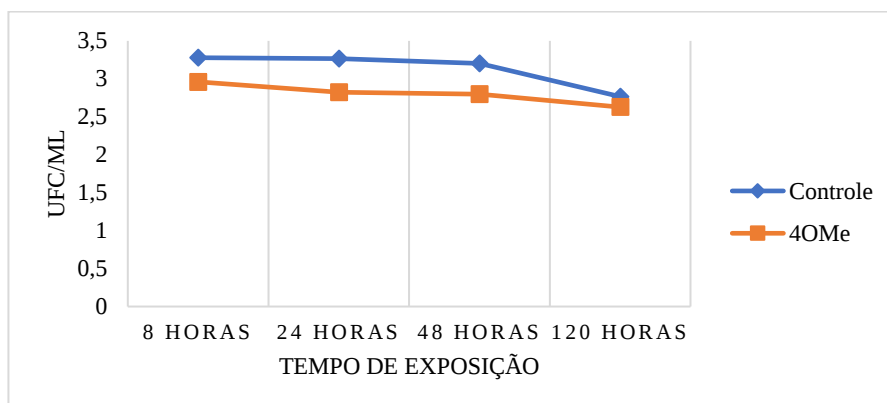
SORBITOL – CIM (µg/mL)				
TRCBS	RPMI Suplementado		RPMI sem suplementação	
	caspofungina	JA-4OMe	caspofungina	A-4OMe
	4	>62,5	0,5	7,8

Como controle para avaliar a eficácia do teste, utilizamos a caspofungina, fármaco que tem como alvo molecular este protetor osmótico. Na ausência de sorbitol o valor da CIM foi 0,5 µg/mL, ao suplementar o meio, ocorreu uma alteração aumentando esse valor em oito vezes (CIM=4 µg/mL).

2.5 Ensaio de tempo de morte de *Trichophyton rubrum* exposto a metochalcona

Avaliamos a influência do tempo de morte por um período de 120 h, pela exposição do fungo à metoxichalcona **JA-4OMe** (Figura 2) na concentração de 125 µg/mL, valor quatro vezes a CIM. Um gráfico foi traçado entre o número logarítmico de UFC/mL e o tempo de redução.

Figura 2. Curva do tempo de morte de *Trichophyton rubrum* CBS118892 na presença de 125 µg/mL de **JA-4OMe**



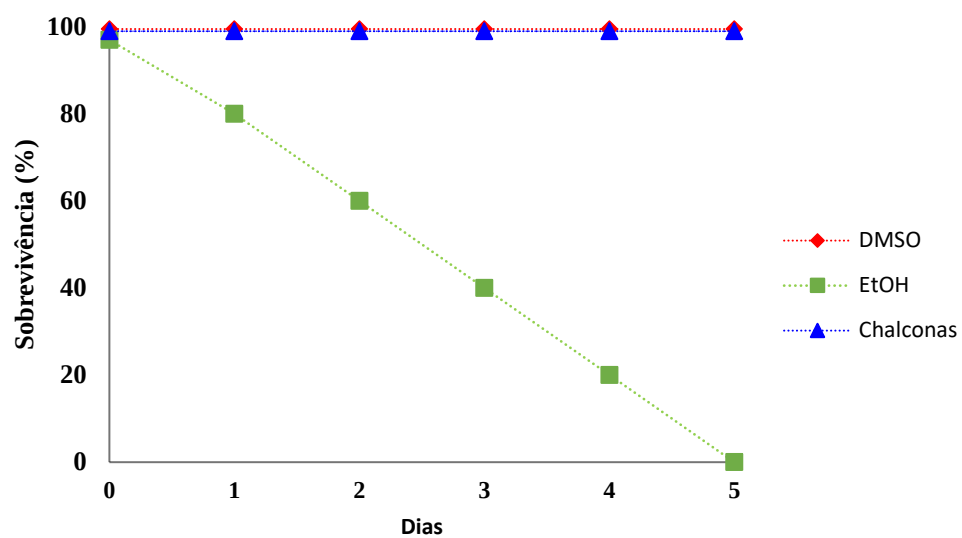
O tempo de morte pode variar em decorrência a susceptibilidade do fungo ao composto. Estudos de tempo de morte pela exposição a um fármaco proporciona informações para mostrar qual a tolerância de um organismo ao agente antifúngico (MONK; GOFFEAU, 2008). A partir de 8 h de exposição observou uma redução do número de UFC ao comparar com o controle de crescimento, contudo após 120h não se observou a redução máxima de UFC/mL para cepas de *T. rubrum*.

2.6 Ensaio de toxicidade contra larvas de *Galleria mellonella*

A avaliação inicial da toxicidade da metoxichalcona **JA-4OMe** foi realizada utilizando o modelo alternativo com larvas *Galleria mellonella*. O uso do modelo com *G. mellonella* tem sido bem confiável pelas semelhanças com a resposta imunológica dos mamíferos, apresentando hematócitos larvais semelhantes aos fagócitos que liberam proteínas semelhantes aos anticorpos de mamíferos (SHEEHAN; KAVANAGH, 2018; IGNASIAK; MAXWELL, 2017; COOK; MCARTHUR, 2013; BRENNAN ET AL., 2002).

Para este experimento, foi injetado o composto **JA-4OMe** e teve a sua viabilidade avaliada por 120 horas. As larvas de *G. mellonella* sobreviveram demonstrando que este composto não é tóxico para este organismo. (Figura 3).

Figura 3. Representação gráfica do teste de toxicidade da metoxichalcona **JA-4OMe** contra larvas de *Galleria mellonella*



3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse estudo visou o planejamento, a síntese e caracterização da atividade antidermatofítica de **JA-4OMe**, bem como de análogos com anel B substituído por grupos eletrodoadores. Foram obtidos oito análogos de 2',4'-dimetoxichalconas, **com rendimentos de 30% a 96%**. A caracterização estrutural feita pela análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C confirmaram a identidade das substâncias planejadas. Podemos afirmar que até o momento, somos o primeiro grupo de pesquisa a descrever a atividade antifúngica da metochalcona (**JA-4OMe**) contra fungos dermatófitos, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. canis* e *E. floccosum*.

A avaliação da CIM contra diferentes espécies de fungos dermatófitos indicou atividade antidermatofítica ampla das metoxichalconas, destacando-se os análogos **JA-3Me** e **JA-4OMe**. Este último conhecido como metochalcona, um fármaco, o que nos motivou a prosseguir com a caracterização mais aprofundada. A combinação do composto **JA-4OMe** com antifúngicos mostrou efeito sinérgico com anfotericina B, fluconazol, terbinafina, e voriconazol com valores de ICIF de 0,2 3 0,3. Os ensaios com meio suplementado com ergosterol e sorbitol, sugere que **JA-4OMe** pode atuar tanto na parede celular quanto na membrana de *T. rubrum*. Por fim, o teste de toxicidade *in vivo* contra as larvas de *G. mellonella* mostrou que **JA-4OMe** não foi tóxica quando administrada a 500 $\mu\text{g/mL}$.

4. EXPERIMENTAL

4.1. Química

Item 4.1, Capítulo II, página 59

4.1.1. Síntese

A síntese das metoxichalconas foi realizada utilizando procedimento descrito no capítulo 2, item 4.1.1. Os dados de caracterização por RMN de ^1H e ^{13}C foram apresentados no Apêndice B, página 59.

4.2 Microrganismos e Cultura

Item 4.2, Capítulo II, página 60.

4.3 Avaliação da atividade antifúngica

4.3.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Item 4.4, Capítulo III, página 61.

4.3.2 Atividade sinérgica - Método de tabuleiro de xadrez

Item 4.5, Capítulo II, página 61

4.3.3 *Time-kill*

Item 4.7, Capítulo II, página 63.

4.3.4 Ensaio de toxicidade com modelo experimental *Galleria mellonella*

Item 4.9, Capítulo II, página 64

4. CONCLUSÕES GERAIS

Nessa pesquisa utilizamos a 2',4'-dimetoxichalcona como protótipo para o planejamento de análogos metoxilados de chalconas. Foram sintetizadas por meio da reação de condensação aldólica de Claisen-Schmidt, um total de 31 compostos, com rendimentos de 15 a 96%.

Os análogos foram avaliados contra fungos dermatófitos, utilizando cepas de referência e isolados clínicos de *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. canis* e *E. floccosum*. Uma triagem inicial a 31,2 µg/mL permitiu a seleção dos compostos mais ativos. Os análogos que continham substituintes eletrodoadores foram menos ativos que os análogos com substituídos por grupos eletroatratores.

A substância **JA-0** e os análogos **JA-2F** e **JA-4OMe** apresentaram efeitos promissores para a atividade antidermatofítica. Esses dois compostos, apresentaram ação sinérgica ao combiná-los com anfotericina B, terbinafina e voriconazol. A ausência de toxicidade dos compostos no modelo *in vivo*, *Galleria mellonella*, possibilita o seu uso como opções para novas abordagens terapêuticas no controle das dermatofitoses.

Através deste trabalho, foi possível verificar que os compostos chalcônicos metoxilados pode ser uma classe candidata promissora para o desenvolvimento de novos agentes antidermatofítica, pois apresentam ação de amplo espectro contra um painel de fungos dermatófitos.

REFERÊNCIAS

AL-JANABI, A. A. Dermatophytosis: Causes, clinical features, signs, and treatment. **Journal of Symptoms and Signs**, v. 3, n. 3, p. 200-3, 2014.

AL-KHIKANI, F. H. O. et al. Dermatophytosis a worldwide contiguous fungal infection: Growing challenge and few solutions. **Biomedical and Biotechnology Research Journal (BBRJ)**, v. 4, n. 2, p. 117, 2020.

AL SHEIKH, H. Epidemiology of dermatophytes in the eastern province of Saudi Arabia. *Research Journal of Microbiology*, v.4, p. 229-234, 2009.

ALSPAUGH, J. A. New Spins on Old Drugs: Enhancing Activity of Antifungals. **Cell Chemical Biology**, v. 27, n. 3, p. 255–256, 2020.

ASHBURN, T. T.; THOR, K. B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. **Nature reviews Drug discovery**, v. 3, n. 8, p. 673-683, 2004.

BAX, H. et al. The role of the time-kill kinetics assay as part of a preclinical modeling framework for assessing the activity of anti-tuberculosis drugs. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 105, p. 80-85, 2017.

BELTRAMINO R., PENENORY A., BUCETA A.M. An open-label, randomized multicenter study comparing the efficacy and safety of Cyclo 3 Fort® versus hydroxyethyl rutoside in chronic venous lymphatic insufficiency. **Angiology**, v.51, p. 535–544, 2000.

BOECK, P. et al. S. Antifungal activity and studies on mode of action of novel xanthoxylone-derived chalcones. **Archiv der Pharmazie - Chemistry in Life Sciences**, n. 338, p.87-95, 2005.

BOWMAN S.M., FREE S.J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **Bioessays**, v. 28, p. 799-808, 2006.

BURMAOGLU, S. et al. Design of potent fluoro-substituted chalcones as antimicrobial agents. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 32, n. 1, p. 490-495, 2017.

BUZZI, F. de C. et al. **Síntese de novas moléculas com potencial terapêutico: imidas cíclicas, chalconas e compostos relacionados**. (Tese) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, p. 198. 2007.

CARMONA, E. M.; LIMPER, A. H. Overview of Treatment Approaches for Fungal Infections. **Clinics in Chest Medicine**, v. 38, n. 3, p. 393–402, 2017.

CARRASCAL-CORREA, D. F.; ZULUAGA, A.; GONZÁLEZ, A. Species distribution of the main aetiologic agents causing skin dermatophytosis in Colombian patients: A 23-year experience at a Mycological Reference Center. **Mycoses**, v. 63, p. 494–499, 2020.

CEILLEY, R. I. Fungus: New Treatment Options for Toenail Onychomycosis and Tinea Pedis. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, Irvine, v.34, n.4, p. 61- 64, jun. 2015.

CHAMORRO, M.J.; HOUSE, S.A. Tinea Manuum. **In: StatPearls. StatPearls Publishing**, Treasure Island (FL), 2021. PMID: 32644474.

CHOI, Myeong A. et al. Synthesis of 2', 4'-Dimethoxychalcone Derivatives and Evaluation of Their Antitumor Activities Against Non-small Cell Lung Cancer. **YAKHAK HOEJI**, v. 60, n. 3, p. 135-140, 2016.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2008) Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Conidium-forming Filamentous Fungi, M38–A2. Wayne, PA: **CLSI**.

COSTA-ORLANDI, C. B. et al. In vitro characterization of Trichophyton rubrum and T. mentagrophytes biofilms. **Biofouling**, v. 30, n. 6, p. 719-727, 2014.

DALLA LANA, D. F. et al. Dermatofitoses: agentes etiológicos, formas clínicas, terapêutica e novas perspectivas de tratamento. **Clinical and biomedical research**, Vol. 36, n. 4, p. 230-241, 2016.

DOAN, T. N. TRAN, D. T. Synthesis, antioxidant and antimicrobial activities of a novel series of chalcones, pyrazolic chalcones, and allylic chalcones. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 2, n. 04, p. 282, 2011.

DOS SANTOS, R.M.; DIAS-SOUZA, M.V. Effectiveness of five antidandruff cosmetic formulations against planktonic cells and biofilms of dermatophytes. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.24, p. 331-337, 2015.

EKINS, S. et al. In silico repositioning of approved drugs for rare and neglected diseases. **Drug discovery today**, v. 16, n. 7-8, p. 298-310, 2011.

ELEWSKI, BE, TOSTI, A Risk Factors and Comorbidities for Onychomycosis. **The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology**, v. 11, n. 8, p. 38-42, 2015.

ESCALANTE, A. et al. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B Isolated from Phytolacca tetramera Hauman. **Journal of Natural Products**, v. 17, p. 1720-1725, 2008.

FRANCO, D.; INTEGRAL, **Vida Plena**. pelo espírito Joanna de Ângelis. Salvador. Livraria Espírita Alvorada, 2022.

FRÍAS-DE-LEÓN M. G. et al. Molecular identification of isolates of the Trichophyton mentagrophytes complex. **International Journal of Medical Sciences**, v.17, n. 1, p. 45-52, 2020.

FROTA, M.Z. M. Avaliação de métodos de extração de DNA e de identificação de dermatófitos por análise de PCR-RFLP. 2011. 94 f. **Tese** (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2011.

- FUENTEFRI, A., et al. Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance. **Letters in Applied Microbiology**, v. 66, p. 2–13, 2017.
- GARCIA, A. R. et al. Identification of chalcone derivatives as inhibitors of *Leishmania infantum* arginase and promising antileishmanial agents. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, p. 624-678, 2021.
- GAUR, R. et al. Synthesis, antitubercular activity, and molecular modeling studies of analogues of isoliquiritigenin and liquiritigenin, bioactive components from *Glycyrrhiza glabra*. **Medicinal Chemistry Research**, v. 24, n. 9, p. 3494-3503, 2015.
- GAUR, R. et al. In vivo anti-diabetic activity of derivatives of isoliquiritigenin and liquiritigenin. **Phytomedicine**, v. 21, n. 4, p. 415-422, 2014.
- GEISSEL, B. et al. Azole-induced cell wall carbohydrate patches kill *Aspergillus fumigatus*. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2018.
- GNAT, S., ŁAGOWSKI, D., & NOWAKIEWICZ, A. Major challenges and perspectives in the diagnostics and treatment of dermatophyte infections. **Journal of Applied Microbiology**, n.129, v. 2, p.212-232, 2020.
- GNAT S., NOWAKIEWICZ A., ZIEZBA, P. Taxonomy of dermatophytes – the classification systems may change but the identification problems remain the same. **Advancements of Microbiology – Postępy Mikrobiolog II**, v.58, n.1, p. 49-58, 2019.
- GOMES, M. N. et al. Chalcone derivatives: promising starting points for drug design. **Molecules**, v. 22, n. 8, p. 1210, 2017.
- HAVLICKOVA B, CZAİKA V, FRIEDRICH M. 2009. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. **Mycoses**, v.51, p. 2-15, 2009.
- HSIEH, A. et al. A new mutation in the SQLE gene of *Trichophyton mentagrophytes* associated to terbinafine resistance in a couple with disseminated tinea corporis. **Journal de mycologie medicale**, v. 29, n. 4, p. 352-355, 2019.
- HIGUCHI K., et al. Sofalcone, a gastroprotective drug, promotes gastric ulcer healing following eradication therapy for *Helicobacter pylori*: A randomized controlled comparative trial with cimetidine, an H2-receptor antagonist. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 25, p. 155–160, 2010.
- HOOG et al. Toward a Novel Multilocus Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes. **Mycopathologia**, v.182, n. 1-2, p. 5-31, 2017.
- IGNASIAK, K.; MAXWELL, A. *Galleria mellonella* (greater wax moth) larvae as a model for antibiotic susceptibility testing and acute toxicity trials. **BMC Res Notes**, v.10, p. 428, 2017.
- ILYAS, M.; SHARMA, A. Cutaneous fungal infections in solid organ transplant recipients. **Transplantation Reviews**, v. 31, n. 3, p. 158-165, 2017.

- JIN, Yong-Sheng. Recent advances in natural antifungal flavonoids and their derivatives. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 29, n. 19, p. 126589, 2019.
- KANG, L. et al. Structure–activity relationship investigation of coumarin–chalcone hybrids with diverse side-chains as acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors. **Molecular diversity**, v. 22, n. 4, p. 893-906, 2018.
- KAVERI, M.V. et al. Synthesis and spectral studies of $\text{RuCl}(\text{CO})(\text{L})(\text{PPh}_3)(\text{B})$ ($\text{HL}=2'$ -hydroxychalcones and $\text{B}=\text{PPh}_3$, pyridine or piperidine) and their catalytic and biological applications. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.61, p. 2915-2918, 2005.
- KHEDMATI, E. et al. Identification of subtilisin virulence genes (SUB1-7) in *Epidermophyton floccosum* isolated from patients with dermatophytosis in Iran. **Gene Reports**, v. 20, p. 100748, 2020.
- KHURANA, A.; SARDANA, K.; CHOWDHARY, A. Antifungal resistance in dermatophytes: Recent trends and therapeutic implications. **Fungal Genetics and Biology**, v. 132, p. 103255, 2019.
- KIM, Y.S. et al. Methoxychalcone inhibitors of androgen receptor translocation and function. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 22, n. 5, p. 2105-2109, 2012.
- KLEPSE Michael et al. Influence of Test Conditions on Antifungal Time-Kill Curve Results: Proposal for Standardized Methods. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 42, p. 1207–1212, 1998.
- KUCEROVA-CHLUPACOVA, Marta et al. Novel pyrazine analogs of chalcones: synthesis and evaluation of their antifungal and antimycobacterial activity. **Molecules**, v. 20, n. 1, p. 1104-1117, 2015.
- KUMAR, S.N., et al. Activity and synergistic interactions of 384stilbenes and antibiotic combinations against bacteria in vitro. *World J Microbiol* 385Biotechnol. 2012; 28: 3143–3150
- LAHTCHEV, K. L. et al. Antifungal activity of chalcones: A mechanistic study using various yeast strains. **European journal of medicinal chemistry**, v. 43, n. 10, p. 2220-2228, 2008.
- LEMES, T. H. et al. *In vitro* antifungal activity of *Candida* culture extracts against *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. **Brazilian Journal of Case Reports**, v. 1, n. 4, p. 135 – 152, 2021.
- LEON-GONZALEZ, Antonio et al. Chalcones as promising lead compounds on cancer therapy. **Current medicinal chemistry**, v. 22, n. 30, p. 3407-3425, 2015.
- LEWIS, R. E. Current concepts in antifungal pharmacology. *Mayo Clin Proc*, v.86, n. 8, p. 805-817, 2011.

LLADÓ, D. C., Arias, L. F., Mendoza, I. A., Bonifaz, A. (2016). La onicomycosis y su influencia en la calidad de vida: Onychomycosis and its Influence on Quality of Life. *Dermatología Cosmética, médica y Quirúrgica* 14, 318–327.

LÓPEZ, S. N et al. *In vitro* antifungal evaluation and structure–activity relationships of a new series of chalcone derivatives and synthetic analogues, with inhibitory properties against polymers of the fungal cell wall. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 9, p.1999–2013, 2001.

LOPES, G.; PINTO, E.; SALGUEIRO, L. Natural products: an alternative to conventional therapy for dermatophytosis? **Mycopathologia**, v. 182, n. 1-2, p. 143-167, 2017.

MAHAPATRA, D. K.; BHARTI, S. K.; ASATI, V. Chalcone scaffolds as anti-infective agents: Structural and molecular target perspectives. **European journal of medicinal chemistry**, v. 101, p. 496-524, 2015.

MARAVALHO, I.V.S. **Síntese de chalconas e seus derivados heterocíclicos com potencial fotofísico**. (Monografia). Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília-DF, p. 45. 2019.

MARQUES, Beatriz C. et al. Methoxychalcones: effect of methoxyl group on the antifungal, antibacterial and antiproliferative activities. **Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 7, p. 881-891, 2020.

MARTINEZ-ROSSI N.M.et al. Dermatophyte resistance to antifungal drugs: mechanisms and prospectus. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1108, 2018.

MARTO, P. G.; et al.Dermatofitosis por hongos antropofilicos em Cádiz (1997–2008). **Actas Dermo-Sifiliograficas**, v.101, n.3, p.242-247, 2010.

MATOS, Maria João et al. Potential pharmacological uses of chalcones: a patent review (from June 2011–2014). **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 25, n. 3, p. 351-366, 2015.

MENDONÇA, A.M. S. et al. Synergism between Fluconazole and Terminalia catappa Extract and its Use in the Treatment of Candida-infected Tenebrio molitor Larvae. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 10, p. 78929-78950, 2020.

MERCER, D. K.; STEWART, C. S. Keratin hydrolysis by dermatophytes. **Medical Mycology**, v. 57, n. 1, p. 13-22, 2019.

MESSIER, C. et al. Inhibition of Candida albicans biofilm formation and yeast-hyphal transition by 4-hydroxycordoin. **Phytomedicine**, v. 18, n. 5, p. 380-383, 2011.

MIGUEL, F.B.; et al. Spectrochimica Acta Part A: **Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 152, 318-326, jan. 2016.

MITCHELL, G.; et al. Tomatidine acts in synergy with aminoglycoside antibiotics against multiresistant *Staphylococcus aureus* and prevents virulence gene expression. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, p. 559- 568, 2012.

MONK, B.C.; GOFFEAU A. Outwitting multidrug resistance to antifungals. **Science**, v. 321, p. 367-369, 2008.

NARWAL, S.; KUMAR, S.; VERMA, P. K. Synthesis and biological activity of new chalcone scaffolds as prospective antimicrobial agents. **Research on Chemical Intermediates**, v. 47, n. 4, p. 1625-1641, 2021.

NASCENTES, J. A. S. et al. Síntese e Avaliação de Análogos da 2',4'-Dimetoxichalcona Contra Fungos Dermatófitos. **In.:** V Simpósio de Biociências e Microbiologia, 2020.

NASCENTES, J. A. S. et al. Atividade antifúngica de metoxichalconas contra *Trichophyton rubrum*. **In.:** III Simpósio de Biociências e Microbiologia, 2018.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020.

NOSENGO N. Can you teach old drugs new tricks? **Nature**, v. 16, n. 534, p. 314-316, 2016.

NOWAKOWSKA, Zdzisława. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. **European journal of medicinal chemistry**, v. 42, n. 2, p. 125-137, 2007.

PERES, N. T. A. et al. Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 85, n. 5, p. 657-667, 2010.

PEREIRA, Thais Cristine. Recent Advances in the Use of *Galleria mellonella* Model to Study Immune Responses against Human Pathogens. **J Fungi (Basel)**, v. 27 n. 4, p. 128, 2018.

PERFECT, John R. The antifungal pipeline: a reality check. **Nature reviews Drug discovery**, v. 16, n. 9, p. 603, 2017.

RAMOS, M. A. S. et al. Syngonanthus nitens Bong.(Rhul.)-loaded nanostructured system for vulvovaginal candidiasis treatment. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 8, p. 1368, 2016.

ROBBINS, N.; CAPLAN, T.; COWEN, L. E. Molecular evolution of antifungal drug resistance. **Annual review of microbiology**, v. 71, p. 753-775, 2017.

ROCHA D, VIEIRA F.A.S. Levantamento epidemiológico de infecções fúngicas de pacientes atendidos em um laboratório da região do Vale dos Sinos, RS. **NewsLab: a revista do Laboratório Moderno**2014;121:100-8.

ROSEN, T. et al. Onychomycosis: epidemiology, diagnosis, and treatment in a changing landscape. **Journal of Drugs in Dermatology: JDD**, v. 14, n. 3, p. 223– 33, 2015.

ROTTA, I. et al. Eficácia de antifúngicos tópicos em diferentes dermatomicoses: uma revisão sistemática com metanálise. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 3, p. 308-318, 2012.

RUPARELIA, K. C. et al. The synthesis of chalcones as anticancer prodrugs and their bioactivation in CYP1 expressing breast cancer cells. **Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 4, p. 322-332, 2018.

SAHOOS, A.K.; MAHAJAN R. Management of tinea corporis, tinea cruris, and tinea pedis: A comprehensive review. **Indian Dermatol Online**, v. 7, p.77-86, 2016.

SAINI, M. S. et al. A review: biological significances of heterocyclic compounds. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 4, n. 3, p. 66-77, 2013.

SARDANA K., ARORA P., MAHAJAN K. Intracutaneous pharmacokinetics of oral antifungals and their relevance in recalcitrant cutaneous dermatophytosis: Time to revisit basics. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology.**, v.83, p.730-732, 2017.

SARDI, J. C. et al. Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. Pt 1, p. 10-24, Jan 2013. ISSN 1473-5644 (Electronic) 0022-2615 (Linking)

SANTOS, M. B. et al. Antiproliferative activity and p53 upregulation effects of chalcones on human breast cancer cells. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 34, n. 1, p. 1093-1099, 2019.

SANTOS, Mariana B. et al. Antiproliferative and pro-apoptotic activities of 2'-and 4'-aminochalcones against tumor canine cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 138, p. 884-889, 2017.

SCORZONI, L. et al. Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n.36, 2017.

SHARMA, M., et al. Antifungal curcumin induces reactive oxygen species and triggers an early apoptosis but prevents hyphae development by targeting the global repressor TUP1 in *Candida albicans*. **Bioscience Reports**, v. 30, p.391–404, 2010.

SHABAA, R. A. H. Microbial study of *Trichophyton rubrum* isolated from various Tinea infections. **EurAsian Journal of BioSciences**, v. 14, n. 2, p. 2553-2558, 2020.

SHALABY M.F., EL-DIN, EL-HAMD, M.A. Isolation, Identification, and In Vitro Antifungal Susceptibility Testing of Dermatophytes from Clinical Samples at Sohag University Hospital in Egypt. **Electron Physician**, v. 8, p. 2557–67, 2016.

SHEEHAN G, KAVANAGH K. Analysis of the early cellular and humoral responses of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*. **Virulence**, v. 9, p.163, 2018.

- SIDRIM, J.J.C.; MOREIRA, J. L. B. Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica. **In: Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica.** p. 287-287, 1999.
- SINHA, S. et al. In vitro anti-malarial efficacy of chalcones: cytotoxicity profile, mechanism of action and their effect on erythrocytes. **Malaria Journal**, v. 18, n. 1, p. 1-11, 2019.
- SINGH, A. et al. High terbinafine resistance in *Trichophyton interdigitale* isolates in Delhi, India harbouring mutations in the squalene epoxidase gene. **Mycoses**, v. 61, n. 7, p. 477-484, 2018.
- SILVA, E. S. et al. Clinical aspects of the incident of dermatophytoses in the State of Sergipe, Brazil. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, 2021.
- SIVAKUMAR, P. M.; MUTHU KUMAR, T.; DOBLE, M.. Antifungal activity, mechanism and QSAR studies on chalcones. **Chemical biology & drug design**, v. 74, n. 1, p. 68-79, 2009.
- TAINWALA R, SHARMA Y. Pathogenesis of dermatophytoses. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v.56, p.259-261, 2011.
- THILLAINAYAGAM, M. et al. In silico analysis reveals the anti-malarial potential of quinolinyl chalcone derivatives. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 33, n. 5, p. 961-977, 2015.
- THOMPSON, G. R.; CADENA, J.; PATTERSON, T. F. Overview of antifungal agents. **Clinics in chest medicine**, v. 30, n. 2, p. 203-215, 2009.
- TOSTI, A.; ELEWSKI, B. E. Onychomycosis: practical approaches to minimize relapse and recurrence. **Skin appendage disorders**, v. 2, n. 1-2, p. 83-87, 2016.
- VEASEY, J.V. et al. Epidemiological profile of tinea capitis in São Paulo City. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 92, n. 2, p. 283-284, 2017.
- VENTURA, T. L. B. et al. Antimycobacterial and anti-inflammatory activities of substituted chalcones focusing on an anti-tuberculosis dual treatment approach. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 8072-8093, 2015.
- VERMOUT, S. et al. Pathogenesis of dermatophytosis. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5, p. 267-275, 2008.
- VILAR, S.; SANTANA, L.; URIARTE, E. Probabilistic neural network model for the in silico evaluation of anti-HIV activity and mechanism of action. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 1118-1124, 2006.
- VLAHOVIC, T.C. Onychomycosis. **Clinics in Podiatric Medicine and Surgery**, v. 33, p. 305-318, 2016.

WANG Y-H, et al. The synthesis and synergistic antifungal effects of chalcones against drug resistant *Candida albicans*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, p. 3098–3102, 2016.

WIEDERHOLD, Nathan P. The antifungal arsenal: alternative drugs and future targets. **International journal of antimicrobial agents**, v. 51, n. 3, p. 333-339, 2018.

WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R. C. The dermatophytes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 2, p. 240-259, 1995.

YADAV, Neesha et al. Antimalarial activity of newly synthesized chalcone derivatives in vitro. **Chemical biology & drug design**, v. 80, n. 2, p. 340-347, 2012.

YAEGHOOBI, M. et al. QSAR, in silico docking and in vitro evaluation of chalcone derivatives as potential inhibitors for H1N1 virus neuraminidase. **Medicinal Chemistry Research**, v. 25, n. 10, p. 2133-2142, 2016.

YOSHIKAWA, F.S.Y. **A participação dos receptores da imunidade inata na resposta contra *Trichophyton rubrum***. 2016. 202f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

ZHUANG, Chunlin et al. Chalcone: a privileged structure in medicinal chemistry. **Chemical reviews**, v. 117, n. 12, p. 7762-7810, 2017.

APÊNDICE A: MATERIAL COMPLEMENTAR DO CAPÍTULO II [artigo 1]**Síntese e atividade antidermatofítica de 2',4-dimetoxichalcona e análogos**

Julyanna Andrade S. Nascentes¹, Leticia Ribeiro de Assis¹, Natalia Seron Brizzotti²,
Thiago Henrique Lemes¹, Miguel Divino da Rosa¹, Anelise Assumpção Rondinni¹,
Maria Beatriz Silva Costa; Reinaldo dos Santos Theodoro¹, Álvaro Luiz Helena¹,
Eduarda Cardoso da Silva¹, Margarete Teresa Gottardo de Almeida², Luis Octavio
Regasini^{1*}

¹ Departamento de Química e Ciências Ambientais, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade+ Estadual Paulista (Unesp), Rua Cristóvão Colombo, 2265 - Jardim Nazareth - São José do Rio Preto/SP - CEP 15054-000, SP, Brasil.

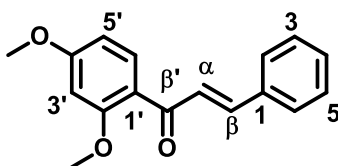
² Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (Famerp), Brasil. Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416 - Vila 12 São Pedro, São José do Rio Preto - SP, 15090-000.

* Autor correspondente, e-mail: luis.regasini@unesp.br

Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos, IBILCE - UNESP, São José do Rio Preto
Tel.: +55 17 3221-2362

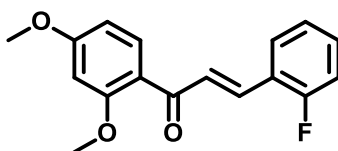
1. Análises de Ressonância Magnética Nuclear

1.1 Chalcona JA-0



Os dados de caracterização foram reportados por Santos et al (2019).

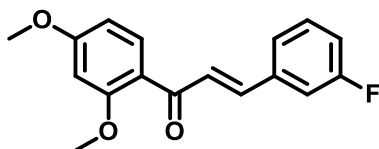
1.2 Chalcona JA-2F



Pó amarelo; rendimento: 15%, ponto de fusão (PF): 217,0 °C, pureza (HPLC): 92%.

RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz): δ 3,93 (s, 3H, 2'-OCH₃), 3,90 (s, 3H, 4'-OCH₃), 6,52 (d, J = 2,3 Hz, H-3'), 6,60 (dd, J = 2,3 e 8,6 Hz, H-5'), 7,11–7,14 (m, H-3), 7,18–7,20 (m, H-5), 7,35–7,38 (m, H-4), 7,62–7,65 (m, H-6), 7,65 (d, J = 16,0 Hz, H- α), 7,81 (d, J = 8,6 Hz, H-6'), 7,81 (d, J = 16,0 Hz, H- β). **RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 150 MHz):** δ 55,57 (4'-OCH₃), 55,71 (2'-OCH₃), 98,64 (C-3'), 105,3 (C-5'), 116,2 (d, J = 22 Hz, C-3), 122,0 (C-1'), 123,6 (d, J = 11,7 Hz, C-1), 124,4 (d, J = 3,5 Hz, C-5), 129,5 (d, J = 3,5 Hz, C- α), 129,7 (d, J = 6,8 Hz, C-6), 131,2 (d, J = 8,7 Hz, C-3), 133,0 (C-6'), 134,5 (d, J = 2,2 Hz, C- β), 161,6 (d, J = 253,8 Hz, C-2), 160,6 (C-4'), 164,4 (C-2'), 190,3 (C- β).

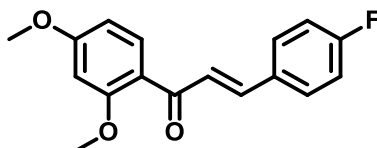
Chalcona JA-3F



Pó amarelo; rendimento: 84%, PF: 85°C, pureza (HPLC): 91%. **RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz):** δ : 3,90 (s, 3H, 4'-OCH₃), 3,94 (s, 3H, 2'-OCH₃), 6,52 (d, J = 2,3 Hz, H-3'), 6,59 (dd, J = 2,3 e 8,6 Hz, H-5'), 7,07–7,10 (m, H-4), 7,30–7,32 (m, H-6), 7,35–7,40 (m, H-2 e H-5), 7,54 (d, J = 15,8 Hz, H- α), 7,65 (d, J = 15,8 Hz, H- β), 7,80 (d, J = 8,6 Hz, H-

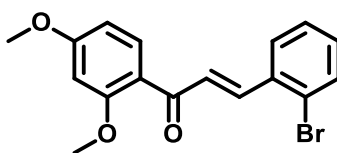
6'). **RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 150 MHz):** δ 55,58 (4'-OCH₃), 55,79 (2'-OCH₃), 98,63 (C-3'), 105,4 (C-5'), 114,0 (d, J = 21,8 Hz, C-2), 116,2 (d, J = 8,3 Hz, C-5), 121,9 (C-1'), 124,4 (d, J = 2,7 Hz, C-6), 128,4 (C- α), 133,1 (C-6'), 137,9 (d, J = 7,7 Hz, C-1), 140,3 (d, J = 2,7 Hz, C- β), 160,6 (C-4'), 163,0 (d, J = 246,1 Hz, C-3), 164,5 (C-2'), 190,0 (C- β').

Chalcona JA-4F

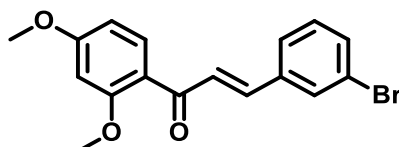


Pó amarelo; rendimento: 83%, PF: 90 °C, pureza (HPLC): 96%. **RMN ^1H (CDCl_3 , 600 MHz):** δ 3,89 (s, 3H, 4'-OCH₃), 3,93 (s, 3H, 2'-OCH₃), 6,52 (d, J = 2,3 Hz, H-3'), 6,59 (dd, J = 2,3 e 8,6 Hz, H-5'), 7,10 (dd, J = 8,6 e 8,6 Hz, H-3 e H-5), 7,47 (d, J = 15,8 Hz, H- α), 7,60 (dd, J = 5,3 e 8,6 Hz, H-2 e H-6), 7,66 (d, J = 15,8 Hz, H- β), 7,79 (d, J = 8,6 Hz, H-6'). **RMN ^{13}C (CDCl_3 , 150 MHz):** δ 55,57 (4'-OCH₃), 55,77 (2'-OCH₃), 98,66 (C-3'), 105,3 (C-5'), 115,9 (d, J = 21,9 Hz, C-3 e C-5), 122,1 (C-1'), 126,9 (C- α), 130,1 (d, J = 8,4 Hz, C-2 e C-6), 131,7 (d, J = 3,3 Hz, C-1), 132,9 (C-6'), 140,7 (C- β), 160,4 (C-4'), 163,7 (d, J = 250,8 Hz, C-4), 164,3 (C-2'), 190,3 (C- β').

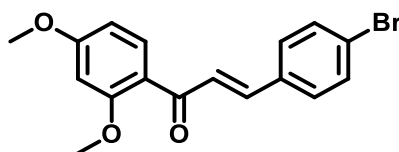
Chalcona JA-2Br



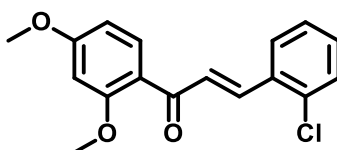
Pó amarelo; rendimento: 84%, PF: 95 °C, pureza (HPLC): 96%. **RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz):** δ 3,90 (s, 3H, 4'-OCH₃), 3,92 (s, 3H, 2'-OCH₃), 6,52 (d, J = 2,3 Hz, H-3'), 6,60 (dd, J = 2,3 e 8,6 Hz, H-5'), 7,23 (ddd, J = 1,6, 7,3 e 8,0 Hz, H-5), 7,36 (ddd, J = 1,2, 7,8 e 8,0 Hz, H-4), 7,46 (d, J = 15,7 Hz, H- α), 7,64 (dd, J = 1,2 e 8,0 Hz, H-6), 7,71 (dd, J = 1,6 e 7,8 Hz, H-3), 7,80 (d, J = 8,6 Hz, H-6'), 8,02 (d, J = 15,7 Hz, H- β). **RMN ^{13}C (CDCl_3 , 150 MHz):** δ 55,59 (4'-OCH₃), 55,77 (2'-OCH₃), 98,61 (C-3'), 105,2 (C-5'), 121,9 (C-1'), 125,8 (C-2), 127,6 (C- α), 127,8 (C-5), 129,8 (C-4), 130,8 (C-6), 133,4 (C-3), 135,6 (C-1), 140,3 (C- β), 160,5 (C-4'), 164,5 (C-2'), 190,3 (C- β').

Chalcona JA-3Br

Pó amarelo; rendimento: 90%, PF: 95°C, pureza (HPLC): 95%. **RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz):** δ 3,90 (s, 3H, 4'-OCH₃), 3,94 (s, 3H, 2'-OCH₃), 6,52 (d, J = 2,3 Hz, H-3'), 6,59 (dd, J = 2,3 e 8,6 Hz, H-5'), 7,50–7,53 (m, H-4 e H-6), 7,52 (d, J = 15,8 Hz, H- α), 7,60 (d, J = 15,8 Hz, H- β), 7,75 (dd, J = 1,6 e 1,7 Hz, H-2), 7,79 (d, J = 8,6 Hz, H-6'), 7,82 (dd, J = 7,0 e 8,7 Hz, H-5). **^{13}C (CDCl_3 , 150 MHz):** δ 55,59 (4'-OCH₃), 55,82 (2'-OCH₃), 98,63 (C-3'), 105,4 (C-5'), 121,9 (C-1'), 122,9 (C-3), 127,0 (C- α), 128,4 (C-6), 130,3 (C-2), 130,8 (C-5), 132,6 (C-4), 137,7 (C-1), 140,0 (C- β), 160,6 (C-4'), 164,5 (C-2'), 189,9 (C- β').

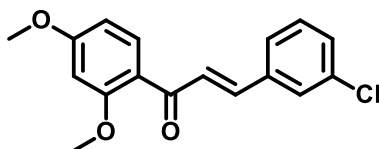
Chalcona JA-4Br

Pó amarelo; rendimento: 90%, PF: 96 °C, pureza (HPLC): 93%. **RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz):** δ 3,89 (s, 3H, 4'-OCH₃), 3,93 (s, 3H, 2'-OCH₃), 6,52 (d, J = 2,3 Hz, H-3'), 6,59 (dd, J = 2,3 e 8,6 Hz, H-5'), 7,53 (d, J = 15,7 Hz, H- α), 7,47 (d, J = 8,4 Hz, H-3 e H-5), 7,54 (d, J = 8,4 Hz, H-2 e H-6), 7,62 (d, J = 15,7 Hz, H- β), 7,79 (d, J = 8,6 Hz, H-6'). **RMN ^{13}C (CDCl_3 , 150 MHz):** δ 55,59 (4'-OCH₃), 55,79 (2'-OCH₃), 98,66 (C-3'), 105,3 (C-5'), 122,0 (C-1'), 124,1 (C-4), 127,8 (C- α), 129,7 (C-2 e C-6), 132,1 (C-3 e C-5), 133,0 (C-6'), 134,5 (C-1), 140,4 (C- β), 160,5 (C-4'), 164,3 (C-2'), 190,1 (C- β').

Chalcona JA-2Cl

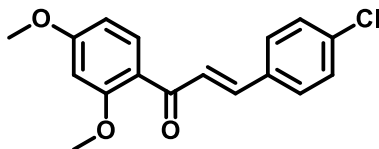
Pó amarelo; rendimento: 44%, PF: 115 °C, pureza (HPLC): 95%. **RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz):** δ 3,90 (s, 3H, 4'-OCH₃), 3,93 (s, 3H, 2'-OCH₃), 6,52 (d, J = 2,3 Hz, H-3'), 6,60 (dd, J = 2,3 e 8,6 Hz, H-5'), 7,29–7,33 (m, H-4 e H-5), 7,43–7,45 (m, H-3), 7,51 (d, J = 15,8 Hz, H- α), 7,71 (m, H-6), 7,80 (d, J = 8,6 Hz, H-6'), 8,07 (d, J = 15,8 Hz, H- β). **RMN ^{13}C (CDCl_3 , 150 MHz):** δ 55,59 (4'-OCH₃), 55,75 (2'-OCH₃), 98,61 (C-3'), 105,3 (C-5'), 121,9 (C-1'), 135,3 (C-2), 126,7 (C- α), 129,6 (C-5), 127,7 (C-4), 129,6 (C-6), 130,6 (C-3), 133,1 (C-6'), 133,8 (C-1), 137,7 (C- β), 160,5 (C-4'), 164,4 (C-2'), 190,2 (C- β).

Chalcona JA-3Cl

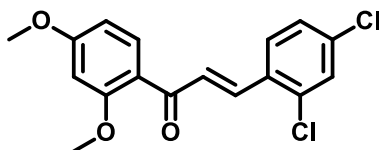


Pó amarelo; rendimento: 56%, PF: 115 °C, pureza (HPLC): 91%. **RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz):** δ 3,90 (s, 3H, 4'-OCH₃), 3,94 (s, 3H, 2'-OCH₃), 6,52 (d, J = 2,3 Hz, H-3'), 6,59 (dd, J = 2,3 e 8,6 Hz, H-5'), 7,33–7,37 (m, H-4 e H-5), 7,46–7,48 (m, H-6), 7,54 (d, J = 15,8 Hz, H- α), 7,59 (dd, J = 1,4 e 1,9 Hz, H-2), 7,62 (d, J = 15,8 Hz, H- β), 7,80 (d, J = 8,6 Hz, H-6'). **RMN ^{13}C (CDCl_3 , 150 MHz):** δ 55,58 (4'-OCH₃), 55,80 (2'-OCH₃), 98,61 (C-3'), 105,4 (C-5'), 121,9 (C-1'), 126,6 (C- α), 128,4 (C-6), 127,8 (C-2), 130,1 (C-5), 129,7 (C-4), 134,8 (C-3), 137,4 (C-1), 140,0 (C- β), 160,6 (C-4'), 164,5 (C-2'), 189,9 (C- β).

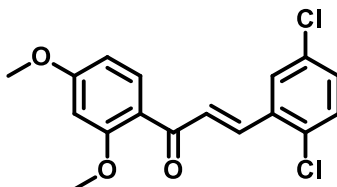
Chalcona JA-4Cl



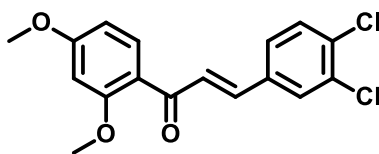
Pó amarelo; rendimento: 86%, PF: 110 °C, pureza (HPLC): 93%. **RMN ^1H (CDCl_3 , 600 MHz):** δ 3,90 (s, 3H, 4'-OCH₃), 3,94 (s, 3H, 2'-OCH₃), 6,53 (d, J = 2,2 Hz, H-3'), 6,60 (dd, J = 2,2 e 8,6 Hz, H-5'), 7,39 (d, J = 8,5 Hz, H-3 e H-5), 7,53 (d, J = 15,8 Hz, H- α), 7,54 (d, J = 8,5 Hz, H-2 e H-6), 7,65 (d, J = 15,8 Hz, H- β), 7,80 (d, J = 8,6 Hz, H-6').

Chalcona JA-2,4Cl

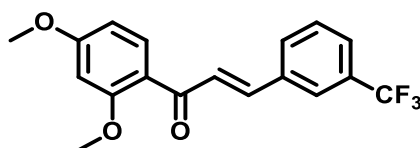
Pó amarelo; rendimento: 93%, PF: 140 °C, pureza (HPLC): 92%. **JA-2,4Cl. RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz):** δ 3,90 (s, 3H, 4'-OCH₃), 3,92 (s, 3H, 2'-OCH₃), 6,52 (d, *J* = 2,3 Hz, H-3'), 6,60 (dd, *J* = 2,2 e 8,6 Hz, H-5'), 7,29 (dd, *J* = 2,0 e 8,5 Hz, H-5), 7,46 (d, *J* = 2,0 Hz, H-3), 7,50 (d, *J* = 15,8 Hz, H-α), 7,65 (d, *J* = 8,5 Hz, H-6), 7,81 (d, *J* = 8,6 Hz, H-6'), 7,99 (d, *J* = 15,8 Hz, H-β). **RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz):** δ 55,60 (4'-OCH₃), 55,77 (2'-OCH₃), 98,63 (C-3'), 105,4 (C-5'), 121,8 (C-1'), 127,4 (C-5), 128,5 (C-α), 130,0 (C-6), 130,8 (C-3), 132,4 (C-1), 133,2 (C-6'), 135,8 (C-2), 135,9 (C-4), 136,4 (C-β), 160,5 (C-4'), 164,5 (C-2'), 189,8 (C-β').

Chalcona JA-2,6Cl

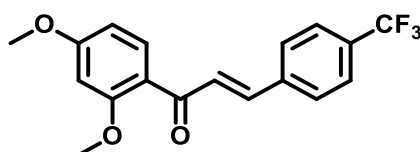
Pó amarelo; rendimento: 95%, PF: 120 °C, pureza (HPLC): 93%. **RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz):** δ 3,89 (s, 3H, 4'-OCH₃), 3,91 (s, 3H, 2'-OCH₃), 6,50 (d, *J* = 2,3 Hz, H-3'), 6,59 (dd, *J* = 2,3 e 8,7 Hz, H-5'), 7,18 (dd, *J* = 8,0 e 8,1 Hz, H-4), 7,38 (d, *J* = 8,1 Hz, H-3 e H-5), 7,70 (d, *J* = 16,1 Hz, H-α), 7,79 (d, *J* = 16,1 Hz, H-β), 7,89 (d, *J* = 8,7 Hz, H-6'). **¹³C (CDCl₃, 150 MHz):** δ 55,58 (4'-OCH₃), 55,74 (2'-OCH₃), 98,53 (C-3'), 105,4 (C-5'), 121,7 (C-1'), 128,8 (C-3 e C-5), 129,4 (C-α), 133,2 (C-1), 133,3 (C-6'), 134,9 (C-4), 135,0 (C-2 e C-6), 135,2 (C-β), 160,8 (C-4'), 164,6 (C-2'), 189,7 (C-β').

Chalcona JA-3,4Cl

Pó amarelo; rendimento: 82%, PF: 115 °C, pureza (HPLC): 95%. **RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz):** δ 3,90 (s, 3H, 4'-OCH₃), 3,94 (s, 3H, 2'-OCH₃), 6,52 (d, *J* = 2,3 Hz, H-3'), 6,59 (dd, *J* = 2,3 e 8,7 Hz, H-5'), 7,42 (dd, *J* = 2,0 e 8,3 Hz, H-6), 7,48 (d, *J* = 8,3 Hz, H-5), 7,52 (d, *J* = 15,8 Hz, H-α), 7,57 (d, *J* = 15,8 Hz, H-β), 7,68 (d, *J* = 2,0 Hz, H-2), 7,80 (d, *J* = 8,7 Hz, H-6'). **¹³C (CDCl₃, 150 MHz):** δ 55,51 (4'-OCH₃), 55,83 (2'-OCH₃), 98,63 (C-3'), 105,4 (C-5'), 121,8 (C-1'), 127,3 (C-α), 128,8 (C-5), 129,7 (C-6), 130,8 (C-2), 133,1 (C-3), 133,7 (C-4), 135,7 (C-1), 138,9 (C-β), 160,6 (C-4'), 164,5 (C-2'), 189,7 (C-β').

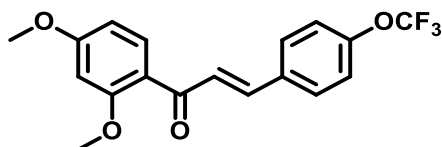
Chalcona JA-3-CF₃

Pó amarelo; rendimento: 54%, PF: 135 °C, pureza (HPLC): 92%. **RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz):** δ 3,90 (s, 3H, 4'-OCH₃), 3,94 (s, 3H, 2'-OCH₃), 6,53 (d, *J* = 2,3 Hz, H-3'), 6,60 (dd, *J* = 2,3 e 8,7 Hz, H-5'), 7,54 (dd, *J* = 7,6 e 7,7 Hz, H-5), 7,61 (d, *J* = 15,8 Hz, H-α), 7,64 (d, *J* = 7,6 Hz, H-4), 7,70 (d, *J* = 15,8 Hz, H-β), 7,77 (d, *J* = 7,7 Hz, H-6), 7,85 (s, H-2). **¹³C (CDCl₃, 150 MHz):** δ 55,59 (4'-OCH₃), 55,79 (2'-OCH₃), 98,64 (C-3'), 105,4 (C-5'), 121,8 (C-1'), 123,9 (q, *J* = 272,4 Hz, 3-CF₃), 124,6 (q, *J* = 3,8 Hz, C-2), 126,2 (q, *J* = 3,8 Hz, C-4), 128,9 (C-α), 129,4 (C-5), 131,3 (q, *J* = 32,4 Hz, C-3), 131,4 (C-6), 136,4 (C-1), 139,8 (C-β), 160,6 (C-4'), 164,5 (C-2'), 189,8 (C-β').

Chalcona JA-4CF₃

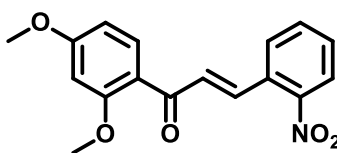
Pó amarelo; rendimento: 41%, PF: 140 °C, pureza (HPLC): 93%. **RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz):** δ 3,91 (s, 3H, 4'-OCH₃), 3,95 (s, 3H, 2'-OCH₃), 6,54 (d, *J* = 2,2 Hz, H-3'), 6,61 (dd, *J* = 2,2 e 8,6 Hz, H-5'), 7,26 (d, *J* = 8,2 Hz, H-3 e H-5), 7,63 (d, *J* = 15,8 Hz, H-α), 7,64 (d, *J* = 8,2 Hz, H-2 e H-6), 7,67 (d, *J* = 15,8 Hz, H-β), 7,81 (d, *J* = 8,6 Hz, H-6'). **RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz):** δ 55,60 (4'-OCH₃), 56,79 (2'-OCH₃), 98,64 (C-3'), 105,4 (C-5'), 121,8 (C-1'), 125,7 (q, *J* = 32,6 Hz, C-3 e C-5), 128,2 (C-1), 128,3 (C-2 e C-6), 129,4 (C-α), 133,1 (C-6'), 131,3 (q, *J* = 278 Hz, C-4), 139,7 (C-β), 160,6 (C-4'), 164,6 (C-2'), 189,8 (C-β').

Chalcona JA-4OCF₃

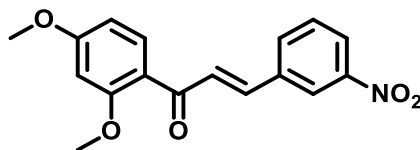


Pó amarelo; rendimento: 49%, PF: 145°C, pureza (HPLC): 93%. **RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz):** δ 3,90 (s, 3H, 4'-OCH₃), 3,94 (s, 3H, 2'-OCH₃), 6,53 (d, *J* = 2,2 Hz, H-3'), 6,60 (dd, *J* = 2,2 Hz, H-5'), 7,26 (d, *J* = 8,7 Hz, H-2 e H-6), 7,53 (d, *J* = 15,8 Hz, H-α), 7,64 (d, *J* = 8,7 Hz, H-3 e H-5), 7,67 (d, *J* = 15,8 Hz, H-β), 7,81 (d, *J* = 8,6 Hz, H-6').

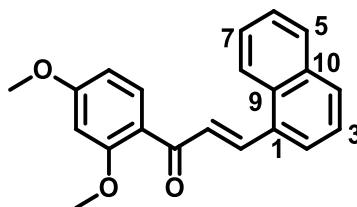
Chalcona JA-2NO₂



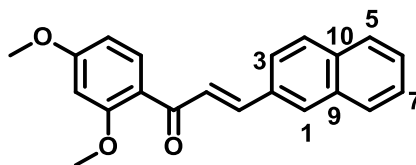
Pó laranja; rendimento: 32%, pureza (HPLC): 95%. **RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz):** δ 3,90 (s, 3H, 4'-OCH₃), 3,92 (s, 3H, 2'-OCH₃), 6,51 (d, *J* = 2,2 Hz, H-3'), 6,60 (dd, *J* = 2,2 e 8,6 Hz, H-5'), 7,33 (d, *J* = 8,6 Hz, H-6), 7,40 (d, *J* = 15,6 Hz, H-α), 7,52–7,55 (m, H-4), 7,65–7,68 (m, H-5), 7,80 (d, *J* = 8,6 Hz, H-6'), 8,01 (d, *J* = 15,6 Hz, H-β), 8,02 (dd, *J* = 0,9 e 8,1 Hz, H-3). **RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz):** δ 55,60 (4'-OCH₃), 55,75 (2'-OCH₃), 98,59 (C-3'), 105,4 (C-5'), 121,4 (C-1'), 124,8 (C-3), 129,2 (C-α), 129,8 (C-4), 131,7 (C-1), 131,9 (C-6), 133,2 (C-6'), 133,3 (C-5), 136,9 (C-β), 148,7 (C-2), 160,6 (C-4'), 164,6 (C-2'), 189,9 (C-β').

Chalcona JA-3NO₂

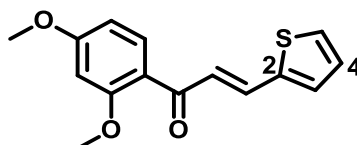
Pó amarelo; rendimento: 75%, pureza (HPLC): 92%. **RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz):** δ 3,91 (s, 3H, 4'-OCH₃), 3,96 (s, 3H, 2'-OCH₃), 6,53 (d, J = 2,2 Hz, H-3'), 6,61 (dd, J = 2,2 e 8,7 Hz, H-5'), 7,59 (dd, J = 7,9 e 8,0 Hz, H-5), 7,67 (d, J = 15,8 Hz, H- α), 7,71 (d, J = 15,6 Hz, H- β), 7,83 (d, J = 8,7 Hz, H-6'), 7,89 (ddd, J = 0,9, 1,8 e 7,9 Hz, H-6), 8,23 (ddd, J = 0,9, 2,0 e 8,0 Hz, H-4), 8,47 (dd, J = 1,8 e 2,0 Hz, H-3). **RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz):** δ 55,63 (4'-OCH₃), 55,85 (2'-OCH₃), 98,61 (C-3'), 105,5 (C-5'), 121,6 (C-1'), 122,2 (C-2), 124,1 (C-4), 129,86 (C- α), 129,9 (C-5), 133,2 (C-6'), 134,1 (C-6), 137,4 (C-1), 138,5 (C- β), 148,7 (C-3), 160,8 (C-4'), 164,8 (C-2'), 189,4 (C- β').

Chalcona JA-1Naftila

Pó amarelo; rendimento: 55%, PF: 150°C, pureza (HPLC): 94%. **RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz):** δ 3,91 (s, 3H, 4'-OCH₃), 3,96 (s, 3H, 2'-OCH₃), 6,55 (d, J = 2,3 Hz, H-3'), 6,63 (dd, J = 2,3 e 8,6 Hz, H-5'), 7,53 (dd, J = 7,0 e 8,3 Hz, H-3), 7,54–7,51 (m, 2H, H-6 e H-7), 7,64 (d, J = 15,5 Hz, H- α), 7,87 (d, J = 8,6 Hz, H-6'), 7,87 (d, J = 7,0 Hz, H-2), 7,90–7,93 (m, 2H, H-5 e H-8), 8,32 (d, J = 8,3 Hz, H-4), 8,55 (d, J = 15,6 Hz, H- β). **RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz):** δ 55,59 (4'-OCH₃), 55,79 (2'-OCH₃), 98,66 (C-3'), 105,3 (C-5'), 122,2 (C-1'), 123,8 (C-5), 125,0 (C-3), 125,5 (C-8), 126,2 (C- α), 126,7 (C-7), 128,7 (C-2), 129,9 (C-6), 130,2 (C-4), 131,8 (C-9), 133,0 (C-10), 133,1 (C-6'), 133,8 (C-1), 138,9 (C- β), 160,6 (C-4'), 164,3 (C-2'), 190,3 (C- β').

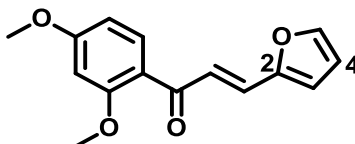
Chalcona JA-2Naftila

Pó amarelo; rendimento: 53%, PF: 160 °C, pureza (HPLC): 96%. **RMN ^1H (CDCl_3 , 600 MHz):** δ 3,91 (s, 3H, 4'-OCH₃), 3,96 (s, 3H, 2'-OCH₃), 6,55 (d, J = 2,3 Hz, H-3'), 6,63 (dd, J = 2,3 e 8,6 Hz, H-5'), 7,53–7,54 (m, 2H, H-6 e H-7), 7,66 (d, J = 15,7 Hz, H- α), 7,79 (dd, J = 1,5 e 8,5 Hz, H-3), 7,83 (d, J = 8,6 Hz, H-6'), 7,85–7,90 (m, 3H, H-4, H-5 e H-8), 7,88 (d, J = 15,7 Hz, H- β), 7,90–7,93 (m, 2H, H-5 e H-8), 8,01 (s, H-1). **RMN ^{13}C (CDCl_3 , 150 MHz):** δ 55,58 (4'-OCH₃), 55,82 (2'-OCH₃), 98,71 (C-3'), 105,2 (C-5'), 122,3 (C-1'), 128,6 (C-5), 126,6 (C-3), 130,2 (C-8), 123,8 (C- α), 127,1 (C-7), 133,0 (C-2), 127,4 (C-6), 128,6 (C-4), 133,4 (C-9), 134,2 (C-10), 132,9 (C-6'), 127,8 (C-1), 142,2 (C- β), 160,5 (C-4'), 164,2 (C-2'), 190,5 (C- β').

Chalcona JA-2Tienila

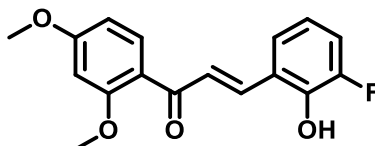
Pó amarelo; rendimento: 72%, PF: 155°C, pureza (HPLC): 95%. **RMN ^1H (CDCl_3 , 600 MHz):** δ 3,90 (s, 3H, 4'-OCH₃), 3,94 (s, 3H, 2'-OCH₃), 6,52 (d, J = 2,2 Hz, H-3'), 6,59 (dd, J = 2,3 e 8,6 Hz, H-5'), 7,09 (dd, J = 3,9 e 4,7 Hz, H-4), 7,32 (d, J = 3,9 Hz, H-5), 7,38 (d, J = 15,3 Hz, H- α), 7,39 (d, J = 4,7 Hz, H-3), 7,79 (d, J = 8,6 Hz, H-6'), 7,83 (d, J = 15,3 Hz, H- β). **RMN ^{13}C (CDCl_3 , 150 MHz):** δ 55,56 (4'-OCH₃), 55,74 (2'-OCH₃), 98,65 (C-3'), 105,2 (C-5'), 122,1 (C-1'), 131,1 (C-5), 127,9 (C-3), 126,3 (C- α), 141,1 (C-2), 128,2 (C-4), 132,9 (C-6'), 134,5 (C- β), 160,5 (C-4'), 164,2 (C-2'), 189,8 (C- β').

Chalcona JA-2furanila



Pó amarelo; rendimento: 20%, PF: 165°C, pureza (HPLC): 96%. **RMN ^1H (CDCl_3 , 600 MHz):** δ 3,88 (s, 3H, 4'-OCH₃), 3,93 (s, 3H, 2'-OCH₃), 6,51 (d, J = 2,3 Hz, H-3'), 6,58 (dd, J = 2,3 e 8,6 Hz, H-5'), 6,67 (d, J = 3,4 Hz, H-3), 6,50 (dd, J = 1,6 e 3,4 Hz, H-4), 7,44 (d, J = 15,5 Hz, H- α), 7,49 (d, J = 15,5 Hz, H- β), 7,51 (d, J = 1,6 Hz, H-5), 7,78 (d, J = 8,6 Hz, H-6'). **RMN ^{13}C (CDCl_3 , 150 MHz):** δ 55,56 (4'-OCH₃), 55,71 (2'-OCH₃), 98,61 (C-3'), 105,2 (C-5'), 112,4 (C-3), 115,1 (C-4), 122,2 (C-1'), 124,7 (C- α), 128,6 (C- β), 132,9 (C-6'), 144,4 (C-5), 152,1 (C-2), 160,5 (C-4'), 164,2 (C-2'), 189,9 (C- β').

Chalcona JA-2OH3F



Pó amarelo; rendimento: 49%, PF: 155 °C, pureza (HPLC): 97%. **RMN ^1H (CDCl_3 , 600 MHz):** δ 3,90 (s, 3H, 4'-OCH₃), 3,92 (s, 3H, 2'-OCH₃), 6,04 (sl, 2-OH), 6,52 (d, J = 2,2 Hz, H-3'), 6,59 (dd, J = 2,2 e 8,6 Hz, H-5'), 6,88 (dd, J = 8,0 e 8,7 Hz, H-3), e 7,11 (dd, J = 7,9 e 8,7 Hz, H-5), 7,36 (d, J = 7,9 Hz, H-6), 7,69 (d, J = 16,0 Hz, H- α), 7,80 (d, J = 8,6 Hz, H-6'), 7,95 (d, J = 16,0 Hz, H- β).

Figura 1a. Espectro de RMN de ^1H da chalcona JA-2F (600 MHz, CDCl_3)

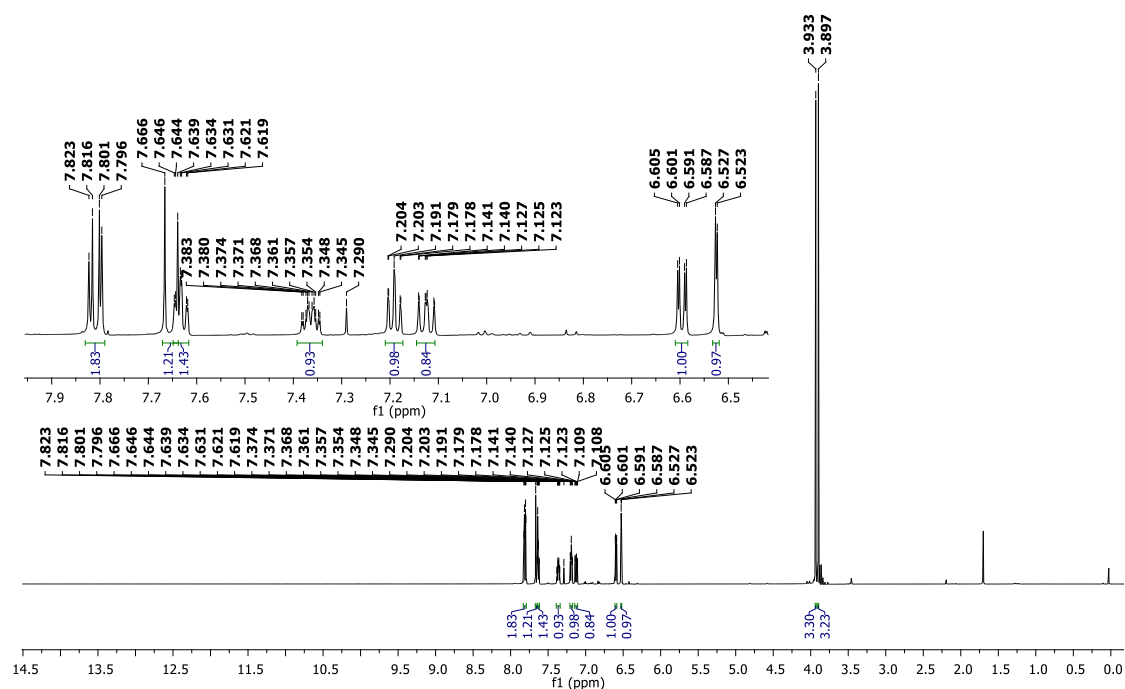


Figura 1b. Espectro de RMN de ^{13}C da chalcona JA-2F (150 MHz, CDCl_3)

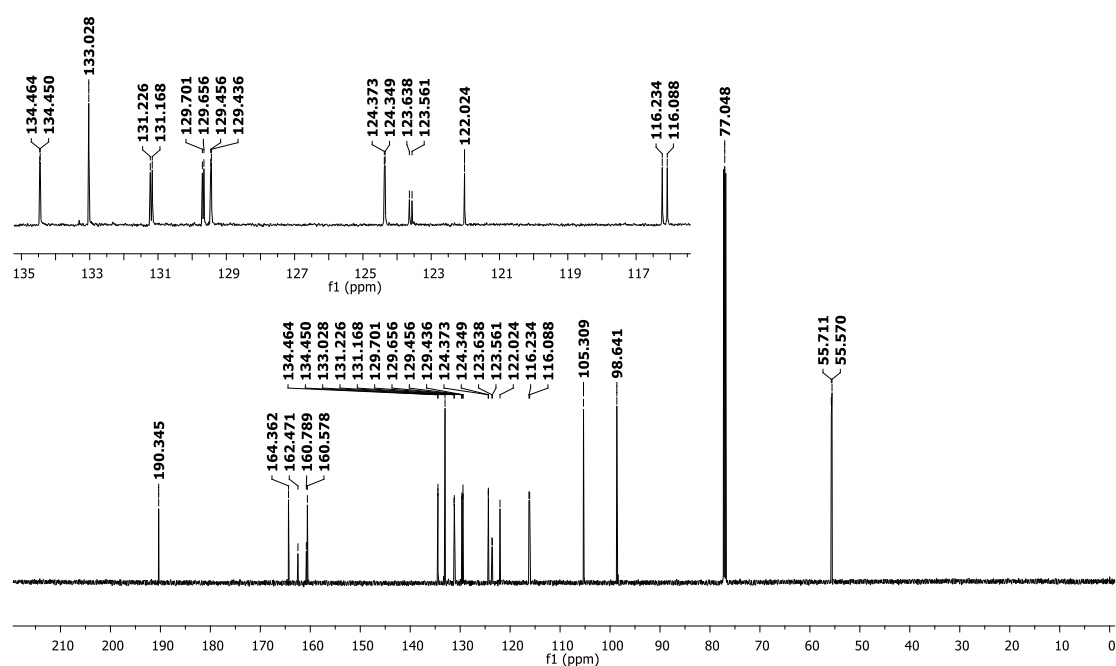


Figura 2a. Espectro de RMN de ^1H da chalcona **JA-3F** (600 MHz, CDCl_3)

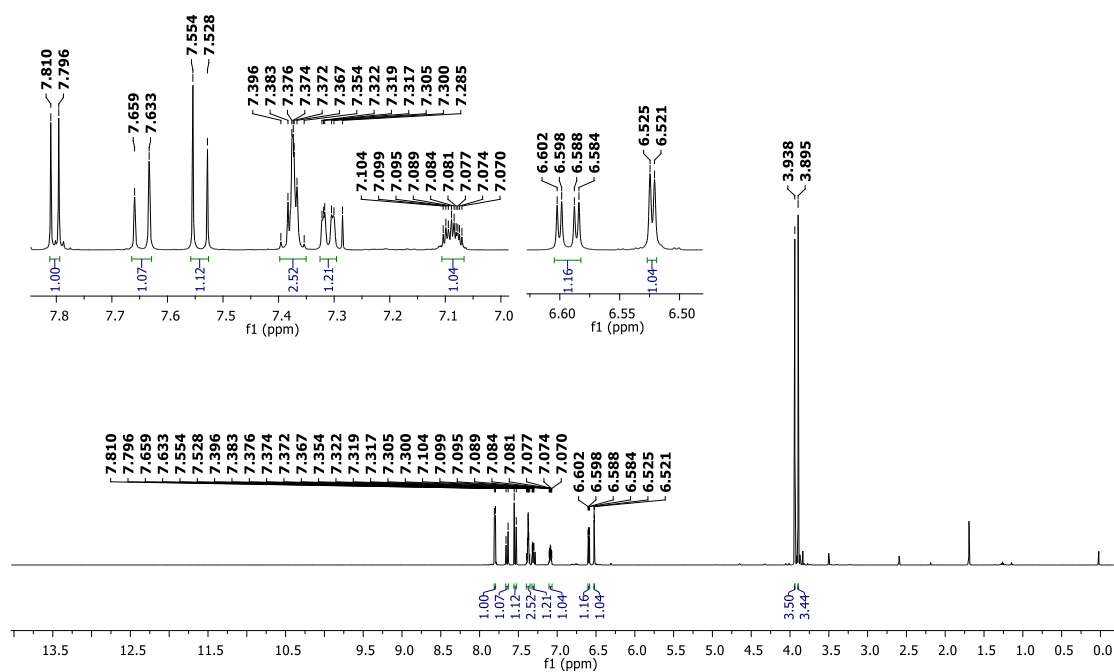


Figura 2b. Espectro de RMN de ^{13}C da chalcona **JA-3F** (150 MHz, CDCl_3)

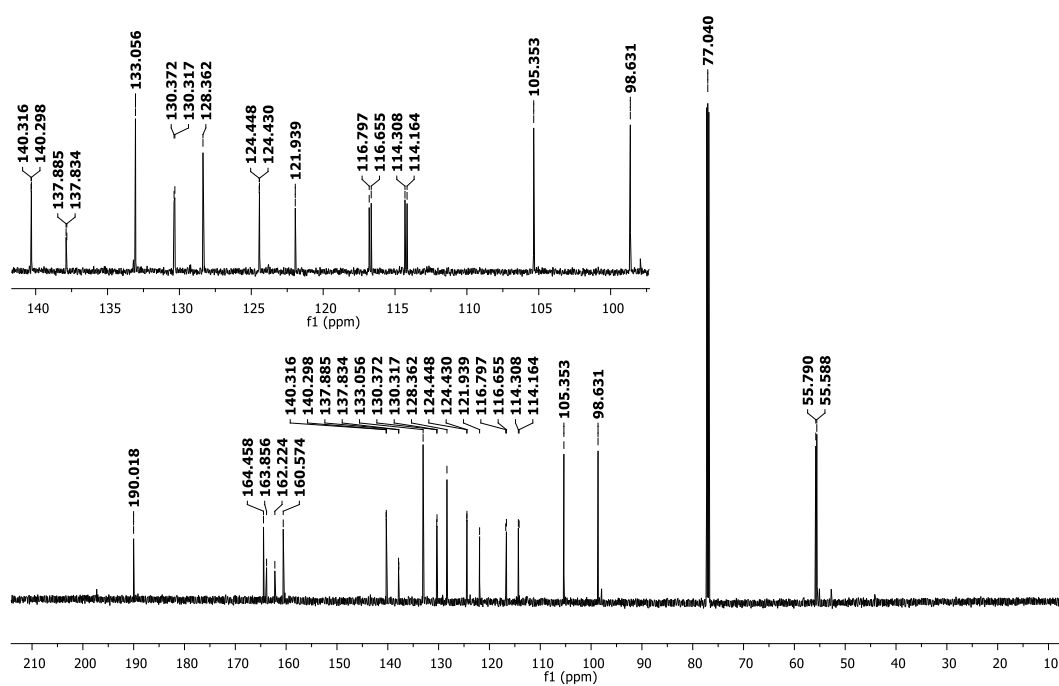


Figura 3a. Espectro de RMN de ^1H da chalcona **JA-4F** (600 MHz, CDCl_3)

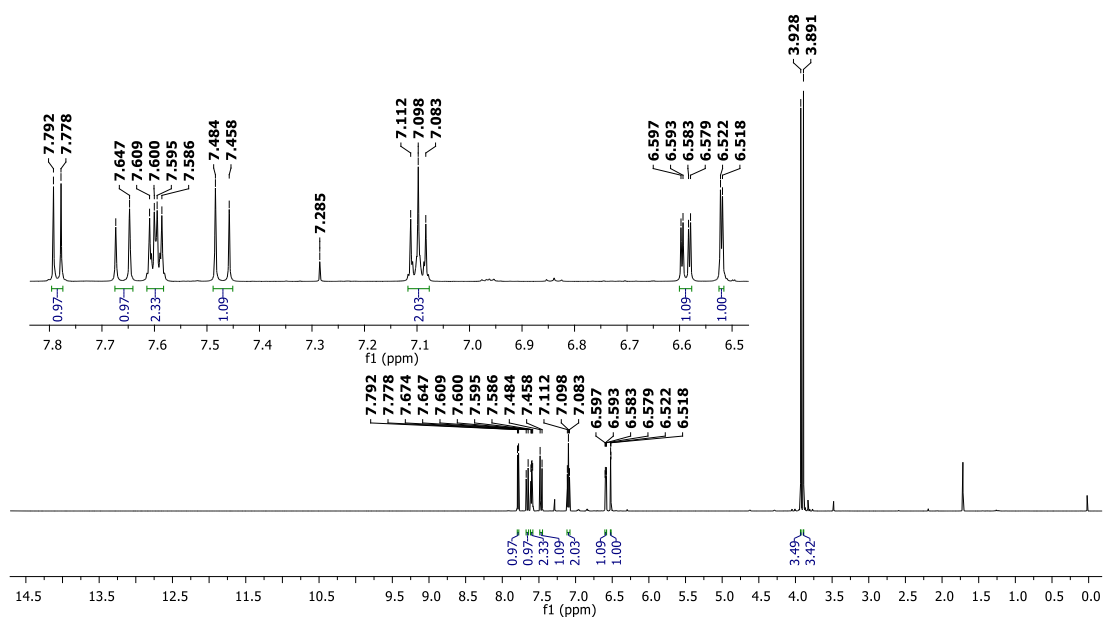


Figura 3b. Espectro de RMN de ^{13}C da chalcona **JA-4F** (150 MHz, CDCl_3)

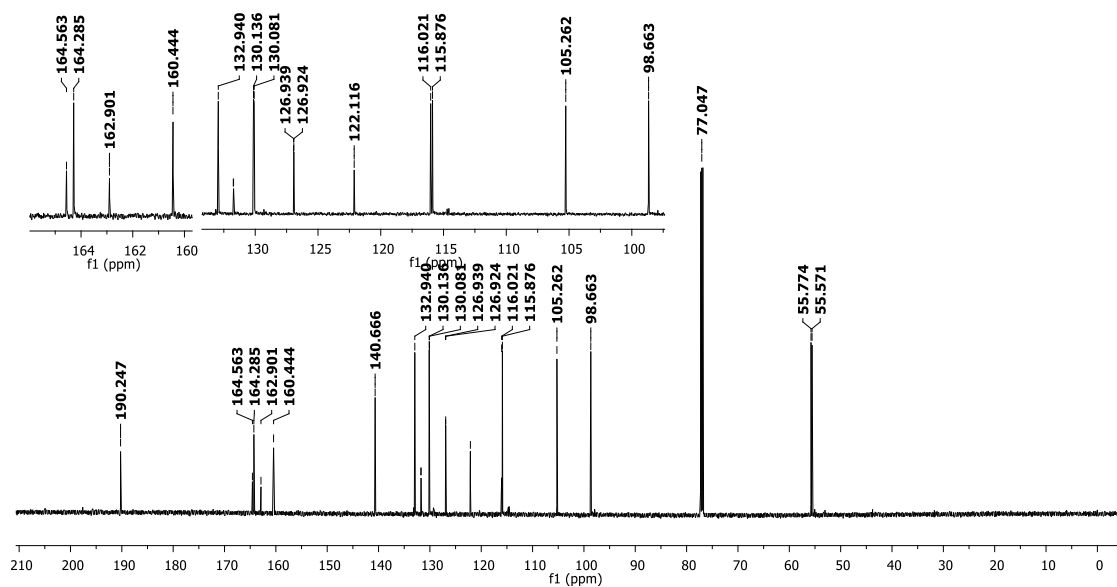


Figura 4a. Espectro de RMN de ^1H da chalcona **JA-2Br** (600 MHz, CDCl_3)

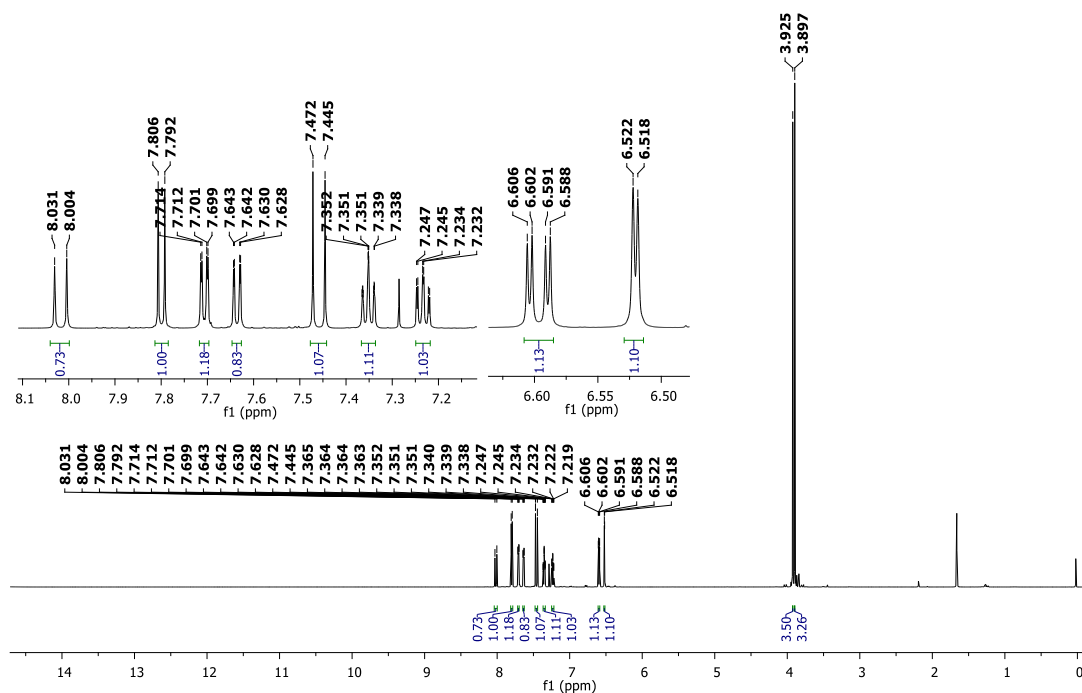


Figura 4b. Espectro de RMN de ^{13}C da chalcona **JA-2Br** (150 MHz, CDCl_3)

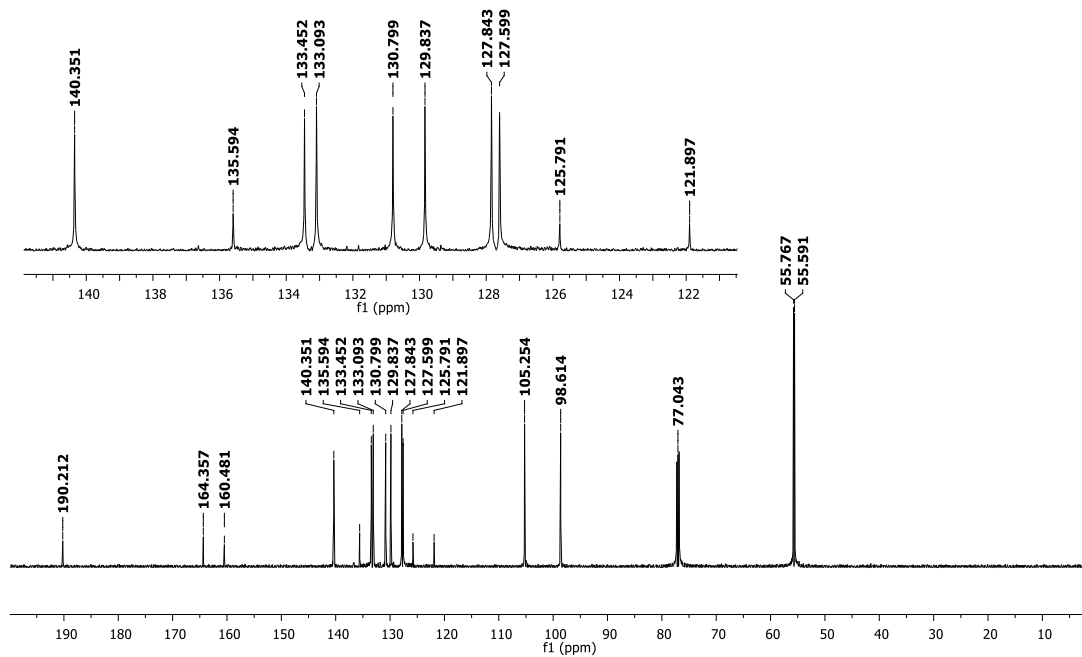


Figura 5a. Espectro de RMN de ^1H da chalcona **JA-3Br** (600 MHz, CDCl_3)

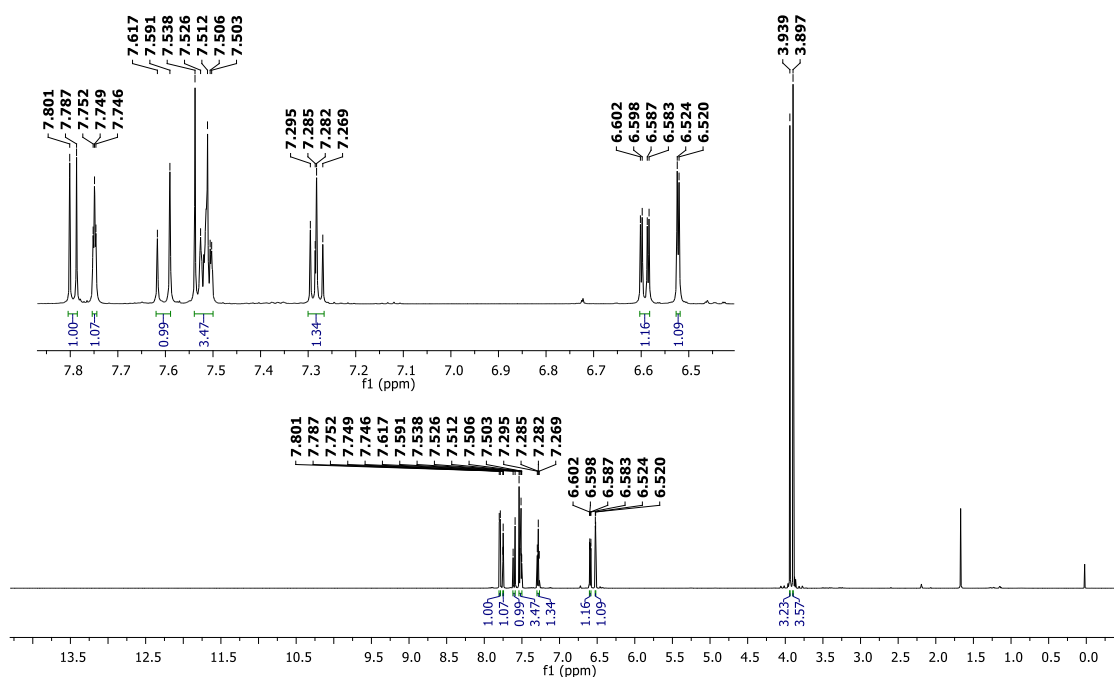


Figura 5b. Espectro de RMN de ^{13}C da chalcona **JA-3Br** (150 MHz, CDCl_3)

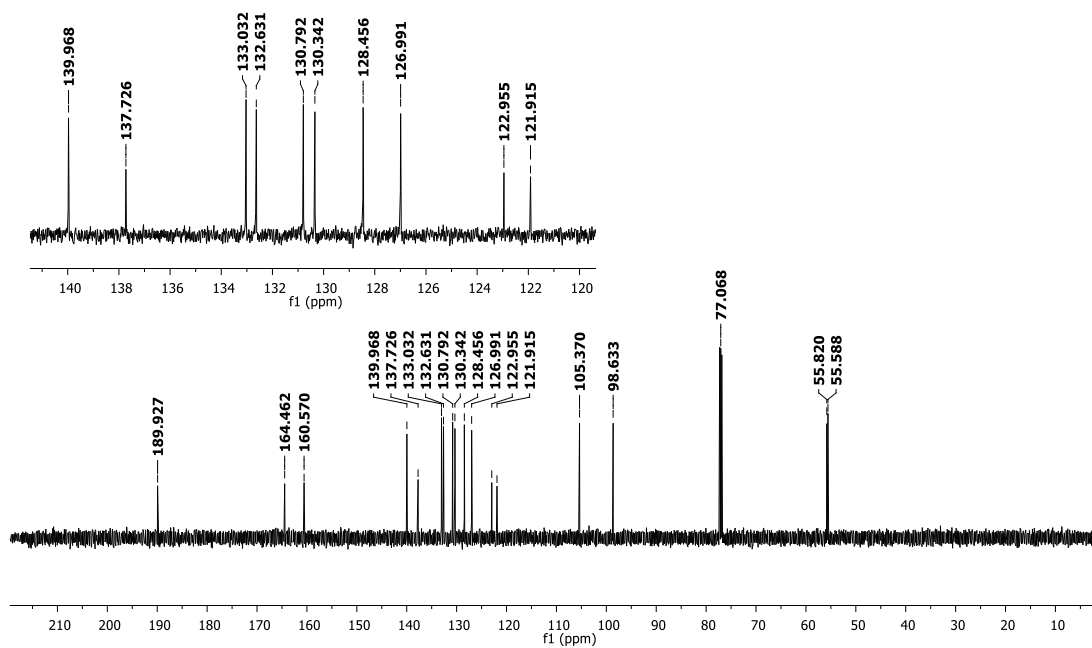


Figura 6a. Espectro de RMN de ^1H da chalcona **JA-4Br** (600 MHz, CDCl_3)

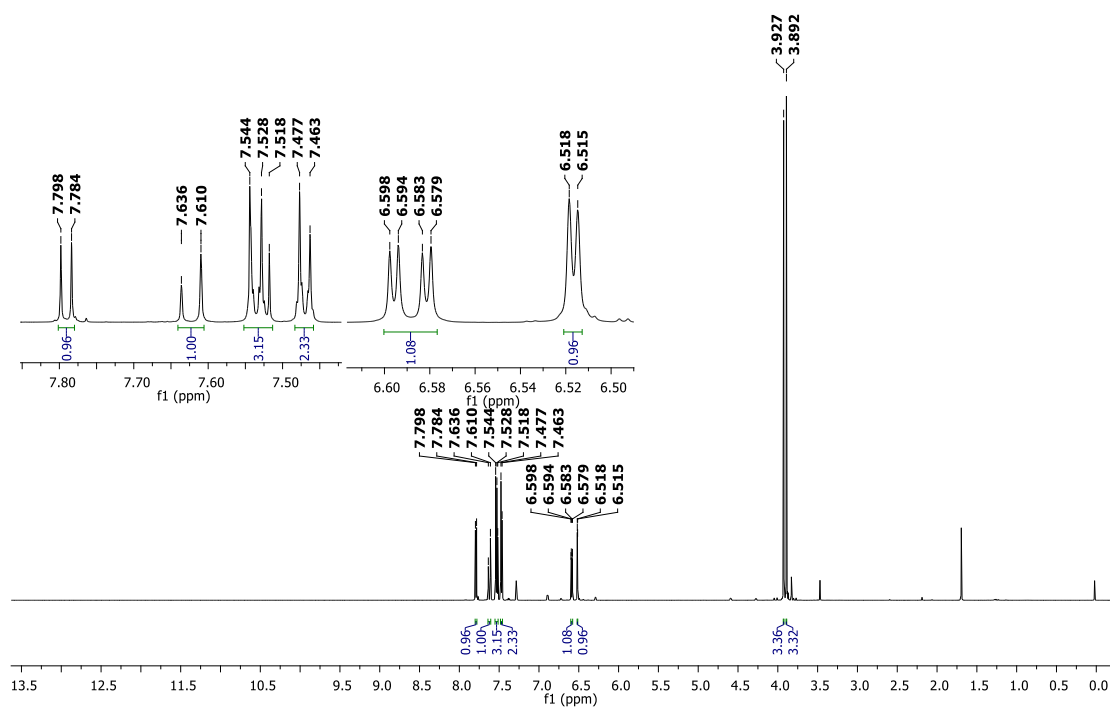


Figura 6b. Espectro de RMN de ^{13}C da chalcona **JA-4Br** (150 MHz, CDCl_3)

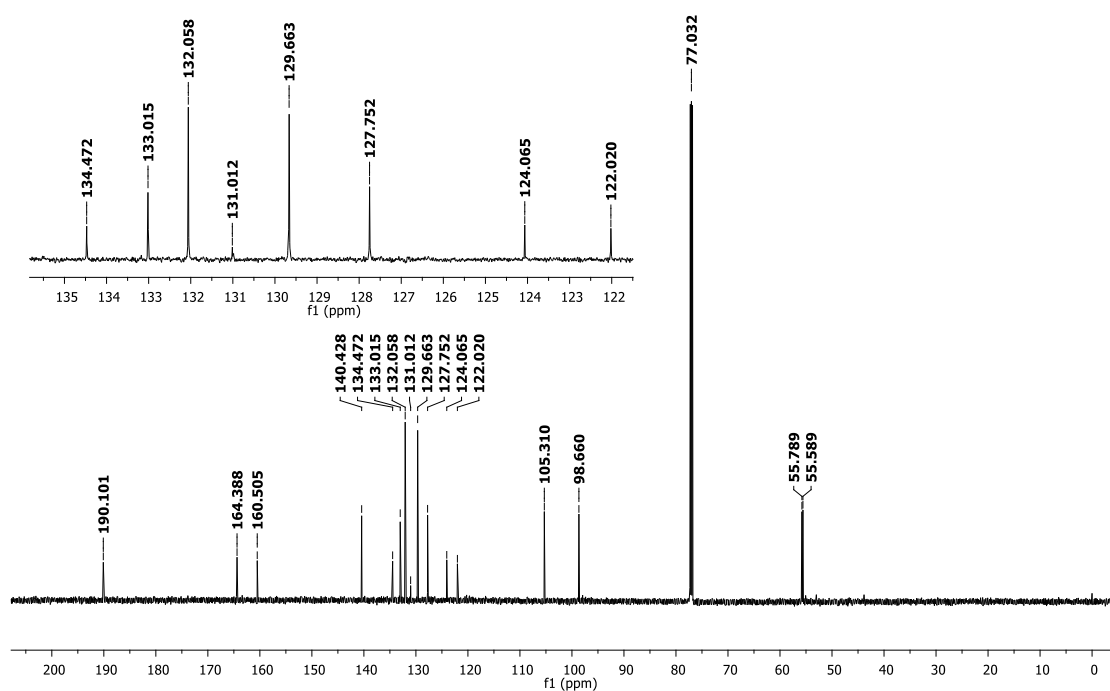


Figura 7a. Espectro de RMN de ^1H da chalcona **JA-2Cl** (CDCl_3 , 600 MHz)

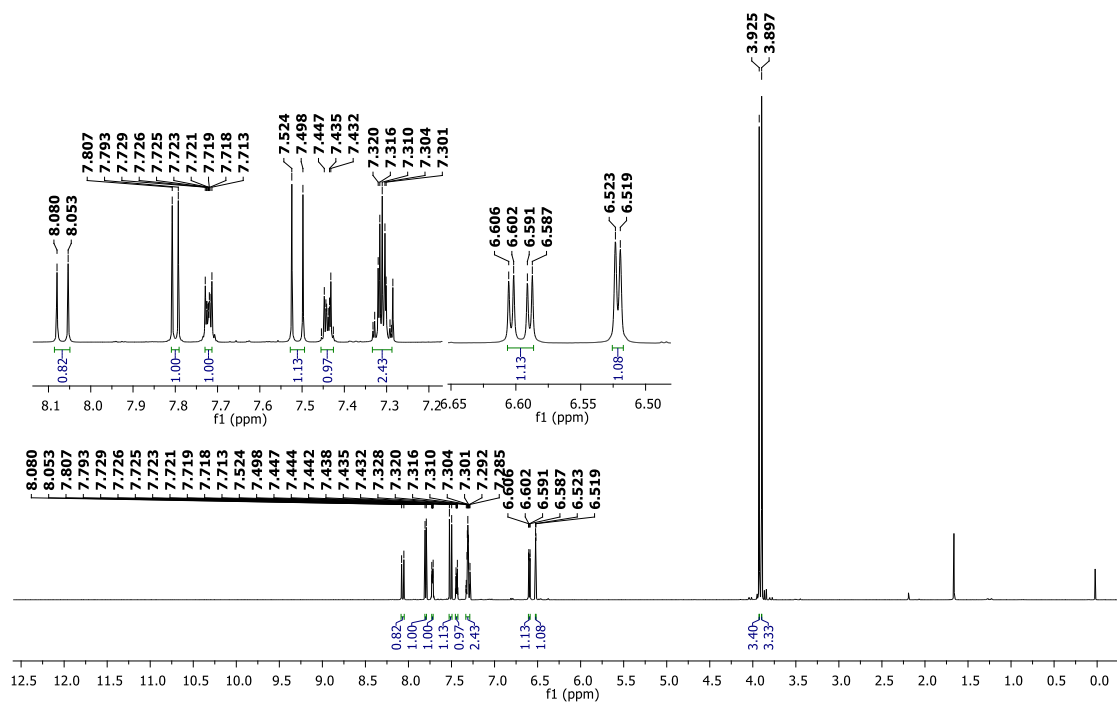


Figura 7b. Espectro de RMN de ^{13}C da chalcona **JA-2Cl** (CDCl_3 , 150 MHz)

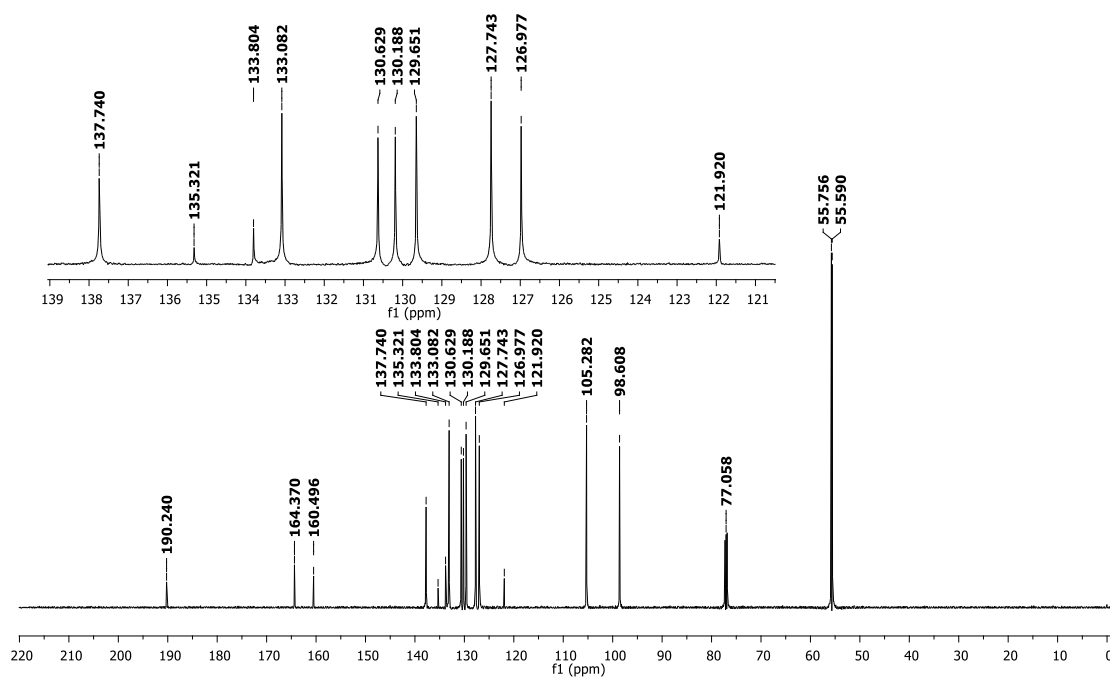


Figura 8a. Espectro de RMN de ^1H da chalcona **JA-3Cl** (CDCl_3 , 600 MHz)

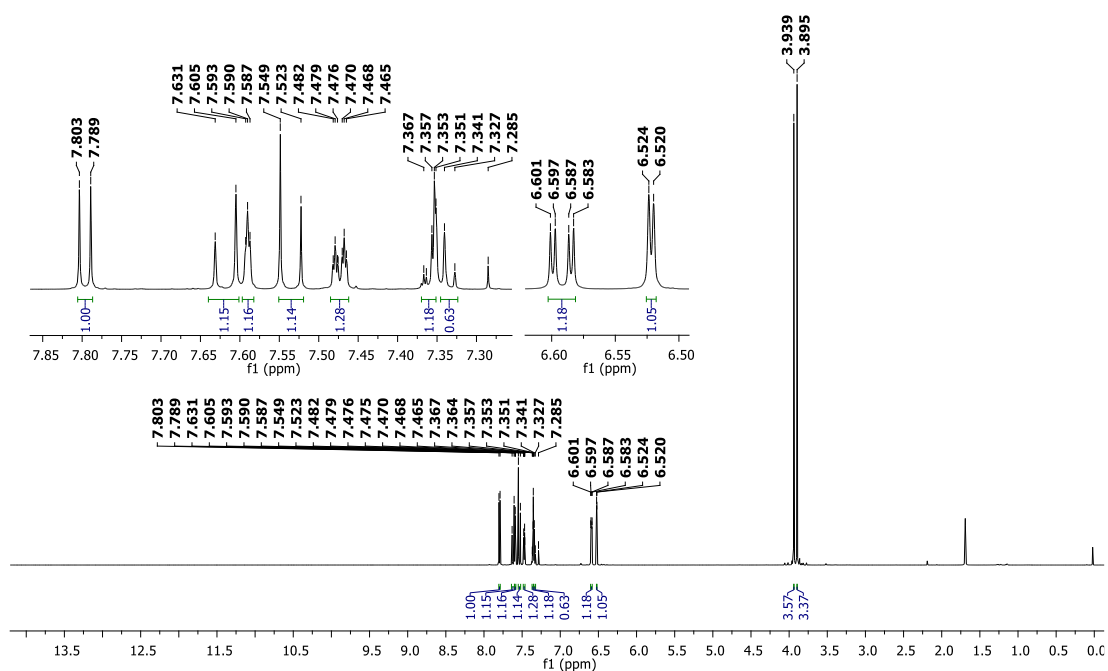


Figura 8b. Espectro de RMN de ^{13}C da chalcona **JA-3Cl** (CDCl_3 , 150 MHz)

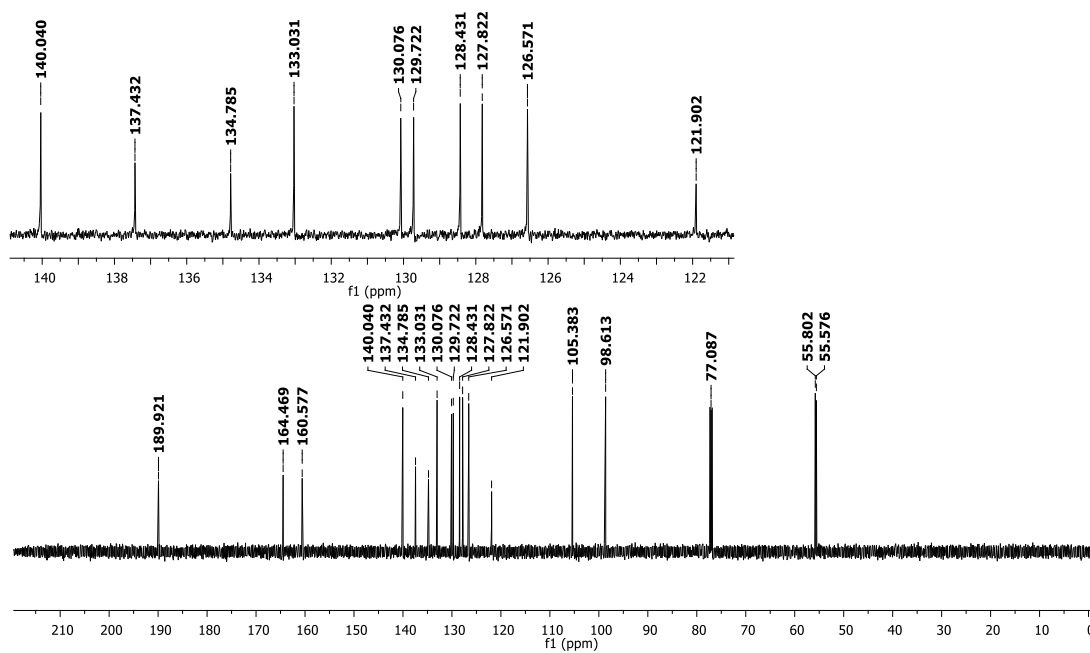


Figura 9a. Espectro de RMN de ^1H da chalcona **JA-4Cl** (CDCl_3 , 600 MHz)

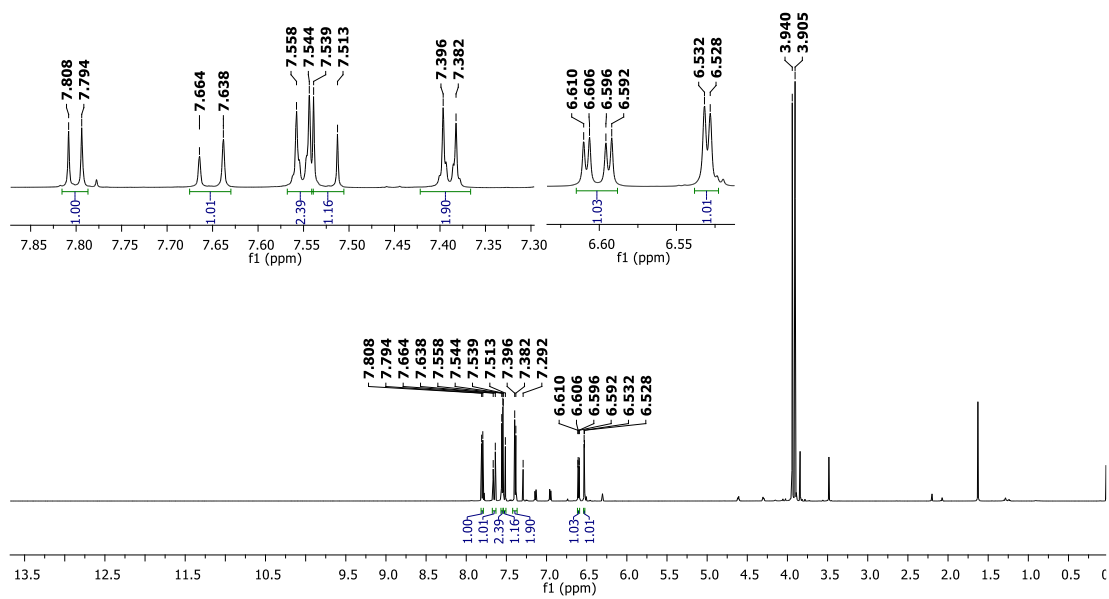


Figura 10a. Espectro de RMN de ^1H da chalcona **JA-2,4Cl** (CDCl_3 , 600 MHz)

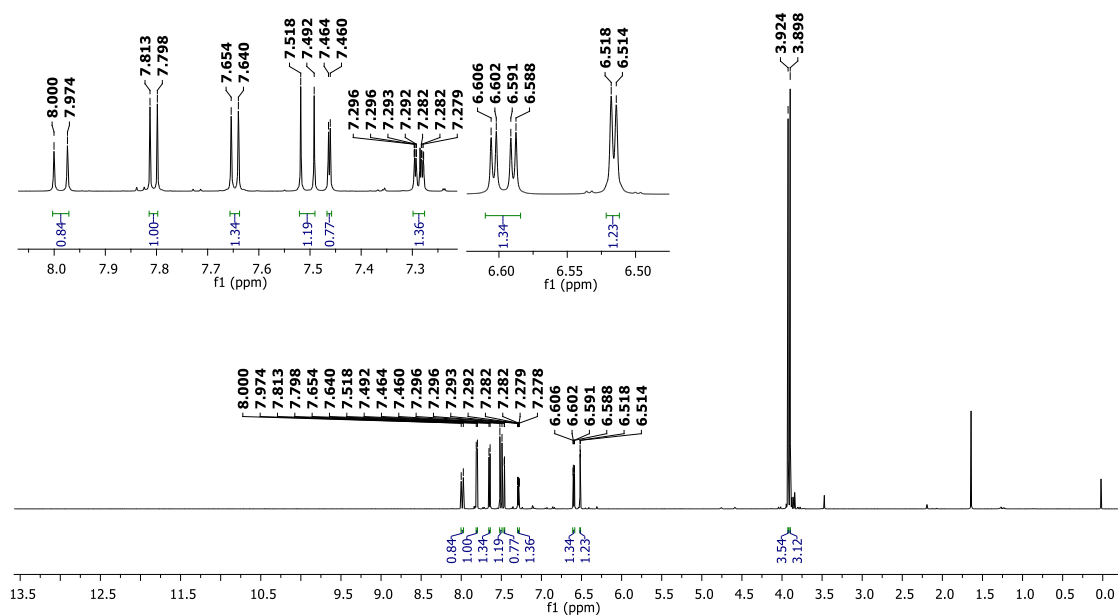


Figura 10b. Espectro de RMN de ^{13}C da chalcona **JA-2,4Cl** (CDCl_3 , 150 MHz)

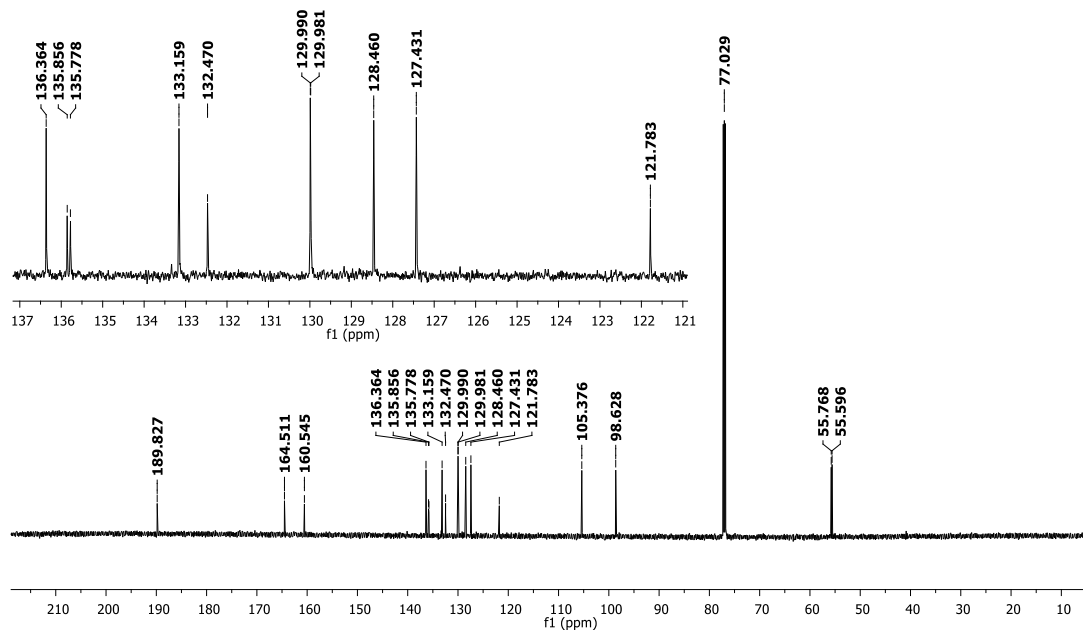


Figura 11a. Espectro de RMN de ^1H da chalcona **JA-2,6Cl** (CDCl_3 , 600 MHz)

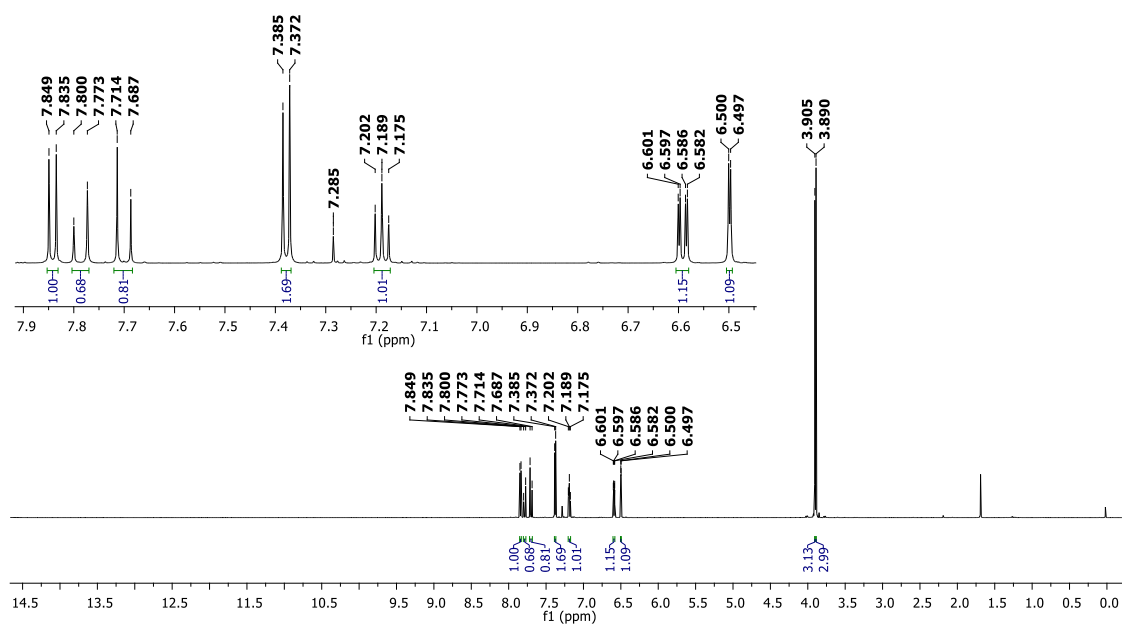


Figura 11b. Espectro de RMN de ^{13}C da chalcona **JA-2,6Cl** (CDCl_3 , 150 MHz)

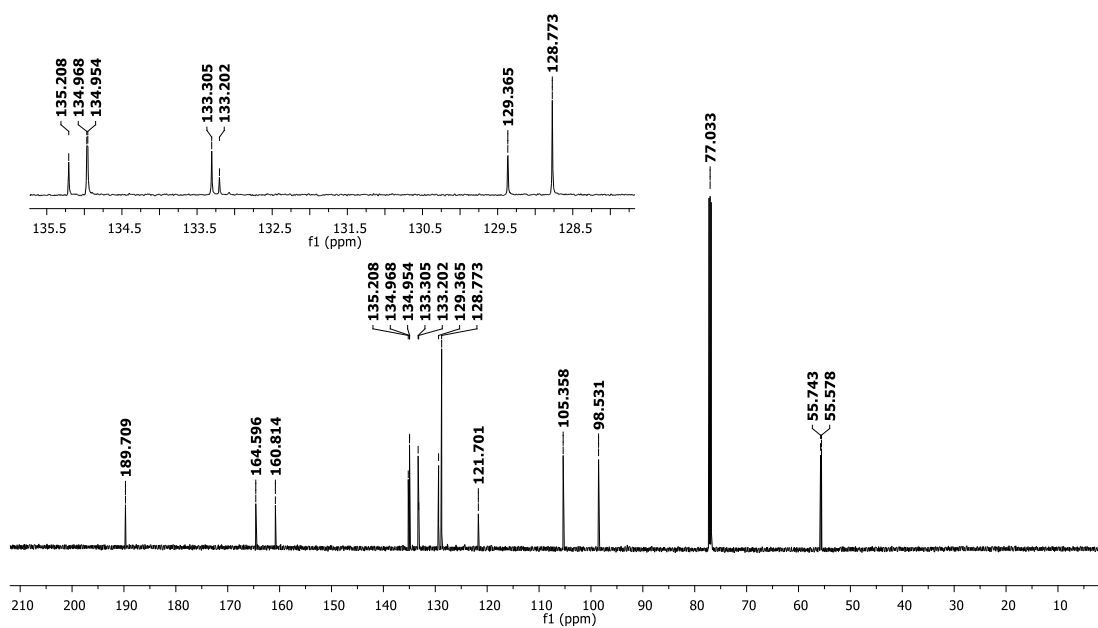


Figura 12a. Espectro de RMN de ^1H da chalcona **JA-3,4Cl** (CDCl_3 , 600 MHz)

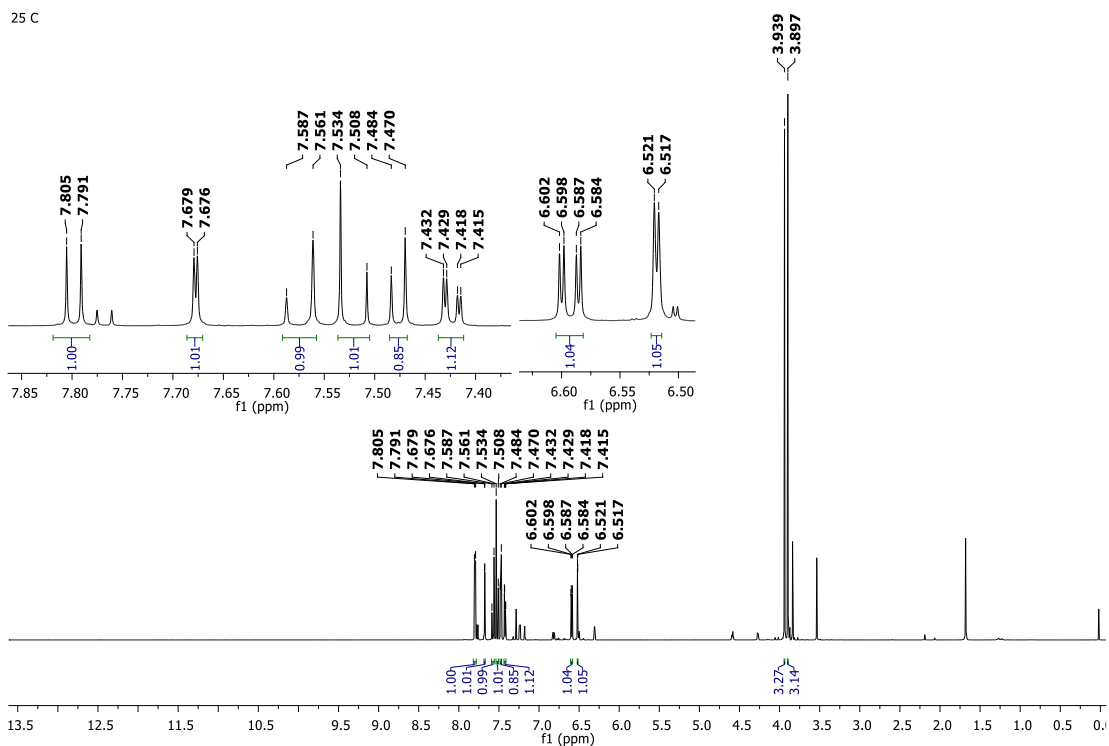


Figura 12b. Espectro de RMN de ^{13}C da chalcona **JA-3,4Cl** (CDCl_3 , 150 MHz)

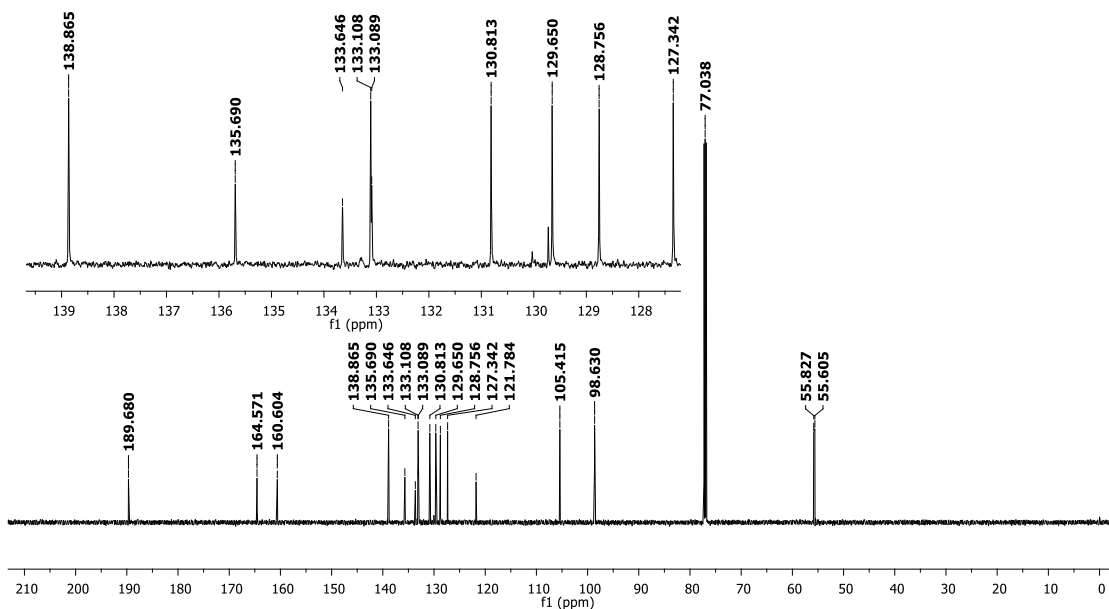


Figura 13a. Espectro de RMN de ^1H da chalcona **JA-3CF₃** (CDCl_3 , 600 MHz)

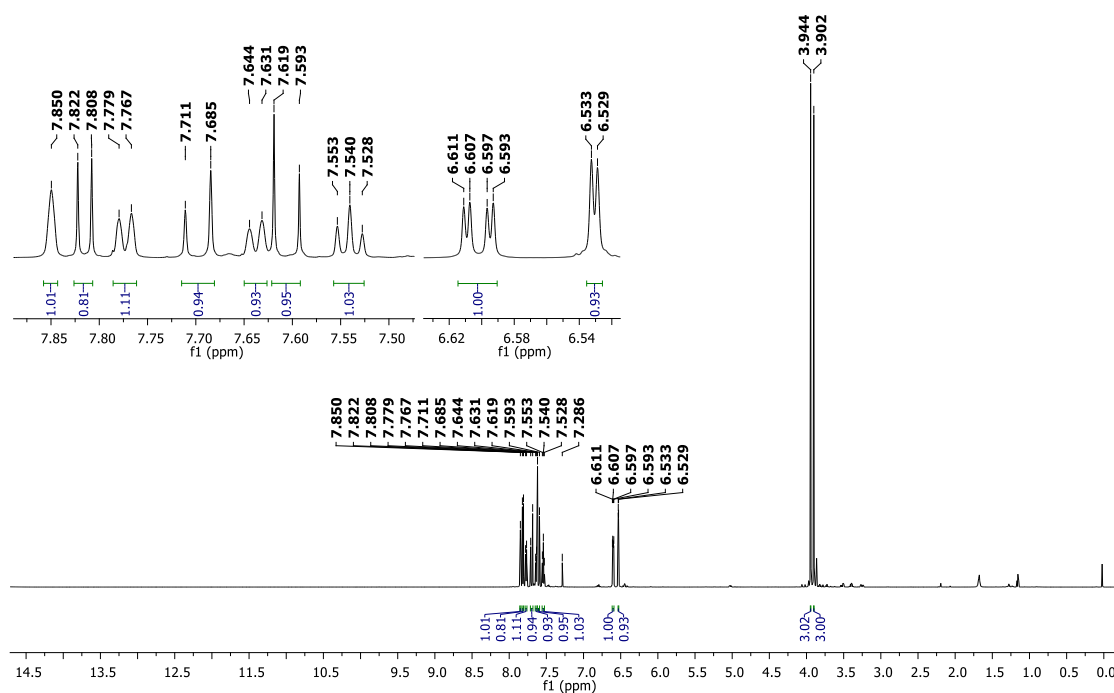


Figura 13b. Espectro de RMN de ^{13}C da chalcona **JA-3CF₃** (CDCl_3 , 150 MHz)

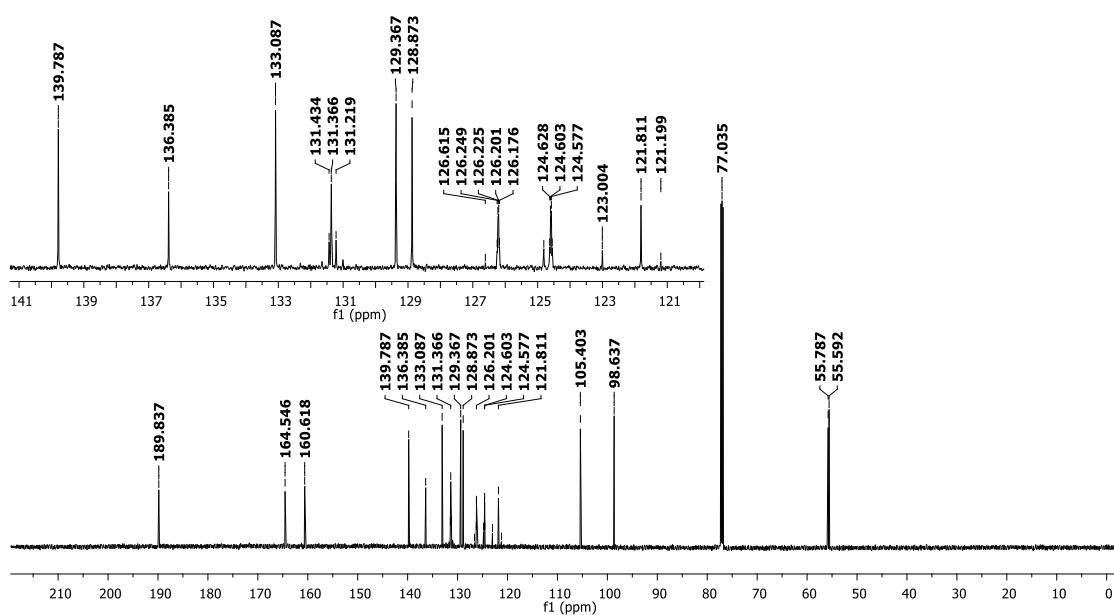


Figura 14a. Espectro de RMN de ^1H da chalcona **JA-4CF₃** (CDCl_3 , 600 MHz)

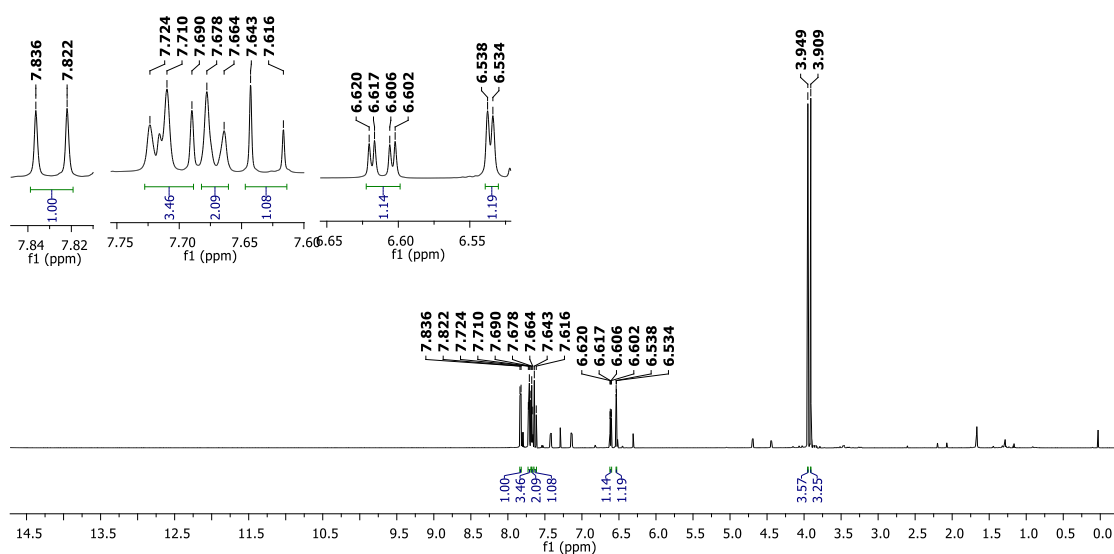


Figura 14b. Espectro de RMN de ^{13}C da chalcona **JA-4CF₃** (CDCl_3 , 150 MHz)

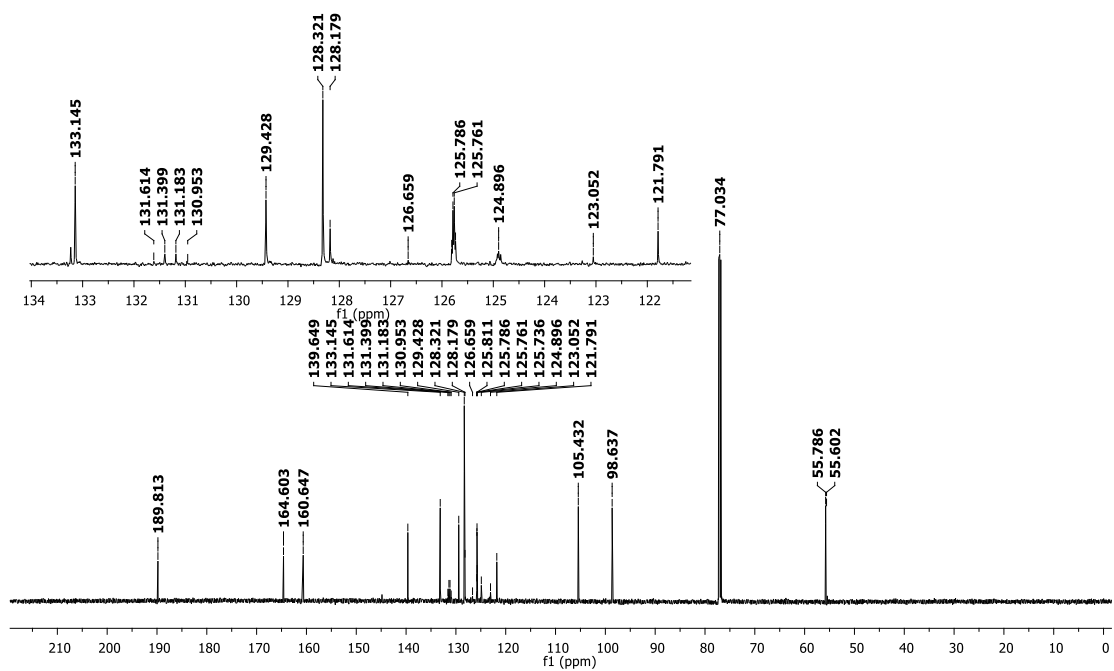


Figura 15a. Espectro de RMN de ^1H da chalcona **JA-4OCF₃** (CDCl_3 , 600 MHz)

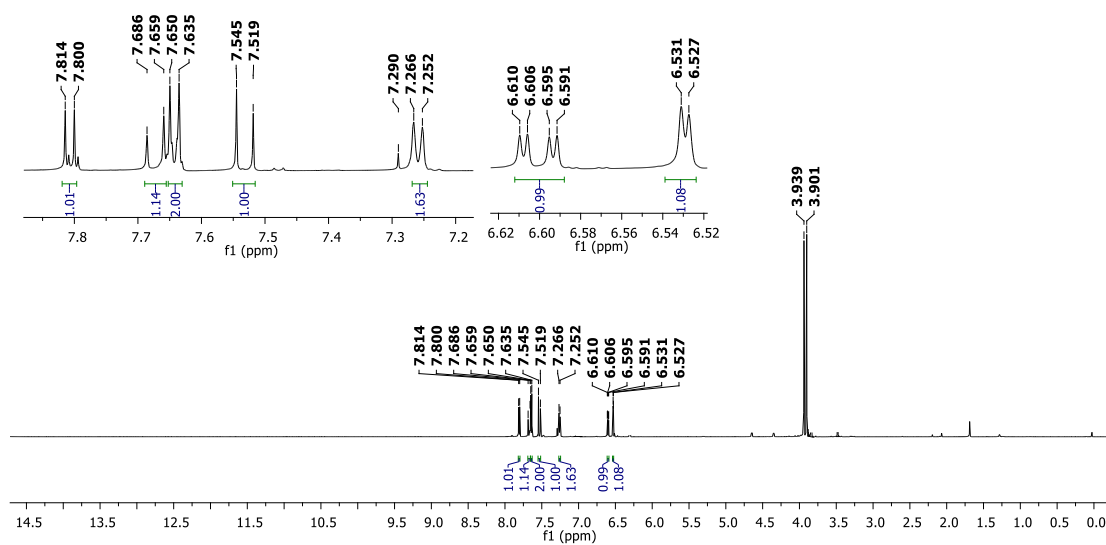


Figura 16a. Espectro de RMN de ^1H da chalcona **JA-2NO₂** (CDCl_3 , 600 MHz)

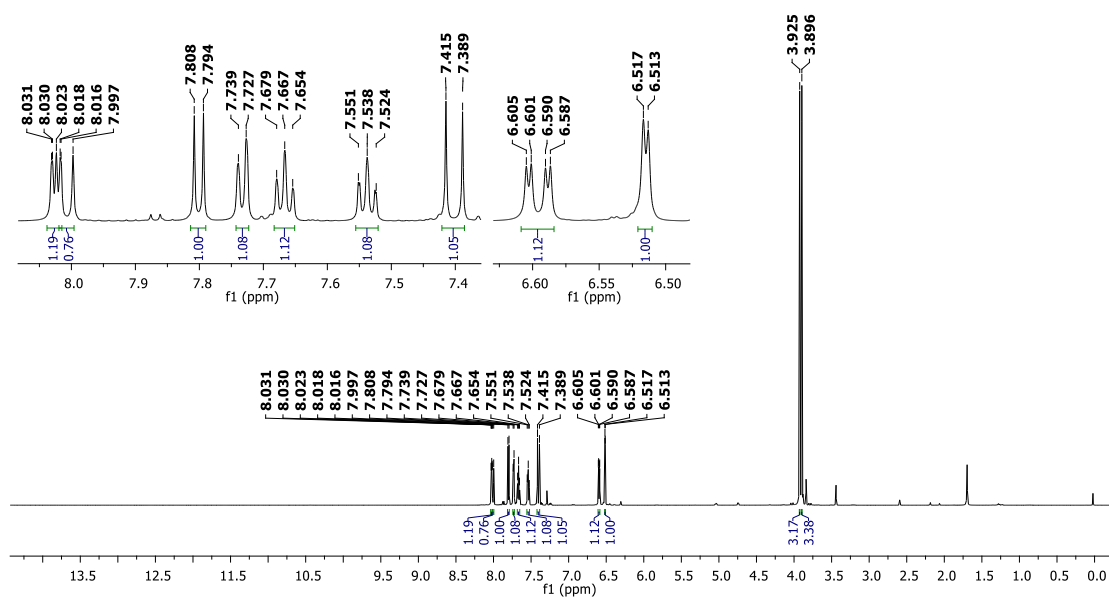


Figura 16b. Espectro de RMN de ^{13}C da chalcona **JA-2NO₂** (CDCl_3 , 150 MHz)

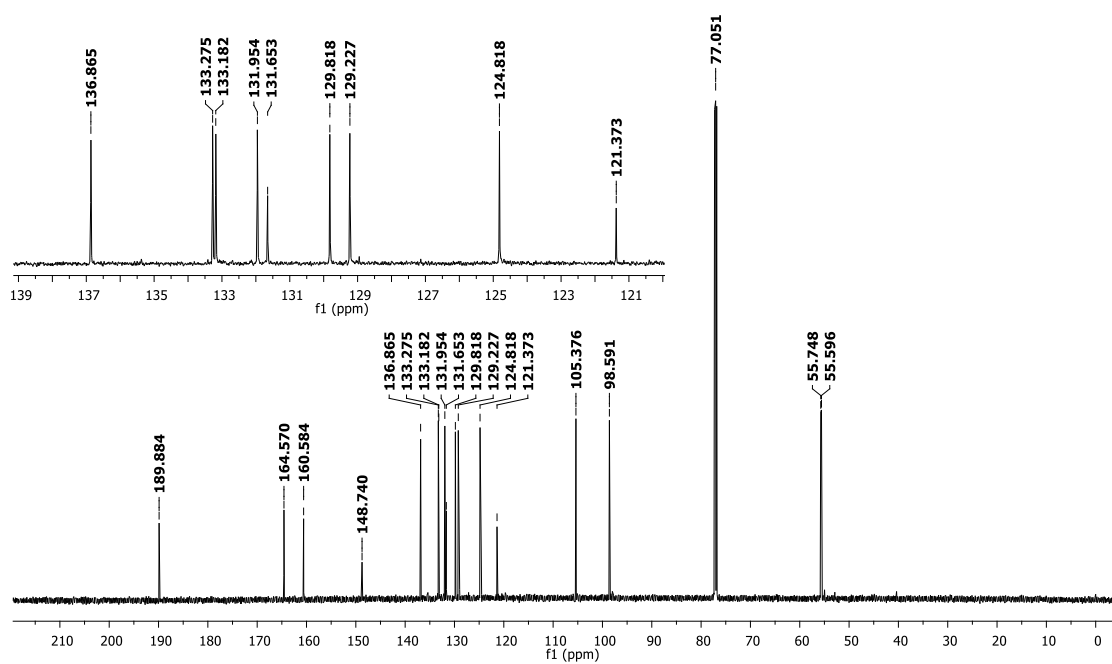


Figura 17a. Espectro de RMN de ^1H da chalcona **JA-3NO₂** (CDCl_3 , 600 MHz)

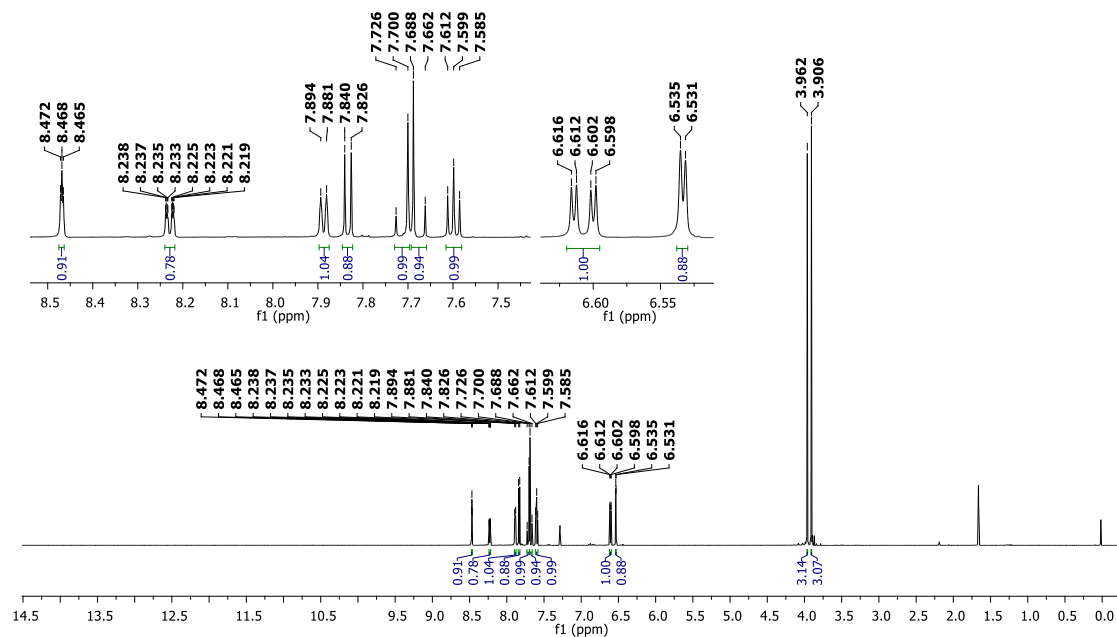


Figura 17b. Espectro de RMN de ^{13}C da chalcona **JA-3NO₂** (CDCl_3 , 150 MHz)

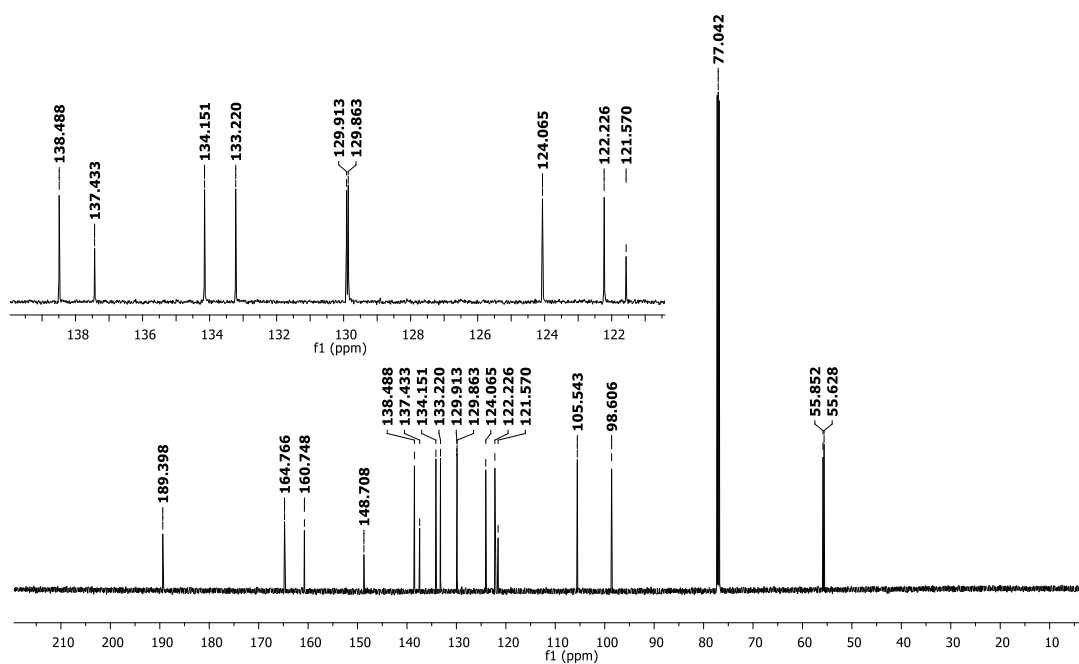


Figura 18a. Espectro de RMN de ^1H da chalcona **JA-1Naftila** (CDCl_3 , 600 MHz)

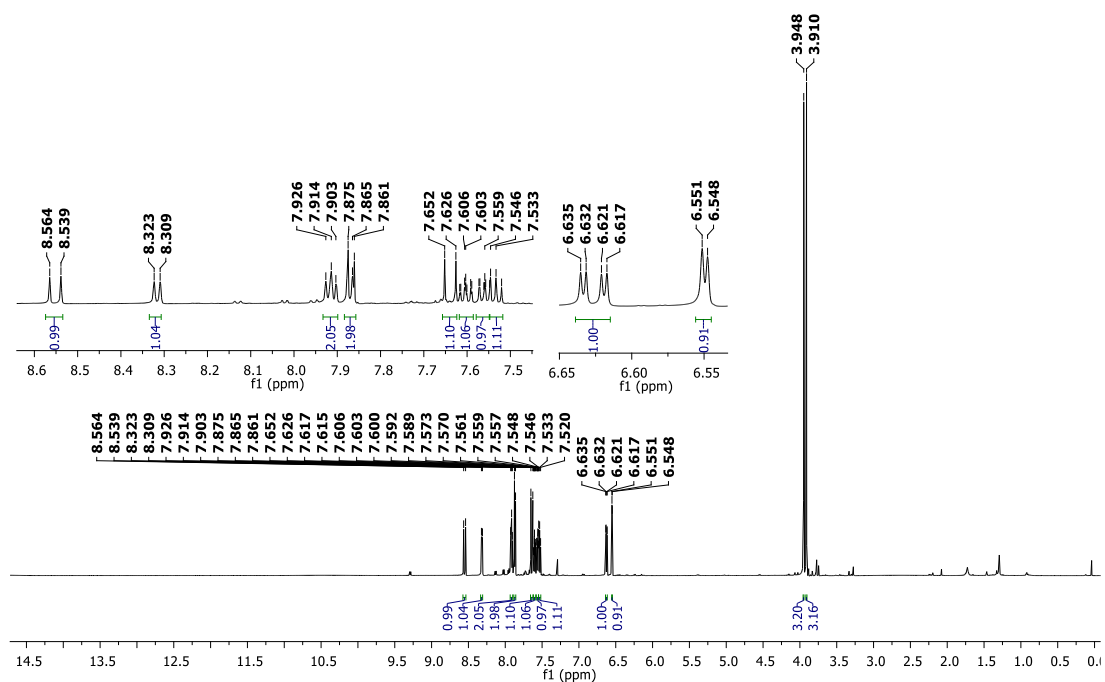


Figura 18b. Espectro de RMN de ^{13}C da chalcona **JA-1Naftila** (CDCl_3 , 150 MHz)

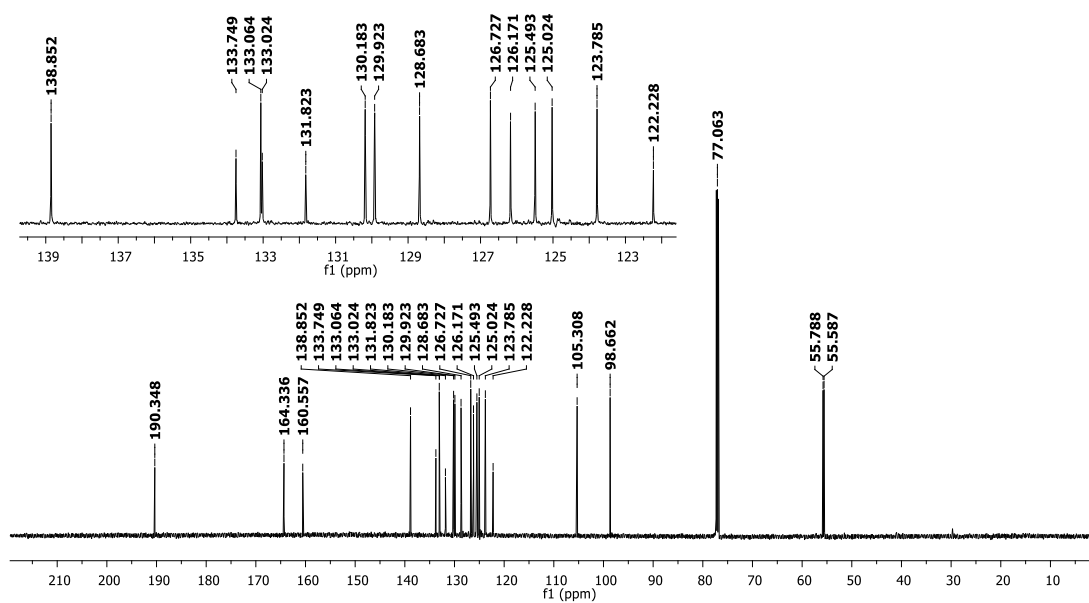


Figura 19a. Espectro de RMN de ^1H da chalcona **JA-2Naftila** (CDCl_3 , 600 MHz)

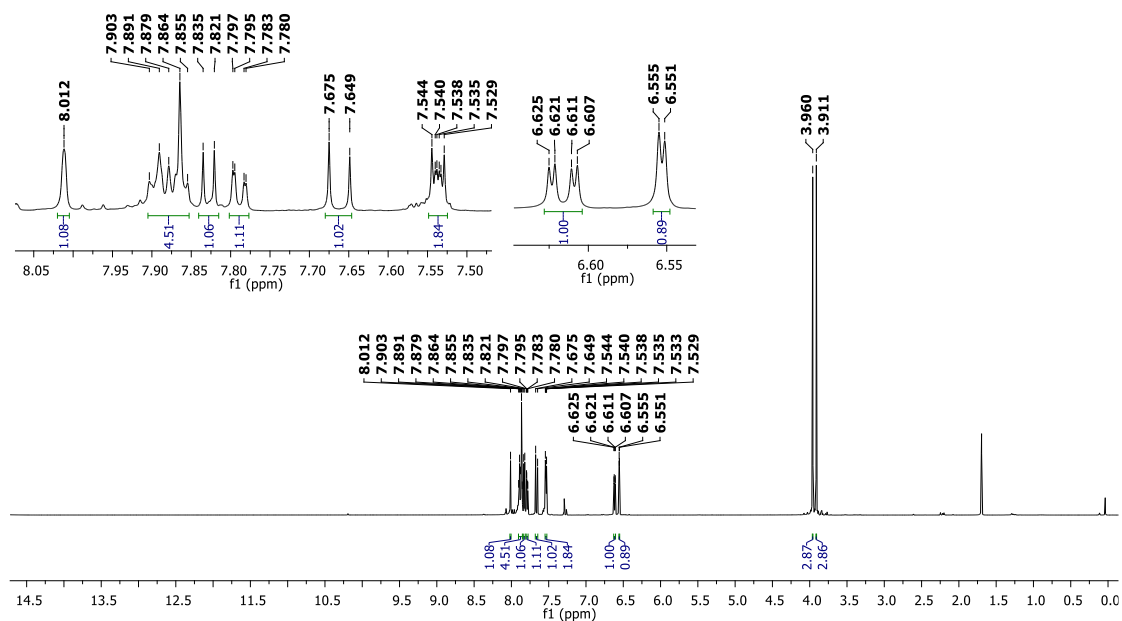


Figura 19b. Espectro de RMN de ^{13}C da chalcona **JA-2Naftila** (CDCl_3 , 150 MHz)

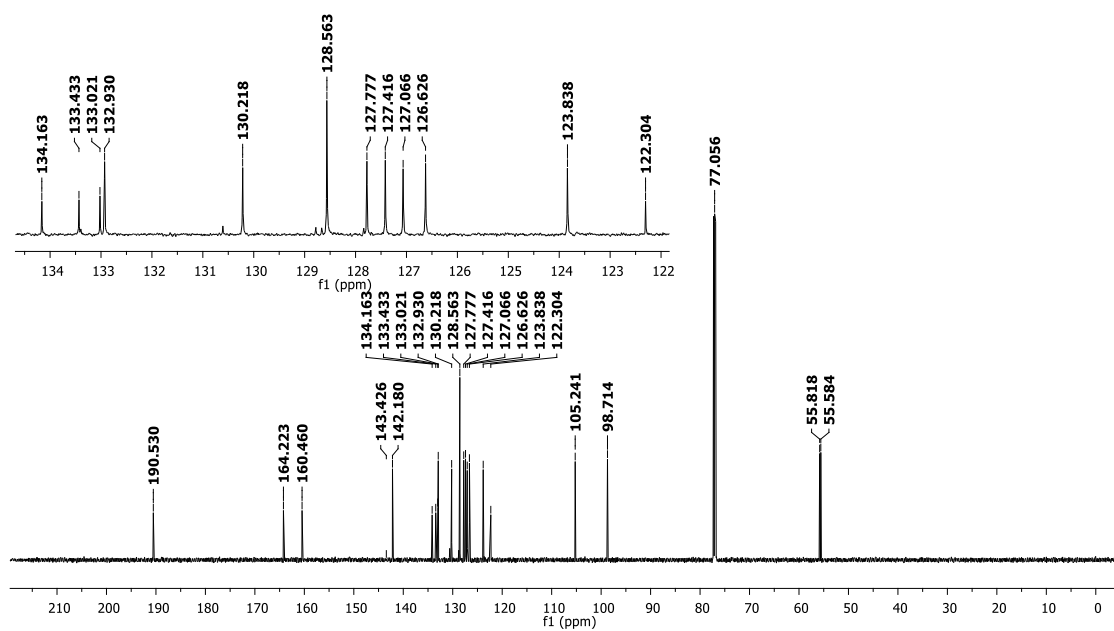


Figura 20a. Espectro de RMN de ^1H da chalcona **JA-2Tienila** (CDCl_3 , 600 MHz)

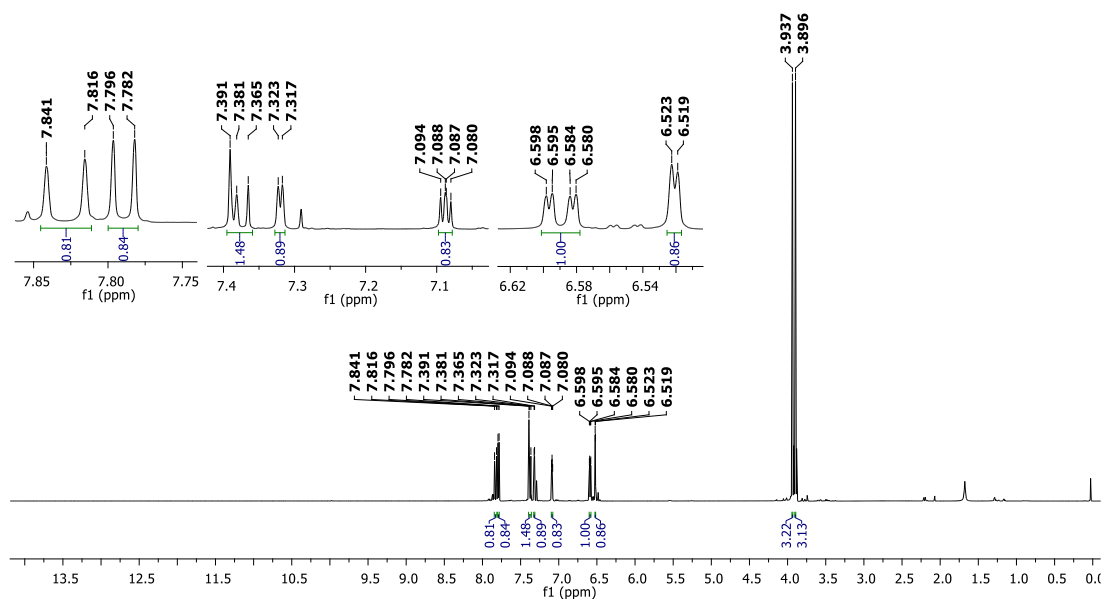


Figura 20b. Espectro de RMN de ^{13}C da chalcona **JA-2Tienila** (CDCl_3 , 150 MHz)

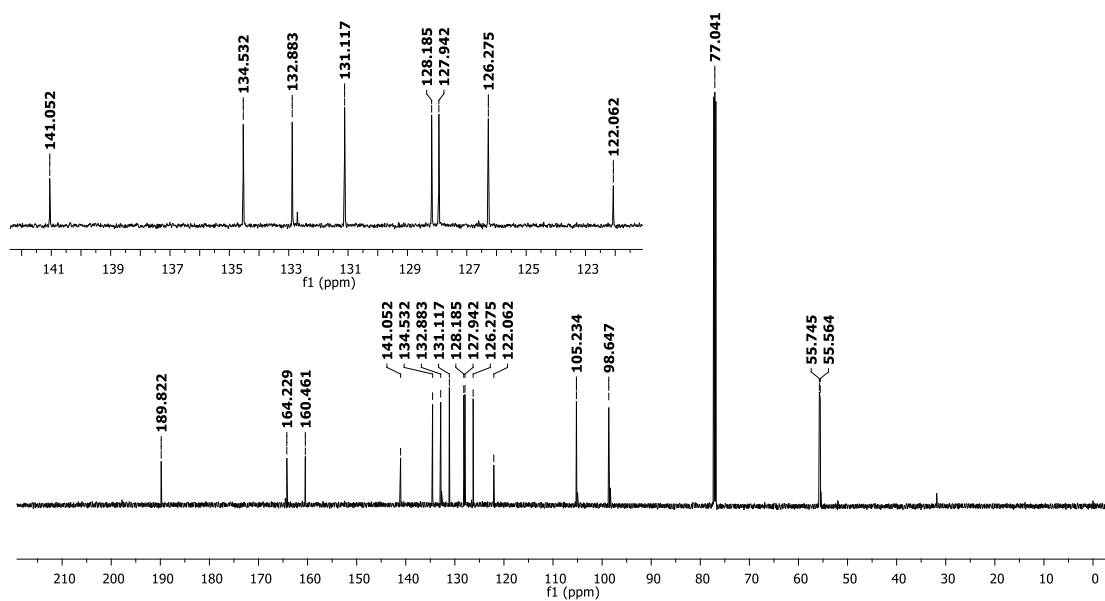


Figura 21a. Espectro de RMN de ^1H da chalcona **JA-2furanila** (CDCl_3 , 600 MHz)

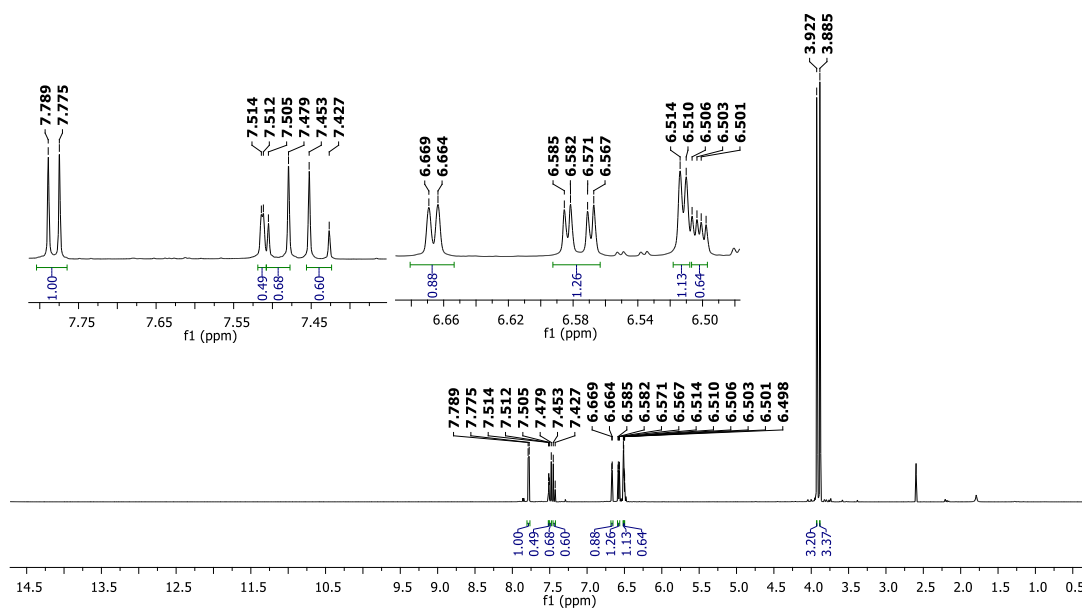


Figura 21b. Espectro de RMN de ^{13}C da chalcona **JA-2furanila** (CDCl_3 , 150 MHz)

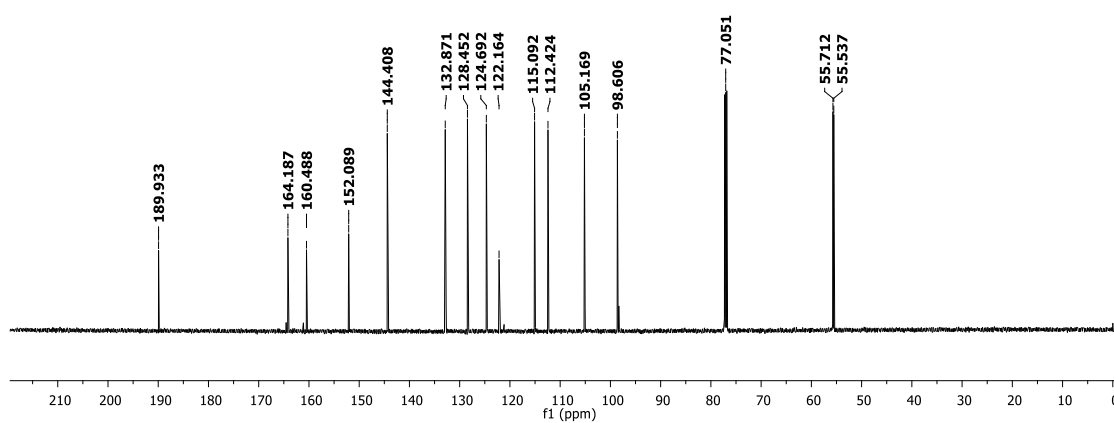
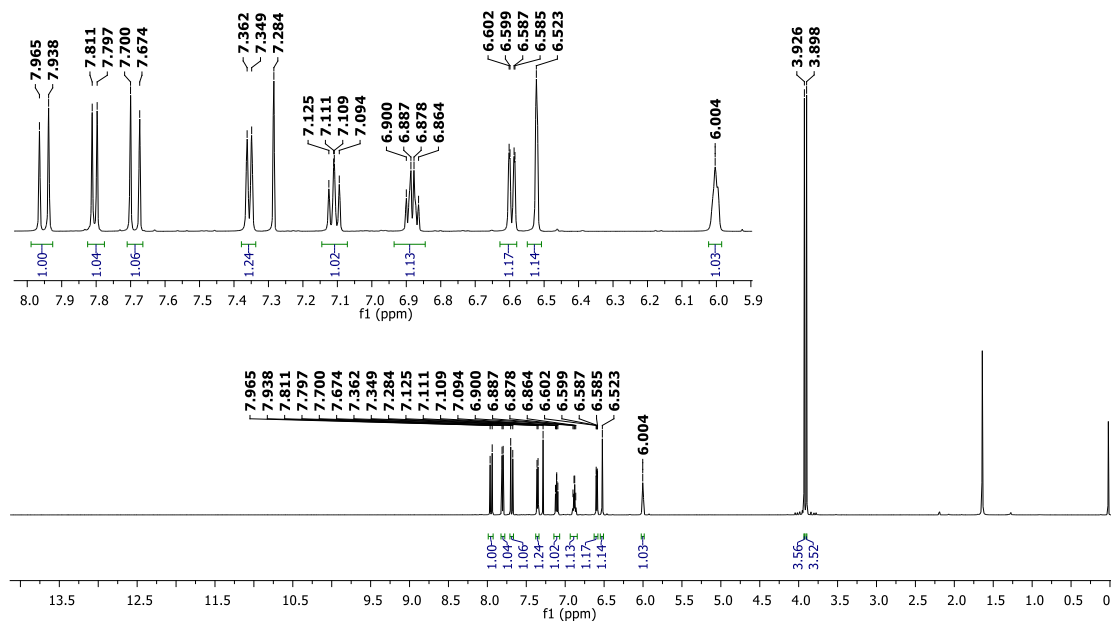


Figura 22a. Espectro de RMN de ^1H da chalcona **JA-2OH3F** (CDCl_3 , 600 MHz)



APÊNDICE B: MATERIAL COMPLEMENTAR DO CAPÍTULO III [artigo 2]**Metochalcona como agente antifúngico, uma proposta de reposicionamento de fármacos**

Julyanna Andrade S. Nascentes¹, Leticia Ribeiro de Assis¹, Natalia Seron Brizzotti²,
Thiago Henrique Lemes¹, Reinaldo dos Santos Theodoro¹, Rodrigo Raposo Lemos¹,
Eduarda Cardoso da Silva¹, Miguel Divino da Rosa¹, Mariela Domiciano Ribeiro²,
Margarete Teresa Gottardo de Almeida², Luis Octavio Regasini^{1*}

¹ Departamento de Química e Ciências Ambientais, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Rua Cristóvão Colombo, 2265 - Jardim Nazareth - São José do Rio Preto/SP - CEP 15054-000, SP, Brasil.

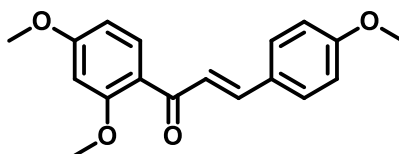
² Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (Famerp), Brasil. Av. Brg. Faria Lima, 5416 - Vila 12 São Pedro, São José do Rio Preto - SP, 15090-000.

* Autor correspondente, e-mail: luis.regasini@unesp.br

Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos, IBILCE - UNESP, São José do Rio Preto
Tel.: +55 17 3221-2362

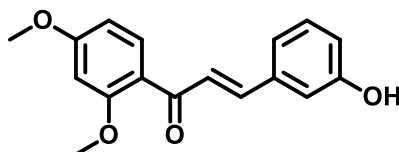
1. Análises de Ressonância Magnética Nuclear

1.1 Chalcona JA-4OMe



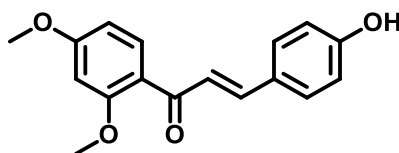
Pó amarelo; rendimento: 55 ; pureza (HPLC): 96%; ponto de fusão: 115°. **RMN ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz):** δ 3,80 (s, 3H, 4-OCH₃), 3,84 (s, 3H, 4'-OCH₃), 3,89 (s, 3H, 2'-OCH₃), 6,64 (dd, J = 2,3 e 8,6 Hz, H-5'), 6,68 (d, J = 2,3 Hz, H-3'), 6,99 (d, J = 8,7 Hz, H-3 e H-5), 7,41 (d, J = 15,8 Hz, H- α), 7,52 (d, J = 15,8 Hz, H- β), 7,59 (d, J = 8,6 Hz, H-6'), 7,67 (d, J = 8,7 Hz, H-2 e H-6). **RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz):** δ 55,78 (4-OCH₃), 56,03 (4'-OCH₃), 56,37 (2'-OCH₃), 98,07 (C-3'), 106,4 (C-5'), 114,9 (C-3 e C-5), 122,1 (C-1'), 125,8 (C- α), 127,9 (C-1), 130,6 (C-2 e C-6), 132,4 (C-6'), 141,8 (C- β), 160,4 (C-4'), 161,5 (C-4), 164,2 (C-2'), 189,9 (C- β').

1.2 Chalcona JA-3OH



Pó amarelo; rendimento: 77%; pureza (HPLC): 92%; ponto de fusão: 145°. **RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz):** δ 3,86 (s, 3H, 4'-OCH₃), 3,92 (s, 3H, 2'-OCH₃), 6,66 (dd, J = 2,3 e 8,6 Hz, H-5'), 6,70 (d, J = 2,3 Hz, H-3'), 6,85 (dd, J = 1,9 e 8,0 Hz, H-4), 7,09 (dd, J = 1,3 e 1,9 Hz, H-2), 7,14 (dd, J = 1,3 e 8,0 Hz, H-6), 7,25 (dd, J = 7,8 e 8,0 Hz, H-5), 7,46 (d, J = 16,0 Hz, H- α), 7,49 (d, J = 16,0 Hz, H- β), 7,63 (d, J = 8,6 Hz, H-6'). **RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz):** δ 56,09 (4'-OCH₃), 56,45 (2'-OCH₃), 99,10 (C-3'), 106,5 (C-5'), 114,2 (C-2), 117,7 (C-4), 120,0 (C-6), 121,8 (C-1'), 127,3 (C- α), 130,5 (C-5), 132,6 (C-6'), 136,6 (C-1), 141,8 (C- β), 158,2 (C-3), 160,7 (C-4'), 164,5 (C-2'), 189,6 (C- β').

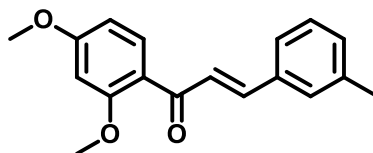
1.3 Chalcona JA-4OH



Pó amarelo; rendimento: 30%; pureza (HPLC): 90%; ponto de fusão: 140°C. **RMN ^1H (CDCl₃, 600 MHz):** δ 3,89 (s, 3H, 4'-OCH₃), 3,92 (s, 3H, 2'-OCH₃), 6,28 (sl, 4-OH),

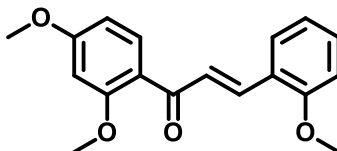
6,52 (d, $J = 2,3$ Hz, H-3'), 6,58 (dd, $J = 2,3$ e 8,6 Hz, H-5'), 6,90 (d, $J = 8,4$ Hz, H-3 e H-5), 7,40 (d, $J = 15,7$ Hz, H- α), 7,51 (d, $J = 8,4$ Hz, H-2 e H-6), 7,67 (d, $J = 15,7$ Hz, H- β), 7,76 (d, $J = 8,6$ Hz, H-6').

1.4 Chalcona JA-3Me



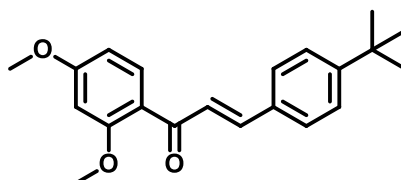
Pó amarelo; rendimento: 96%; pureza (HPLC): 92%; ponto de fusão: 115°C. **RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz):** δ 2,38 (s, 3H, 4- CH_3), 3,87 (s, 3H, 4'- OCH_3), 3,90 (s, 3H, 2'- OCH_3), 6,50 (d, $J = 2,3$ Hz, H-3'), 6,56 (dd, $J = 2,3$ e 8,6 Hz, H-5'), 7,19 (d, $J = 7,5$ Hz, H-4), 7,28 (dd, $J = 7,6$ e 7,5 Hz, H-5), 7,14 (d, $J = 7,6$ Hz, H-6), 7,39 (s, H-2), 7,49 (d, $J = 15,8$ Hz, H- α), 7,65 (d, $J = 15,8$ Hz, H- β), 7,75 (d, $J = 8,6$ Hz, H-6'). **RMN ^{13}C (CDCl_3 , 150 MHz):** δ 21,40 (4- CH_3), 55,57 (4'- OCH_3), 55,79 (2'- OCH_3), 98,67 (C-3'), 105,14 (C-5'), 122,3 (C-1'), 125,4 (C- α), 127,0 (C-6), 128,7 (C-5), 129,1 (C-2), 130,8 (C-4), 132,9 (C-6'), 135,4 (C-1), 138,5 (C-3), 142,3 (C- β), 160,4 (C-4'), 164,1 (C-2'), 190,7 (C- β').

1.5 Chalcona JA-2OMe



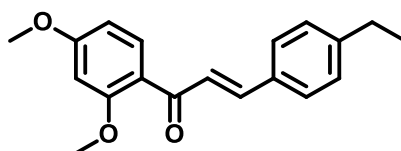
Pó branco; rendimento: 57%; pureza (HPLC): 91% ; ponto de fusão: 103°C . **RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz):** δ 3,86 (s, 3H, 2'- OCH_3), 3,88 (s, 3H, 4'- OCH_3), 3,90 (s, 3H, 2'- OCH_3), 6,65 (dd, $J = 2,3$ e 8,6 Hz, H-5'), 6,69 (d, $J = 2,3$ Hz, H-3'), 7,01 (ddd, 0,9, 7,5 e 7,7 Hz, H-5), 7,10 (dd, $J = 0,9$ e 8,06 Hz, H-3), 7,41 (ddd, $J = 1,6$, 7,5 e 8,1 Hz, H-4), 7,58 (d, $J = 15,9$ Hz, H- α), 7,61 (d, $J = 8,6$ Hz, H-6'), 7,71 (dd, $J = 1,6$ e 0,7 Hz, H-6), 8,07 (d, $J = 15,9$ Hz, H- β). **RMN ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$, 150 MHz):** δ 56,01 (2'- OCH_3), 56,10 (4'- OCH_3), 56,39 (2'- OCH_3), 99,09 (C-3'), 106,5 (C-5'), 112,2 (C-3), 121,3 (C-5), 122,0 (C-1'), 123,6 (C-1), 127,8 (C- α), 128,9 (C-4), 132,2 (C-6), 132,5 (C-6'), 136,6 (C- β), 158,6 (2'- OCH_3), 160,7 (C-4'), 164,4 (C-2'), 190,0 (C- β').

1.6 Chalcona JA-4terc



Pó amarelo; rendimento: 93%; pureza (HPLC): 97% ; ponto de fusão: 150/°C . **RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz):** δ 1,36 (s, 9H, 4-tercbutil), 3,89 (s, 3H, 4'-OCH₃), 3,92 (s, 3H, 2'-OCH₃), 6,52 (d, J = 2,2 Hz, H-3'), 6,58 (dd, J = 2,2 e 8,6 Hz, H-5'), 7,44 (d, J = 8,3 Hz, H-3 e H-5), 7,49 (d, J = 15,8 Hz, H- α), 7,56 (d, J = 8,3 Hz, H-2 e H-6), 7,68 (d, J = 15,8 Hz, H- β), 7,76 (d, J = 8,6 Hz, H-6').

1.7 Chalcona JA-4etil



Pó amarelo; rendimento: 79%; pureza (HPLC): 95%; ponto de fusão: 130°C. **RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz):** δ 1,28 (t, J = 7,6 Hz, 3H, -CH₃), 2,71 (q, J = 7,6 Hz, 2H, -CH₂-), 3,90 (s, 3H, 4'-OCH₃), 3,93 (s, 3H, 2'-OCH₃), 6,53 (d, J = 2,3 Hz, H-3'), 6,60 (dd, J = 2,3 e 8,6 Hz, H-5'), 7,26 (d, J = 8,1 Hz, H-3 e H-5), 7,50 (d, J = 15,8 Hz, H- α), 7,55 (d, J = 8,1 Hz, H-2 e H-6), 7,69 (d, J = 15,8 Hz, H- β), 7,78 (d, J = 8,6 Hz, H-6'). **RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz):** δ 15,38 (-CH₂CH₃), 28,34 (-CH₂CH₃), 55,56 (4'-OCH₃), 55,77 (2'-OCH₃), 98,69 (C-3'), 105,2 (C-5'), 122,4 (C-1'), 126,3 (C- α), 128,4 (C-3 e C-5), 128,43 (C-2 e C-6), 132,8 (C-6'), 133,0 (C-1), 142,3 (C- β), 146,7 (C-4), 160,4 (C-4'), 164,1 (C-2'), 190,7 (C- β).

Figura 1a. Espectro de RMN de ^1H da chalcona **JA-4OMe** (DMSO- d_6 , 600 MHz)

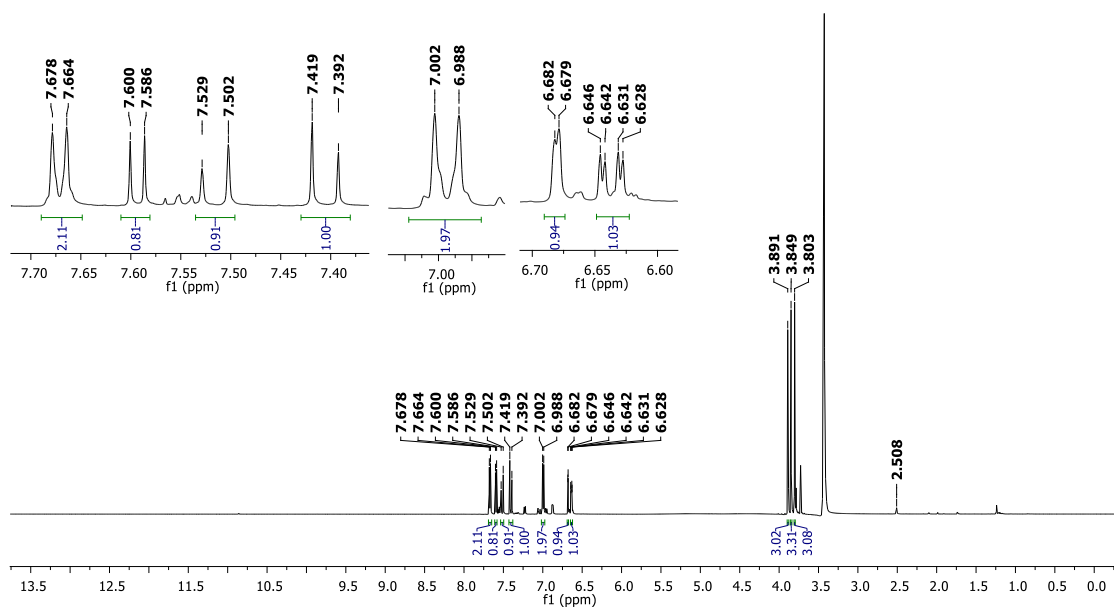


Figura 1b. Espectro de RMN de ^{13}C da chalcona **JA-4OMe** (DMSO- d_6 , 150 MHz)

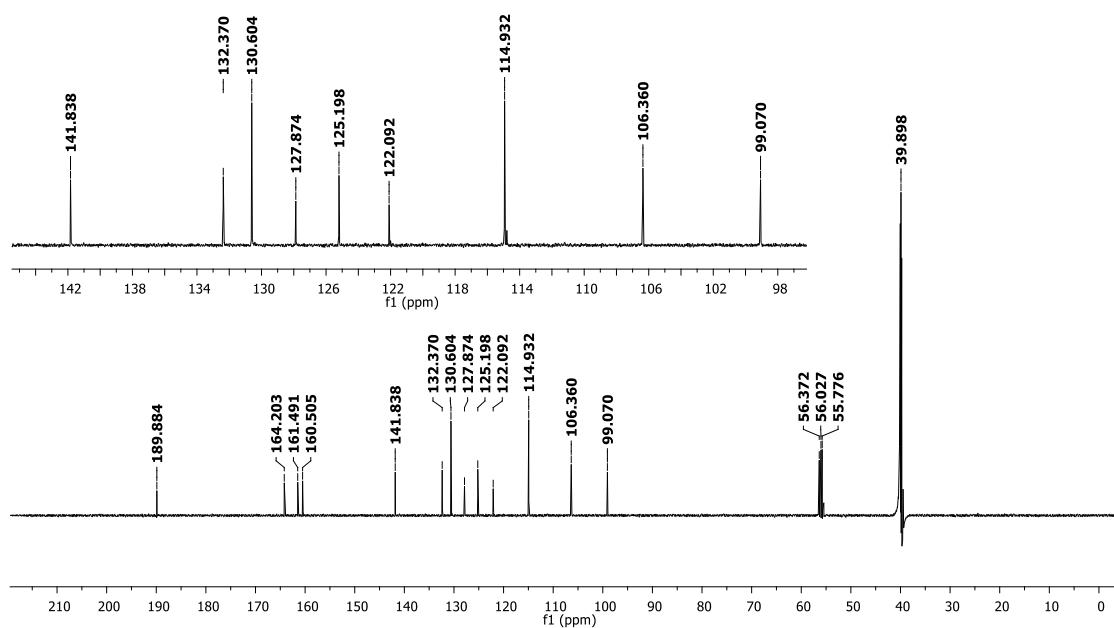


Figura 2a. Espectro de RMN de ^1H da chalcona **JA-3OH** ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz)

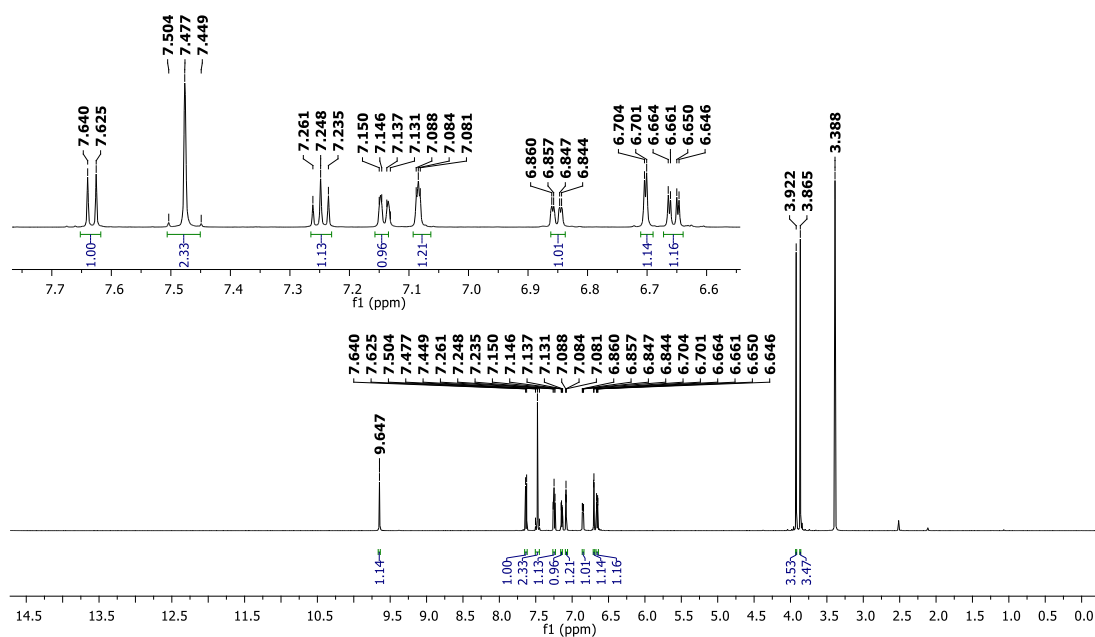


Figura 2b. Espectro de RMN de ^{13}C da chalcona **JA-3OH** ($\text{DMSO-}d_6$, 150 MHz)

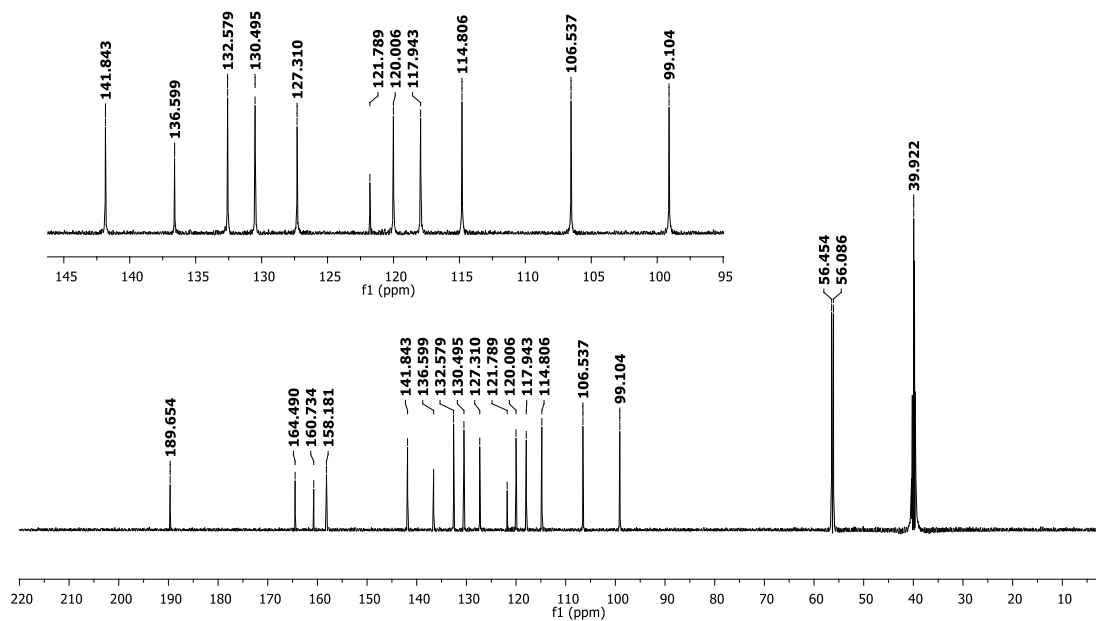


Figura 3a. Espectro de RMN de ^1H da chalcona **JA-4OH** (CDCl_3 , 600 MHz)

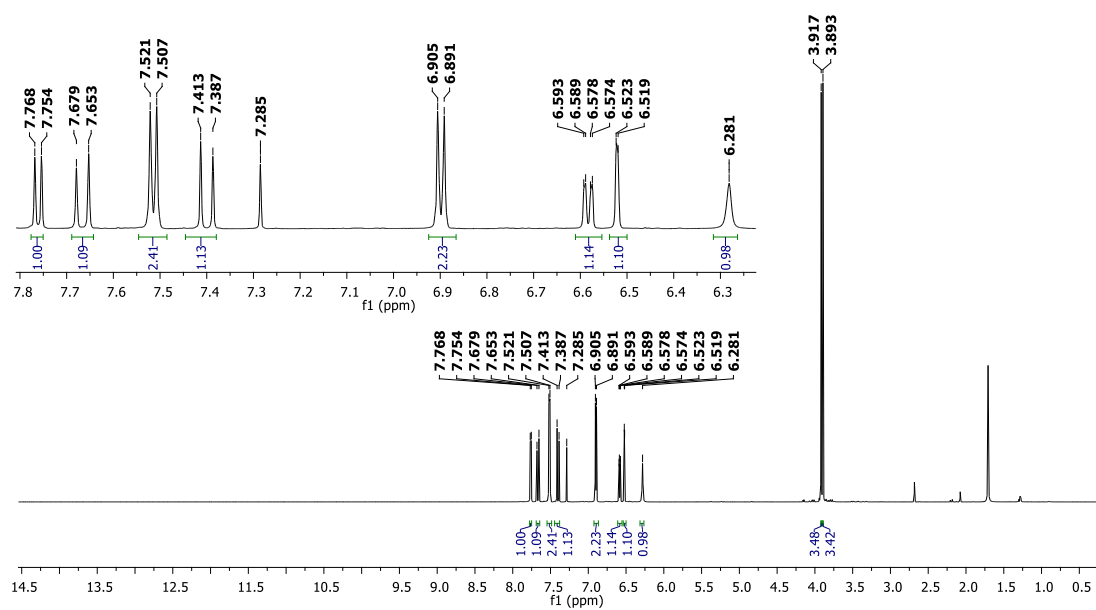


Figura 4a. Espectro de RMN de ^1H da chalcona **JA-3Me** (CDCl_3 , 600 MHz)

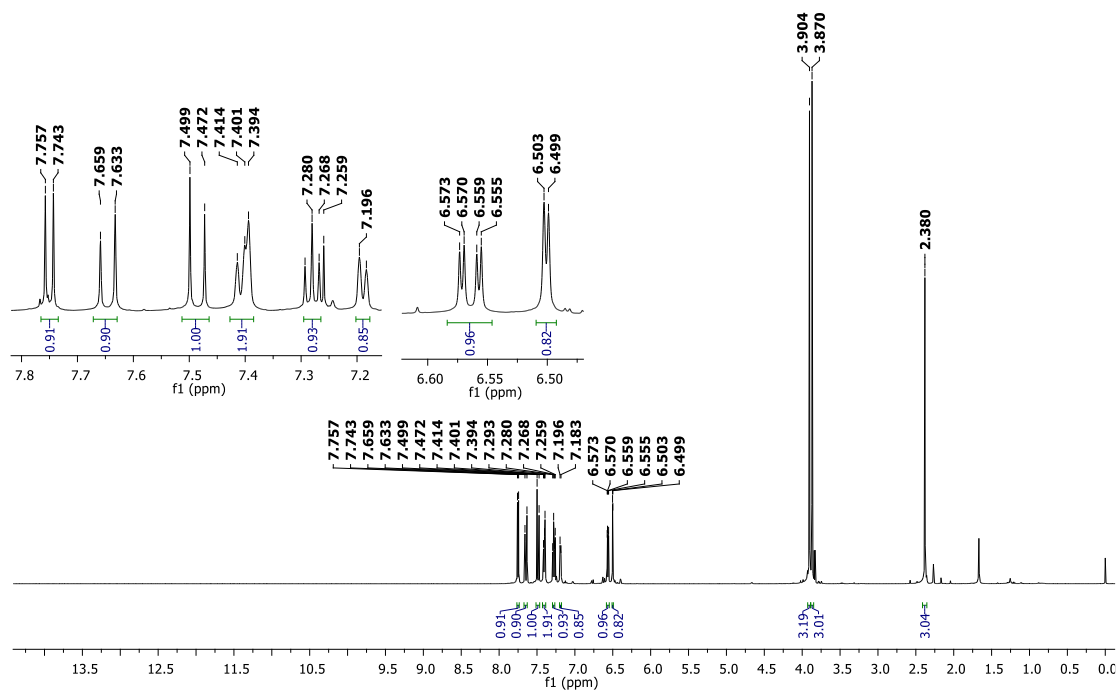


Figura 4b. Espectro de RMN de ^{13}C da chalcona **JA-3Me** (CDCl_3 , 150 MHz)

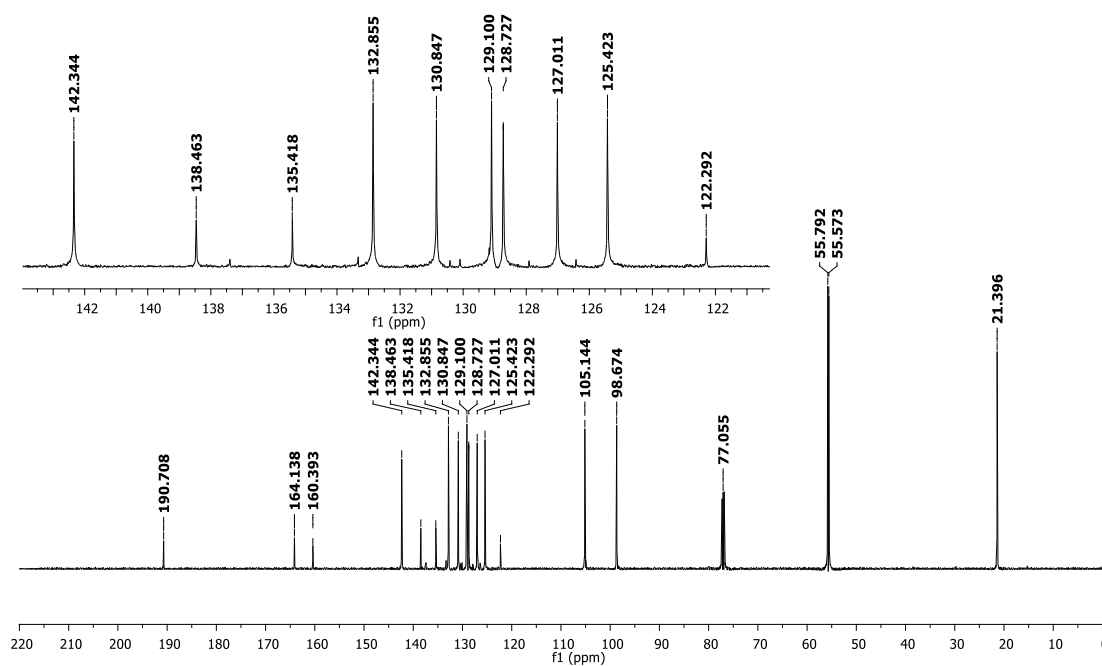


Figura 5a. Espectro de RMN de ^1H da chalcona **JA-2OMe** ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz)

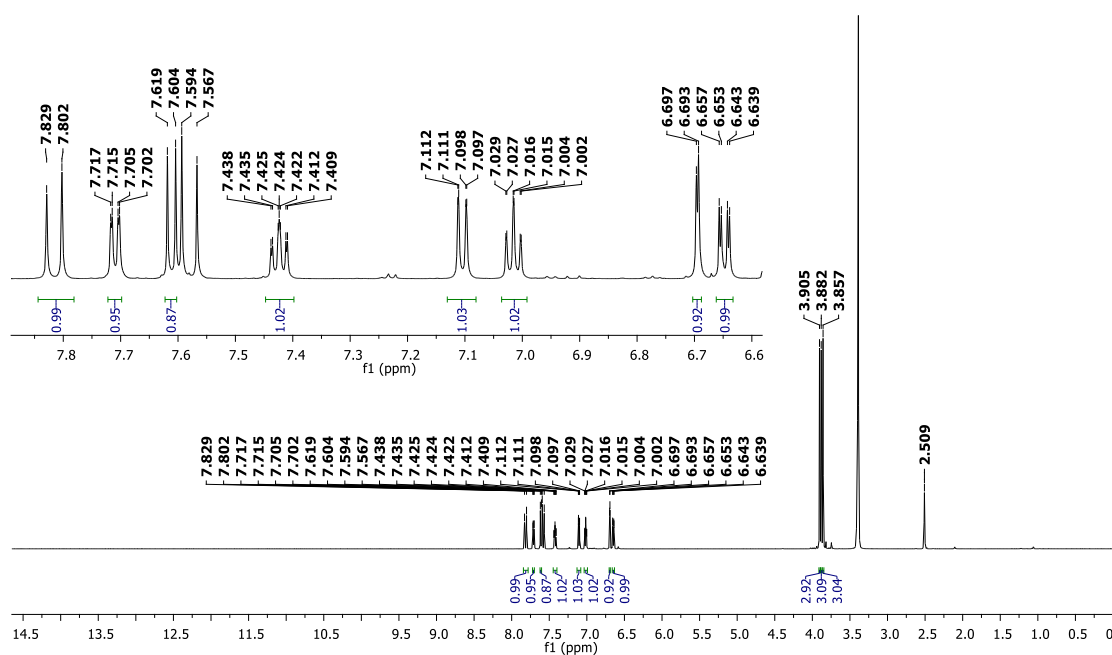


Figura 5b. Espectro de RMN de ^{13}C da chalcona **JA-2OMe** ($\text{DMSO-}d_6$, 150 MHz)

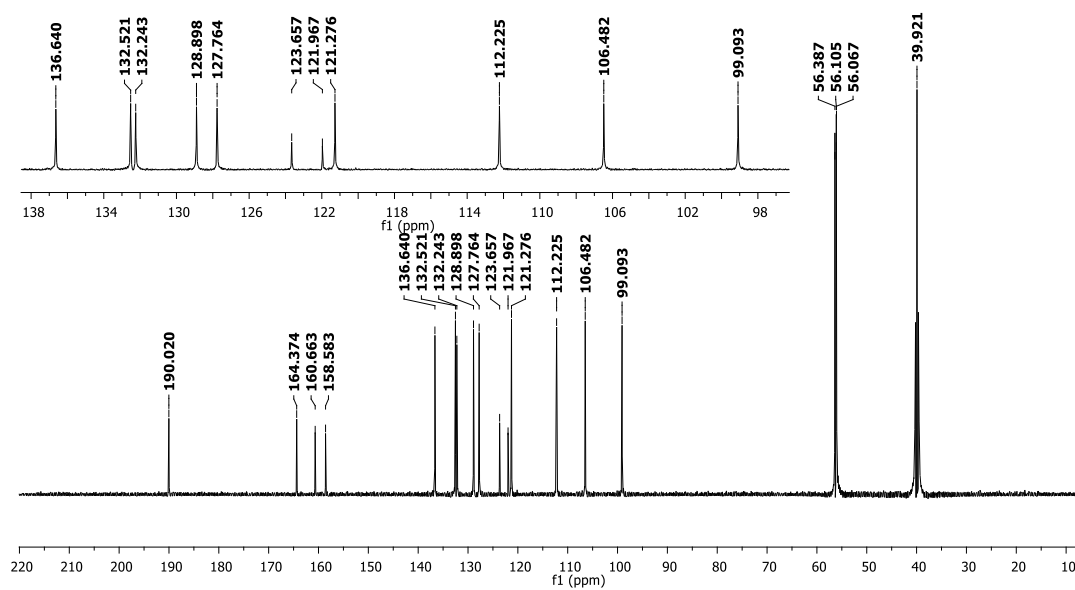


Figura 6a. Espectro de RMN de ^1H da chalcona **JA-4terc** (CDCl_3 , 600 MHz)

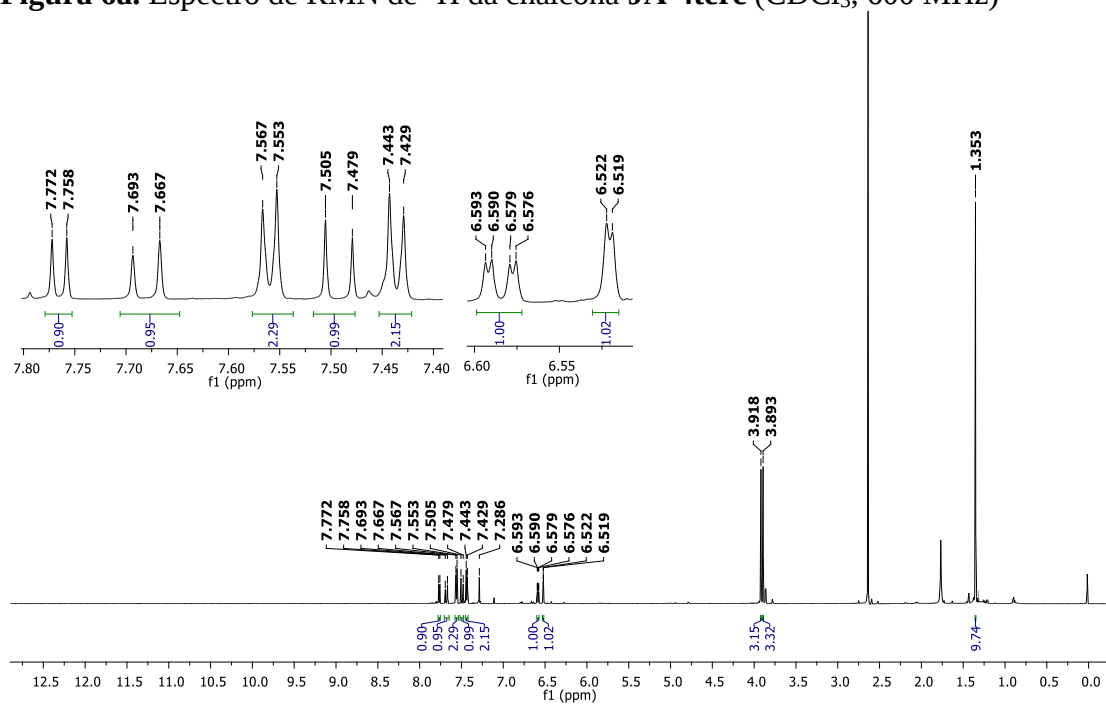


Figura 7a. Espectro de RMN de ^1H da chalcona **JA4etil** (CDCl_3 , 600 MHz)

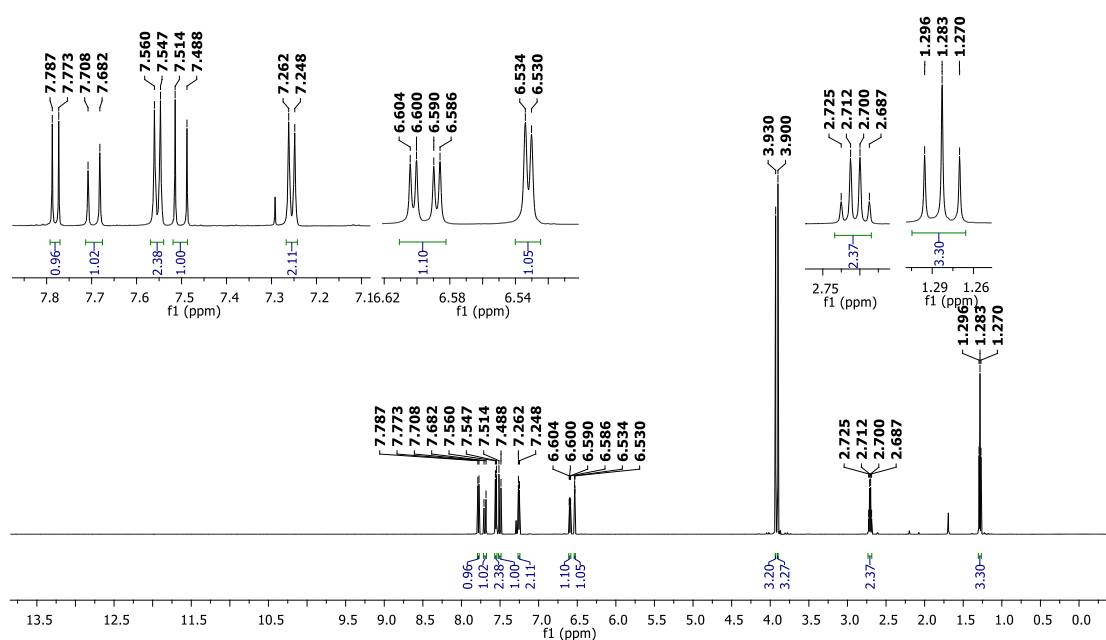


Figura 7b. Espectro de RMN de ^{13}C da chalcona **JA-4etil** (CDCl_3 , 150 MHz)

