

ALVARO LUIZ HELENA

Síntese e avaliação de licochalcona H (LCH) e seus análogos como potenciais agentes antibacterianos e antimicobacterianos

**SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
2022**

ALVARO LUIZ HELENA

Síntese e avaliação de licochalcona H (LCH) e seus análogos como potenciais agentes antibacterianos e antimicobacterianos

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

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Luis Octavio Regasini

São José do Rio Preto - SP

2022

H474s

Helena, Alvaro Luiz

Síntese e avaliação de licochalcona H (LCH) e seus análogos comopotenciais agentes antibacterianos e antimicobacterianos / Alvaro Luiz Helena. -- São José do Rio Preto, 2022

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

Orientador: Luis Octavio Regasini

1. Chalconas. 2. Micobactérias. 3. Bactérias. 4. Compostos bioativos das plantas. 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.

ALVARO LUIZ HELENA

Síntese e avaliação de licochalcona H (LCH) e seus análogos como potenciais agentes antibacterianos e antimicobacterianos

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

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Luis Octavio Regasini

UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto – Orientador

Prof. Dr. Aldo Sena de Oliveira

UFSC – Câmpus Blumenau

Prof. Dr. Andrei Leitão

USP – Câmpus de São Carlos

São José do Rio Preto - SP

04 de abril de 2022

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Luis Octavio Regasini**, primeiramente, pela oportunidade e confiança em poder fazer parte do grupo de pesquisa,

Ao Prof. Dr. **Aldo Sena de Oliveira** e Prof. Dr. **Andrei Leitão** por todo apoio, pela disponibilidade e por todas as contribuições ao presente trabalho,

A todos os meus amigos de laboratório, especialmente, a **Julyanna Andrade**, **Patrick Ozanique** e ao **Kevin Lima**. Aos meus amigos de outros laboratórios também, especialmente, ao **Thomas Brito**,

À minha família, por sempre me apoiar em minhas decisões e sonhos,

À UNESP, especialmente ao IBILCE, pelos 6 anos de formação contínua, a todos os professores e funcionários pelo incrível trabalho,

Ao Prof. Dr. **Carlos Henrique Gomes Martins**, Universidade Federal de Uberlândia, Laboratório de Ensaio Antimicrobianos – LEA, pelos ensaios antimicrobianos contra as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e Micobactérias,

Ao Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP/São José do Rio Preto, especialmente, ao Dr. **Fábio Moraes**, pela realização dos experimentos de Ressonância Magnética Nuclear. À Me. **Dani C Oliveira Lisboa**, Laboratório de Bioenergia (UNESP), pelas análises de HPLC.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Número do processo: 88887.499740/2020-00, à qual agradeço,

Agradeço a FAPESP pelo financiamento do Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos (LAQ).

RESUMO

Com o crescente desenvolvimento de resistência aos fármacos antibacterianos, as infecções microbianas mais comuns vêm se tornando um grande risco e desafio para saúde pública. A licochalcona H (**LCH**) foi selecionada como protótipo para o planejamento de três séries de análogos a serem sintetizados e avaliados contra bactérias e micobactérias patogênicas humanas. A **LCH** é uma retrochalcona C-isoprenilada, sendo um isômero constitucional da licochalcona A (**LCA**) e da licochalcona C (**LCC**), isoladas das raízes de *Glycyrrhiza glabra* (regaliz ou alcaçuz). A série I visa a avaliação de análogos modificados no anel A, permitindo avaliar a relevância da presença e posição da hidroxila e de substituintes eletrodoadores e eletroatratores. As modificações com relação ao substituinte isoprenila do anel B compõem a série II de análogos. A série III é composta pelas reduções parcial e total da cetona α , β -insaturada de **LCH**. Até o momento foram sintetizadas 35 substâncias, sendo 24 intermediários e 11 produtos finais, sendo eles a **LCH**, dois produtos naturais (equinatina e loureirina C) e os demais são inéditos na literatura. Para obtenção dos produtos finais desenvolveu-se uma rota sintética inédita que inclui reações de proteção com grupo metoximetila, O-metilação, iodação regioseletiva, condensação aldólica de Claisen-Schmidt, acoplamento de Suzuki-Miyaura, desproteção e redução de carbonila α , β -insaturada. **LCH**, equinatina (**ECH**) e **7** se mostraram ativos contra bactérias Gram-positivas, micobactérias e inativas contra Gram-negativas, exceto contra *Helicobacter pylori*, com valores de Concentração Inibitória Mínima capaz de inibir pelo menos 90% dos micro-organismos (CIM₉₀) variando de 9,2 – 1480 μ M. **7**, um regioisômero de **LCH**, apresentou uma potência aumentada, em comparação com o protótipo, em até 8 vezes contra bactérias Gram-positivas e em até 2 vezes contra micobactérias. Por outro lado **7**, foi 3 vezes menos ativa que **LCH** contra *H. pylori*. Dos análogos avaliados biologicamente da série I, **7** foi o único que apresentou atividade significativa comparado aos controles positivos (tetraciclina e clorexidina), o que indica que a hidroxila no anel A possui contribuição farmacofórica. Contra as micobactérias a **ECH** foi destaque, considerando sua simplicidade sintética, demonstrando valores de CIM₉₀ variando de 115,6 – 231,2 μ M.

Palavras-chave: Licochalcona H. Iodação-Regioseletiva. Acoplamento de Suzuki. Bactérias. Micobactérias.

ABSTRACT

With the increasing development of resistance to antibacterial drugs, the most common microbial infections have become a major risk and challenge for public health. Licochalcone H (**LCH**) was selected as a prototype for the design of three series of analogues to be synthesized and evaluated against human pathogenic bacteria and mycobacteria. **LCH** is a C-isoprenylated retrochalcone, a constitutional isomer of licochalcone A (**LCA**) and licochalcone C (**LCC**), isolated from the roots of *Glycyrrhiza gabra* (regalis or licorice). The series I aims at the evaluation of modified analogues in the A ring, allowing to evaluate the relevance of the presence and position of the hydroxyl and electron donor-acceptor substituents. Modifications with respect to the isoprenyl substituent of B ring compose the series II of analogues. Series III is composed of partial and total reductions of the α , β unsaturated ketone of **LCH**. So far, 35 substances have been synthesized, 24 of which are intermediates and 11 are final products, being **LCH**, two natural products (echinatin and loureirin C) and the others are unpublished in the literature. To obtain the final products, an unprecedented synthetic route was developed that includes protection reactions with methoxymethyl group, O-methylation, regioselective iodination, Claisen-Schmidt aldol condensation, Suzuki-Miyaura coupling, deprotection and reduction of α , β unsaturated carbonyl. **LCH**, echinatin (**ECH**) and **7** were active against Gram-positive bacteria, mycobacteria and inactive against Gram-negative bacteria, except against *Helicobacter pylori*, with minimum inhibitory concentration values capable of inhibiting at least 90% of microorganisms (MIC_{90}) ranging from 9,2 – 1480 μ M. **7**, a regioisomer of **LCH**, showed an increased potency compared to the prototype, up to 8 times against Gram-positive bacteria and up to 2 times against mycobacteria. On the other hand, **7** was 3 times less active than **LCH** against *H. pylori*. Of the biologically evaluated analogues of series I, **7** was the only one that showed significant activity compared to positive controls (tetracycline and chlorhexidine), which indicates that hydroxyl group in the A ring has a pharmacophoric contribution. Against mycobacteria, **ECH** was the highlight, considering its synthetic simplicity, showing MIC_{90} values ranging from 115,6 – 231,2 μ M.

Keywords: Licochalcone H. Regioselective-Iodination. Suzuki coupling. Bacteria. Mycobacteria.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Estrutura geral do núcleo chalcônicos	14
Figura 2	– Estrutura da licochalcona A, licochalcona H e licochalcona C	15
Figura 3	– Produtos finais e seus rendimentos globais	23
Figura 4	– Estrutura geral para identificação dos hidrogênios dos espectros	47
Figura 5	– Espectro de RMN H^1 do composto 26 (600MHz – $CDCl_3$)	47
Figura 6	– Espectro de RMN H^1 do composto 27 (600MHz – $CDCl_3$)	48
Figura 7	– Espectro de RMN H^1 do composto 28 (600MHz – $CDCl_3$)	48
Figura 8	– Espectro de RMN H^1 do composto 3a (600MHz – $CDCl_3$)	49
Figura 9	– Espectro de RMN H^1 do composto 3 (600MHz – acetona- d_6)	49
Figura 10	– Cromatograma de HPLC do composto 3 . Metanol:Água (3:1), 254 nm	50
Figura 11	– Espectro de RMN H^1 do composto 5 (600MHz – acetona – d_6)	50
Figura 12	– Cromatograma de HPLC do composto 5 . Metanol:Água (3:1), 254 nm	51
Figura 13	– Espectro de RMN H^1 do composto 7 (600MHz – acetona – d_6)	51
Figura 14	– Cromatograma de HPLC do composto 7 . Metanol:Água (3:1), 254 nm	52
Figura 15	– Espectro de RMN H^1 do composto 8 (600MHz – acetona – d_6)	52
Figura 16	– Cromatograma de HPLC do composto 8 . Metanol:Água (3:1), 254 nm	53
Figura 17	– Espectro de RMN H^1 do composto 9 (600MHz – acetona – d_6)	53
Figura 18	– Cromatograma de HPLC do composto 9 . Metanol:Água (3:1), 254 nm	54
Figura 19	– Espectro de RMN H^1 do composto 12 (600MHz – acetona – d_6)	54
Figura 20	– Espectro de RMN H^1 do composto 13 (600MHz – acetona- d_6)	55
Figura 21	– Espectro de RMN H^1 do composto 14 (600MHz – acetona- d_6)	55
Figura 22	– Espectro de RMN H^1 do composto 16 (600MHz – acetona- d_6)	56
Figura 23	– Cromatograma de HPLC do composto 16 . Metanol:Água (3:1), 254 nm	56
Figura 24	– Espectro de RMN H^1 do composto 17 (600MHz – DMSO d_6)	57
Figura 25	– Cromatograma de HPLC do composto 17 . Metanol:Água (3:1), 254 nm	57
Figura 26	– Espectro de RMN H^1 do composto 22 (600MHz – DMSO d_6)	58
Esquema 1	– Planejamento dos análogos de LCH das séries I-III	16
Esquema 2	– Planejamento dos análogos das séries I e II	17

Esquema 3	–	Planejamento dos análogos reduzidos da série III	18
Esquema 4	–	Síntese regioseletiva de licochalcona H (LCH, 3)	21
Esquema 5	–	Síntese dos análogos 5, 7, 8, 9, 12, 13, 14 e 16	22
Esquema 6	–	Síntese de equinatina (ECH, 17)	22
Esquema 7	–	Síntese de loureirina C (22)	23
Esquema 8	–	Mecanismo proposto de proteção de 25	24
Esquema 9	–	Mecanismo proposto de metilação de 26	25
Esquema 10	–	Mecanismo proposto baseado em Racys de iodação regioseletiva de 27 (Racys et al., 2015)	26
Esquema 11	–	Mecanismo de condensação aldólica de Claisen-Schmidt para obtenção de 3a (Perrin, Kuei-Lin, 2016)	27
Esquema 12	–	Mecanismo proposto baseado Miyaura e Suzuki (Miyaura; Suzuki, 1995)	28
Esquema 13	–	Mecanismo de desproteção de 3b proposto	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividade antibacteriana de LCH e seus análogos expressa em valores de CIM	30
Tabela 2 – Atividade antimicobacteriana	31

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

LCH	licochalcona H
LCA	licochalcona A
LCC	licochalcona C
ECH	equinatina
CIM	Concentração Inibitória Mínima
OMS	Organização Mundial de Saúde
Gg	<i>Glycyrrhiza glabra</i>
PdCl₂(dppf)	[1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocene]dichloropalladium(II), complex with dichloromethane
S_N2	Substituição nucleofílica bimolecular
S_EAr	Substituição eletrofílica aromática
E1cB	Eliminação unimolecular de base conjugada
CCD	Cromatografia em camada delgada
TMS	Tetrametilsilano
δ	Deslocamento químico
J	Acoplamento
s	Simpletos
d	Dupletos
dd	Duplos dupletos
t	Tripletos
q	Quadrupletos
dt	Duplos tripletos
m	Multipletos
HPLC – PAD	High Performance Liquid Chromatography – pulsed amperometric detection
R_f	Fator de retenção
ATCC	American Type Culture Collection
LEA	Laboratório de Ensaio Antimicrobianos
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente à Meticilina
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à metilina

LISTA DE SÍMBOLOS

μM	Micromolar
$\mu\text{g mL}^{-1}$	Micrograma por mililitro
nm	Nanometros
MHz	Megahertz
mmol	Milimol
mL	Mililitro
g	Gramas
Hz	Hertz
μL	Microlitro

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
1.1	Resistência microbiana	13
1.2	Produtos naturais	13
1.2.1	Chalconas	14
1.3	Justificativa	14
1.4	Planejamento	15
1.4.1	Modificação no anel A e B (Série I e II)	16
1.4.2	Modificação na α , β -cetona (Série I e II)	17
2.	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivo geral	19
2.2	Objetivos específicos	19
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
3.1	Parte química	20
3.1.1	Síntese regiosseletiva de LCH (3): rota baseada em Wang H. e colaboradores	20
3.1.2	Síntese dos análogos 5, 7, 8, 9, 12, 13, 14 e 16 (Série I)	21
3.1.3	Síntese de equinatina (17 , série II): rota adaptada de Nielsen e colaboradores	22
3.1.4	Síntese de loureirina C (22 , série III) metodologia de Mirza-Aghayan e coautores	22
3.1.5	Produtos finais e seus respectivos rendimentos globais	23
3.1.6	Mecanismos de reações envolvidas na síntese da LCH	24
3.1.7	Metodologias testadas e otimizações sintética	29
3.2	Estudo biológico	30
3.2.1	Atividade antibacteriana – Concentração Inibitória Mínima (CIM ₉₀)	30
3.2.2	Atividade antimicobacteriana – Concentração Inibitória Mínima (CIM ₉₀)	31
4.	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	33
4.1	Parte química	33
4.1.1	Geral	33
4.1.2	Síntese de licochalcona H (3)	33
4.1.3	Síntese de 5, 7, 8, 9, 12, 13, 14 e 16	36
4.1.4	Síntese de equinatina	39
4.1.5	Síntese de loureirina C (22)	40
4.2	Estudo biológico	41
4.2.1	Determinação de CIM	41
5.	CONCLUSÃO	43

REFERÊNCIAS	44
MATERIAL SUPLEMENTAR	47

1. INTRODUÇÃO

1.1 Resistência Microbiana

A resistência microbiana é uma preocupação global que está entre as 10 principais ameaças a saúde pública (WHO, 2021). A constante evolução dos mecanismos de resistência requer esforços para o entendimento e desenvolvimento contínuo de novos fármacos que sejam eficazes, seguros e capazes de contornar os padrões mecânicos de resistência, tornando-se indispensável a criação de novos programas de incentivo a pesquisa (Rossolini et al., 2010).

Em 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) criou uma lista de prioridade de patógenos para a pesquisa e desenvolvimento de novos agentes antibacterianos, que é composta por bactérias de: Prioridade 1 (Crítica) – *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*, resistentes à carbapenêmicos; *Enterobacteriaceae*, resistente à carbapenêmicos e produtores de beta-lactamases de espectro estendido. Prioridade 2 (Alta) – *Enterococcus faecium*, resistente à vancomicina; *Staphylococcus aureus*, resistente à meticilina e vancomicina; *Helicobacter Pylori*, resistente à claritromicina; *Campylobacter* spp. e *Salmonellae*, resistente à fluoroquinolonas; *Neisseria gonorrhoeae*, resistente à fluoroquinolonas e cefalosporina. Prioridade 3 (Média) – *Streptococcus pneumoniae*, não susceptível à penicilina; *Haemophilus influenzae*, resistente à ampicilina; *Shigella* spp., resistente à fluoroquinolonas (WHO, 2017).

Além das resistências bacterianas a OMS reporta o recrudescimento de cepas resistentes do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (TB), as resistências são classificadas em cinco categorias: TB resistente à isoniazida; TB resistente à rifampicina (RR-TB); multi-fármaco resistente (MDR-TB), soma das duas resistências anteriores; pré-extensivamente-fármaco resistente (pre-XDR-TB), TB resistente à rifampicina e qualquer fluoroquinolona (classe de fármacos de segunda linha anti-TB); extensivamente-fármaco resistente (XDR-TB), TB resistente à rifampicina, à qualquer fluoroquinolona, e ao menos um dos fármacos: bedaquilina e linezolida (WHO, 2021). A tuberculose multirresistente é considerada uma das principais causas de morte por doenças infecciosas do mundo, todo ano, cerca 10 milhões de pessoas adoecem e 1,5 milhões vão a óbito (WHO, 2020).

1.2. Produtos Naturais

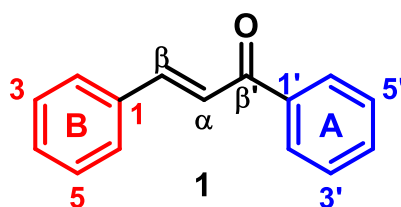
Produtos naturais e seus derivados mostram-se agentes terapêuticos potentes contra patógenos humanos (Dai et al., 2020), sendo considerados um dos principais pilares para o desenvolvimento de fármacos antimicrobianos (Gerard, 2017). Neste contexto, o Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos (LAQ) do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – UNESP

/ São José do Rio Preto, inspira-se na estrutura de produtos naturais derivados de plantas para o planejamento e desenvolvimento de novas substâncias bioativas.

1.2.1. Chalconas

As chalconas são estruturas base para o planejamento de bioativos do grupo de pesquisa, devido ao seu amplo espectro de bioatividades reportadas na literatura e sua simplicidade sintética (Zhuang et al., 2017). Essas substâncias ocorrem naturalmente no metabolismo secundário de plantas, constituindo uma das maiores subclasses de flavonoides (Di Carlo et al., 1999). Podem ser consideradas flavonoides de cadeia aberta, constituídas por dois anéis aromáticos interligados por uma cetona α , β -insaturada (Figura 1) (Osman et al., 2022; Dewick, 2009).

Figura 1 – Estrutura geral do núcleo chalcônico



Fonte: Elaborado pelo autor.

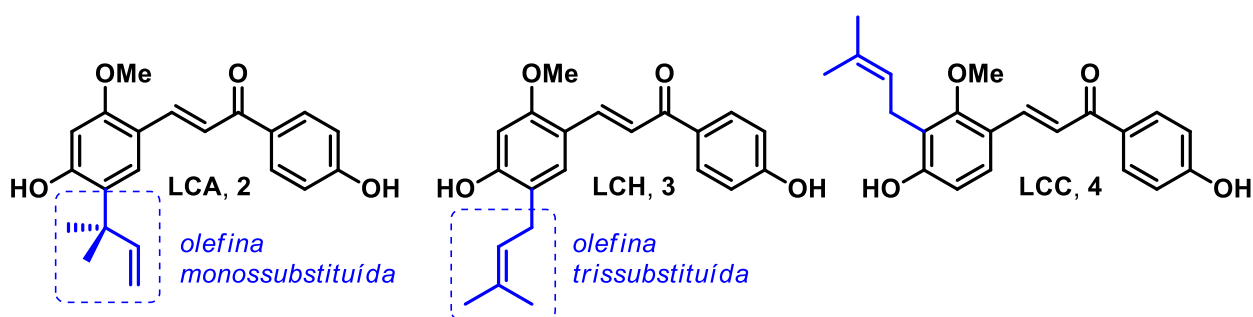
As retrochalconas são uma classe de chalconas que possuem os anéis A e B com oxidações biossinteticamente invertidas, sendo a principal característica a falta de funcionalizações oxigenadas nos carbonos 2' e 6'. Uma das principais espécies vegetais que acumulam retrochalconas é *Glycyrrhiza glabra* (Gg), popularmente chamada de alcaçuz ou regaliz, nativa de várias regiões como Oriente Médio, sul da Europa e Índia, sendo comumente empregada pela medicina tradicional de culturas dessas regiões e também de regiões orientais, há centenas de anos. Gg é utilizada no tratamento de complicações relacionadas ao pulmão, úlceras, hepatites e doenças de pele. Além de, etnofarmacologicamente, serem usadas para tratarem hepatite crônica viral no Japão, tuberculose na China e úlceras péptica e bucal em diversas outras partes do mundo (Upadhyay et al., 2020). As licochalconas são retrochalconas extraídas de Gg, e compõem um grupo de sete substâncias: licochalconas A, B, C, D, E, G e equinatina (ECH) (Kwak et al., 2019).

1.3. Justificativa

A licochalcona A (**LCA, 2**), retrochalcona majoritária de Gg, podendo conter de 8-10 mg por grama de extrato (Liu et al., 2021), exibe um amplo espectro de bioatividades, principalmente antitumoral (Liu et al., 2021; Hu et al., 2019; Yuan et al. 2020). LCA possui atividade antibacteriana descrita contra espécies Gram-positivas e Gram-negativas, sendo ativa contra *Helicobacter pylori*,

exibindo um valor de concentração inibitória mínima (CIM) de $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ e contra micobactérias, apresentando valores de CIM de 7,9, 15,7 e $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ contra *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium avium*, respectivamente (Fukai et al., 2002; Friis et al., 2001). Contudo a LCA apresenta uma citotoxicidade indesejável (Osman et al., 2022), possivelmente relacionada a instabilidade química e metabólica de sua olefina monossustituída. Com a substituição da funcionalização C-prenila (olefina monossustituída) por uma C-isoprenila (olefina trissustituída) chegamos na estrutura da licochalcona H (LCH, 3), que contorna o problema da instabilidade olefínica. Dessa forma, a LCH foi selecionada como protótipo para o planejamento de novos agentes antimicrobianos. A LCH é uma retrochalcona C-isoprenilada que foi sintetizada pela primeira vez por Wang, Z. em 2013, recebeu o nome por se tratar de um regioisômero de licochalcona C (LCC, 4), que por sua vez ocorre de forma natural e exibe diversas bioatividades descritas na literatura (Wang, Z. et al., 2013) (Figura 2).

Figura 2 – Estruturas da licochalcona A (LCA, 2), licochalcona H (LCH, 3) e licochalcona C (LCC, 4)



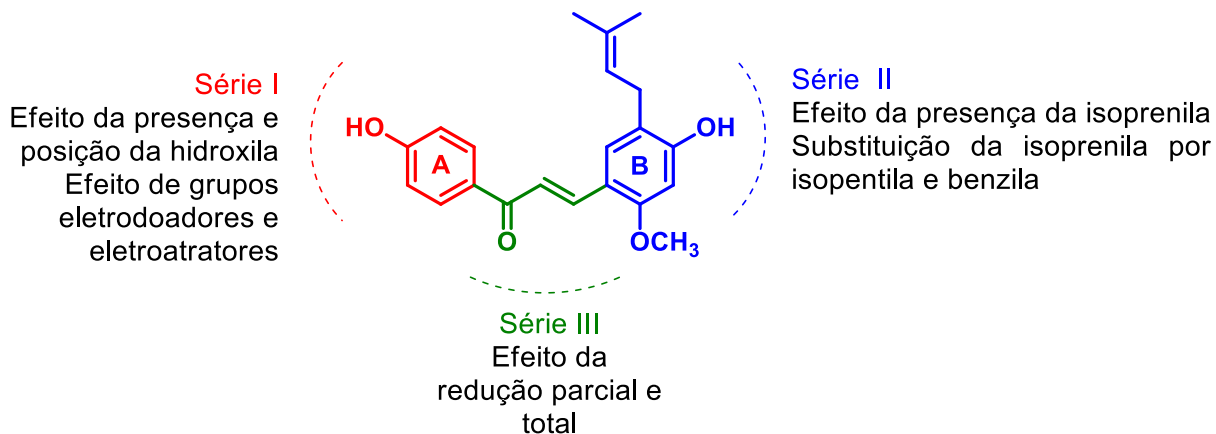
Fonte: Elaborado pelo autor.

A LCH exibe na literatura atividade antitumoral, inibindo eficazmente a via de sinalização JAK/STAT3 e, dessa forma, induzindo a apoptose celular de carcinoma espinocelular oral, com valores de MIC_{50} contra as linhagens HN22 e HSC4 de $11,8 \mu\text{M}$ e $14,4 \mu\text{M}$, respectivamente (Oh et al., 2019; Nho et al., 2018). Já suas atividades antibacteriana e antimicobacteriana são completamente inexploradas.

1.4. Planejamento

Foram planejadas três séries de análogos que têm como objetivo potencializar a atividade antimicrobiana de LCH, sendo as séries I, II e III com modificações no anel A (relevância da *para*-hidroxila e permuta por substituintes eletrodoadores e eletroatradores), anel B (efeito da substituição da isoprenila) e cetona α , β -insaturada (efeito da redução parcial e total), respectivamente (Esquema 1).

Esquema 1 – Planejamento dos Análogos de LCH das séries I-III

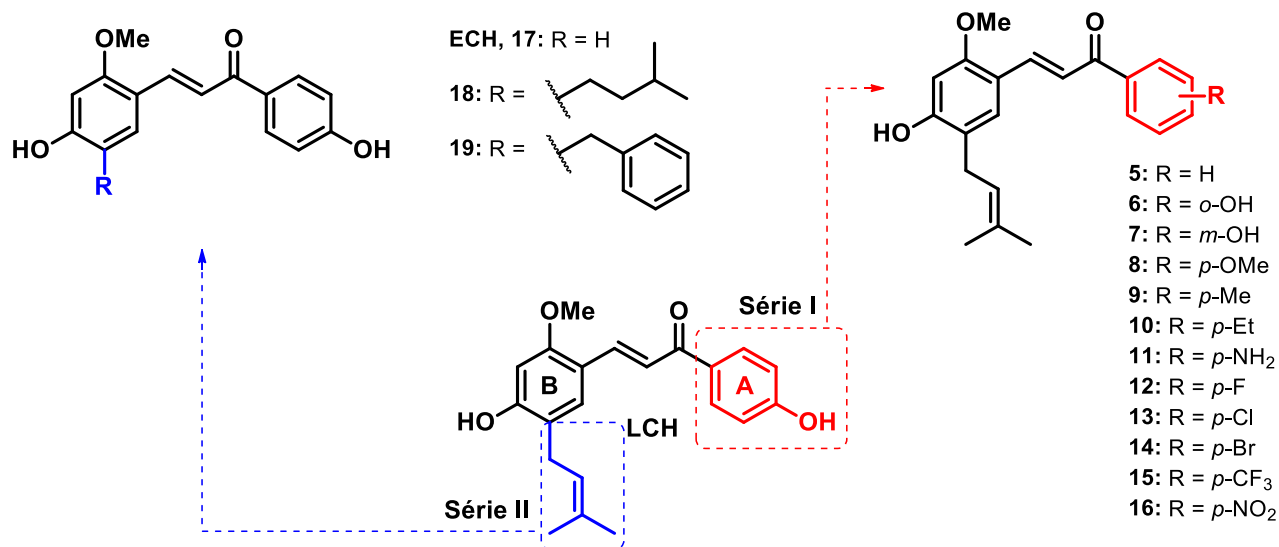


Fonte: Elaborado pelo autor.

1.4.1 Modificações no Anel A e B (Série I e II)

A série I (Esquema 2) inclui modificações na hidroxila do anel A. Primeiramente avalia-se a importância da presença dessa subunidade, levando ao análogo **5**; em segundo lugar altera-se a posição da hidroxila para *orto* e *meta*, análogos **6** e **7**, respectivamente; e por fim permuta-se a subunidade por outros substituintes eletrodoadores (**9 – 11**), e também substituintes eletroatratores (**12 – 16**), todos inéditos na literatura. A série II (Esquema 2) de análogos modifica a C-isoprenila, o análogo (**ECH**, **17**) avalia a importância da presença subunidade, levando a estrutura da Equinatina, já **18** e **19** alteram a subunidade para isopentila e benzila, respectivamente, ambos inéditos.

Esquema 2 – Planejamento de análogos das séries I e II (5 – 19)

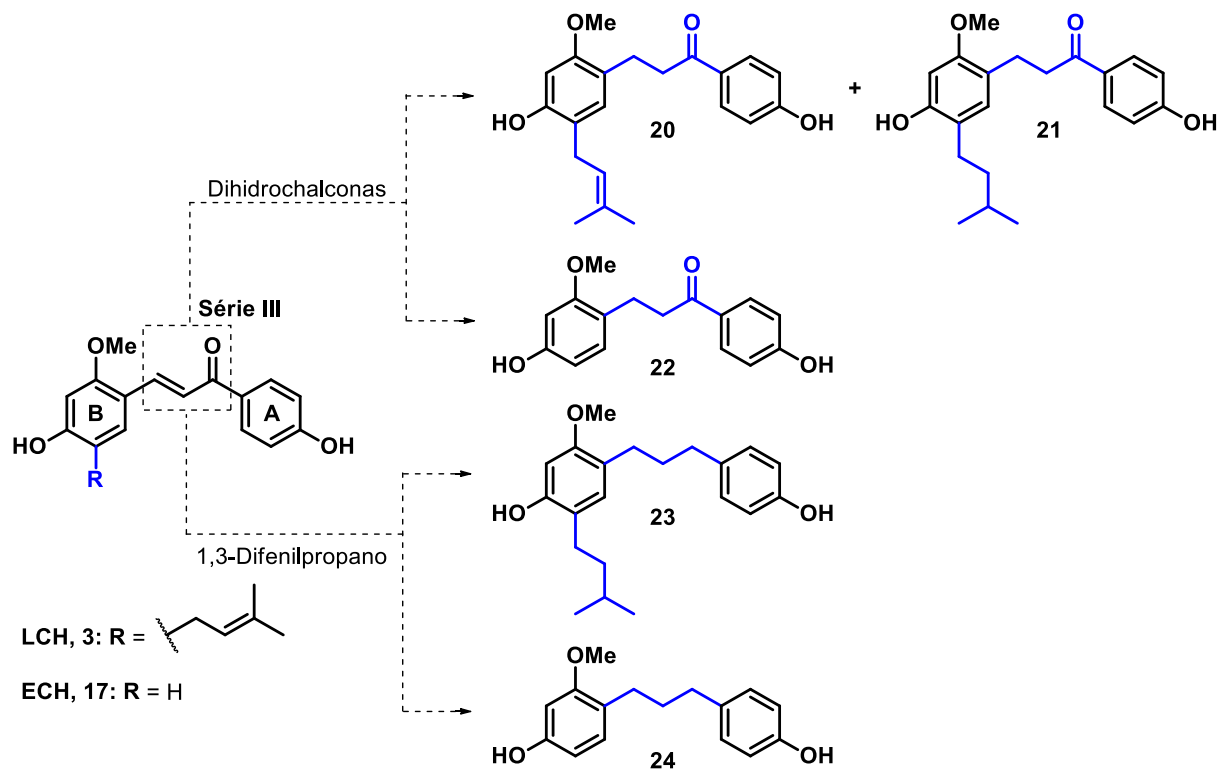


Fonte: Elaborado pelo autor.

1.4.2 Modificações na Cetona α , β -insaturada (Série III)

A série III (Esquema 3) de análogos conta com reduções da cetona α , β -insaturada tanto da LCH (**3**) como da ECH (**17**) inicialmente temos as reduções parciais, onde se formam as dihidrochalconas, para LCH: compostos (**20** e **21**), ambos inéditos. E para ECH: composto **22**, levando a estrutura da Loureirina C, composto de origem natural extraído da *Dracaena draco*, popularmente conhecida como Dragon's Blood, possuindo atividade anti-inflamatória (Li et al., 2021; Su et al., 2014). E por fim, as reduções totais, para LCH: composto **23**, inédito. E para ECH: composto **24**, coincidindo com a estrutura da Broussonina B, composto de origem natural isolado da *Broussonetia papyrifera*, possuindo atividade antifúngica (Almeida et al. 1999).

Esquema 3 – Planejamento de análogos reduzidos da série III (20 – 24)



Fonte: Elaborado pelo autor.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho é sintetizar e avaliar as atividades antibacteriana e antimicobacteriana de licochalcona H (**LCH**) e seus análogos.

2.2. Objetivos específicos

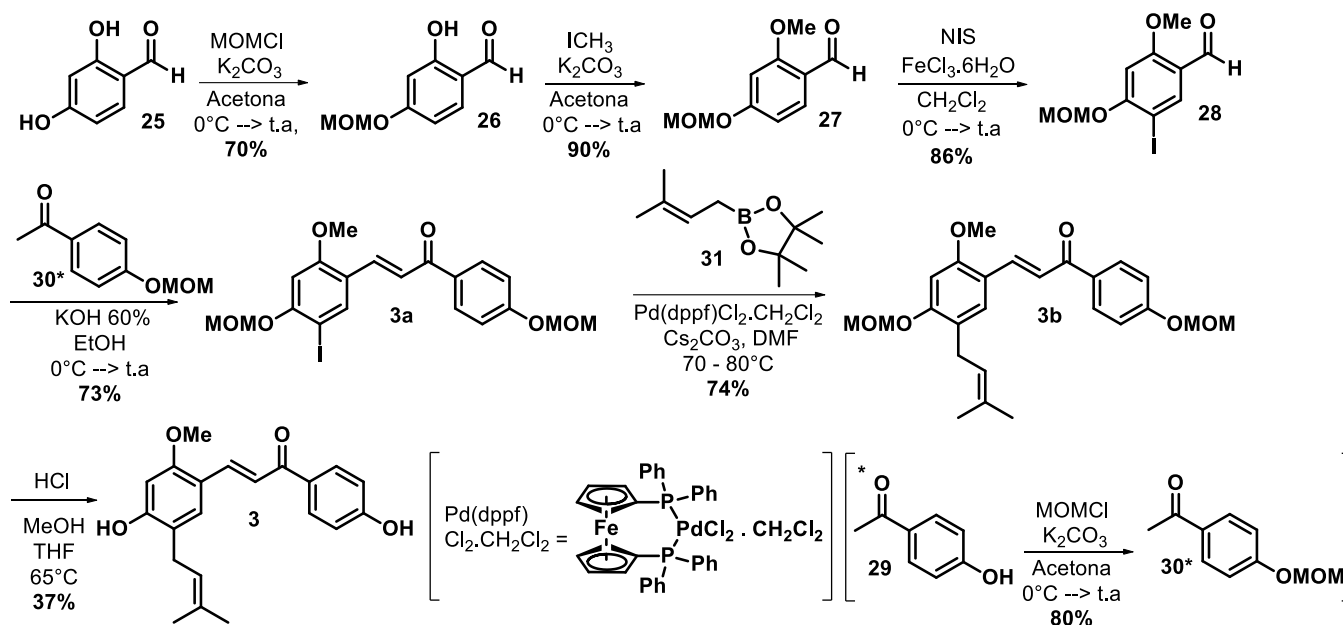
- a) Investigar a síntese de licochalcona H (**LCH**) e três séries de análogos com modificações nos anéis A e B e da ponte cetônica α , β -insaturada;
- b) Avaliar a atividade antibacteriana contra *S. aureus* (MSSA e MRSA), *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *S. pneumoniae*, *S. sanguinis*, *S. sobrinus*, *S. mutans*, *H. pylori*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, e *K. pneumoniae*;
- c) Avaliar a atividade antimicobacteriana contra *M. tuberculosis*, *M. avium* e *M. kansasii*;

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Parte química

3.1.1 Síntese regiosseletiva de LCH (**3**): Rota baseada em Wang, H. e colaboradores, 2013; 2015.

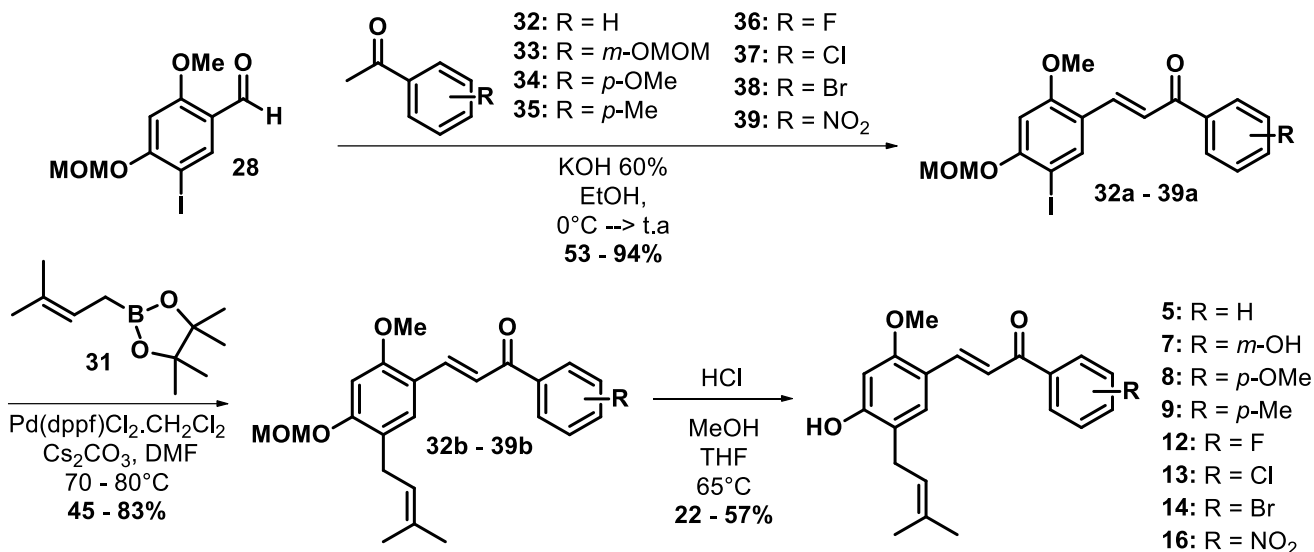
O Esquema 4 mostra a rota sintética inédita para obtenção de LCH (**3**) por iodação regiosseletiva e acoplamento de Suzuki (Racys et al., 2015; Miyaura; Suzuki., 1995; Wang, H. et al., 2013; 2015). Como mostrado no esquema 3, a síntese ocorre em sete etapas. A primeira etapa sintética é a reação de proteção de 2,4-dihidroxibenzaldeído (**25**) via clorometil metil éter (MOMCl) e carbonato de potássio em acetona para obtenção de **26** (70%). Na etapa seguinte o produto 2-hidroxi-4-metoximetoxibenzaldeído (**26**) foi submetido a reação de metilação via iodometano e carbonato de potássio em acetona originando o composto **27** (90%). O produto 2-metoxi-4-metoximetoxibenzaldeído (**27**) passou, então, por reação de iodação regiosseletiva via N-iodosuccinimida (NIS) catalisada por cloreto férrico hexahidratado em diclorometano para obtenção do intermediário de síntese **28** (86%). O intermediário 2-metoxi-4-metoximetoxi-5-iodobenzaldeído (**28**) foi condensado com 4-metoximetoxiacetofenona (**30**) sob catálise básica, hidróxido de potássio 60%, em etanol para obtenção da chalcona **3a** (73%). A Chalcona **3a** passou por reação de acoplamento de Suzuki via ácido borônico do éster pinacol de isoprenila (**31**) catalisada por PdCl₂ (dppf) e carbonato de cézio em DMF para obtenção da chalcona acoplada **3b** (74%). E por fim, a última etapa consiste na desproteção da chalcona **3b** em ácido clorídrico, metanol e THF para a obtenção de licochalcona H (**3**, 37%), com rendimento global de 10%.

Esquema 4 – Síntese regioseletiva de licochalcona H (LCH, **3**)

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.1.2 Síntese dos análogos **5**, **7**, **8**, **9**, **12**, **13**, **14** e **16** (série I)

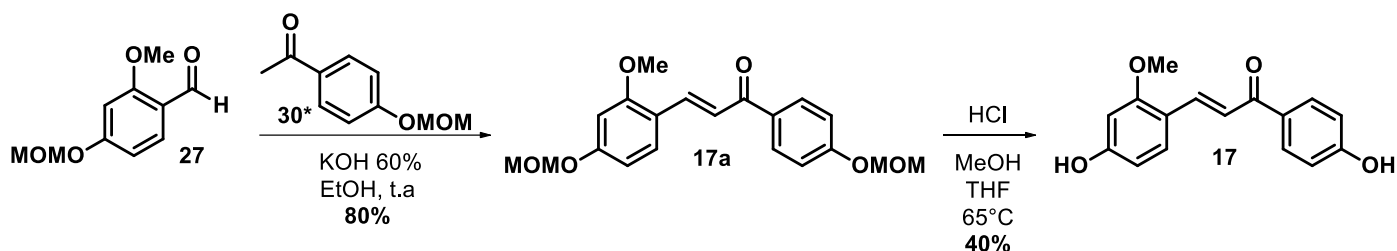
A síntese dos análogos **5**, **7**, **8**, **9**, **12**, **13**, **14** e **16** assim como a de LCH foi realizada via acoplamento de Suzuki (Esquema 5). O intermediário de síntese **28** também utilizado para a síntese dos análogos, reage com derivados acetofenônicos (**32** – **39**) sob catálise básica, hidróxido de potássio 60%, em etanol para obtenção das chalconas **32a** – **39a**, com rendimentos variando de 53 à 94%. As chalconas **32a** – **39a** passaram por reações de acoplamento de Suzuki via éster do ácido pinacol (**31**) catalisada por $PdCl_2$ (dppf) e carbonato de céσιο em DMF para obtenção das chalconas isopreniladas **32b** – **39b**, rendimentos variando de 45 à 82%. Na última etapa as chalconas isopreniladas **32b** – **39b** sofreram desproteção em ácido clorídrico, metanol e THF para a obtenção dos produtos finais **5**, **7**, **8**, **9**, **12**, **13**, **14** e **16**, com rendimentos variando de 22 à 57% e rendimentos globais de 1 à 11%.

Esquema 5 – Síntese dos análogos **5**, **7**, **8**, **9**, **12**, **13**, **14** e **16**.

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.1.3 Síntese de equinatina (**17**, série II): Rota adaptada de Nielsen e colaboradores, 1995.

O Esquema 6 mostra a rota sintética utilizada para a obtenção da equinatina (**17**) adaptada (Nielsen et al., 1995). Na primeira etapa ocorre a condensação entre **27** e **30** sob catálise básica, hidróxido de potássio 60%, em etanol para obtenção do intermediário chalcônico **17a** (80%). Por fim, ocorre a desproteção de **17a** em ácido clorídrico, metanol e THF para obtenção da equinatina (**17**, 40%), com rendimento global de 20%.

Esquema 6 – Síntese de equinatina (ECH, **17**).

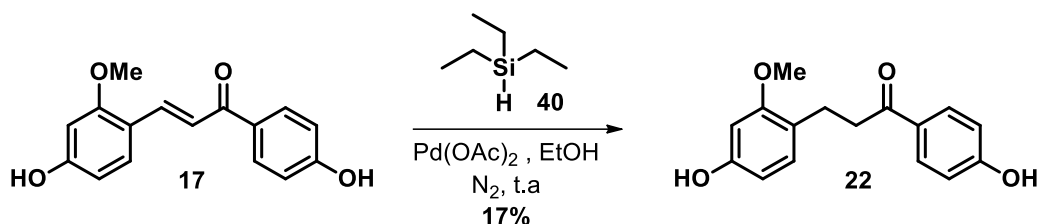
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.1.4 Síntese de Loureirina C (**22**, série III): Metodologia de Mirza-Aghayan e coautores

A síntese de Loureirina C (**22**) foi realizada via redução seletiva da insaturação α , β posicionada de **17** de acordo com Mirza-Aghayan e coautores (Mirza-Aghayan et al., 2007) como mostra o Esquema 7. A reação de redução parcial da equinatina (**17**) ocorre com trietilsilano (**40**)

catalisada por acetato de paládio (II) em etanol para obtenção Loureirina C (**22**) 17%, com rendimento global de 3%.

Esquema 7 – Síntese de loureirina C (**17**)

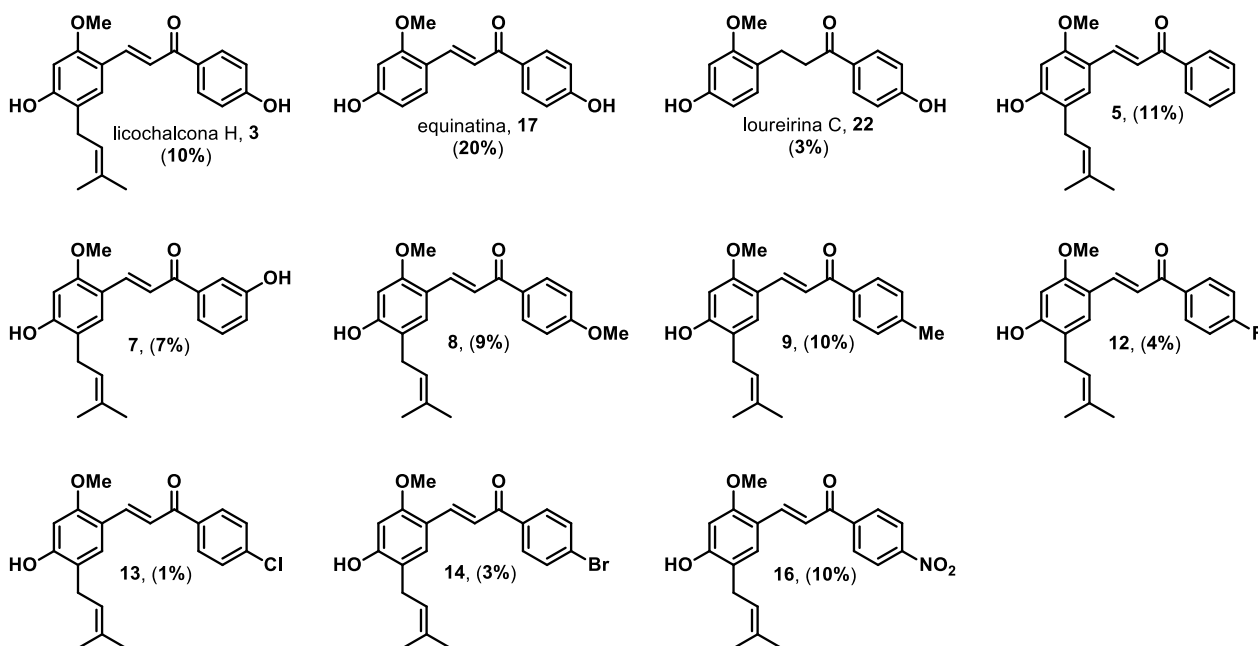


Fonte: Elaborado pelo autor.

3.1.5 Produtos finais e seus respectivos rendimentos globais

A Figura 3 mostra a estrutura química dos 11 produtos finais com seus respectivos rendimentos globais. Os rendimentos globais variaram de 1 à 20%. Retrochalconas C-isopreniladas foram obtidas com rendimentos globais de 1 à 11%. Os baixos rendimentos das retrochalconas halogenadas (**12 – 14**) pode estar associado a condições das suas respectivas acetofenonas, bem como o alto estresse cromatográfico exigido em decorrência disso. Ademais os rendimentos globais, no geral, podem ser melhorados com otimizações nas reações de proteção/desproteção e condensação ou por meio de novas metodologias.

Figura 3 – Produtos finais, e seus rendimentos globais.



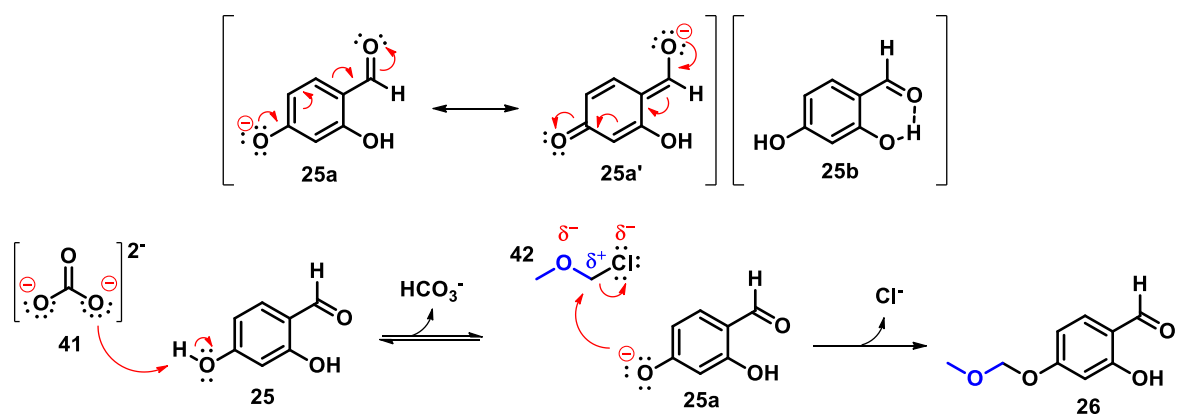
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.1.6 Mecanismos de reações envolvidas na síntese da LCH

- *Mecanismo de proteção*

O mecanismo da reação de proteção de 2,4-dihidroxibenzaldeído (**25**), Esquema 8, consiste em uma substituição nucleofílica bimolecular (S_N2). Primeiramente, considera-se a ressonância estendida (**25a** e **25a'**) da 4-hidroxila tornando-a mais ácida em relação à 2-hidroxila, e em segundo lugar a formação de um pseudo-anel de 6 membros com o hidrogênio da 2-hidroxila (**25b**), dificultando a desprotonação da subunidade. Como evidenciado, a 4-hidroxila é a subunidade mais reativa, facilmente convertendo **25** em **25a** pela captura do próton pelo íon bicarbonato (**41**). O íon enolato de **25a** então ataca o carbono parcial positivo de **42** (cloreto de metoximetila), formando o produto 4-protegido **26**.

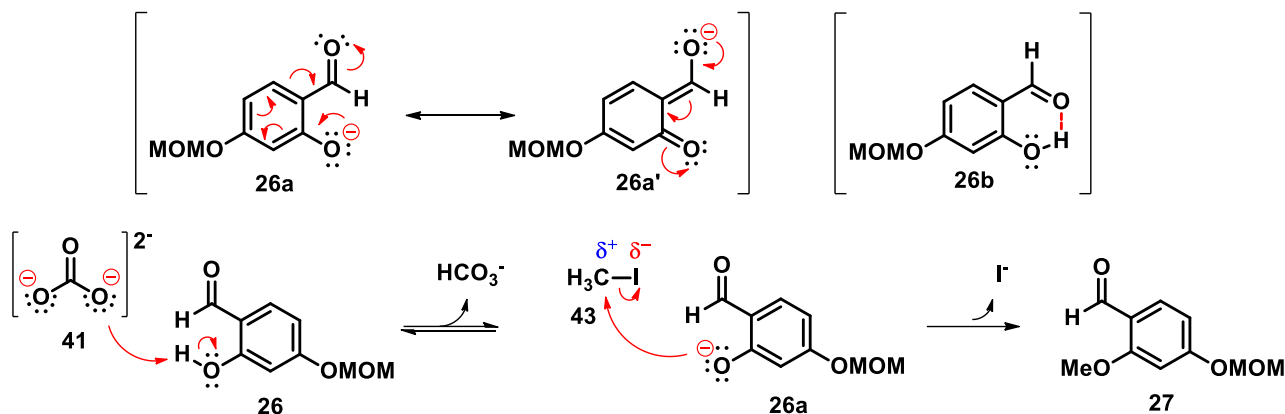
Esquema 8 – Mecanismo proposto de proteção de **25**



Fonte: Elaborado pelo autor.

- *Mecanismo de metilação*

O Esquema 9 mostra o mecanismo de reação de metilação de **26**, que consiste em uma substituição nucleofílica bimolecular (S_N2). Em **26a** e **26a'** observa-se a ressonância da 2-hidroxila na formação do íon enolato, e em **26b** o pseudo-anel de 6 membros, que se torna um obstáculo, pois diminui a reatividade da subunidade, para contornar, aumenta-se a equivalência de catalisador **41**. Após a desprotonação o íon enolato de **26a** pode atacar o carbono parcial positivo de **43** (iodometano), formando o produto 2-metoxilado **27**.

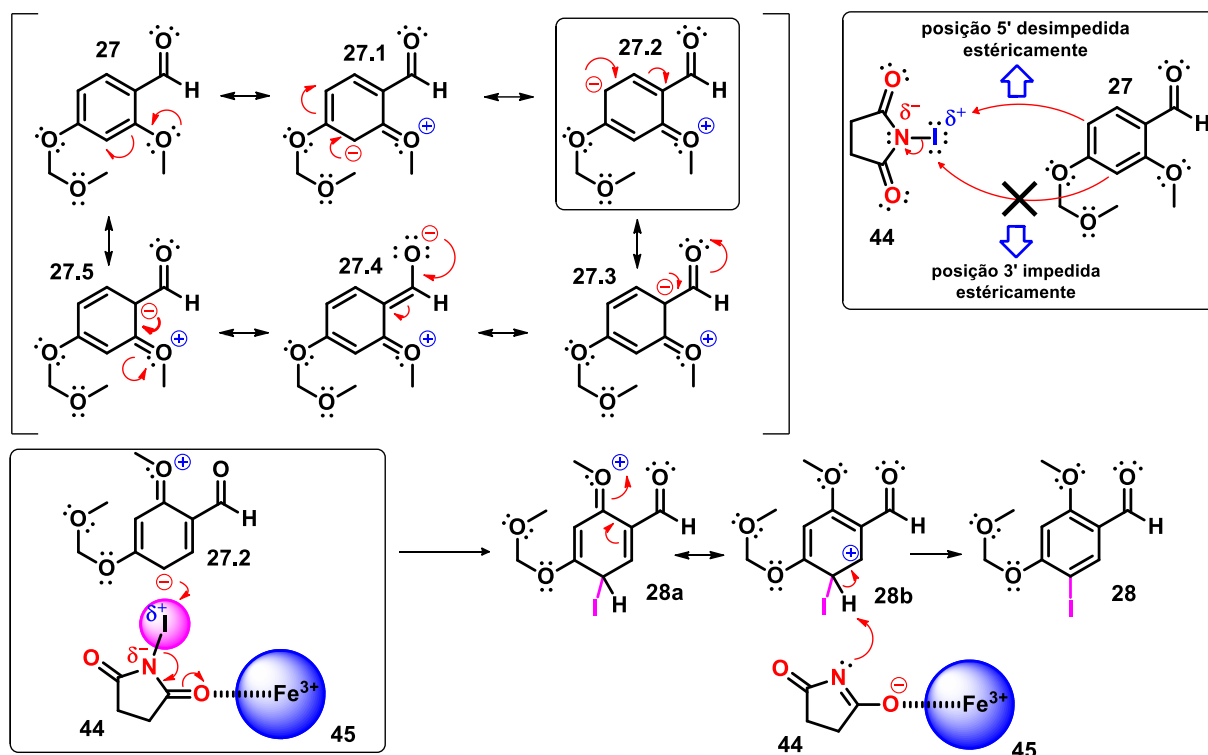
Esquema 9 – Mecanismo proposto de metilação de **26**

Fonte: Elaborado pelo autor.

- *Mecanismo de iodação regioseletiva*

O mecanismo proposto da reação de iodação regioseletiva se baseia em Racys, 2015, ponto chave para síntese de LCH (Racys et al., 2015) Esquema 10, consiste em uma substituição eletrofílica aromática (S_{EAr}). A regioseletividade da iodação pode ser explicada pelo impedimento estérico criado pelos grupos 2-metoxi e 4-metoximetoxi sobre a posição 3' de **27**. As estruturas de **27** – **27.5** mostram a ressonância do par de elétrons, doado por dos grupos metoxi (ativador de anel), com a carbonila. Em **27.2** observa-se a ativação da posição 5' desimpedida, que consegue atacar o iodo, parcial positivo, do agente iodante **44**, que por estar ativado pelo ferro (III) (**45**) é capaz de quebrar a ligação nitrogênio-iodo. Após a entrada do iodo o cátion ressona no anel, intermediários **28a** e **28b**, até o par de elétrons livre no nitrogênio de **44a** capturar o hidrogênio da posição 5' de **28b**, restaurando a ligação dupla do anel e formando o intermediário de síntese **28**.

Esquema 10 – Mecanismo proposto baseado em Racys de iodação regioseletiva de **27** (Racys et al., 2015)

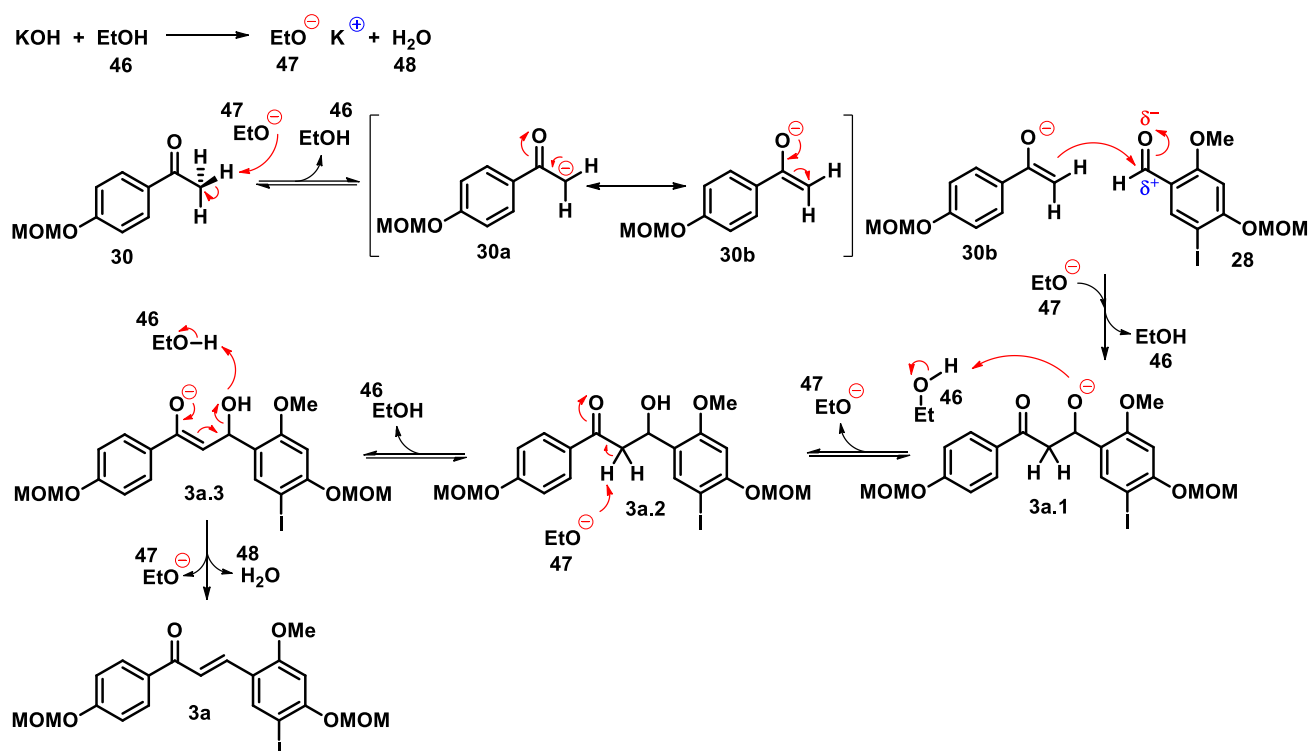


Fonte: Elaborado pelo autor.

- *Mecanismo de condensação aldólica de Claisen-Schmidt*

A condensação aldólica de Claisen-Schmidt sob catálise básica tem seu mecanismo demonstrado no Esquema 11, consiste em uma eliminação unimolecular de base conjugada (E1cB) (Perrin; Chang 2016). Inicialmente observa-se a formação do íon etóxido (**47**), a partir da reação entre etanol (**46**) e a base (KOH). Em seguida, **47** ataca o hidrogênio metílico de 4-metoximetoxiacetofenona (**30**), formando **46** e as formas de ressonância **30a** e **30b** que estabilizam o par de elétrons livre. O carbono metilênico de **30b**, então, é capaz de formar ligação C-C com **28** (benzaléido intermediário de síntese), gerando **3a.1** (o hidrogênio excedente é capturado por **47** indo a **46**). O íon enolato de **3a.1**, captura um próton de **46**, formando **47** e **3a.2**. O hidrogênio ligado ao carbono β de **3a.2** sofre ataque por **47**, formando **46** e **3a.3**. Por fim, a hidroxila de **3a.3** ataca um próton do etanol (**46**) formando uma molécula de água (**48**), íon etóxido (**47**) e o produto da reação **3a**.

Esquema 11 – Mecanismo de condensação aldólica de Claisen-Schmidt para obtenção de **3a** (Perrin; Kuei-Lin 2016)

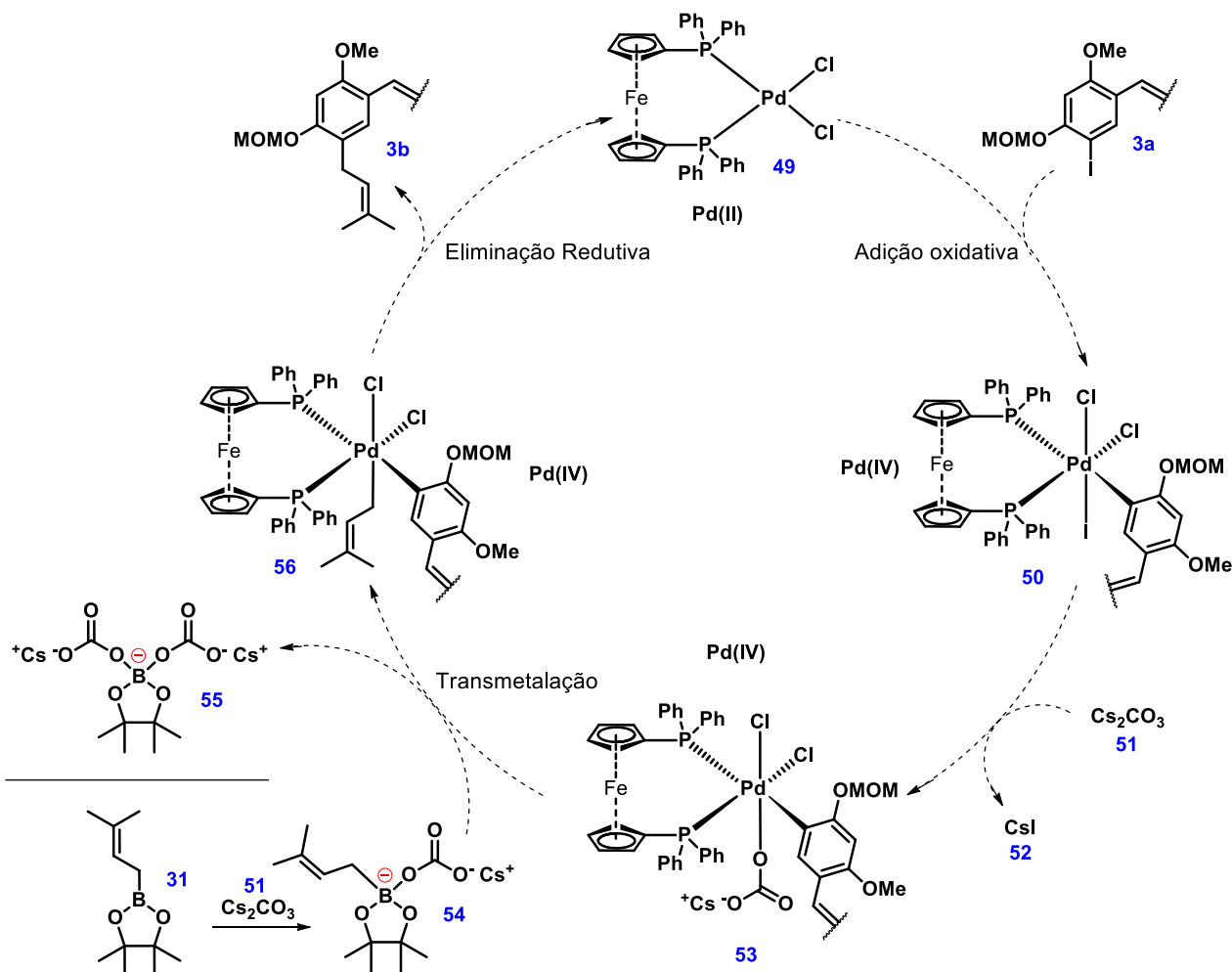


Fonte: Elaborado pelo autor.

- *Mecanismo de acoplamento de Suzuki*

O mecanismo de acoplamento de Suzuki (Esquema 12) proposto, foi desenvolvido com base no ciclo catalítico geral de acoplamento cruzado de Miyaura & Suzuki (Miyaura; Suzuki 1995). Na primeira etapa do ciclo tem-se o intermediário chalcônico (**3a**), passando por uma adição oxidativa ao complexo de paládio (**49**), formando **50** (complexo hexacoordenado de Paládio (IV)). Em seguida temos a substituição do iodo ligado a **50** pelo carbonato de céσιο (**51**), formando **52** e **53**. O carbonato de céσιο (**51**) também se liga ao ácido borônico do éster pinacol de isoprenila (**31**), formando **54**. Na transmetalção ocorre uma substituição da subunidade isoprenila de **54** pelo carbonato, subunidade ligada ao **53**, formando **55** e **56**. Por fim, a eliminação redutiva fecha o ciclo, permitindo a ligação C-C entre a subunidade isoprenila e a subunidade do intermediário chalcônico, que até então estavam ligados a **56**, formando o intermediário chalcônico C-isoprenilado **3b** e a estrutura restaurada do complexo de paládio (II) **49**.

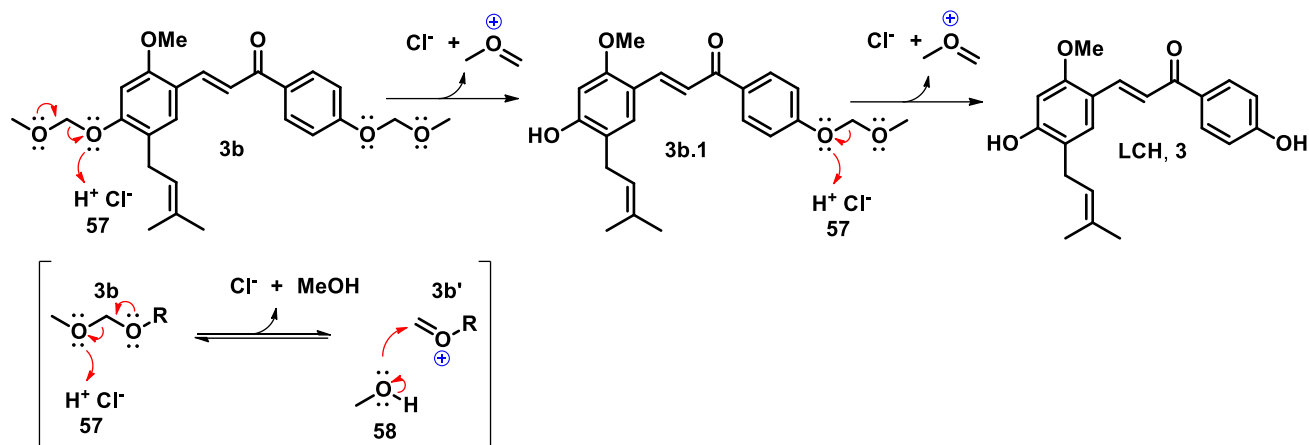
Esquema 12 – Mecanismo proposto, baseado em Miyaura & Suzuki (Miyaura; Suzuki, 1995)



Fonte: Elaborado pelo autor.

- *Mecanismo de desproteção*

O Esquema 13 mostra o mecanismo proposto para a desproteção do intermediário chalcônico C-isoprenilado **3b**. Os elétrons livres dos oxigênios das subunidades metoximetoxi de **3b** se ligam aos prótons liberados pelo ácido clorídrico (**57**), caso a ligação aconteça com o oxigênio diretamente ligado ao anel fenólico ocorre a desproteção, formando o intermediário **3b.1** (monoprotetido). Caso contrário, há a formação do intermediário **3b'** que reagindo com o metanol (**58**) entra em equilíbrio no meio, voltando a estrutura de **3b**, que pode reagir novamente até que ocorra a desproteção. O mesmo acontece com a subunidade metoximetoxi do anel A de **3b.1**, formando, por fim, a licochalcona H (**3**).

Esquema 13 – Mecanismo de desproteção de **3b** proposto

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.1.7 Metodologias testadas e otimizações sintéticas

A síntese de LCH foi descrita, em 2013, por Wang, Z. (Wang, Z. et al., 2013). A primeira etapa, utiliza-se o 2,4-dihidroxibenzaldeído (**25**) como material de partida, inclui reação de alquilação de Friedel-Crafts promovida por ácido, a qual demonstra baixa regioseletividade, devido a possibilidade de ataque as posições 3 e 5 do anel de **25** que são igualmente ativadas pelas hidroxilas, e conduz a vários subprodutos inviabilizando a purificação. Precedentemente a seleção da rota utilizada demais metodologias descritas na literatura foram testadas, incluindo metodologias de rearranjo sigmatrópico (Sugamoto et al., 2011) adaptado para aldeídos e metodologias de iodação direta (Benelhadj et al., 2014), sem regioseletividade, para avaliação de sua eficiência. No entanto, nenhum dos testes citados foram satisfatórios, apresentando alto estresse cromatográfico derivado da promiscuidade sintética, e por consequência, baixos rendimentos.

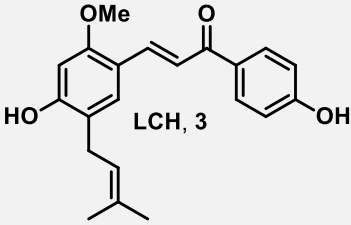
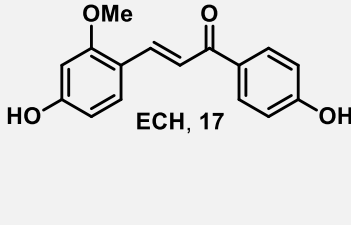
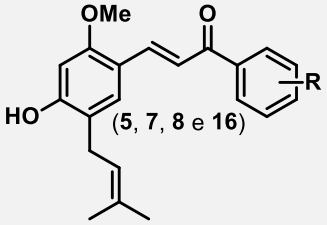
A regioseletividade foi fundamental para a obtenção de **28**, porém sem a utilização de catalisador a iodação de **27** se mostrava ineficiente, mesmo após variações de temperatura, tempo reacional e estequiométricas. A alternativa foi utilizar catalisadores metálicos como o cloreto de ferro (III) hexahidratado (**45**), reagente de baixo custo que tem como propósito ativar o agente iodante NIS (**44**), baseando-se em iodações altamente regioseletiva (Racys et al., 2015), a princípio utilizava-se 100% de equivalente molar, após múltiplas tentativas de otimização chegou-se à quantidade catalítica de 3% de equivalente molar, com tempo reacional igual e rendimentos superiores, ademais passou-se a utilizar-se métodos de purificação simplificados, como a recristalização acetato de etila / hexano.

3.2 Estudo biológico

3.2.1 Atividade antibacteriana – Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀)

A Tabela 1 mostra os valores de CIM₉₀ dos compostos LCH (**3**), ECH (**17**), **5**, **7**, **8**, **16** e controles positivos (tetraciclina e clorexidina) contra as espécies bacterianas Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC (6538); *Staphylococcus aureus* ATCC (BAA44) (MRSA); *Staphylococcus epidermidis* ATCC (14990); *Enterococcus faecalis* ATCC (1299); *Streptococcus pneumoniae* ATCC (6305); *Streptococcus sanguinis* ATCC (10556); *Streptococcus sobrinus* ATCC (33478); *Streptococcus mutans* ATCC (25175); e Gram-negativas: *Helicobacter pylori* ATCC (43526); *Pseudomonas aeruginosa* ATCC (27853); *Klebsiella pneumoniae* ATCC (13883); *Escherichia coli* ATCC (35218).

Tabela 1 – Atividade antibacteriana de LCH e seus análogos expressa em valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀ em µM)

Código	µM											
	<i>S.a.</i> ¹	<i>S.a.</i> ²	<i>S.e.</i>	<i>E.f.</i>	<i>S.p.</i>	<i>S.sa.</i>	<i>S.so.</i>	<i>S.m.</i>	<i>H.p.</i>	<i>P.a.</i>	<i>K.p.</i>	<i>E.c.</i>
 LCH, 3												
 ECH, 17												
 (5 , 7 , 8 e 16)												
LCH, 3	36,9	36,9	36,9	1182	73,8	36,9	73,8	73,8	11,5	>1182	>1182	>1182
ECH, 17	185	185	92,5	1480	>1480	185	370	370	115,6	>1480	>1480	>1480
5 (R = H)	>1240	>1240	>1240	>1240	>1240	>1240	>1240	>1240	>1240	>1240	>1240	>1240
7 (R = <i>p</i> -OH)	9,2	9,2	18,4	295	295	9,2	18,4	9,2	36,9	>1182	>1182	>1182
8 (R = <i>p</i> -OMe)	>1135	>1135	>1135	>1135	>1135	>1135	>1135	>1135	>1135	>1135	>1135	>1135
16 (R = <i>p</i> -NO ₂)	>1088	>1088	>1088	>1088	>1088	>1088	>1088	>1088	>1088	>1088	>1088	>1088
tetraciclina	0,2	13,3	13,3	3,3	0,4	-	-	-	3,3	13,3	3,3	1,6
clorexidina	-	-	-	-	-	1,8	3,6	0,9	-	-	-	-

S. a.1: *Staphylococcus aureus* ATCC (6538); **S. a.2:** *Staphylococcus aureus* ATCC (BAA44) (MRSA); **S. e.:** *Staphylococcus epidermidis* ATCC (14990); **E. f.:** *Enterococcus faecalis* ATCC (1299); **S. p.:** *Streptococcus pneumoniae* ATCC (6305); **S. as.:** *Streptococcus sanguinis* ATCC (10556); **S. so.:** *Streptococcus sobrinus* ATCC (33478); **S. m.:** *Streptococcus mutans* ATCC (25175); **H. p.:** *Helicobacter pylori* ATCC (43526); **P. a.:** *Pseudomonas aeruginosa* ATCC (27853); **K. p.:** *Klebsiella pneumoniae* ATCC (13883); **E. c.:** *Escherichia coli* ATCC (35218).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para **série I** de análogos pode-se observar a perda de atividade quando há substituição da hidroxila (análogos **5**, **8** e **16**), porém a mudança da funcionalização para a posição *meta* (análogo

7), ocasionou um incremento na atividade de até oito vezes para bactérias Gram-positivas, com exceção da *S. pneumoniae*. Dessa forma, podemos afirmar que a hidroxila é um grupo farmacofórico. O análogo **7** apresentou valores interessantes de CIM₉₀, contra *S. aureus* (MRSA) chegou a concentrações de 9,2 µM superando o controle positivo (tetraciclina). Para as bactérias Gram-negativas a LCH se destacou, apresentando CIM₉₀ de 11,5 µM contra *H. pylori*, sendo o controle positivo apenas 3,5 vezes mais ativo, porém para o restante das espécies Gram-negativas nenhum composto testado apresentou atividade.

Ao compararmos o análogo simplificado ECH (**17**) da série II com a LCH (**3**), pode-se observar a importância da isoprenila para a atividade, até 20 vezes mais potente, indicando uma possível contribuição farmacofórica para a subunidade. Os compostos di-hidroxilados apresentaram melhor eficiência, com espectro de atividades contra oito diferentes espécies bacterianas, incluindo cepas resistentes a metilina.

Pode-se associar a importância do grupo hidroxila com sua capacidade de fazer ligações de hidrogênio, uma vez que a hidroxila na posição *meta* a torna menos ácida, possibilitando interações mais fortes com possíveis alvos biológicos. Para isoprenila associa-se a uma questão de lipossolubilidade, o que é essencial para transpor a parede celular do micro-organismo.

3.2.2 Atividade antimicobacteriana – Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀)

A Tabela 2 mostra os valores de CIM₉₀ dos compostos LCH (**3**), ECH (**17**), **5**, **7**, **8**, **16** e controle positivo (isoniazida) contra as espécies micobacterianas: *M. avium* ATCC (25291); *M. kansasii* ATCC (12478) e *M. tuberculosis* ATCC (27294).

Tabela 2 – Atividade Antimicobacteriana de LCH e análogos expressa em valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀ em µM)

Código	µM		
	<i>Mycobacterium avium</i>	<i>Mycobacterium kansasii</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
LCH, 3	184,5	184,5	92,2
ECH, 17	115,6	231,2	115,6
5 (R = H)	1550	3100	1550
7 (R = <i>m</i> -OH)	92,2	184,5	92,2
8 (R = <i>p</i> -OMe)	2838	2838	2838
16 (R = <i>p</i> -NO ₂)	>2722	>2722	2722

isoniazida	>7,3	7,3	3,6
-------------------	------	-----	-----

Fonte: Elaborado pelo autor.

Observa-se que a relação estrutura-atividade se assemelha a já discutida para as espécies de bactérias, onde a **7** apresenta maior atividade antimicobacteriana, porém ao comparar a LCH com a ECH, observamos o efeito contrário. Nesse caso a isoprenila não traz uma contribuição farmacofórica e ainda reduz sua atividade contra *M. avium*, sugerindo uma busca por análogos mais simples para obter compostos mais potentes.

4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.1 Parte química

4.1.1 Geral

Todos os reagentes foram obtidos por meio de fontes comerciais da Sigma-Aldrich®, e para obtenção dos produtos e seus intermediários, muitos solventes foram utilizados, como hexano, acetato de etila, etanol, DMF, DCM, diclorometano, THF, acetona, e metanol, todos obtidos pela Synth®. Para o monitoramento das reações e análise preliminar de pureza dos produtos, utilizou-se cromatografia em camada delgada (CCD) comparativa, as cromatoplasmas de sílica gel com base de alumínio foram obtidos pela Supelco®. As cromatoplasmas foram reveladas sob inspeção com luz ultravioleta com comprimentos de onda de 254 e 365 nm. Para revelação química utilizou-se solução de anisaldeído sulfúrico. Purificações foram realizadas por cromatografia em coluna de fase normal com granulometria de 100 a 200 Mesh, placas preparativas CCD de sílica gel, e Sephadex® LH-20 (Sigma-Aldrich®).

Os espectros de RMN de ¹H foram gerados com o auxílio dos espectrômetros Bruker Avance III 14.1 T 600MHz e Bruker Avance III 9.4 T 400MHz, usando acetona-*d*₆, CDCl₃ ou DMSO-*d*₆ como solvente com TMS (δ 0.00) como padrão interno. Os deslocamentos químicos (δ) são mostrados em ppm e constantes de acoplamento (J) em Hz. As multiplicidades são representadas como simpletos (s), dupletos (d), duplos dupletos (dd), tripletos (t), quadrupletos (q), duplos tripletos (dt), e multipletos (m). A pureza dos compostos foi medida pelo equipamento de HPLC-PAD, usando como fase móvel MeOH/H₂O (70:30, 75:25, e 80:20) de forma isocrático.

4.1.2 Síntese de licochalcona H (**3**)

A rota sintética desenvolvida para síntese de **3** utilizou como base os princípios de iodação regioseletiva (Racys, 2015) e acoplamento de Suzuki, de acordo com Wang, H. e colaboradores (2013).

- *Síntese de 2-hidroxi-4-(metoximetoxi)benzaldeído (26)*

A uma solução de 2,4-dihidroxibenzaldeído **25** (1.00 g, 7.24 mmol) em acetona (10 mL) adicionou-se K₂CO₃ (2.4 g, 17.37 mmol). Após 10 min de agitação, a reação foi submetida a banho de gelo, gotejou-se cloreto de metoximetila (0.659 mL, 8.68 mmol). Após 6 horas a temperatura ambiente adicionou-se água destilada (20 mL) e o produto bruto foi extraído com acetato de etila,

seco com sulfato de magnésio e concentrado sob pressão reduzida. O produto foi purificado por coluna cromatográfica de sílica gel, fase móvel: hexano/acetato de etila (Hex/Ac, 8:2) de forma isocrática para obtenção de **26** (70%) como cristal branco - Rf: 0,61 (Hex/Ac, 8:2).

RMN ¹H (600 MHz, acetona-*d*₆) δ 11.40 (s, 1H, CHO), δ 9.84 (s, 1H, 2-OH), δ 7.68 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, 6), δ 6.70 (dd, *J* = 8.6, 2.3 Hz, 1H, 5), δ 6.56 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, 3), δ 5.30 (s, 2H, CH₂), δ 3.46 (s, 3H, CH₃).

- *Síntese de 2-metoxi-4-(metoximetoxi)benzaldeído (27)*

A uma solução de **26** (0.828 g, 4.54 mmol) em acetona (10 mL) adicionou-se K₂CO₃ (2.51 g, 18.18 mmol). Após 10 min de agitação, a reação foi submetida a banho de gelo, gotejou-se iodometano (0.340 mL, 5.46 mmol). Após 7 horas a temperatura ambiente adicionou-se água destilada (20 mL) e o produto bruto foi extraído com acetato de etila, seco com sulfato de magnésio e concentrado sob pressão reduzida para obtenção de **27** (90%) como cristal incolor - Rf: 0,44 (Hex/Ac, 8:2).

RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃) δ 10.29 (s, 1H, CHO), δ 7.78 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, 6), δ 6.67 (dd, *J* = 8.6, 2.1 Hz, 1H, 5), δ 6.60 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, 3), δ 5.22 (s, 2H, CH₂), δ 3.89 (s, 3H, 2-OMe), δ 3.48 (s, 3H, CH₃).

- *Síntese de 5-iodo-2-metoxi-4-(metoximetoxi)benzaldeído (28)*

A uma solução de **27** (0.600 g, 3.04 mmol) em diclorometano (7.5 mL) e atmosfera de N₂ adicionou-se cloreto de ferro hexahidratado (0.025 g, 0.09 mmol) e, por fim, *N*-Iodosuccinimida (0.720 g, 3.20 mmol) em porções. A reação perdurou por 7 horas em temperatura ambiente. Foi adicionado solução saturada de tiosulfato de sódio (4 mL), para remover os resíduos de iodo, e água destilada (20 mL). O produto bruto foi extraído com diclorometano, seco com sulfato de magnésio e concentrado sob pressão reduzida. O produto foi purificado por recristalização hexano/acetato de etila para obtenção de **28** (86%) como cristal branco – Rf: 0,26 (Hex/Ac, 8:2).

RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃) δ 10.20 (s, 1H, CHO), δ 8.20 (s, 1H, 6), δ 6.70 (s, 1H, 3), δ 5.31 (s, 2H, CH₂), δ 3.91 (s, 3H, 2-OMe), δ 3.52 (s, 3H, CH₃).

- *Síntese de 4-(metoximetoxi)acetofenona (30)*

A uma solução de 4-hidroxiacetofenona **29** (0.340 g, 2.50 mmol) em acetona (10 mL) adicionou-se K_2CO_3 (0.830 g, 6.0 mmol). Após 10 min de agitação, a reação foi submetida a banho de gelo, gotejou-se cloreto de metoximetila (0.241 g, 3.0 mmol). Após 6 horas a temperatura ambiente adicionou-se água destilada (20 mL) e o produto bruto foi extraído com acetato de etila, seco com sulfato de magnésio e concentrado sob pressão reduzida. O produto foi purificado por coluna cromatográfica de sílica gel, fase móvel: hexano/acetato de etila (Hex/Ac, 8:2) de forma isocrática para obtenção de **30** (80%) como óleo incolor - Rf: 0,46 (Hex/Ac, 8:2).

- Síntese de *(E)*-3-(5-iodo-2-metoxi-4-(metoximetoxi)fenil)-1-(4-(metoximetoxi)fenil)prop-2-en-1-ona (**3a**)

A uma solução de 4-(metoximetoxi)acetofenona **30** (0.175 g, 0.97 mmol) em etanol (5 mL) e banho de gelo adicionou-se, vagarosamente, solução 60% de KOH (2 mL), e em porções, 5-iodo-2-metoxi-4-(metoximetoxi)benzaldeído **28** (0.300 g, 0.92 mmol). Após 1,5 horas a temperatura ambiente, o produto bruto foi vertido em gelo triturado e filtrado, para obtenção de **3a** (74%) como sólido amarelo – Rf: 0,21 (Hex/Ac, 8:2).

RMN 1H (600 MHz, $CDCl_3$) δ 8.01 (dd, $J = 8.8, 2.0$ Hz, 2H, 2' & 6'), δ 7.99 (s, 1H, 6), δ 7.95 (d, $J = 15.7$ Hz, 1H, β), δ 7.50 (d, $J = 15.7$ Hz, 1H, α), δ 7.11 (dd, $J = 8.8, 2.0$ Hz, 2H, 3' & 5'), δ 6.71 (s, 1H, 3), δ 5.28 (s, 2H, CH_2), δ 5.25 (s, 2H, CH_2'), δ 3.89 (s, 3H, 2-OMe), δ 3.52 (s, 3H, CH_3), δ 3.49 (s, 3H, CH_3').

- Síntese de *(E)*-3-(2-metoxi-4-(metoximetoxi)-5-(3-metilbut-2-en-1-il)fenil)-1-(4-(metoximetoxi)fenil)prop-2-en-1-ona (**3b**)

A uma solução de *(E)*-3-(5-iodo-2-metoxi-4-(metoximetoxi)fenil)-1-(4-(metoximetoxi)fenil)prop-2-en-1-ona **3a** (0.333 g, 0.69 mmol) em DMF (4 mL) e atmosfera de N_2 , adicionou-se carbonato de céσιο **51** (0.447 g, 1.37 mmol), $PdCl_2(dppf)$ **49** (0.056 g, 0.07 mmol) e ácido borônico do éster pinacol de isoprenila **31** (0.304 mL, 1.37 mmol). Após 1 hora a, aproximadamente, 70°C o produto bruto foi filtrado em pastilha de celite com acetato de etila, para remover os resíduos de paládio, o filtrado foi lavado com água destilada e solução saturada de cloreto de sódio para remover os resíduos de carbonato e DMF, e concentrado sob pressão reduzida. O produto foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel, fase móvel: 9:1 a 8:2 (Hex/Ac) como gradiente para obtenção de **3b** (74%) como óleo amarelo.

- Síntese de (E)-3-(4-hidroxi-2-metoxi-5-(3-metilbut-2-en-1-il)fenil)-1-(4-hidroxifenil)prop-2-en-1-ona: licochalcona H (**3**)

A uma solução de (E)-3-(2-metoxi-4-(metoximetoxi)-5-(3-metilbut-2-en-1-il)fenil)-1-(4-(metoximetoxi)fenil)prop-2-en-1-ona **3b** (0.254 g, 0.75 mmol) em THF (2 mL) adicionou-se metanol (2 mL) e, vagarosamente ácido clorídrico 1N (2 mL). Após 6 horas de reação a, aproximadamente, 65°C o produto bruto foi extraído com acetato de etila, seco com sulfato de magnésio e concentrado sob pressão reduzida. O produto foi purificado por coluna cromatográfica de gel de sílica, fase móvel: (65:35, Hex/Ac) para a obtenção de licochalcona H **3** (37%) como cristal amarelo/alaranjado, e com rendimento global de 10%. Pureza de: 96.05% por HPLC-PAD (254 nm).

RMN ¹H (600 MHz, Acetona) δ 9.24 (s, 1H, 4-OH'), δ 8.98 (s, 1H, 4-OH), δ 8.03 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H, β), δ 8.00 (dd, *J* = 8.7 Hz, 2H, 2' & 6'), δ 7.66 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H, α), δ 7.57 (s, 1H, 6), δ 6.95 (dd, *J* = 8.7 Hz, 2H, 3' & 5'), δ 6.59 (s, 1H, 3), δ 5.35 (tt, *J* = 7.3, 1.4 Hz, 1H, 2''), δ 3.86 (s, 3H, 2-OMe), δ 3.29 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, 1''), δ 1.73 (s, 3H, 4''), δ 1.71 (s, 3H, 5'').

4.1.3. Síntese de **5**, **7**, **8**, **9**, **12,13**, **14** e **16**

A rota sintética desenvolvida para síntese de **5**, **7**, **8**, **9**, **12,13**, **14** e **16** (série I) foi a mesma utilizada para síntese de licochalcona H (**3**), iodação regioseletiva (Racys, 2015) e acoplamento de Suzuki, de acordo com Wang, H. e colaboradores (2013).

- Síntese de **32a** – **39a**

O procedimento foi o mesmo da síntese de **3a** utilizando as acetofenonas **32** – **39** (0.68 mmol) e 5-iodo-2-metoxi-4-(metoximetoxi)benzaldeído **28** (0.62 mmol) como substrato para obtenção de **32a** – **39a**, com rendimentos de 53 a 94%.

- Síntese de **32b** – **39b**

O procedimento foi o mesmo da síntese de **3b** utilizando os compostos **32a** – **39a** (0.200 g) como substrato para obtenção de **32b** – **39b**, com rendimentos de 45 a 83%.

- Síntese de **5**, **7**, **8**, **9**, **12,13**, **14** e **16**

Procedimento similar ao da síntese de **3** utilizando os compostos **32b** – **39b** (0.100 g) como substrato para obtenção de **5**, **7**, **8**, **9**, **12,13**, **14** e **16**, com rendimentos de 22 a 57%.

- *(E)*-3-(4-hidroxi-2-metoxi-5-(3-metilbut-2-en-1-il)fenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona: **5**

Composto **5** obtido como sólido amarelo com rendimento de desproteção de 33% e rendimento global de 11%. Pureza de: 99.48% por HPLC-PAD (254 nm).

RMN ¹H (600 MHz, Acetona) δ 8.99 (s, 1H, 4-OH), δ 8.08 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H, β), δ 8.06 (dd, *J* = 8.5, 1.2 Hz, 2H, 2' & 6'), δ 7.67 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H, α), δ 7.62 (tt, *J* = 7.2, 1.6 Hz, 1H, 4'), δ 7.60 (s, 1H, 6), δ 7.53 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, 3' & 5') δ 6.60 (s, 1H, 3), δ 5.35 (tt, *J* = 7.5, 1.5 Hz, 1H, 2''), δ 3.87 (s, 3H, 2-OMe), δ 3.30 (d, *J* = 7.24, 2H, 1'') δ 1.73 (s, 3H, 4''), δ 1.71 (s, 3H, 5'').

- *(E)*-1-(3-hidroxifenil)-3-(4-hidroxi-2-metoxi-5-(3-metilbut-2-en-1-il)fenil)prop-2-en-1-ona: **7**

Composto **7** obtido como cristal amarelo com rendimento de desproteção de 57% e rendimento global de 7%. Pureza de: 98.87% por HPLC-PAD (254 nm).

RMN ¹H (600 MHz, Acetona) δ 9.05 (s, 1H, 4-OH), δ 8.76 (s, 1H, 3'-OH), δ 8.06 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H, β), δ 7.62 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H, α), δ 7.59 (s, 1H, 6), δ 7.55 (tt, *J* = 7.8, 1.2 Hz, 1H, 6'), δ 7.51 (t, *J* = 2.10 Hz, 1H, 2'), δ 7.37 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, 5'), δ 7.09 (dd, *J* = 8.0, 2.5 Hz, 1H, 4'), δ 6.61 (s, 1H, 3), δ 5.36 (tt, *J* = 7.5, 1.5 Hz, 1H, 2''), δ 3.88 (s, 3H, 2-OMe), δ 3.31 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H, 1''), δ 1.75 (s, 3H, 4''), δ 1.73 (s, 3H, 5'').

- *(E)*-3-(4-hidroxi-2-metoxi-5-(3-metilbut-2-en-1-il)fenil)-1-(4-metoxifenil)prop-2-en-1-ona: **8**

Composto **8** obtido como cristal amarelo/alaranjado com rendimento de desproteção de 33% e rendimento global de 9%. Pureza de: 90.74% por HPLC-PAD (254 nm).

RMN ¹H (600 MHz, Acetona) δ 8.96 (s, 1H, 4-OH), δ 8.07 (dd, *J* = 8.9Hz, 2H, 2' & 6'), δ 8.05 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H, β), δ 7.68 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H, α), δ 7.58 (s, 1H, 6), δ 7.05 (d, *J* = 8.9Hz, 2H, 3' & 5'), δ 6.59 (s, 1H, 3), δ 5.35 (tt, *J* = 7.5, 1.5 Hz, 1H, 2''), δ 3.89 (s, 3H, 4'-OMe), δ 3.86 (s, 3H, 2-OMe), δ 3.30 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, 1''), δ 1.73 (s, 3H, 4''), δ 1.71 (s, 3H, 5'').

- *(E)*-3-(4-hidroxi-2-metoxi-5-(3-metilbut-2-en-1-il)fenil)-1-(*p*-tolil)prop-2-en-1-ona: **9**

Composto **9** obtido como cristal amarelo com rendimento de desproteção de 28% e rendimento global de 10%. Pureza de: 93.78% por HPLC-PAD (254 nm).

RMN ¹H (600 MHz, Acetona) δ 9.01 (s, 1H, 4-OH), δ 8.06 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H, β), δ 7.96 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, 2' & 6'), δ 7.66 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H, α), δ 7.58 (s, 1H, 6), δ 7.34 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, 3' & 5'), δ 6.60 (s, 1H, 3), δ 5.35 (tt, *J* = 7.5, 1.5 Hz, 1H, 2''), δ 3.86 (s, 3H, 2-OMe), δ 3.30 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, 1''), δ 1.73 (s, 3H, 4''), δ 1.71 (s, 3H, 5'').

- *(E)*-1-(4-fluorofenil)-3-(4-hidroxi-2-metoxi-5-(3-metilbut-2-en-1-il)fenil)prop-2-en-1-ona: **12**

Composto **12** obtido como cristal amarelo com rendimento de desproteção de 25% e rendimento global de 4%.

RMN ¹H (600 MHz, Acetona) δ 8.16 (dd, *J* = 8.7, 5.6 Hz, 2H, 2' & 6'), δ 8.09 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H, β), δ 7.68 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H, α), δ 7.60 (s, 1H, 6), δ 7.30 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H, 3' & 5'), δ 6.64 (s, 1H, 3), δ 5.36 (tt, *J* = 7.3, 1.3 Hz, 1H, 2''), δ 3.88 (s, 3H, 2-OMe), δ 3.30 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, 1''), δ 1.74 (s, 3H, 4''), δ 1.73 (s, 3H, 5'').

- *(E)*-1-(4-clorofenil)-3-(4-hidroxi-2-metoxi-5-(3-metilbut-2-en-1-il)fenil)prop-2-en-1-ona: **13**

Composto **13** obtido como cristal amarelo com rendimento de desproteção de 8% e rendimento global de 1%.

RMN ¹H (600 MHz, Acetona) δ 9.16 (s, 1H, 4-OH), δ 8.08 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H, β), δ 8.07 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 2' & 6'), δ 7.65 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H, α), δ 7.59 (s, 1H, 6), δ 7.56 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 3' & 5'), δ 6.60 (s, 1H, 3), δ 5.34 (tt, *J* = 7.2, 1.3 Hz, 1H, 2''), δ 3.86 (s, 3H, 2-OMe), δ 3.29 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, 1''), δ 1.73 (s, 3H, 4''), δ 1.71 (s, 3H, 5'').

- *(E)*-1-(4-bromofenil)-3-(4-hidroxi-2-metoxi-5-(3-metilbut-2-en-1-il)fenil)prop-2-en-1-ona: **14**

Composto **14** obtido como cristal amarelo com rendimento de desproteção de 22% e rendimento global de 3%.

RMN ¹H (600 MHz, Acetona) δ 9.04 (s, 1H, 4-OH), δ 8.08 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H, β), δ 7.99 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 2' & 6'), δ 7.72 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 3' & 5'), δ 7.64 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H, α), δ 7.59 (s, 1H, 6), δ 6.60 (s, 1H, 3), δ 5.34 (tt, *J* = 7.2, 1.3 Hz, 1H, 2''), δ 3.87 (s, 3H, 2-OMe), δ 3.29 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, 1''), δ 1.73 (s, 3H, 4''), δ 1.71 (s, 3H, 5'').

- *(E)*-3-(4-hidroxi-2-metoxi-5-(3-metilbut-2-en-1-il)fenil)-1-(4-nitrofenil)prop-2-en-1-ona: **16**

Composto **16** obtido como cristal amarelo com rendimento de desproteção de 39% e rendimento global de 10%. Pureza de: 91.05% por HPLC-PAD (254 nm).

RMN ¹H (600 MHz, Acetona) δ 9.22 (s, 1H, 4-OH), δ 8.37 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, 3' & 5'), δ 8.26 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, 2' & 6'), δ 8.10 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H, β), δ 7.67 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H, α), δ 7.60 (s, 1H, 6), δ 6.61 (s, 1H, 3), δ 5.33 (tt, *J* = 7.5, 1.5 Hz, 1H, 2''), δ 3.88 (s, 3H, 2-OMe), δ 3.29 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, 1''), δ 1.73 (s, 3H, 4''), δ 1.71 (s, 3H, 5'').

4.1.4 Síntese de equinatina (**17**)

A rota sintética adotada para síntese de **17** (série II) foi descrita por Nielsen e colaboradores (1995).

- *Síntese de (E)-3-(2-metoxi-4-(metoximetoxi)fenil)-1-(4-(metoximetoxi)fenil)prop-2-en-1-ona (17a)*

A uma solução de 4-(metoximetoxi)acetofenona **30** (0.175 g, 0.97 mmol) em etanol (5 mL) e banho de gelo adicionou-se, vagorosamente, solução 60% de KOH (2 mL), e em porções, 2-metoxi-4-(metoximetoxi)benzaldeído **27** (0.180 g, 0.92 mmol). Após 1,5 horas a temperatura ambiente, o produto bruto foi vertido em gelo triturado e filtrado, para obtenção de **17a** (80%) como sólido amarelo.

- *Síntese de (E)-3-(4-hidroxi-2-metoxifenil)-1-(4-hidroxifenil)prop-2-en-1-ona: equinatina (17)*

A uma solução de (E)-3-(2-metoxi-4-(metoximetoxi)fenil)-1-(4-(metoximetoxi)fenil)prop-2-en-1-ona **17a** (0.200 g, 0.74 mmol) em THF (2 mL) adicionou-se metanol (2 mL) e, vagorosamente ácido clorídrico 1N (2 mL). Após 6 horas de reação a, aproximadamente, 65°C o produto bruto foi extraído com acetato de etila, seco com sulfato de magnésio e concentrado sob pressão reduzida. O produto foi purificado por coluna cromatográfica de gel de sílica, fase móvel: (6:4, Hex/Ac) para a obtenção de equinatina **17** (40%) como cristal amarelo/alaranjado e com rendimento global de 20%. Pureza de: 99.64% por HPLC-PAD (254 nm).

RMN ¹H (600 MHz, DMSO) δ 7.99 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, 2' & 6'), δ 7.92 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H, β), δ 7.76 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, 6), δ 7.65 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H, α), δ 6.88 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, 3' & 5'), δ 6.47 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, 3), δ 6.44 (dd, *J* = 8.4, 2.2 Hz, 1H, 5), δ 3.84 (s, 3H, 2-OMe).

4.1.5 Síntese de loureirina C (**22**)

A reação adotada para síntese de **22** (série III) foi descrita por Mirza-Aghayan e coautores (2007).

- *Síntese de 3-(4-hidroxi-2-metoxifenil)-1-(4-hidroxifenil)propan-1-ona: loureirina C (**22**)*

A uma solução de (E)-3-(4-hidroxi-2-metoxifenil)-1-(4-hidroxifenil)prop-2-en-1-ona **17** (0.050 g, 0.14 mmol) em etanol (5 mL) e atmosfera de N₂ adicionou-se trietilsilano **40** (0.088 mL, 0.55 mmol) e acetato de paládio Pd(Oac)₂ (0.003 g, 0.014 mmol). Após 2 horas de reação a temperatura ambiente o produto bruto foi filtrado em pastilha de celite com acetato de etila para remover o paládio residual, o filtrado foi lavado com água destilada, seco com sulfato de magnésio e concentrado sob pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia preparativa de gel de sílica, fase móvel: (3:1:1, hexano/acetato de etila/acetona) para obtenção de loureirina C **22** (17%) como sólido incolor, e com rendimento global de 3%.

RMN ¹H (600 MHz, Acetona) δ 7.91 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, 2' & 6'), δ 6.98 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, 6), δ 6.91 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, 3' & 5'), δ 6.45 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, 3), δ 6.34 (dd, *J* = 8.1, 2.3 Hz, 1H, 5), δ 3.78 (s, 3H, 2-OMe), δ 3.11 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, α), δ 2.86 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H, β).

4.2 Estudo biológico

Toda a parte de estudo biológico deste trabalho foi realizada por colaboradores do Laboratório de Ensaio Antimicrobianos (LEA) – Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

4.2.1 Determinação de CIM

- *Cepas bacterianas e micobacterianas*

Foram usadas cepas bacterianas padrão da American Type Culture Collection (ATCC). As cepas foram preservadas sob criogenia a -20 °C na coleção de culturas do Laboratório de Ensaio Antimicrobianos (LEA) do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Os testes foram realizados com as bactérias *S. aureus* ATCC (6538), *S. aureus* ATCC (BAA44), *S. epidermidis* ATCC (14990), *E. faecalis* ATCC (1299), *S. pneumoniae* ATCC (6305), *S. sanguinis* ATCC (10556), *S. sobrinus* ATCC (33478), *S. mutans* ATCC (25175), *H. pylori* ATCC (43526), *P. aeruginosa* ATCC (27853), *K. pneumoniae* ATCC (13883) e *E. coli* ATCC (35218) e micobactérias *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294), *M. kansasii* (ATCC 12478) e *M. avium* (ATCC 25291).

- *Ensaio antibacteriano*

A concentração inibitória mínima (CIM) contra espécies de bactérias gram-positivas e gram-negativas foi determinada em triplicata, usando o método de microdiluição em caldo em placas de 96 poços, usando resazurina como indicador colorimétrico da viabilidade da célula. Os compostos ensaiados foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO; Synth, Diadema-SP, Brasil), com concentrações 1 mg mL⁻¹, seguida por uma diluição em caldo de infusão cérebro coração (BHI – Difco, Detroit-MI, EUA) para atingir concentrações finais variando entre 0,195 e 400,0 µg mL⁻¹. O conteúdo final de DMSO era de 5% (v/v), e foi utilizada como controle negativo. O inóculo foi ajustado para cada microorganismo, para atingir concentração celular de 5x10⁵ unidades de formação de colônia (UFC / mL), como recomendado pelo Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais, com modificações no meio de cultura. O controle de crescimento e de esterilidade também foram inclusos. Tetraciclina e clorexidina foram utilizados como controle positivo, com concentrações entre 0,115 e 5,9 µg mL⁻¹, e 0,115 e 59 µg mL⁻¹, respectivamente. As microplacas de 96 poços foram seladas com plástico filme e incubadas a 37 °C por 24 h. Após esse período, 30 µL de uma solução 0,02% de resazurina foi adicionada as microplacas, que foram incubadas por mais 15 minutos a 37 °C. A CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir mais de

90% do crescimento dos microorganismos, indicado pela mudança da cor azul da resazurina para rosa.

- *Ensaio antimicobacteriano*

A CIM dos compostos ensaiados contra micobactérias foi determinado utilizando o Ensaio de Resazurina em Microplaca, método de Palomino, com breves modificações. Estoques de soluções dos compostos ensaiados foram preparados em DMSO e diluídos no caldo Middlebrook 7H9 (Didcot™, Detroit-MI, EUA) para obter concentrações de 7,8 a 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Isoniazida foi dissolvida em DMSO e utilizada como droga padrão, a concentrações de 0,015 a 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O inóculo foi preparado introduzindo colônias cultivadas em Ogawa-Kudoh (LaborClin) em um tubo com contas de vidro com 500 μL de água esterilizada. Uma alíquota de 200 μL foi transferida para um tubo contendo 2 mL de caldo 7H9, incubado a 37 °C por 7 dias e comparado com a escala 1 McFarland (3×10^8 células/mL). Após o inóculo ser padronizado, foi diluído em placas de 96 poços, numa relação 1:25 com o caldo 7H9 contendo as substâncias testadas. Os controles de crescimento e esterelidade também foram incluídos. As placas de 96 poços (Kasvi®) foram incubadas a 37 °C por 7 dias. Após esse período, 30 μL de uma solução aquosa de 0,02% de resazurina (Sigma-Aldrich®) foi adicionada a cada poço da placa. Após 18 h, a solução de resazurina adquiriu coloração azul, indicando que não havia crescimento de microorganismos (a cor rosa indica a presença de microorganismos viáveis). O valor de CIM, expressado em $\mu\text{g mL}^{-1}$, foi definido como a menor concentração das substâncias capaz de inibir 90 % do crescimento micobacteriano. O ensaio foi realizado em triplicata.

- *Ensaio contra helicobactérias*

O ensaio de microdiluição em caldo, utilizou caldo Mueller Hinton médio, suplementado com 10 % de sêrum fetal bovino. As substâncias foram solubilizadas em DMSO em placas de 96 poços, com concentrações entre 0,48 e 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A concentração do inóculo foi ajustada para 5×10^5 CFU.mL⁻¹. As placas foram preparadas em triplicata, e incubadas a 37 °C por três dias, sob atmosfera de 10% de CO₂. Utilizou-se DMSO e tetraciclina como controle negativo e positivo, respectivamente. Uma solução aquosa de resazurina (30 μL , 0,01 %) foi adicionada a cada poço. A presença da coloração rosa indica a presença de células metabolicamente ativas, enquanto a presença da coloração azul indica células com metabolismo desativado. A menor concentração a cada mudança de cor foi observada, e a média do valor, definida como a CIM.

5. CONCLUSÃO

Foi desenvolvida metodologia de Iodação Regiosseletiva para síntese de LCH e compostos da **série I**, que envolve, como ponto chave, um catalisador metálico de baixo custo e de alta eficiência para ativação do NIS (Racys et al. 2015), etapa essencial para o posterior acoplamento de Suzuki, responsável pela C-prenilação dos compostos (Wang. H, et al. 2013; 2015). Foram sintetizadas 35 substâncias, dentre elas 24 intermediários e 11 produtos finais, incluindo 2 produtos naturais (Equinatina e Loureirina C) e 8 substâncias inéditas na literatura. Dos 6 compostos avaliados biologicamente, 3 deles se mostram ativos com CIM₉₀ de 9,2 – 1480 µM contra bactérias e 92,2 – 231,2 µM contra micobactérias. O composto LCH se destacou contra *H. Pylori* com CIM₉₀ de 11,5 µM e **7** contra *S. aureus* (MRSA) e (MSSA) com CIM₉₀ de 9,2 µM, ambos os patógenos pertencem a lista da OMS de alta prioridade, o que valoriza os resultados e justifica os esforços para realização trabalho.

REFERÊNCIAS

- ☀ ALMEIDA, P. et al. Synthesis and Structural Confirmation of Natural 1,3-Diarylpropanes. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 10(5), p. 347-353, 1999.
- ☀ BENELHADJ, K. et al. White emitters by tuning the excited-state intramolecular proton-transfer fluorescence emission in 2-(2'-Hydroxybenzofuran)benzoxazole dyes. **Chemistry - A European Journal.**, v. 20, p. 12843–12857, 2014.
- ☀ DAI, J. et al. Recent progress of antibacterial natural products: future antibiotics candidates. **Bioorganic Chemistry.** v. 101, 2020.
- ☀ DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach.** John Wiley & Sons LTD, 2^a ed., 2009.
- ☀ DI CARLO, G. et al. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sci.**, v. 65, p. 337–353, p. 1999.
- ☀ Friis-Moller, A. et al. *In Vitro* antimycobacterial and antilegionella activity of licochalcone A from Chinese licorice roots. **Planta Med.**, v. 68, p. 416-419, 2002.
- ☀ FUKAI, T. et al. Anti-*Helicobacter pylori* flavonoids from licorice extract. **Life Sciences.**, v. 71, p. 1449 – 1463, 2002.
- ☀ GERARD, D. Opportunities for natural products in 21st century antibiotic discovery. **Natural Product Reports.**, v. 34, p. 694-701, 2017.
- ☀ HU, C. et al., Licochalcone A suppresses the proliferation of sarcoma HT-1080 cells, as a selective R132C mutant IDH1 inhibitor. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.** v. 30, 2019.
- ☀ H.-N. OH. et al., JAK2 regulation by Licochalcone H inhibits the cell growth and induces apoptosis in oral squamous cell carcinoma. **Phytomedicine.** v. 53, p. 60-69, 2019.
- ☀ KWAK, A. et al. Licochalcone H Synthesized by Modifying Structure of Licochalcone C Extracted from *Glycyrrhiza inflata* Induces Apoptosis of Esophageal Squamous Cell Carcinoma Cells. **Cell Biochemistry and Biophysics.**, v. 78, p. 65-76, 2019.

- ☀ LI, Y. et al. Dragon's Blood Regulates Rac1-WAVE2-Arp2/3 Signaling Pathway to Protect Rat Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction Induced by Simulated Microgravity. **Int. J. Mol. Sci.** v. 22(5), p. 2722, 2021.
- ☀ LIU, X. et al. Licochalcone A inhibits proliferation and promotes apoptosis of colon cancer cell by targeting programmed cell death-ligand 1 via the NF- κ B and Ras/Raf/MEK pathways. **J Ethnopharmacol.** v. 273, 2021.
- ☀ L.-W. YUAN. et al., Licochalcone A inhibits interferon-gamma-induced programmed death-ligand 1 in lung cancer cells. **Phytomedicine.**, v. 80, 2020.
- ☀ MIRZA-AGHAYAN, M. et al. Palladium catalyzed mild reduction of α,β -unsaturated compounds by triethylsilane. **Journal of Organometallic Chemistry.**, v. 692, p. 5113-5116, 2007.
- ☀ MIYAURA, N.; SUZUKI, A. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds. **Chemical Reviews.**, v. 95, p. 2457-2483, 1995.
- ☀ NIELSEN, S. F. et al. Synthesis of antiparasitic licorice chalcones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.**, v. 5, p. 449-452, 1995.
- ☀ OSMAN, M. S. et al. Identification of some chalcone analogues as potential antileishmanial agents: An integrated *in vitro* and *in silico* evaluation. **Arabian Journal of Chemistry.**, v. 15, 2022.
- ☀ PERRIN, C. L.; KUEI-LIN, C. The Complete Mechanism of an Aldol Condensation. **The Journal of Organic Chemistry.**, v. 81, p. 5631-5635, 2016.
- ☀ RACYS, D. T. et al. Highly Regioselective Iodination of Arenes via Iron (III)-Catalyzed Activation of N-Iodosuccinimide. **Organic Letters.**, v. 17, p. 4782–4785, 2015.
- ☀ ROSSOLINI, G. M. et al. Epidemiology and clinical relevance of microbial resistance determinants versus anti-Gram-positive agents. **Current Opinion in Microbiology.**, v. 13, p. 582-588, 2010.
- ☀ SUGAMOTO, K. et al. Synthesis and antibacterial activity of chalcones bearing prenyl or geranyl groups from *Angelica keiskei*. **Tetrahedron Letters.**, v. 67, p. 5346–5359, 2011.

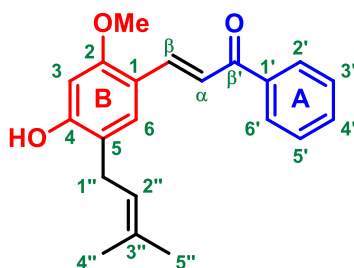
- ☀ S.-H. NHO. et al., Licochalcone H induces the apoptosis of human oral squamous cell carcinoma cells via regulation of matrix 3. **Oncology Reports**. v. 41, p. 333-340, 2019.
- ☀ UPADHYAY, S.; MANTHA, AK.; DHIMAN, M. Glycyrrhiza glabra (Licorice) root extract attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity via alleviating oxidative stress and stabilising the cardiac health in H9c2 cardiomyocytes. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 258, 2020.
- ☀ X.-Q. SU. et al. Dihydrochalcones and homoisoflavanes from the red resin of *Dracaena cochinchinensis* (Chinese dragon's blood). **Fitoterapia**., v. 99, p. 64-71, 2014.
- ☀ WHO, World Health Organization. **Antimicrobial Resistance**. Geneva: 2021. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>> Acesso em: 17 fev 2022.
- ☀ WHO, World Health Organization. **Global tuberculosis report 2021**. Geneva: 2021. Disponível em: <<https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports>> Acesso em: 20 fev 2022.
- ☀ WHO, World Health Organization. **Tuberculosis**. Geneva: 2020. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/tuberculosis#tab=tab_1> Acesso em: 20 fev 2022.
- ☀ WHO, World Health Organization. **WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed**. Geneva: 2017. Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>> Acesso em: 17 fev 2022.
- ☀ WANG, H. et al. Concise synthesis of prenylated and geranylated chalcone natural product by regioselective iodination and Suzuki coupling reactions. **Tetrahedron Letters**., v. 54, p. 6345–6348, 2013.
- ☀ WANG, H. et al. Synthesis and anti-cancer activity evaluation of novel prenylated and geranylated chalcone natural products and their analogs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 92, p. 439–448, 2015.
- ☀ WANG, Z. et al. Concise synthesis of licochalcone C and its regioisomer, licochalcone H. **Archives of Pharmacal Research**., v. 36, p. 1432-1436, 2013.

☀ ZHUANG, C. Et al. Chalcone: A Privileged Structure in Medicinal Chemistry. **Chemical Reviews.**, v. 117, p. 7762-7810, 2017.

MATERIAL SUPLEMENTAR

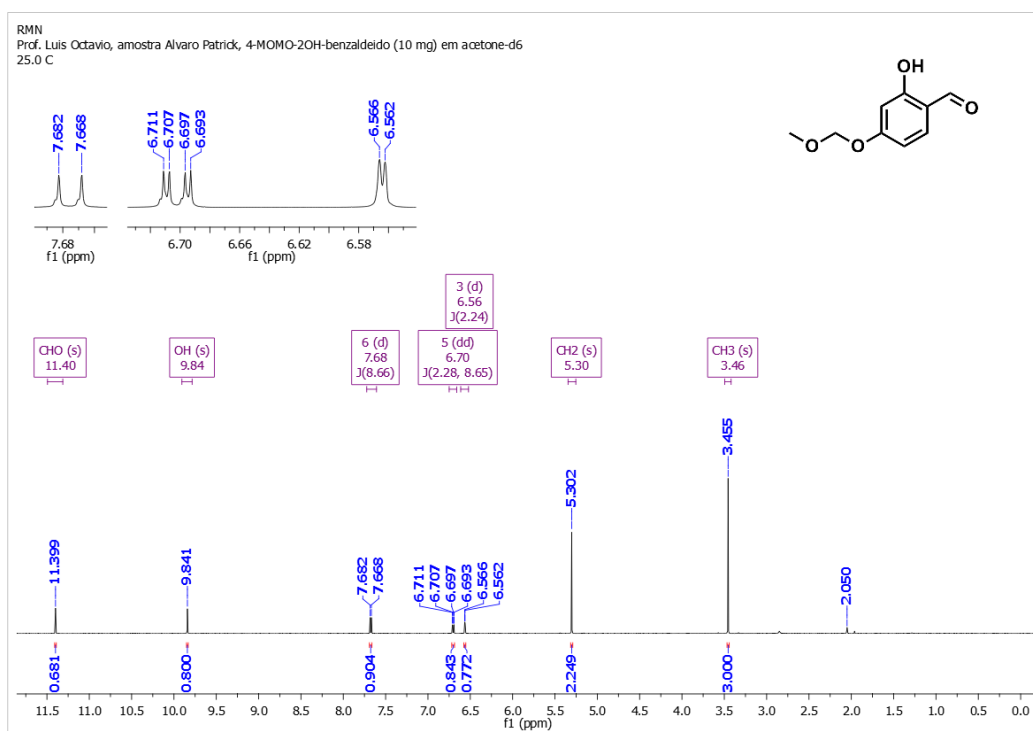
Observação: Alguns duplos dupletos e tripletos não foram apontados pelo software, porém foram descritos nos **Procedimentos experimentais** por meio de cálculos manuais.

Figura 4 – Estrutura geral para identificação dos hidrogênios dos espectros



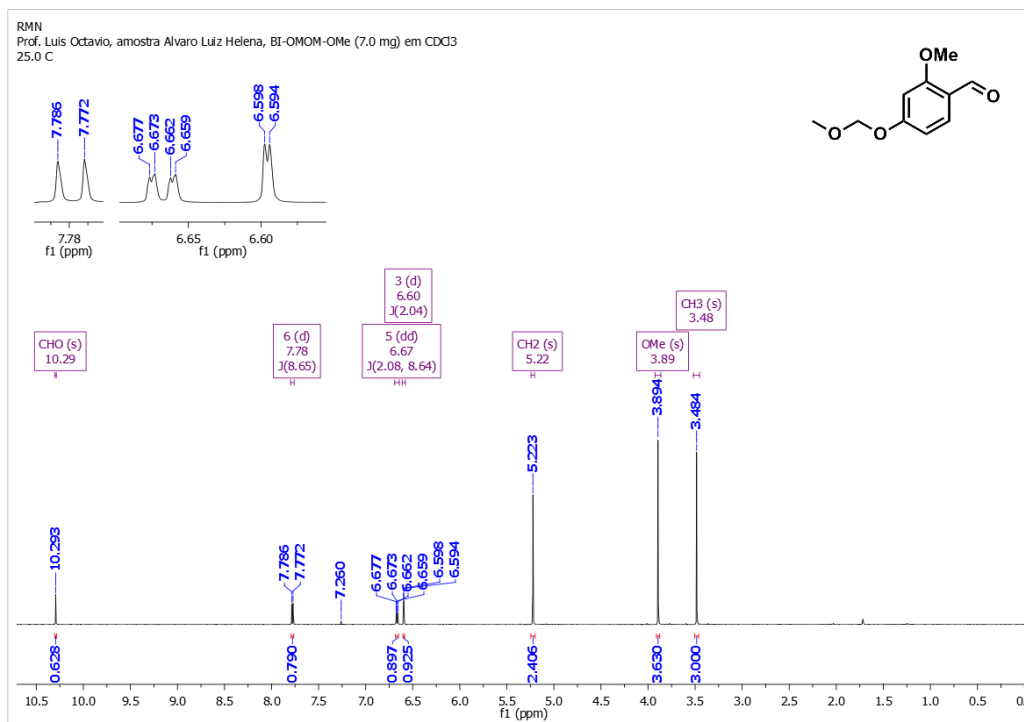
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 5 – Espectro de RMN H¹ do composto **26** (600 MHz – acetone-d₆)



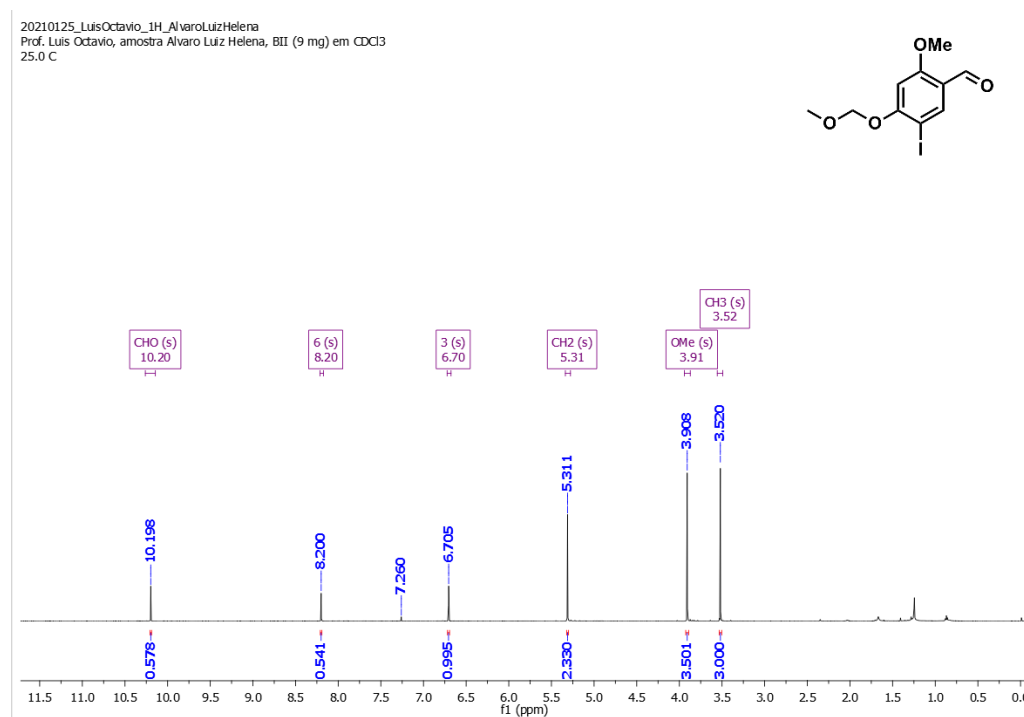
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 6 – Espectro de RMN H¹ do composto **27** (600 MHz – CDCl₃)



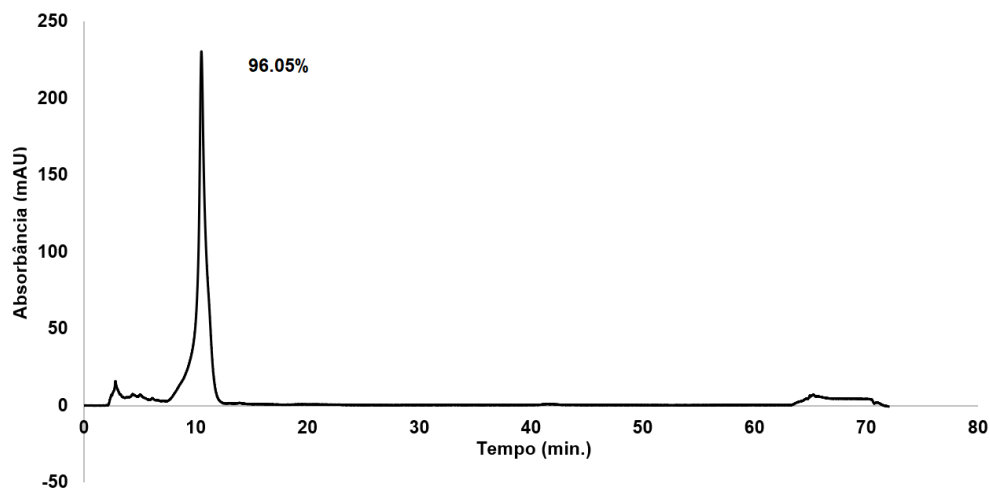
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 7 – Espectro de RMN H¹ do composto **28** (600 MHz – CDCl₃)



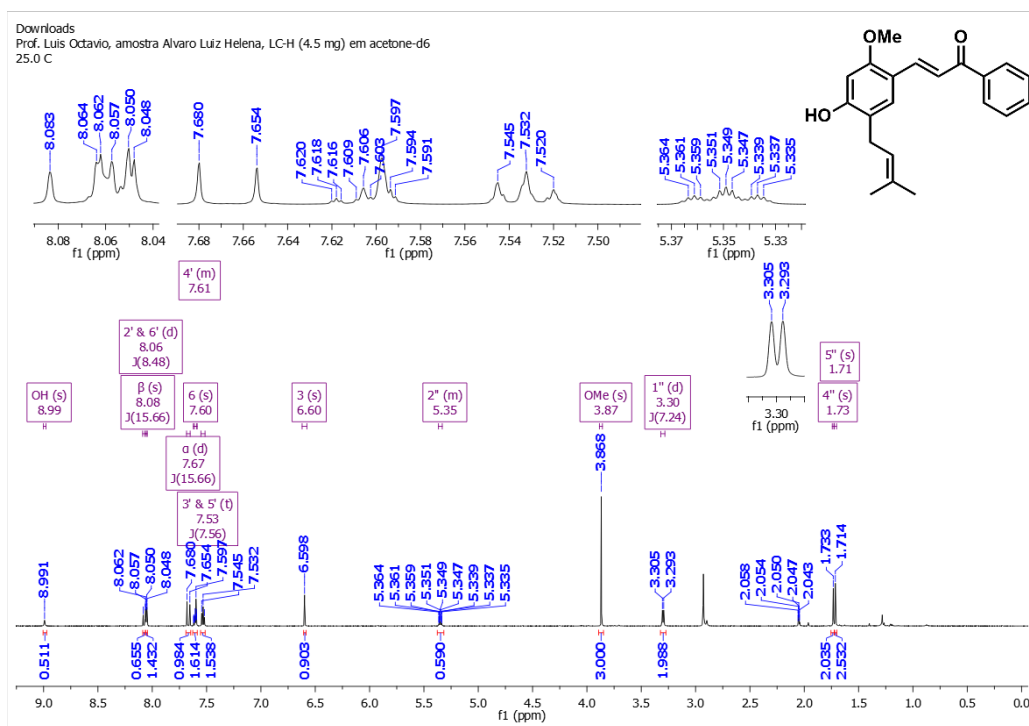
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 10 – Cromatograma de HPLC do composto **3**. Metanol:Água (3:1), 254 nm



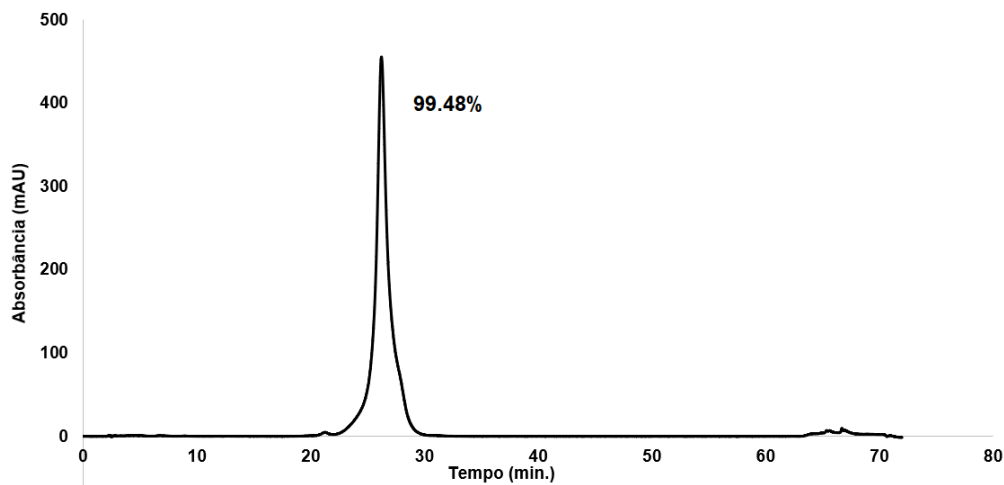
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 11 – Espectro de RMN ^1H do composto **5** (600 MHz – acetona- d_6)



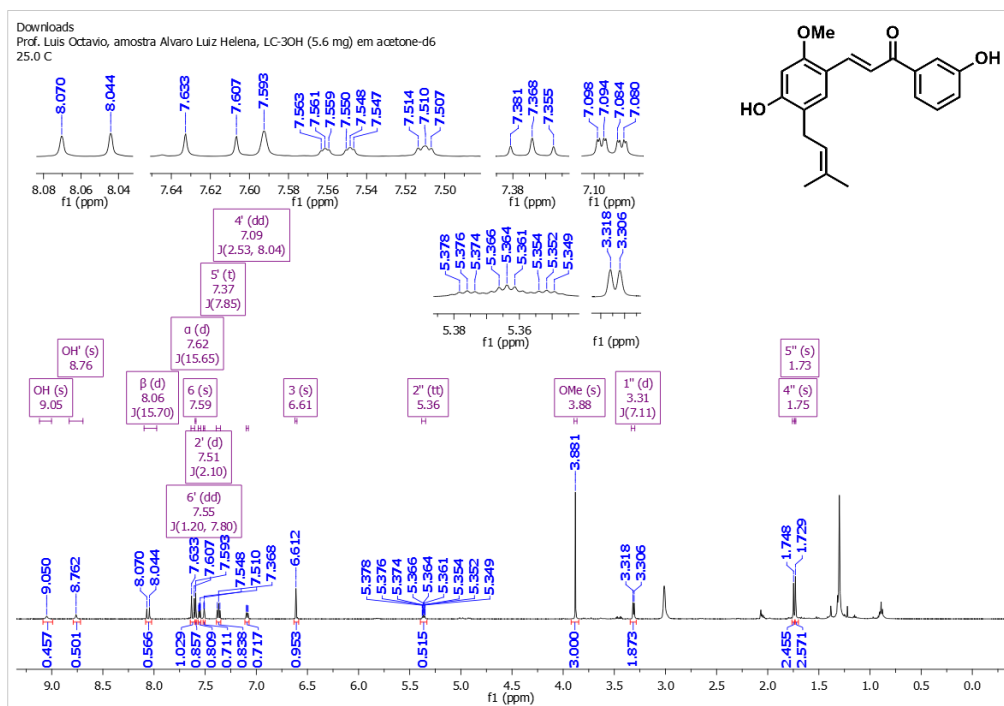
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 12 – Cromatograma de HPLC do composto **5**. Metanol:Água (3:1), 254 nm



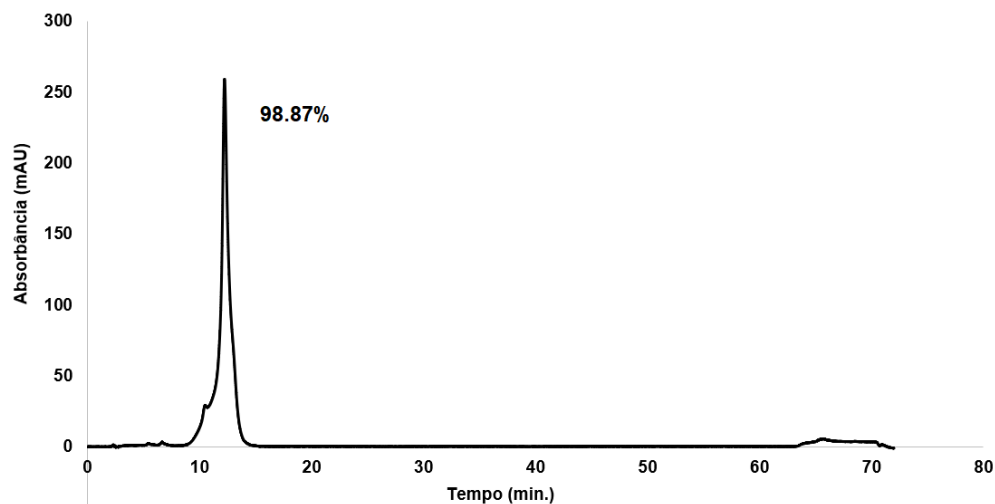
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 13 – Espectro de RMN ^1H do composto **7** (600 MHz – acetona- d_6)



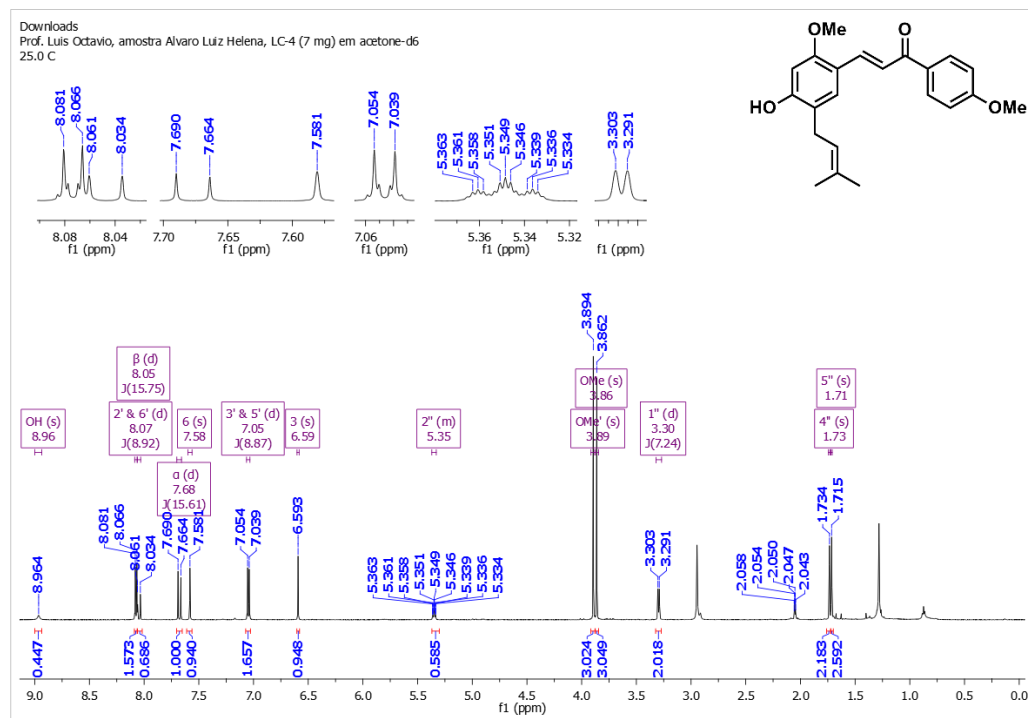
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 14 – Cromatograma de HPLC do composto 7. Metanol:Água (3:1), 254 nm



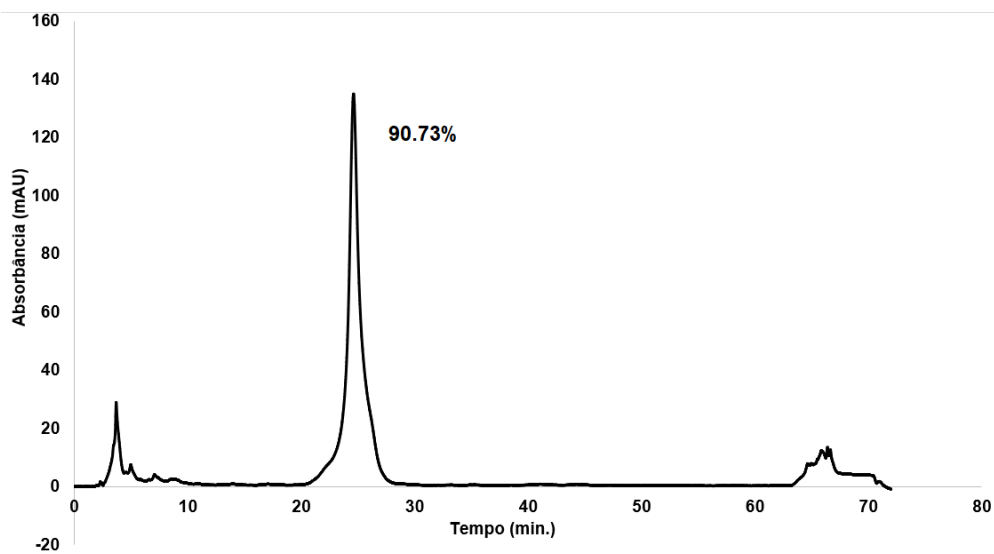
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 15 – Espectro de RMN H^1 do composto 8 (600 MHz – acetona- d_6)



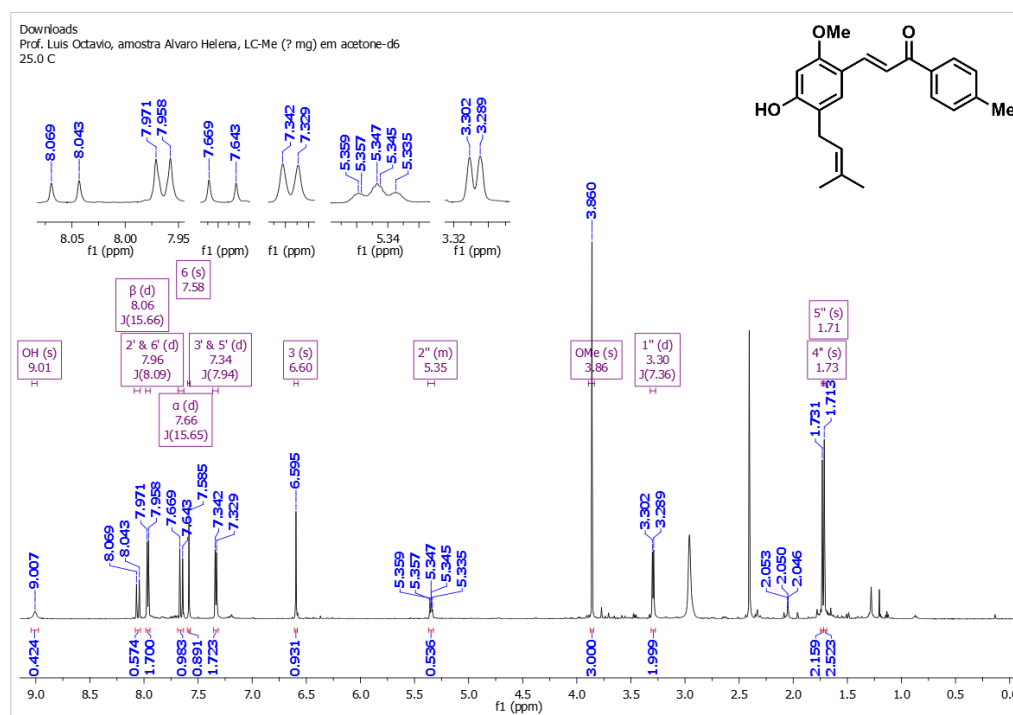
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 16 – Cromatograma de HPLC do composto **8**. Metanol:Água (3:1), 254 nm



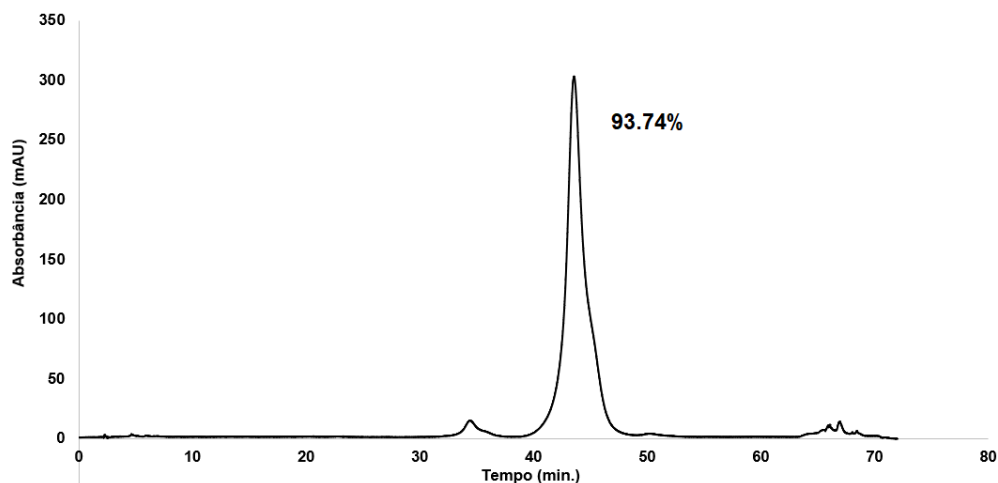
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 17 – Espectro de RMN ^1H do composto **9** (600 MHz – acetona- d_6)



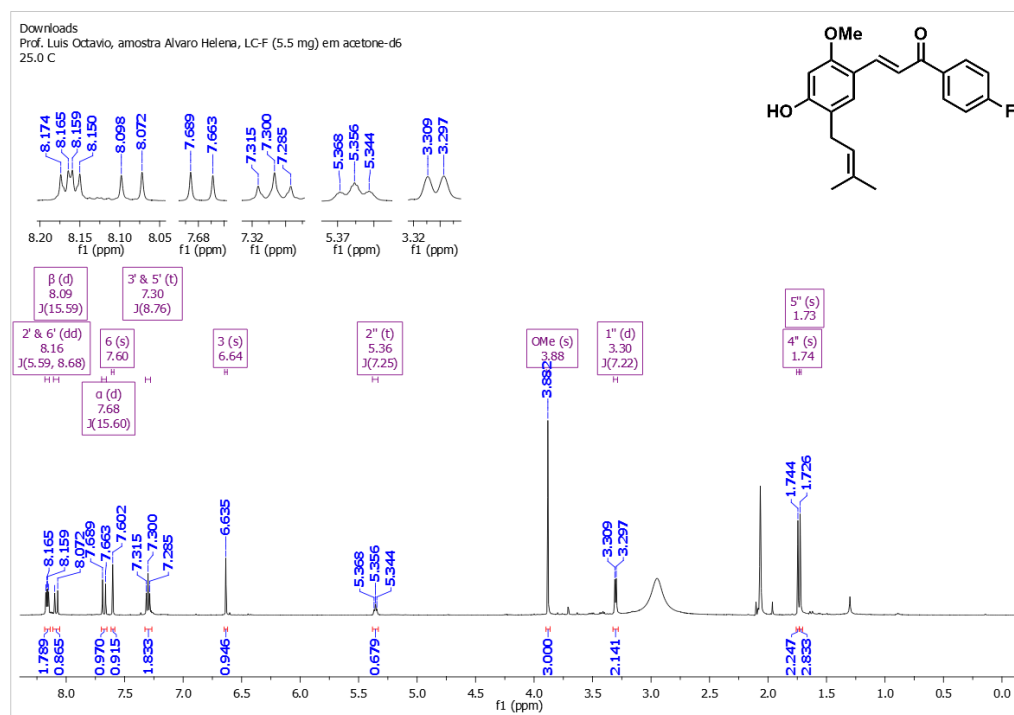
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 18 – Cromatograma de HPLC do composto **9**. Metanol:Água (3:1), 254 nm

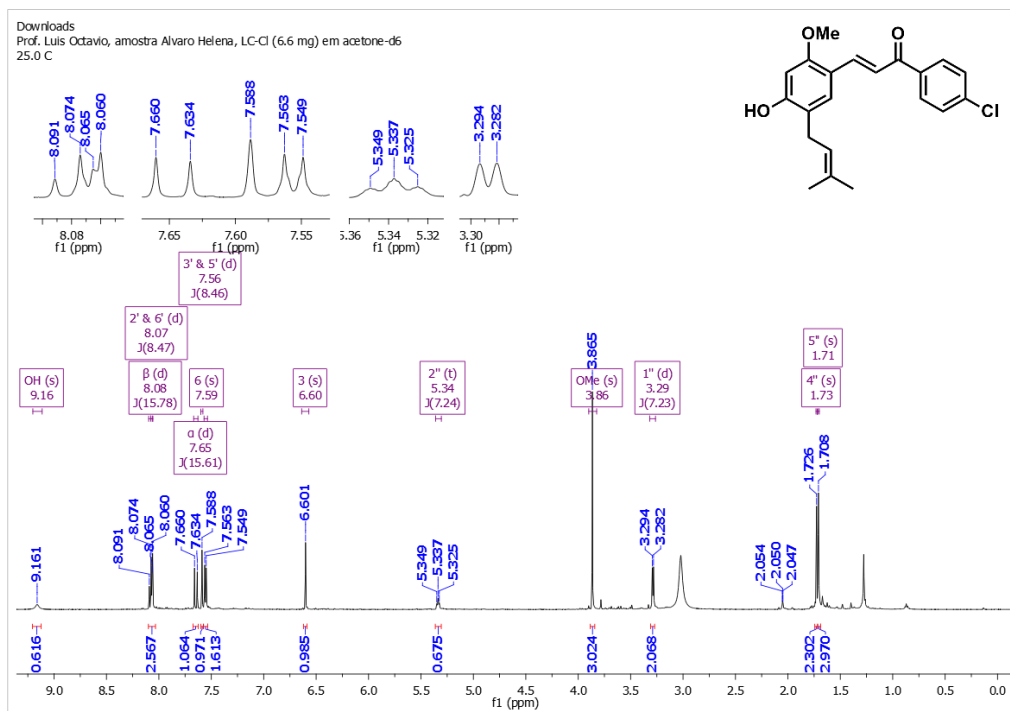


Fonte: Elaborado pelo autor.

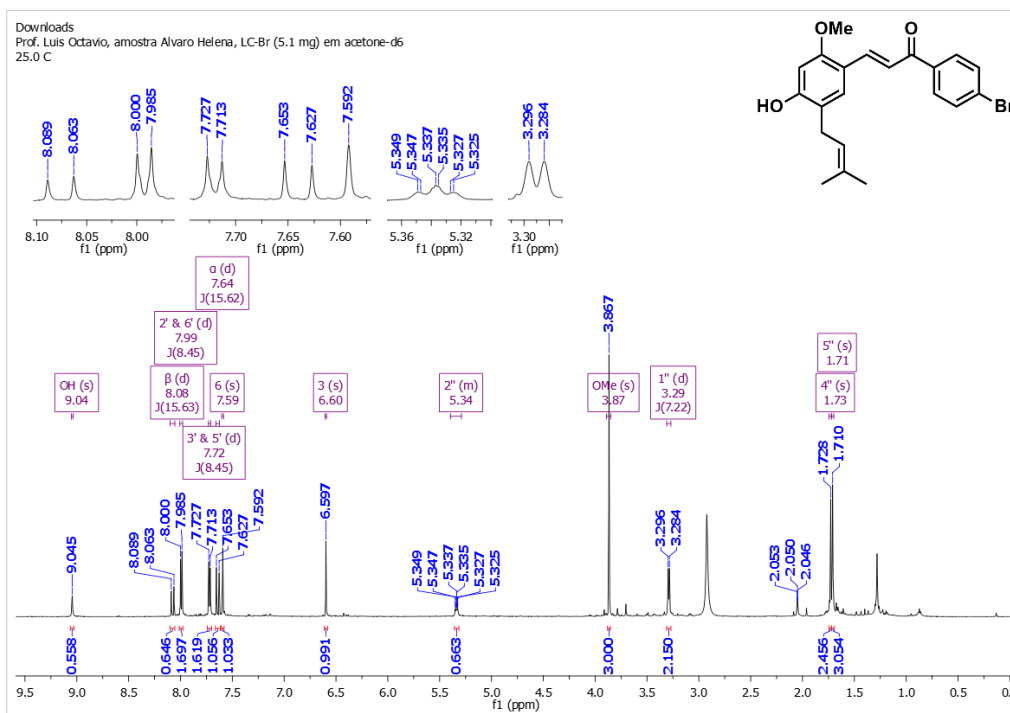
Figura 19 – Espectro de RMN ^1H do composto **12** (600 MHz – acetona- d_6)



Fonte: Elaborado pelo autor.

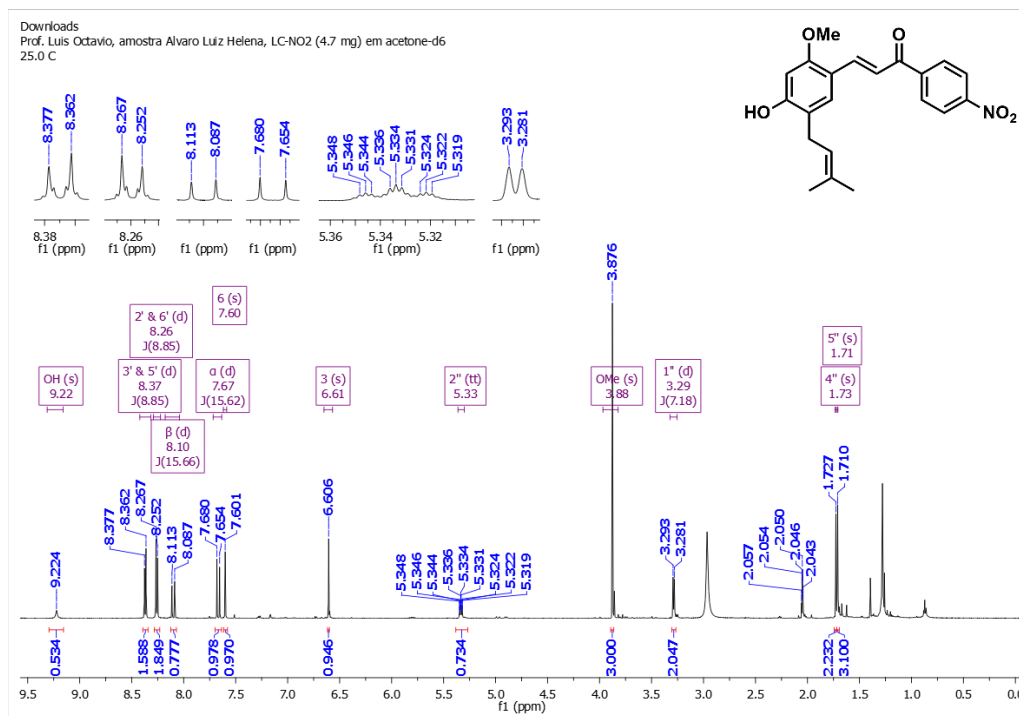
Figura 20 – Espectro de RMN H¹ do composto **13** (600 MHz – acetona-d₆)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 21 – Espectro de RMN H¹ do composto **14** (600 MHz – acetona-d₆)

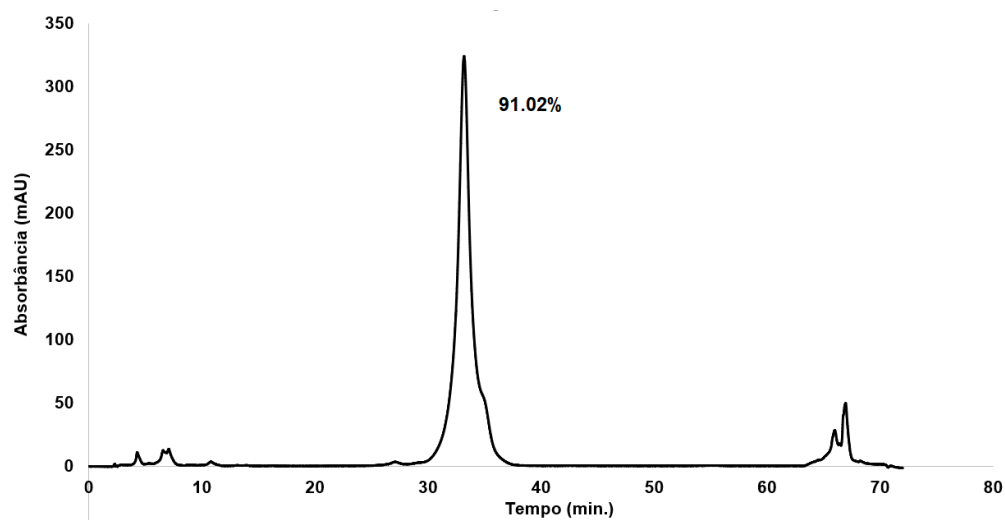
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 22 – Espectro de RMN H¹ do composto **16** (600 MHz – acetona-d₆)



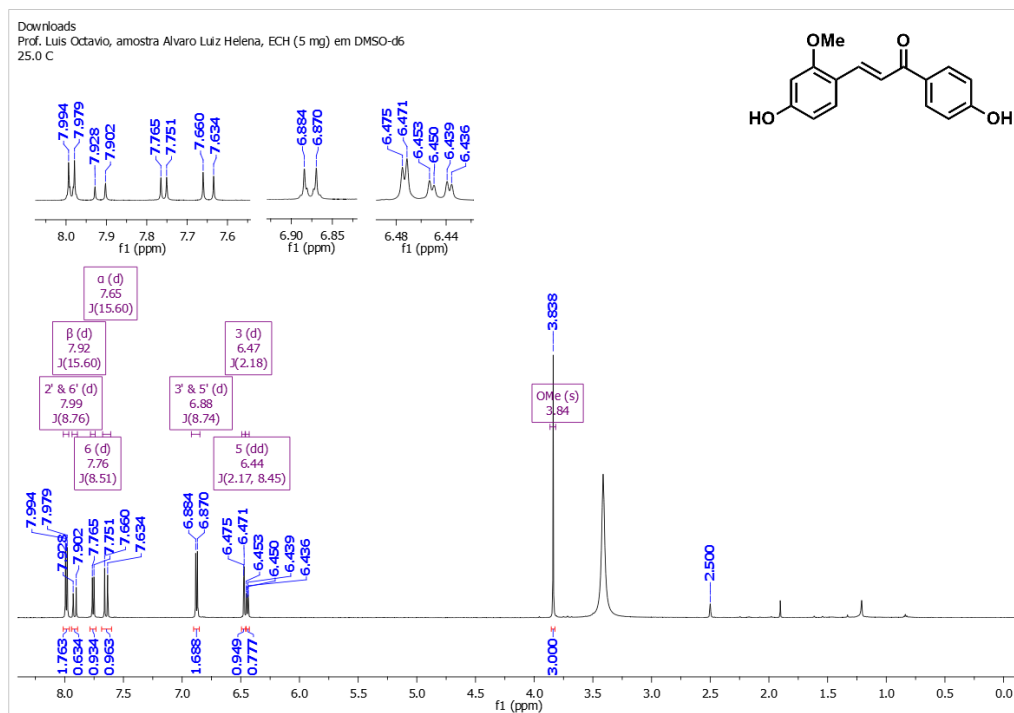
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 23 – Cromatograma de HPLC do composto **16**. Metanol:Água (3:1), 254 nm



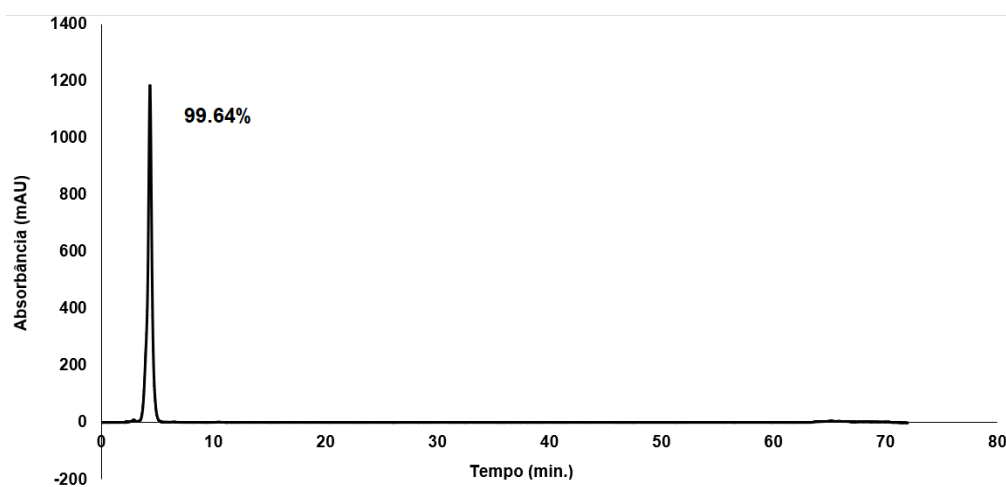
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 24 – Espectro de RMN H¹ do composto **17** (600 MHz – DMSO-*d*₆).



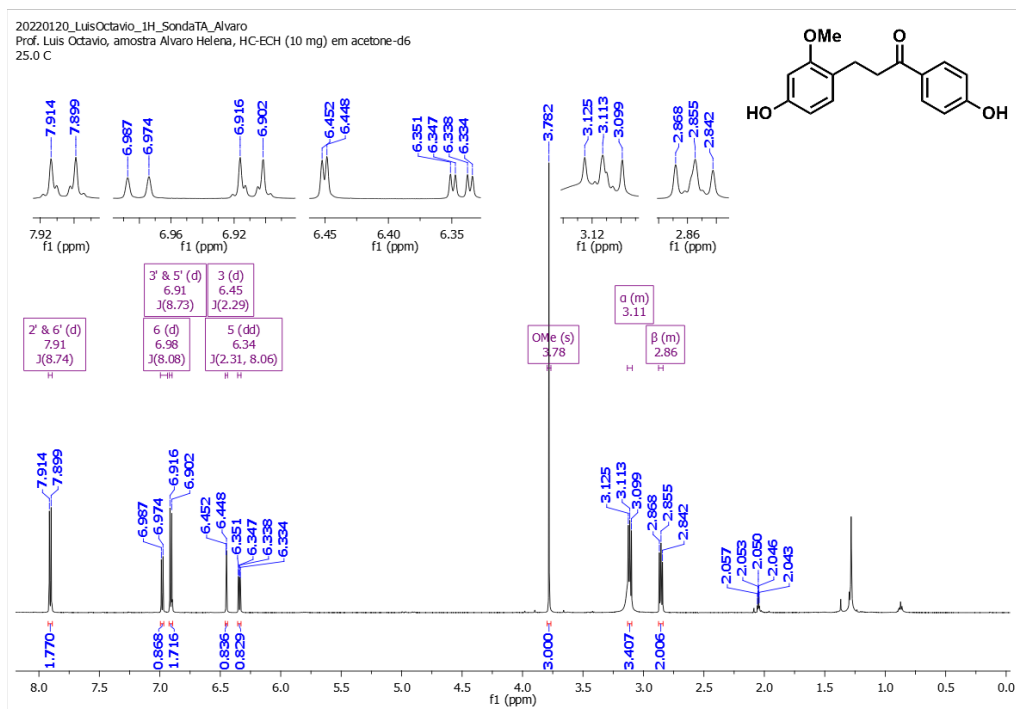
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 25 – Cromatograma de HPLC do composto **17**. Metanol:Água (3:1), 254 nm



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 26 – Espectro de RMN H¹ do composto **22** (600 MHz – acetona-d₆)



Fonte: Elaborado pelo autor.