



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

Rodrigo Raposo Lemos

**Síntese e avaliação de chalconas O-preniladas contra os vírus Oropouche e
Mayaro**

São José do Rio Preto
2021

Rodrigo Raposo Lemos

Síntese e avaliação de chalconas *O*-preniladas contra os vírus Oropouche e Mayaro

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre 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
Coorientador: Profa. Dra. Carolina Colombelli Pacca Mazaro

São José do Rio Preto
2021

L557s

Lemos, Rodrigo Raposo de

Síntese e avaliação de chalconas O-preniladas contra os vírus Oropouche e Mayaro / Rodrigo Raposo de Lemos. -- São José do Rio Preto, 2022
72 p. : il.

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

Orientadora: Luis Octavio Regasini

Coorientadora: Carolina Colombelli Pacca Mazaro

1. Vírus Oropouche. 2. Vírus Mayaro. 3. Antivirais. 4. Arboviroses. 5. Chalconas. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Rodrigo Raposo Lemos

**Síntese e avaliação de chalconas O-preniladas contra os vírus Oropouche e
Mayaro**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre 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 – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Marcos Pivatto
UFU – Universidade Federal de Uberlândia

Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti
UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

São José do Rio Preto
25 de outubro de 2021

AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente pela vida, saúde e todas as bênçãos. A minha base familiar, minha mãe Selma, meu pai Aldo e meu irmão Aldo, que mesmo de longe estiveram sempre presentes durante esses anos, me concedendo amor, atenção, conselhos, palavras de afeto e carinho, enfim, todo apoio para que eu pudesse continuar essa trajetória mesmo à distância.

Ao meu tio Alex, por todo apoio de sempre, o qual se fez presente mesmo de longe em muitos momentos. Ao meu tio e padrinho Bruno, por todo apoio mesmo com toda distância, meus agradecimentos também a você. Aos meus tios Alex e tia Jeane e minha prima Amandinha, que mesmo distante se fizeram presentes muitas vezes, trazendo momentos de alegria e boas conversas.

Ao meu querido orientador Luis Octavio, minha imensa gratidão por ter me recebido e confiado em mim, para que eu fizesse parte do seu grupo de pesquisa, por todos os conselhos e ensinamentos que me fizeram crescer e evoluir profissionalmente.

A Julyanna e Dinis, duas grandes pessoas que se tornaram mais do que amigos e sim irmãos, os quais me apoiaram e me ajudaram muito durante essa caminhada. Vocês serão lembrados para sempre com muito carinho no meu coração!

Aos colegas e amigos do laboratório em especial Reinaldo, Miguel, Graciele e Lígia pelos bons momentos vividos tanto dentro como fora do laboratório, risadas, brincadeiras e companheirismo.

A minha querida coorientadora Carol, a qual não mediu esforços em nenhum momento para me ajudar, e fazer os ensaios biológicos. Sempre disposta e bem receptiva, meu muito obrigado.

A minha querida amiga Clarita, a qual sempre que precisei esteve disposta a conversar e me ajudar no que fosse preciso.

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

“Medo é a ferramenta de um Diabo idealizado pelo homem. A fé inabalável em si mesmo é tanto a arma que derrota este diabo quanto a ferramenta que o homem utiliza para construir uma vida de sucesso. E é mais do que isso. É uma conexão direta com as forças irresistíveis do universo que apoiam o homem que não acredita em fracassos e derrotas, senão como experiências meramente temporárias.”

Napoleon Hill (2011, p.1).

RESUMO

Os vírus Oropouche (OROV) e Mayaro (MAYV) são vírus envelopados causadores da febre oropouche e mayaro, respectivamente. Ambas as infecções podem ser consideradas como zoonoses emergentes e possuem sintomas semelhantes a outras arboviroses, o que dificulta o diagnóstico clínico, causando uma consequente ampla subnotificação nos países da América Latina e Caribe. Não existem vacinas e fármacos disponíveis para a profilaxia e tratamento das infecções por OROV e MAYV. Dessa forma, torna-se necessária a busca e o desenvolvimento de novas substâncias, capazes de interromper o ciclo replicativo desses vírus. Nesse contexto, chalconas podem ser um grupo químico de partida promissor para essa investigação, uma vez que apresentam atividade antiviral contra vários vírus, incluindo o vírus da dengue (DENV), vírus da imunodeficiência humana tipo I (HIV-1), vírus do mosaico do tabaco (TMV) e citomegalovírus (CMV). Nesse presente trabalho foram sintetizadas dez chalconas O-preniladas por meio de duas etapas; (i) reação de O-prenilação do seringaldeído e (ii) reação de Claisen-Schmidt entre os seringaldeído O-prenilado e respectivas acetofenonas. Os rendimentos globais dessas reações variaram de 3% a 17%. As substâncias foram purificadas utilizando cromatografia em coluna de fase normal e de permeação em gel. As estruturas das substâncias foram confirmadas por meio da análise dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio. Os procedimentos químicos permitiram a obtenção dos produtos isolados em quantidades e pureza adequadas aos ensaios de toxicidade contra células Vero E6 e antiviral. Sete chalconas O-preniladas demonstraram toxicidade contra células Vero E6 na maioria das concentrações testadas e ausente ou fraca inibição da replicação de OROV e MAYV. A chalcona 17, substituída por um grupo amina na posição 2' do anel A colaborou com uma viabilidade celular em 50% das células Vero E6 infectadas por OROV a 4,7 μM e 9,4 μM .

Palavras-chave: Vírus Oropouche. Vírus Mayaro. Arboviroses. Antivirais. Chalconas.

ABSTRACT

Oropouche (OROV) and Mayaro (MAYV) are enveloped virus, which are able to cause Oropouche and Mayaro fevers, respectively. Both infections are emergent zoonosis and possess similar symptoms to other arbovirosis, avoiding their clinical diagnosis and subnotifications in Latin America and Caribbean countries. There are not vaccines and drugs to prophylaxis and treatment of OROV and MAYV infections. Thus, the search and development of new compounds is necessary, which are able to finish the replicative cycle of these virus. In this context, chalcones can be starting and promising chemical group to this investigation, considering their antiviral activity against other viruses, including DENV, HIV- 1, TMV and CMV. In this current work, 10 O-prenylated chalcones were synthesized in two steps; (i) O-prenylation reaction of syringaldehyde and (ii) Claisen-Schmidt reaction between O-prenylated syringaldehyde and respective acetophenones. Global yields of these reactions ranged from 3% to 17%. Compounds were purified by chromatographic column separations over normal and gel permeation phases. Structure of compounds were confirmed by Nuclear Magnetic Resonance spectral analyses. Chemical procedures led to isolated products in adequate amounts and purity to toxicity assays against vero E6 cells and antiviral assays. Seven O-prenylated chalcones demonstrated toxicity against Vero E6 cells in tested concentrations and absence or weak inhibition of OROV and MAYV replication. Chalcone 17, which is substituted by amino group at position 2' on ring A, exhibited 50% cell viability of vero E6 cells infected by OROV at 4.7 μ M and 9.4 μ M.

Keywords: Oropouche Virus. Mayaro Virus. Arbovirosis. Antiviral. Chalcone.

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 01.	Rendimentos da rota sintética de chalconas <i>O</i> -preniladas.....	37
--------------------	--	----

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01.	Modelo estrutural dos <i>Orthobunyavirus</i>	14
Figura 02.	Modelo de replicação dos <i>Orthobunyavirus</i>	15
Figura 03.	Distribuição dos genótipos do OROV na América Latina.....	19
Figura 04.	Modelo estrutural dos <i>Alphavirus</i>	20
Figura 05.	Modelo de replicação dos <i>Alphavirus</i>	21
Figura 06.	Distribuição do MAYV na América Latina	23
Figura 07.	Estrutura Geral das Chalconas.....	25
Figura 08.	Chalcona com atividade antiviral contra o TMV.....	25
Figura 09	Chalcona com atividade antiviral contra o DENV2.....	26
Figura 10.	Chalcona com atividade antiviral <i>in silico</i> contra o DENV.....	26
Figura 11.	Chalcona com atividade antiviral contra o TMV e CMV.....	27
Figura 12.	Chalconas com atividade antiviral contra o HIV-1.....	27
Figura 13.	Estrutura do seringaldeído.....	28
Figura 14.	Gráficos de ensaio de citotoxicidade e atividade antiviral contra o OROV	41
Figura 15.	Gráficos de ensaio de citotoxicidade e atividade antiviral contra o MAYV.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Rendimentos da etapa 2 e globais para a síntese das Chalconas O-prenilada.....	37
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CC50	Concentração necessária para diminuir 50% da viabilidade celular
CC-FN	Coluna cromatográfica de fase normal
CHIKV	Vírus Chikungunya Carboximetilcelulose
CMCCMV	Citomegalovírus
CO ₂	Dióxido de carbono
DENV	Vírus da dengue
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC50	Concentração do composto que inibe em 50% a replicação viral
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
LAQ	Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos
MAYV	Vírus Mayaro
MTT ORF	Thiazolyl blue tetrazoliumbromide Fração de leitura aberta
OROV	Vírus Oropouche
PCR	Polymerase chain reaction
PCR-RT	Polymerase chain reaction – Real time
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
RdPd	RNA polimerase RNA dependente
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SFB	Soro fetal bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
TMV	Vírus do mosaico do Tabaco

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Arbovírus.....	13
1.2 Vírus Oropouche.....	13
1.3 Febre Oropouche.....	16
1.4 Vetores do OROV.....	17
1.5 Epidemiologia, diagnóstico e tratamento da febre oropouche.....	18
1.6 Vírus Mayaro.....	20
1.7 Estrutura e replicação do MAYV.....	20
1.8 Febre Mayaro.....	22
1.9 Epidemiologia, diagnóstico e tratamento da febre Mayaro.....	22
1.10 Chalcona antivirais.....	24
2. OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo geral.....	29
2.2 Objetivos específicos.....	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1 Reagentes e Solventes.....	30
3.2 Métodos de cromatográficos.....	30
3.2.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	30
3.2.2. Cromatografia em Coluna de Fase Normal (CC-FN)	30
3.2.3. Cromatografia em Coluna de Permeação em Gel (CC-PG)	30
3.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	31
3.4 Estratégia sintética para obtenção de chalconas O-preniladas.....	31
3.4.1 Reação de O-prenilação do seringaldeído.....	31
3.4.2 Reação de Condensação de Claisen-Schmidt.....	32
3.4.2.1 Preparo das chalconas O-preniladas derivadas do seringaldeído (9-18).....	32
3.5 Bioensaios.....	33
3.5.1 Cultura celular.....	33
3.5.2 Cultivo viral.....	33
3.5.3 Avaliação da citotoxicidade.....	34
3.5.4 Avaliação da inibição da replicação viral	35

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	36
4.1 Síntese das chalconas O-preniladas.....	36
4.1.1 Dados de RMN de ^1H da chalcona 9.....	38
4.1.2 Dados de RMN de ^1H da chalcona 10.....	38
4.1.3 Dados de RMN de ^1H da chalcona 11.....	38
4.1.4 Dados de RMN de ^1H da chalcona 12.....	38
4.1.5 Dados de RMN de ^1H da chalcona 13.....	39
4.1.6 Dados de RMN de ^1H da chalcona 14.....	39
4.1.7 Dados de RMN de ^1H da chalcona 15.....	39
4.1.8 Dados de RMN de ^1H da chalcona 16.....	39
4.1.9 Dados de RMN de ^1H da chalcona 17.....	39
4.1.10 Dados de RMN de ^1H da chalcona 18.....	40
4.2 Avaliação da atividade antiviral das chalconas O-preniladas.....	40
5. CONCLUSÕES.....	44
REFERÊNCIAS.....	45
APÊNDICES.....	57

1 INTRODUÇÃO

1.1 Arbovírus

As arboviroses são doenças infecciosas transmitidas por vetores artrópodes hematófagos, entre hospedeiros vertebrados humanos e não humanos pela picada de mosquitos. Os vírus que causam são denominados de arbovírus. Sendo que aqueles que infectam os humanos pertencem a cinco famílias: *Rhabdoviridae*, *Togaviridae*, *Peribunyaviridae*, *Flaviviridae* e *Reoviridae* (KNIPE; HOWLEY, 2013; RUST, 2012; FIGUEIREDO, 2007).

As arboviroses apresentam distribuição em todos os continentes, entretanto predominam nos trópicos, pois é onde encontram as condições climáticas propícias à disseminação. Todavia existe a ocorrência de várias arboviroses em regiões de clima frio, incluindo algumas de natureza grave para o ser humano, como a encefalite russa vernestival, Saint Louis e japonesa (VERONESI, 2015).

O Brasil é coberto por um terço de florestas tropicais e outros ecossistemas predominantes no território nacional, alta densidade populacional e grande circulação de mosquitos transmissores de arboviroses, o que torna um país altamente propício à emergência e reemergência de arbovírus, dando condições para a realização de ciclos zoonóticos e surgimento de surtos e epidemias (FIGUEIREDO, 2007).

Pessoas que vivem ou circulam em regiões silvestres estão mais suscetíveis a serem infectadas por arbovírus, pois nesses ambientes as condições são favoráveis para a sobrevivência e reprodução dos vetores. No entanto grandes epidemias são periodicamente observadas em zonas urbanas ou rurais, resultando na infecção de milhares de pessoas (VERONESI, 2015).

Com o processo de sinantropia, resultado da adaptação do mosquito *Aedes aegypti* aos ambientes urbanos, muitas arboviroses conseguiram manter os seus ciclos urbanos independentemente dos ciclos silvestres (TRPIS; HAUSERMANN, 1978).

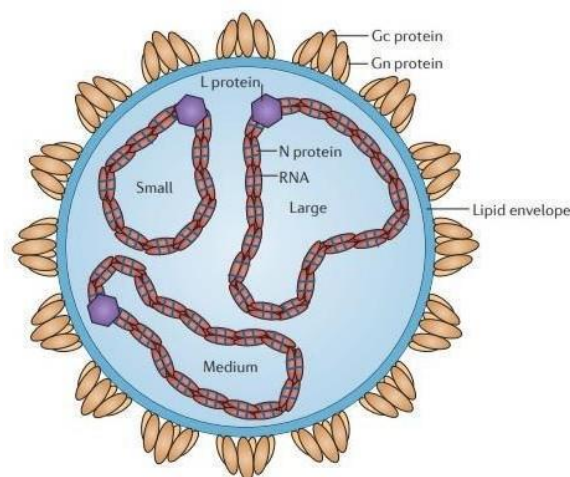
As manifestações clínicas variam de formas mais graves com pacientes apresentando quadros hemorrágicos, encefalites (inflamação no cérebro), plaquetopenia (diminuição do número de plaquetas), hematêmese (vômito com presença de sangue), a formas mais amenas onde os pacientes apresentam quadros febris, mialgia (dor muscular), artralgia (dor na articulação) e fotofobia (sensibilidade da visão a luz) (SILVA-CASO et al., 2019; VERNAL; MARTINI; FONSECA, 2019).

1.2 Vírus Oropouche (OROV)

O vírus Oropouche (OROV) foi isolado de uma paciente que apresentava um quadro febril em Trinidad e Tobago. O vírus foi nomeado Oropouche em homenagem ao local de onde foi descoberto (ANDERSON et al., 1961). O OROV é o agente etiológico da febre oropouche, sendo transmitido principalmente pelo mosquito *Culicoides paraensis*, pertence ao gênero *Orthobunyavirus* e a família *Peribunyaviridae*. No entanto, o OROV já foi isolado em outras espécies de mosquitos como o *Culex quinquefasciatus*, *Coquillettidia venezuelensis*, *Aedes (Ochletotatus) serratus*, que são considerados vetores secundários (ALENCAR et al., 2011; KNIPE; HOWLEY, 2013; CARDOSO et al., 2010; LUNA et al., 2017; MOURÃO et al., 2009).

O OROV é um vírus envelopado, possui material genético tripartido de RNA fita simples com o sentido negativo, e mede cerca de 80 a 120 nanômetros de diâmetro (KNIPE; HOWLEY, 2013). Possui os três segmentos em seu genoma, o grande denominado grande (Large), o médio (Médium) e o pequeno (Small) (Figura I). Nesses segmentos genéticos estão as informações para a produção da RNA-polimerase RNA-dependente (RdPd), como também a codificação genética para a síntese das glicoproteínas de superfície Gn e Gc, proteína N, e proteínas não-estruturais NSs e NSm (Figura I) (ELLIOTT, R.; BLAKQORI, G. 2011).

Figura 1. Modelo estrutural dos *Orthobunyavirus*



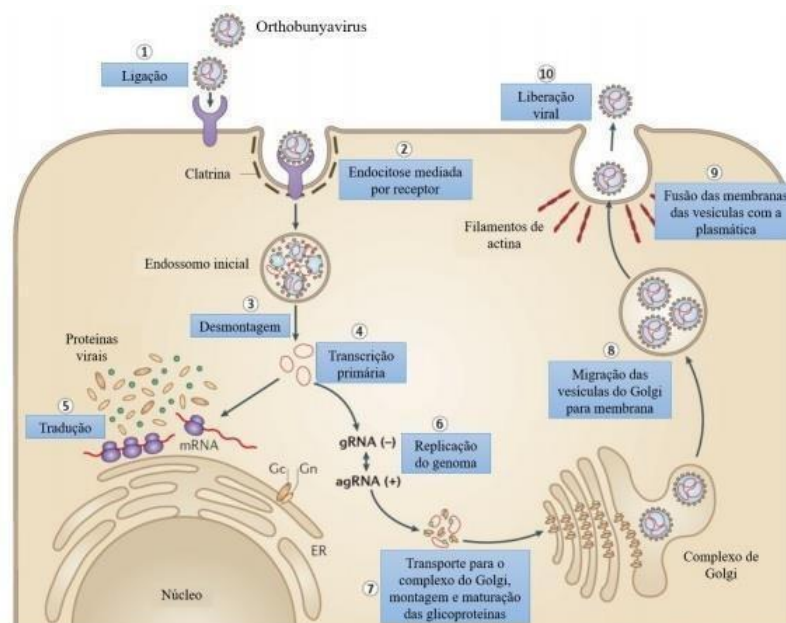
Fonte: (ELLIOT, 2011).

No início do ciclo replicativo do OROV, ocorre interação entre a célula hospedeira e a superfície da partícula viral ocorre por meio dos receptores glicoproteicos virais, que são formados pelas glicoproteínas Gn e Gc (ACRANI et al., 2010). A entrada na célula ocorre por meio de endocitose mediada, na qual as vesículas de transporte são rodeadas por clatrina. A ORF do (L) RNA codifica a proteína L que é uma RdPd (AQUINO; FIGUEIREDO, 2004).

O RNA médio que possui uma ORF, codifica uma grande cadeia polipeptídica que após a tradução é clivada gerando três proteínas virais, duas glicoproteínas estruturais que são Gn e Gc, e a NSm que é uma proteína não-estrutural (DIETZGEN et al., 2012). No segmento de RNA pequeno, existe a codificação para a produção de duas proteínas, uma estrutural e uma não-estrutural denominada NSs. A NSs é uma proteína indispensável ao ciclo replicativo do OROV, devido a sua atuação como antagonista do interferon I (NATASHA et al., 2016).

Após dez horas de incubação do vírus OROV em um tipo de célula de linhagem tumoral denominada HeLa, começa a ser perceptível a produção da progênie viral. No entanto, é depois de 24 horas que é observado um pico na produção dessa progênie. Após a fase de maturação, as partículas virais são liberadas pela via exocítica, que resulta na liberação das partículas. Foi detectado a indução de apoptose nas células HeLa a partir de 36 horas após a inoculação dos vírus (ACRANI et al., 2010).

Figura 2. Modelo de replicação dos *Orthobunyavirus*



Fonte: (ELLIOT, 2011)

1.3 Febre Oropouche

Durante um surto da febre Oropouche na Amazônia peruana, foram analisados os sintomas dos pacientes de todas as faixas etárias, sendo os sintomas mais relatados: dor de cabeça, mialgia, artralgia, dor retro-ocular e hiporexia. Uma porcentagem menor de pacientes desenvolveu sintomas mais graves como plaquetopenia, dor abdominal intensa, dor torácica, sangramento ginecológico e hematêmese. Nenhum dos pacientes apresentou sintomas neurológicos (SILVA-CASO et al., 2019). Em um estudo mais recente, verificado que na descrição do quadro clínico de pacientes infectados com o OROV na costa Peruana, que os sintomas mais comuns foram cefaleia, mialgia, artralgia e perda de apetite (LUNA et al., 2020).

Um paciente do sexo masculino na cidade de Ribeirão Preto, deu entrada no hospital apresentando cefaleia unilateral intensa, febre alta súbita, êmese, fotofobia intensa, torcicolo, confusão, calafrios, tontura e depois diagnosticado também com meningoencefalite. Dezesete dias antes, ele esteve no norte do Brasil, na floresta Amazônica. O exame da reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizado e foi diagnosticado com infecção por OROV (VERNAL; MARTINI; FONSECA, 2019).

Na Amazônia, apesar de não apresentar registros de óbitos, o OROV é o vírus que está mais associado ao estado febril, sendo que muitos pacientes ficam bastante debilitados, muitas vezes com cefaleia intensa na região occipital com irradiações para a nuca e a coluna vertebral, fortes tonturas e lipotimia. Foram relatados também pacientes com mialgia, êmese, diplopia e nistagmo (VERONESI, 2015).

O conhecimento sobre a patogênese da febre causada pelo OROV ainda é escasso, visto que, ainda não foi notificado nenhum óbito relacionado ao vírus em humanos. Entretanto, foi relatado que pacientes infectados com o OROV apresentaram sintomas sistêmicos, com viremia detectada do segundo ao quarto dia depois dos primeiros sintomas surgirem (PINHEIRO et al., 1996).

Em alguns pacientes infectados pelo OROV, foi detectado o vírus no líquido cefalorraquidiano, no entanto a via utilizada pelo vírus para chegar ao sistema nervoso central (SNC) ainda não foi totalmente esclarecida (VERONESI, 2015).

Em pesquisa com modelo animal utilizando hamsters, pesquisadores inocularam o OROV no cérebro e descobriram que o vírus pode se disseminar pela via hematogênica, causando lesões hepáticas com necrose dos hepatócitos e hipertrofia das células de Kupffer (ARAUJO et al., 1978).

Experimentos em camundongos neonatos, o OROV foi inoculado de forma subcutânea, apresentando sintomas no quinto dia de infecção, demonstrando uma grande concentração do OROV no cérebro, com inflamação das meninges levando a um quadro apoptótico dos neurônios. No mesmo experimento, em camundongos foi reportado que existe um neurotropismo do OROV em relação ao hospedeiro, pois por meio de testes imunohistoquímicos foi mostrado que os vírions do OROV percorreram rotas neurais passando pela medula espinhal num movimento ascendente em relação ao cérebro. Instalado no cérebro, o vírus possui uma tendência a migrar da parte posterior para o prosencéfalo (SANTOS, 2014).

1.4 Vetores do OROV

O mosquito *Culicoides paraensis* é o principal vetor do OROV, pertencendo a ordem Diptera, família Ceratopogonidae, estando entre os menores insetos hematófagos (1– 3 mm). Esse mosquito pode ser encontrado em quase toda a extensão territorial do planeta, exceto a Antártica e Nova Zelândia (MELLOR; BOORMAN; BAYLIS, 2000).

Os mosquitos do gênero *Culicoides* são classificados como ectotérmicos e requerem um desenvolvimento semi-aquático, sendo bastante sensíveis no seu nicho ecológico a variações sutis na temperatura e umidade. É um gênero que possui grande preocupação internacional em relação a saúde pública, pois suas espécies são vetores de arbovírus humano e veterinário, sendo 96% dessas classificadas como hematófagos (PURSE et al., 2014; MELLOR; BOORMAN; BAYLIS, 2000).

Os mosquitos machos não são hematófagos, apenas as fêmeas fazem repasto sanguíneo, pois é necessário para a maturação dos ovos fertilizados. É pouco o conhecimento sobre o ciclo de vida do *Culicoides*, no entanto é sabido que os ovos são depositados em locais úmidos e o tempo para chegar ao estágio larval é de 3 a 10 dias. Locais lamacentos, com presença de esterco junto com o solo úmido, perto de fazendas onde existe a criação de gado são ambientes propícios para o desenvolvimento dos vetores, aumentando dessa forma a transmissão do arbovírus entre animais e humanos (MELLOR; BOORMAN; BAYLIS, 2000; PURSE et al., 2015; TEMMAN et al., 2016).

1.5 Epidemiologia, diagnóstico e tratamento da febre Oropouche

O OROV é um dos arbovírus mais frequente no Brasil, a estimativa é de que mais de meio milhão de pessoas foram infectadas pelo OROV, em cerca de mais de 60 anos. Entretanto,

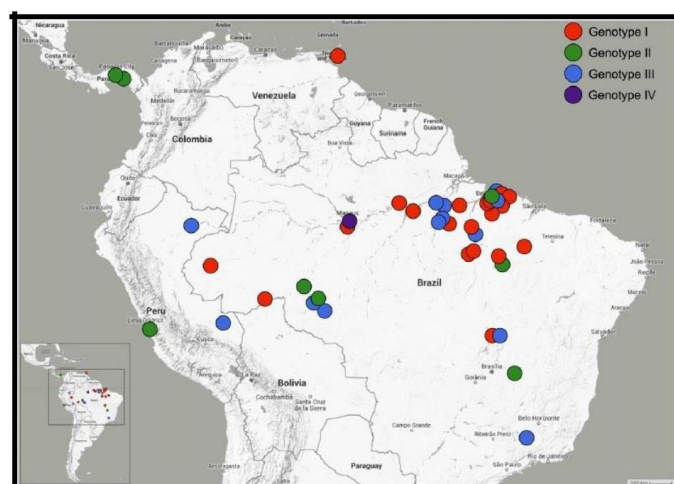
pelos sintomas da febre oropouche ser bastante semelhante ao de outras arboviroses como por exemplo aos sintomas da Dengue, Zika e Febre Amarela, muitos casos da febre oropouche estão sendo subnotificados (TILSTON-LUNEL., et al. 2016; FIGUEIREDO, 2007; ROSA., et al. 2017; DUTRA; CARAGATA; MOREIRA, 2017; ACRANI., et al 2015; CULQUICHICÓN., et al. 2017).

A febre oropouche ocorreu apenas em alguns países, incluindo Trinidad e Tobago, Peru, Panamá e Brasil. No Brasil, o OROV foi isolado pela primeira vez em 1955, e, desde essa data, vem causando muitas epidemias que são restritas aos estados do norte, principalmente Pará e Amazonas (PINHEIRO., et al. 1962; PINHEIRO., et al. 1976; VASCONCELOS., et al. 1989).

Saeed e colaboradores foram pioneiros no estudo sobre epidemiologia molecular do OROV, e relataram a existência de três genótipos. A partir da sequência nucleotídica do gene N de 28 cepas isoladas de regiões e hospedeiros diferentes, foi constatado que em Trinidad e Tobago circulava o Genótipo I do OROV, o genótipo II no Peru, o genótipo III no Panamá e no Brasil foram detectados dois genótipos I e II (SAAED., et al. 2001).

Em estudos na cidade de Manaus foi analisado o segmento genético S no genoma do OROV isolado de humanos, concluindo o surgimento de um novo genótipo numerado como IV. Foi realizado um estudo baseado com 111 sequências completas do segmento genético S do OROV, dividindo assim o OROV em 4 genótipos e 8 subgenótipos. O genótipo I é localizado no Brasil e em Trinidad, o genótipo II no Panamá, Peru e Brasil, o III no Brasil e Peru e o genótipo IV encontrando apenas no Brasil (Figura 3) (TRAVASSOS DA ROSA., et al. 2017; VASCONCELOS., et al. 2011).

Figura 3. Distribuição dos genótipos do OROV na América Latina



Fonte: (TRAVASSOS DA ROSA et al., 2017).

Uma vez que os sintomas da febre oropouche são bastante similares aos de outras arboviroses como a Dengue e Zika, é difícil obter um diagnóstico clínico preciso (PINHEIRO et al., 1981). Assim, para um diagnóstico clínico rápido e confiável do OROV, são necessárias técnicas moleculares clássicas como a PCR-RT (MORELI et al., 2002). O teste de imunofluorescência indireta em leucócitos periféricos para identificação do antígeno do OROV também começou a ser utilizado como método de diagnóstico (DE SOUZA LUNA et al., 2017).

Até o momento, não existe nenhum fármaco antiviral disponível para o tratamento da febre oropouche, bem como vacinas para medidas profiláticas. A única opção são os fármacos para alívio dos sintomas como medidas paliativas. São escassos os estudos existentes na literatura buscando fármacos antivirais contra o OROV. Um estudo realizado por Livonesi e colaboradores, com a ribavirina (um análogo nucleosídico) não apresentou resultados de atividade antiviral contra o OROV (CARPENTER et al., 2013; LIVONESI et al., 2006).

Frente a isso, a melhor maneira é tentar conter o risco de surtos e epidemias pelo OROV, visando a erradicação dos vetores por meio de práticas agrícolas que reduzam a quantidade de criadouros, como também é necessário medidas de proteção pessoal como o uso de mosquiteiros, uso de repelentes e armadilhas luminosas para insetos (CARPENTER et al., 2013; LIVONESI et al., 2006).

1.6 Vírus Mayaro (MAYV)

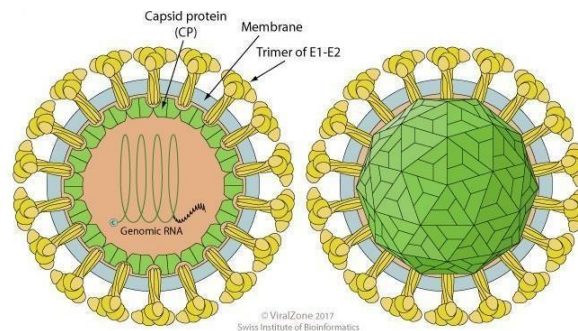
O vírus Mayaro (MAYV) é o agente etiológico da febre mayaro que pertence ao gênero *Alphavirus*, família *Togaviridae*, sendo transmitido principalmente por mosquitos do gênero *Haemagogus*. A transmissão do MAYV, ocorre geralmente de um primata não- humano para um humano. Outros hospedeiros também foram descobertos, tais como roedores, pássaros, preguiças e outros mamíferos de pequeno porte (DE THOISY B et al., 2003).

O MAYV foi isolado pela primeira vez em amostras de sangue de trabalhadores rurais em de Trinidad e Tobago, em 1954. O vírus foi nomeado Mayaro pois era o nome da região localizada a sudeste de Trinidad, onde os casos iniciais da febre foram notificados (ANDERSON et al., 1957).

1.7 Estrutura e replicação do MAYV

O MAYV é um vírus envelopado com simetria icosaédrica, medindo cerca de 65 a 70 nm de diâmetro e possui RNA de fita simples de sentido positivo não segmentado (Figura 4) (KING et al., 2011).

Figura 4. Modelo estrutural dos *Alphavirus*

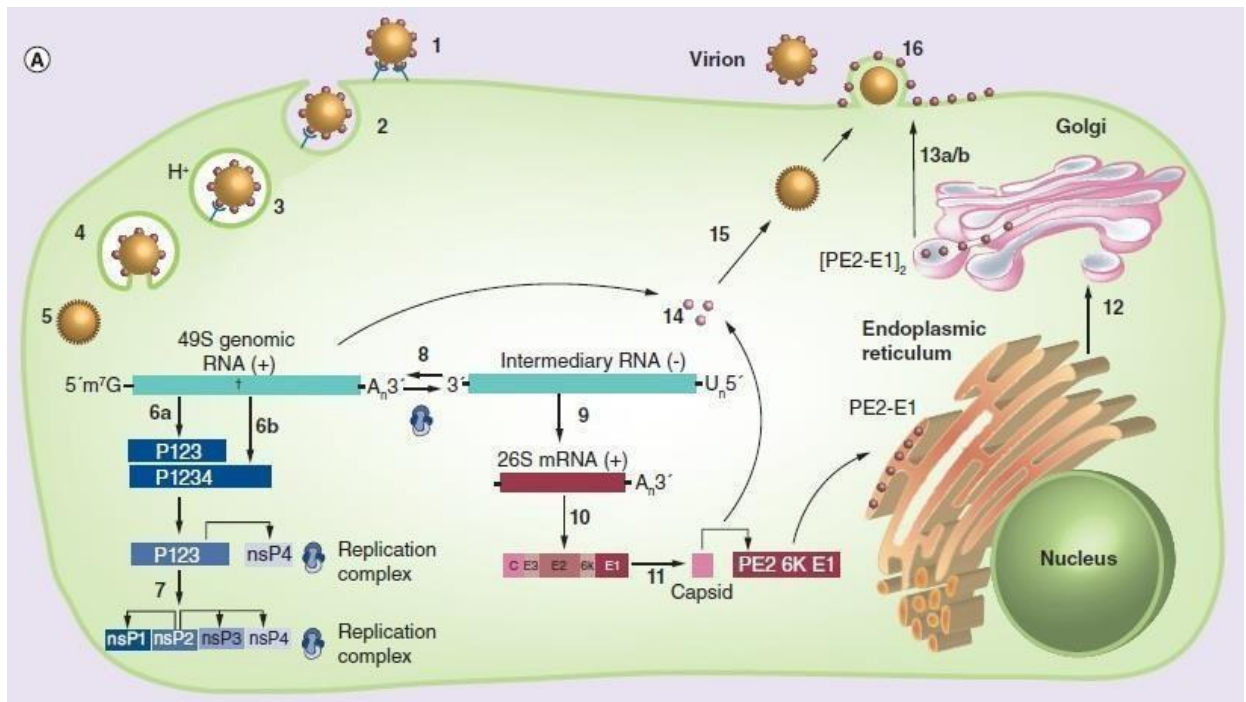


Fonte: https://viralzone.expasy.org/625?outline=all_by_species

Pouco é conhecido sobre o ciclo replicativo de MAYV, sendo que a maioria dos dados são baseados em estudos da replicação de outros *Alphavirus* (Figura 5). O ciclo replicativo se inicia com a adsorção viral via proteína de superfície E2 se ligando assim a célula hospedeira. Em seguida o vírus entra na célula por endocitose na célula hospedeira (WINTACHAI, 2012). Após o vírus entrar no citoplasma, é liberado e sofre desnudamento da vesícula endossomal devido a acidificação do meio, assim, ele libera o material genético para início da replicação. O genoma do MAYV possui duas ORFs, a primeira e a segunda ORF codificam proteínas não-estruturais e proteínas estruturais, respectivamente (STRAUSS; STRAUSS, 1994; MAYOR; PAGANO, 2007).

Dentro da célula o material genético do MAYV se liga ao ribossomo para iniciar a tradução. A primeira ORF que é traduzida codifica a produção de uma cadeia polipeptídica, a qual é clivada em quatro proteínas não-estruturais, que são nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4. A segunda ORF possui a informação que será traduzida a uma cadeia polipeptídica, que após clivagem libera quatro proteínas estruturais E1, E2, E3 e 6K, as quais pertencem ao envelope e ao capsídeo do vírion. Após a montagem da partícula viral, o vírion se funde à membrana celular e por brotamento que é a última etapa do ciclo replicativo, o vírion é liberado da célula (STRAUSS; STRAUSS, 1994).

Figura 5. Modelo de replicação dos *Alphavirus*



Fonte: (MOTA, 2015).

1.8 Febre mayaro

Os sintomas da febre ayaro geralmente são inespecíficos e leves, sendo divididos em duas fases quanto ao quadro de sintomas do paciente. A primeira fase é aguda e a segunda subaguda. A fase aguda se caracteriza por uma pequena viremia de 3 a 4 dias e depois um período de incubação de 7 a 12 dias em que alguns sintomas sistêmicos podem aparecer como febre abrupta, artrite, erupção cutânea geralmente acompanhada de sangramento (PINHEIRO., et al. 1981; MOTA., et al. 2015; THEILACKER et al., 2013; MCGILL., 1995).

O paciente infectado pelo MAYV pode apresentar sintomas como artralgia, cefaléia, êmese, dor retro-ocular, diarreia, mialgia. O quadro febril pode apresentar uma duração de cerca de 10 dias, podendo ressurgir após alguns dias. O MAYV pode causar sintomas mais graves como complicações no SNC, miocardite, podendo levar o paciente a óbito, com manifestações hemorrágicas apesar de raras também são possíveis de acometer aos infectados (CHEN; LANG, 2013; MOURÃO., et al. 2012).

Em alguns pacientes foram relatados sintomas como dor de garganta, dor abdominal, náusea, tosse, anorexia, inchaço dos linfonodos e sangramento gengival, cerca de 20% dos pacientes com febre mayaro apresentam edema na região dos pulsos, articulações, dedos das mãos e tornozelos. Na fase de convalescença o paciente pode ter artralgia, artrite, podendo esses sintomas durarem semanas e até meses (ZUCHI et al., 2014; IZURIETA et al., 2011; AZEVEDO et al., 2019; HALSEY et al., 2013; MUÑOZ; NAVARRO, 2012; PINHEIRO et al., 1981).

O paciente infectado pelo MAYV pode desenvolver um quadro de artralgia bastante incapacitante e doloroso afetando pulsos, mãos, cotovelo, pés, quadris e articulações axiais. Geralmente esses pacientes com artralgia ficam bastante debilitados e com sensibilidade até mesmo ao toque. A infecção pelo MAYV conduz a um quadro de leucopenia, trombocitopenia, albuminúria todos em um grau ligeiramente leve (PINHEIRO et al., 1981).

1.9 Epidemiologia, diagnóstico e tratamento da febre mayaro

É escasso o conhecimento sobre a epidemiologia do MAYV, entretanto é estimado que 1% dos casos de dengue se referem na verdade a infecção pelo MAYV, isso acontece pelo erro no diagnóstico resultando assim em uma subnotificação de infecções por MAYV. Isso pode acontecer em relação ao MAYV e com outros arbovírus que também causam infecções febris, incluindo OROV (FORSHEY., et al. 2010; WEAVER; REISEN, 2010; WEISE., et al. 2014).

Casos esporádicos como surtos e pequenas epidemias da febre mayaro, aconteceram em países como por exemplo Peru, Suriname, Guiana Francesa e Venezuela (TORRES et al., 2004; TALARMIN et al., 1998; METSELAAR, 1966; HALSEY et al., 2013). No Brasil, o MAYV foi registrado principalmente nos estados localizados ao norte como Amazonas e Pará (Figura 6) (ABAD-FRANCH et al., 2012; JONES et al., 2013; CRUZ et al., 2009).

Estudos sorológicos realizados no Brasil entre 1966 e 2010 identificaram uma alta taxa de infecção pelo MAYV, demonstrando assim que o Brasil é um dos países mais afetados por esse arbovírus, o que pode ser explicado pelas características do Brasil ser um país continental e tropical, com florestas e ecossistemas que fornecem um nicho ecológico ao qual os arbovírus são adaptados (LORENZ et al., 2017).

Figura 6. Distribuição do MAYV na América Latina



Fonte: (Mota, 2015).

O diagnóstico clínico da febre mayaro pode ser confundido com o de outros arbovírus devido a semelhança dos sintomas com outras infecções causadas por arbovírus (VIEIRA et al., 2015). O método de diagnóstico mais adequado é o isolamento viral de uma amostra de sangue do paciente, que é considerado como padrão-ouro de diagnóstico. Entretanto devido ao período virêmico curto, esse diagnóstico pode ser dificultado. O isolamento e cultivo viral é realizado em células C6/36, que são células do inseto *Aedes albopictus*, células Vero E6 como também em ratos lactentes por meio da inoculação intracerebral. O período para observar o efeito citopático em média são de três dias (DE FIGUEIREDO; FIGUEIREDO, 2014).

Os métodos clássicos de biologia molecular economicamente mais viáveis tal como a PCR podem ser utilizados como uma ferramenta de diagnóstico (BRONZONI., et al. 2004). Outros métodos como ensaios de imunofluorescência são usados para detecção da febre mayaro (MOTA., et al 2015).

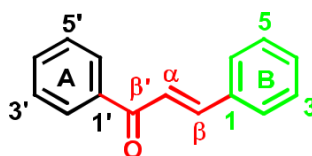
Assim como outras infecções por arbovírus, a febre mayaro não tem um tratamento específico, mas sim um suporte da equipe médica para alívio dos sintomas. Todavia, como a febre Mayaro é semelhante em relação a patologia causada pelo vírus Chikungunya (CHIKV), alguns fármacos usados para tratar a infecção pelo CHIKV é usado para tratar os sintomas da febre Mayaro. Fármacos como ibuprofeno, diclofenaco e naproxeno já foram administrados, porém não obtiveram eficácia desejada (DE FIGUEIREDO; FIGUEIREDO, 2014).

A cloroquina que é um antimalárico, foi testada e obteve bons resultados em relação ao tratamento da febre, melhorando sintomas que estavam graves em pacientes com artralgia (TAUBITZ et al., 2007). A ribavirina foi administrada durante 7 dias com doses de 200 mg duas vezes ao dia, e teve êxito no tratamento com alívio por exemplo de dor nos membros inferiores (RAVICHANDRAN; MANIAN, 2008). Em outros estudos *in vitro*, detectou-se a ação sinérgica da ribavirina com o interferon alfa (IFN- α) (BRIOLANT et al., 2004).

1.10 Chalconas antivirais

As chalconas são classificadas como cetonas α , β -insaturadas, sendo consideradas como flavonoides de cadeia aberta, bem como precursores para a biossíntese de flavonoides cíclicos (AVRAM et al., 2013; MACAEV et al., 2014).

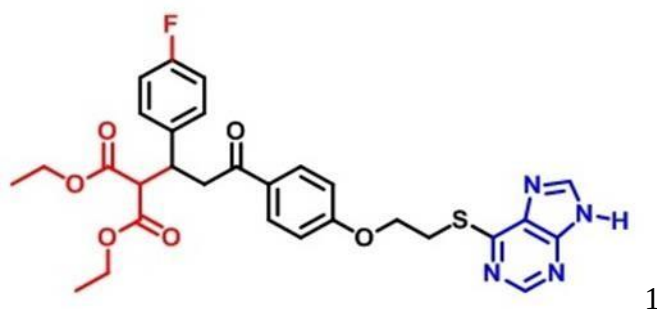
Figura 07. Estrutura geral das chalconas



Diversas pesquisas estão direcionadas ao estudo das chalconas, pois possuem amplo espectro de bioatividades, sendo substâncias promissoras como candidatas para o desenvolvimento de fármacos. Dentre essas atividades, estão: antibacteriana (ZHAO et al., 2011; MARTINS et al., 2013), anti-inflamatória (WEN et al., 2018), antitumoral (ZHOU et al., 2020; WANG et al., 2018; HAN et al., 2019) e antifúngica (MEI-YU et al., 2019; ANDRADE et al., 2018; KONDURU et al., 2013).

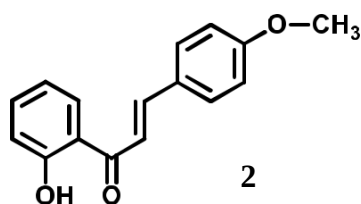
Estudos com experimentos *in vivo* contra o vírus do mosaico do tabaco (TMV), demonstraram que uma série de chalconas purínicas, exibiram atividade antiviral, com destaque para a chalcona 1 que obteve CE50 no valor de 65,8 μ M, a qual foi superior ao valor da ribavirina que exibiu CE50 de 154,3 μ M (Figura 8) (FU et al., 2020).

Figura 8. Chalcona purínica 1 com atividade antiviral contra o vírus do mosaico do tabaco



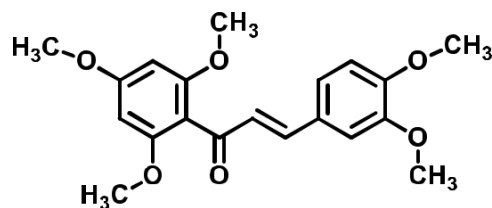
Suroengrit e colaboradores (2017) em sua pesquisa com substâncias antivirais contra os vírus da dengue tipo 2 (DENV2) e o da Zika (ZIKAV), demonstraram que a chalcona 4- metoxilada-2'-hidroxilada 2 apresentou uma CE50 de 10 μ M (Figura 9) (SUROENGRIT et al., 2017).

Figura 9. Chalcona 4-metoxilada-2'-hidroxilada 2 com atividade antiviral contra o DENV2



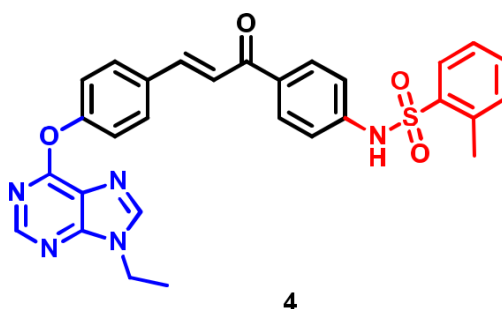
Um estudo *in silico* realizado por Powers e Sertzer (2016) com diversos tipos de compostos de uma biblioteca fitoquímica, teve como destaque uma chalcona 3,4,2',4'6'- pentametoxilada 3 que em experimentos de *docking* se ligou fortemente a uma protease do DENV, exibindo uma energia de ligação de -135,5 kJ/mol (Figura 10) (POWERS; SETZER, 2016).

Figura 10. Chalcona 3,4,2',4'6'-petametoxilada 3 com atividade inibitória *in silico* contra a protease de DENV



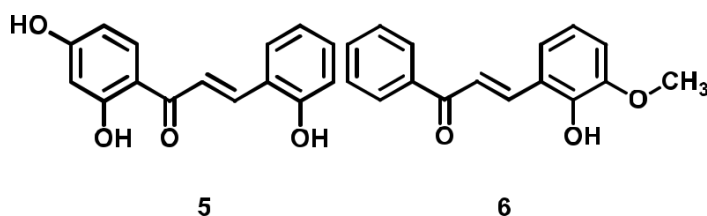
Zhou e colaboradores (2018) sintetizaram uma série de derivados chalcônicos, para analisar a atividade antiviral desses compostos contra o TMV e citomegalovírus (CMV). As chalconas exibem em sua estrutura duas subunidades adicionais, uma purínica e outra toluenosulfonamídica. Das chalconas avaliadas, a substância 4 obteve um resultado promissor, demonstrando EC₅₀ no valor de 51,6 μ M (Figura 11) (ZHOU et al., 2018).

Figura 11. Chalcona purínica-toluenosulfonamídica 4 com atividade antiviral contra o TMV e CMV



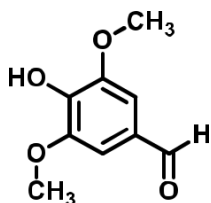
Deng e colaboradores (2006) realizaram estudos com vários compostos para avaliar a sua atividade contra o vírus da imunodeficiência adquirida tipo 1 (HIV-1), o tipo de célula utilizada foi a célula da linhagem T CD4⁺ humanas (CEM-SS). Obtiveram destaque as chalconas 5 e 6 quanto a inibição da replicação viral e a citotoxicidade. A chalcona tri- hidroxilada 5 exibiu um EC₅₀ de 32 μ M e CC₅₀ de 450 μ M, já a chalcona metoxilada- hidroxilada 7 exibiu um EC₅₀ de 23 μ M e CC₅₀ de 107 μ M. Assim a chalcona 7 obteve melhor resultado em relação a inibição da replicação antiviral, entretanto foi mais citotóxica do que a chalcona 6.

Figura 12. Chalconas com atividade antiviral contra o HIV-1.



Tendo em vista que inúmeras chalconas substituídas por grupos metoxilas (OCH₃ ou OMe) foram ativas contra inúmeros vírus, incluindo arbovírus, esse trabalho visou investigar chalconas metoxiladas que foram sintetizadas a partir do seringaldeído, que é um derivado benzaldeídico, *m*'-dissubstituído por metoxilas e *p*-substituído com uma hidroxila (Figura 13).

Figura 13. Estrutura do seringaldeído (7)



7

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Sintetizar e avaliar uma série de chalconas *O*-preniladas derivadas do seringaldeído contra os vírus Oropouche e Mayaro.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar uma série de chalconas *O*-preniladas utilizando duas etapas de síntese;
- Purificar e confirmar a estrutura das chalconas *O*-preniladas por meio de técnicas cromatográficas e espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio, respectivamente;
- Avaliar a citotoxicidade dos compostos contra células diploides de rim de macaco verde africano (Vero E6);
- Avaliar a atividade inibitória das chalconas *O*-preniladas na replicação dos vírus Oropouche e Mayaro.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e Solventes

Todos os reagentes foram obtidos comercialmente da Merck®. Os catalisadores e os solventes empregados nas reações químicas e métodos cromatográficos foram obtidos comercialmente da Synth®.

3.2 Métodos cromatográficos

3.2.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

As reações foram acompanhadas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) utilizando cromatoplasmas de gel de sílica sob base de alumínio da marca Supelco®. Para o desenvolvimento da CCD foram utilizadas misturas dos solventes hexano e acetato de etila de acordo com a polaridade dos analitos. As cromatoplasmas foram reveladas sob lâmpadas de ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm, bem como com reagente anisaldeído sulfúrico, seguido de aquecimento.

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

A cromatografia em Coluna de Fase Normal (CC-FN) foi utilizada para a purificação dos produtos brutos. A CC-FN foi desenvolvida utilizando gel de sílica de 100 a 200 Mesh (Sigma Aldrich®) como fase estacionária e misturas de hexano e acetato de etila como fase móvel, de acordo com a polaridade dos analitos.

3.2.3. Cromatografia em Coluna de Permeação em Gel (CC-PG)

Foi usada também a cromatografia de permeação em gel em coluna de Sephadex LH-20 (dextrana hidroxipropilada – Amersham Pharmacia Biotech) como fase normal e etanol como fase móvel. A Cromatografia de Permeação em Gel (GPC), é também conhecida como Cromatografia por Exclusão de Tamanho (SEC) e, é uma técnica que separa moléculas dissolvidas com base no seu tamanho, bombeando-as através de colunas especializadas que contém no seu interior um material microporoso (Sephadex LH-20).

3.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A confirmação das estruturas obtidas foi realizada por meio da análise dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de Hidrogênio (RMN de ^1H) e de Carbono Treze (RMN de ^{13}C) nos espectrômetros Bruker Avance III, de 14,0 Tesla, e de 9,4 Tesla, presentes no Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular (CMIB). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm, tendo como referência o solvente não-deuterado residual. Foram utilizados os solventes acetona deuterada (acetone- d_6) e clorofórmio deuterado (CDCl_3) da Sigma Aldrich®. Para os deslocamentos químicos de hidrogênio (δH) foram indicados a multiplicidade do sinal (s - singleto; sl – singleto largo, d - duplete; dd - duplo duplete; ddd–duploduploduplete; t - tripleto; m - multiplete), e a constante de acoplamento (J) foi medida em Hz.

3.4 Estratégia sintética para obtenção de chalconas *O*-preniladas

A síntese das chalconas foi realizada em duas etapas: (i) reação de *O*-prenilação do seringaldeído (7) e (ii) reação de condensação de Claisen-Schmidt entre seringaldeído *O*-prenilado (8) e respectivos derivados acetofenônicos, sob catálise básica, formando as chalconas *O*-preniladas 9–18.

3.4.1 Reação de *O*-prenilação do seringaldeído

A primeira etapa de síntese das chalconas *O*-preniladas envolveu a *O*-prenilação do seringaldeído, o qual é disponível comercialmente. O seringaldeído foi *O*-alquilado na posição 4 a partir da reação com brometo de isoprenila, sob catálise de carbonato de potássio e acetona como solvente (EPIFANO., et al. 2012).

O seringaldeído (7) (1,0/mmol) foi solubilizado em acetona (10 mL), na sequência foi adicionado em pequenas alíquotas o carbonato de potássio (2,0 mmol). Ao fim da adição do catalisador a reação foi mantida sob agitação por 15 minutos em temperatura ambiente. Após decorrido o tempo, a reação foi colocada em banho de gelo e foi adicionado o brometo de isoprenila (1,2 mmol) sob atmosfera inerte de nitrogênio. O meio reacional foi mantido sob agitação por 24 h em temperatura ambiente. A reação foi monitorada por cromatografia em camada delgada (CCD). Após 24 h, o meio reacional foi diluído com água (20 mL) para a completa dissolução do carbonato de potássio. A solução aquosa foi submetida à extração

líquido-líquido com acetato de etila (3×20 mL). A fração orgânica foi tratada com uma solução saturada de NaCl (5 mL) e com uma solução de K_2CO_3 (10%) para a remoção do siringaldeído residual, purificando assim o composto. Posteriormente, a fase orgânica foi seca com o agente secante sulfato de magnésio, filtrada à simples e concentrada no evaporador rotativo. Foi obtido um óleo amarelo claro.

3.4.2 Reação de Condensação de Claisen-Schmidt

A segunda etapa de síntese envolveu as reações de condensação aldólica de Claisen-Schmidt entre o siringaldeído *O*-prenilado (8) e uma série de derivados acetofenônicos para a obtenção das chalconas *O*-preniladas. A estratégia de síntese adotado foi a descrita por Espinoza-Hicks e colaboradores (2019) para a síntese de chalconas *O*-preniladas. A reação de condensação aldólica de Claisen-Schmidt ocorreu sob catalise básica de hidróxido de sódio e etanol como solvente (ESPINOZA-HICKS., et al. 2019).

3.4.2.1 Preparo das chalconas *O*-preniladas derivadas do siringaldeído 9–18

O siringaldeído *O*-prenilado (1,05 mmol) e os respectivos derivados acetofenônicos (1,00 mmol) foram solubilizados em 20 mL de uma solução de etanol:água (2:1) contendo 6 mmol de hidróxido de sódio. As misturas reacionais foram mantidas sob agitação em temperatura ambiente por cerca de 1 a 4 horas. A formação dos produtos foi monitorada por CCD. Ao término das conversões, o meio reacional foi vertido em gelo de água deionizada e triturado para precipitação dos produtos brutos. Nos casos em que não se observou precipitação, o produto bruto foi submetido à extração líquido-líquido com acetato de etila como contra-fase (3×50 mL). A fase orgânica foi tratada com uma solução saturada de NaCl (5 mL), seca com o agente secante sulfato de magnésio e sendo filtrada à simples. A solução extrativa foi concentrada em evaporador rotativo. Os produtos foram purificados por cromatografia em coluna de fase normal de gel de sílica como fase estacionária e misturas de hexano e acetato de etila (95:5, 9:1, 8:2, e 7:3) como fases móveis. Para algumas substâncias que não foram totalmente purificados por CC- FN, foi utilizada cromatografia em coluna de permeação em gel (Sephadex LH-20), utilizando etanol como fase móvel.

As chalconas O-preniladas tiveram sua estrutura confirmada por análises de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H) e de Carbono Treze (RMN de ^{13}C).

3.5 Bioensaios

Os ensaios biológicos foram realizados pela Profa. Dra. Carolina Colombelli Pacca Mazaro nas dependências da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP-SP).

3.5.1 Cultura celular

Para a realização dos ensaios de citotoxicidade e da avaliação da atividade antiviral foram utilizadas as células Vero E6 (células diploides de rim de Macaco Verde Africano, clone E6), que foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira (Famerp/ São José do Rio Preto), colocados e mantidos em meio Eagle's Minimum Essential (MEM - acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino – SFB – 100U/mL de Penicilina e 100 g/mL de estreptomicina), na temperatura de 37 °C com 5% de CO_2 , para posterior realização dos experimentos (FIGUEIREDO, 1990).

3.5.2 Cultivo Viral

O OROV (tipo Bean 19991) usado neste estudo foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Maurício do laboratório de pesquisas em virologia FAMERP, São José do Rio Preto/SP. O vírus foi propagado nas células C6/36 e titulado em células Vero E6 por meio do ensaio de placas de lise, para o qual utilizou-se meio semi-sólido para assim evitar a formação de placas secundárias, causando assim a infecção apenas das células adjacentes e ficando seguro de que cada placa formada no teste foi proveniente de uma partícula viral infecciosa no inóculo inicial. Diluições seriadas em uma razão de 10 (10^{-2} a 10^{-6}) da suspensão viral oriunda da cultura celular, foram inoculadas nas células previamente aderidas em microplacas de 24 cavidades.

Após uma hora de incubação, o inóculo viral foi retirado para adição de 1mL/cavidade da mistura (v/v) de carboximetilcelulose (CMC) 2% e meio de manutenção concentrado 2×, acrescido de 1% de SFB. As células foram incubadas a 37 °C, 5% de CO_2 e observadas diariamente até o aparecimento do efeito citopático. Depois de cinco dias, a mistura foi

removida e as células vivas fixadas com solução de paraformaldeído a 4%. A solução de cristal violeta de 1% foi colocada para coloração das células e contagem das placas.

3.5.4 Avaliação da citotoxicidade

Avaliou-se a citotoxicidade das substâncias contra as células Vero E6 utilizando o ensaio colorimétrico do MTT (Thiazolyl blue tetrazoliumbromide, Sigma–Aldrich). As monocamadas de células Vero E6 foram aderidas em microplaca de 96 cavidades e submetidas a diferentes concentrações das substâncias por 5 dias à temperatura de 37 °C com 5% CO₂. Posteriormente à incubação, o sobrenadante foi retirado para adição de 50 µL de meio de cultura acrescido de MTT (1 mg/mL). Após isso, as placas foram incubadas a 37 °C com 5% de CO₂ no período de 1 hora. Depois desse período, o sobrenadante foi removido e adicionou-se 100 µL de DMSO (Synth) para a solubilização dos cristais de formazan. A placa foi agitada por 10 minutos e realizou-se a leitura no espectrofotômetro a LT-4000 Microplatereader (LabTech) a 540 nm. A concentração necessária de cada substância para diminuir a 50% da viabilidade celular (CC₅₀) foi calculada a partir da comparação com as células que não foram tratadas (SCHROTEROVA et al., 2009).

3.5.5 Avaliação da inibição da replicação viral

Avaliou-se a inibição da atividade antiviral, através do tratamento simultâneo em microplacas pelo ensaio de viabilidade MTT. Para isso 96 poços foram plaqueados com 100 µL de suspensão celular VERO E6 ($1,8 \times 10^5$ células/mL) por cavidade e incubada por 24 horas até confluência. Após essa etapa realizou-se diluições seriadas de amostras preparadas em meio L15 + 1% de ATB. Foi utilizado 0,1 MOI tanto no experimento com o OROV, como nos testes com MAYV. A placa foi incubada por 4 dias e monitorada diariamente. Passado esse tempo o meio foi aspirado cuidadosamente, e cada cavidade foi tratada com 50 µL de MTT (1 mg/mL). Após a adição do MTT a placa foi encubada por 4 horas na temperatura de 37 °C. Depois, 100 µL de DMSO foram adicionados a cada cavidade e a placa foi agitada por 10 minutos em um agitador automático e submetida a avaliação espectrofotométrica a 495nm.

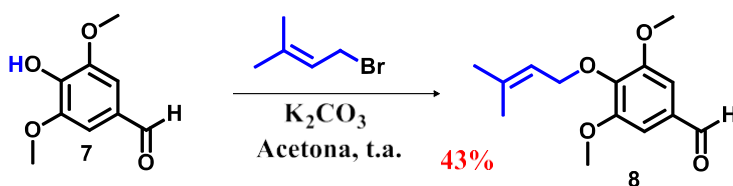
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Síntese das chalconas *O*-preniladas

A síntese das chalconas *O*-preniladas foi realizada em duas etapas sintéticas (Esquema 2). A primeira etapa reacional envolveu o seringaldeído e o brometo de isoprenila sob catálise de carbonato de potássio em acetona como solvente. Essa etapa reacional produz o intermediário seringaldeído *O*-prenilado (8) com características oleosas e rendimento de 43%. Na segunda etapa reacional ocorre a condensação aldólica de Claisen-Schmidt entre 8 e uma série de derivados acetofenônicos sob catálise básica de NaOH e etanol como solvente. Os rendimentos da segunda etapa reacional para a obtenção das chalconas *O*-preniladas 9–18 foram entre 24 a 39%. Os rendimentos para a segunda etapa de síntese estão sumarizados na Tabela 1, bem como os rendimentos globais para a obtenção de cada análogo chalcônico *O*-prenilado. Os rendimentos globais ficaram entre 10 a 17%. O destaque foi para a substância 13 que apresentou os maiores rendimentos, tanto na etapa 2 de condensação (39%) quanto no rendimento global (17%), e as substâncias 10 e 11 com rendimentos mais baixos para a série de chalconas *O*-preniladas, sendo que ambas possuíram os mesmos valores de rendimentos na etapa 2 de condensação (24%) e rendimentos globais (10%).

Esquema 1. Rendimentos da rota sintética de chalconas *O*-preniladas

Etapa 1. *O*-prenilação do seringaldeído:



Etapa 2. Condensação aldólica de Claisen-Schmidt:

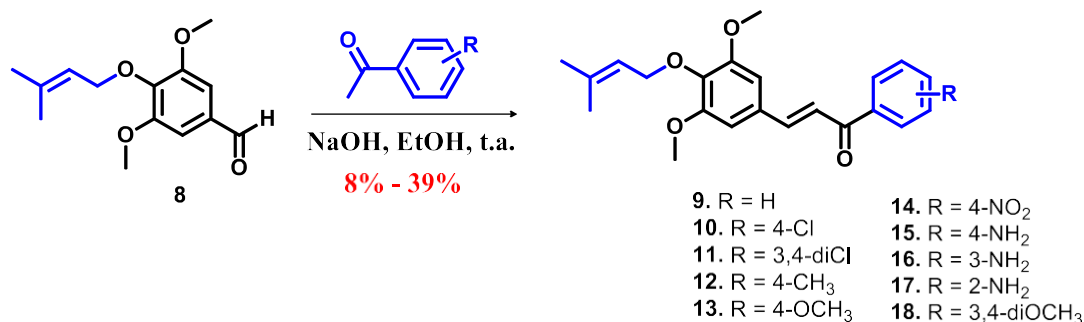
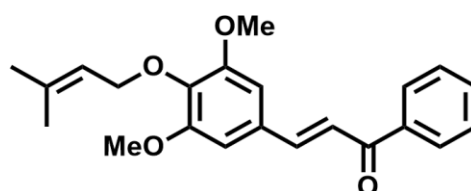


Tabela 1. Rendimentos da (etapa 2 e globais) para a síntese das chalconas *O*-preniladas

Chalcona	R	Rendimento Etapa 2 (%)	Rendimento Global (%)
9	H	25	11
10	4-Cl	24	10
11	3,4-diCl	24	10
12	4-CH ₃	31	13
13	4-OCH ₃	39	17
14	4-NO ₂	35	15
15	4-NH ₂	28	12
16	3-NH ₂	35	15
17	2-NH ₂	14	6
18	3,4-diOCH ₃	8	3

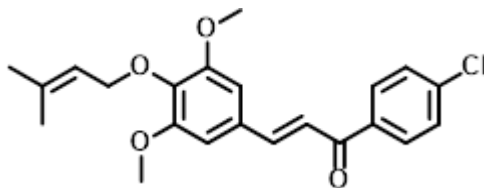
As chalconas *O*-preniladas 9–18 são substâncias inéditas na literatura e seus dados de RMN de ¹H foram descritos, incluindo deslocamento químico (δ H), multiplicidade, integração e constante de acoplamento. Dentre os sinais característicos da formação de chalconas, destaca-se o par de dubletos com *J* de aproximadamente 15,6 Hz, que foram atribuídos ao par de hidrogênios α e β *trans*-posicionados, característicos da ponte cetônica α , β -insaturada, que une os anéis A e B.

4.1.1 Dados de RMN de ¹H da chalcona 9



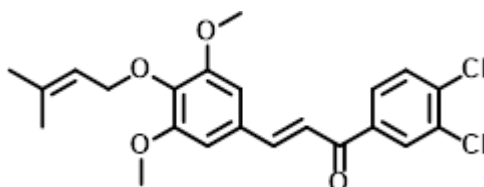
RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃): H (ppm), 8,02 (*d*, 2H, H₂ e H₆, *J* = 7,2 Hz), 7,73 (*d*, 1H, H β , *J* = 15,6 Hz), 7,60 (*t*, 1H, H₄, *J* = 7,2 Hz), 7,52 (*t*, 2H, H₃ e H₅, *J* = 7,2 Hz), 7,41 (*d*, 1H, H α , *J* = 15,6 Hz), 6,86 (*s*, 2H, H₂' e H₆'), 5,58–5,54 (*m*, 1H, H₂''), 4,56 (*d*, 2H, H₁'', *J* = 7,2 Hz), 3,91 (*s*, 6H, 3'-OCH₃ e 5'-OCH₃), 1,75 (*s*, 3H, H₄''), 1,67 (*s*, 3H, H₅'').

4.1.2 Dados de RMN de ^1H da chalcona 10



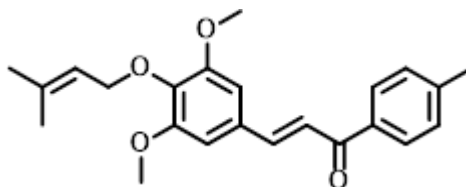
RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6): H (ppm), 8,17 (*d*, 2H, H3 e H5, $J = 8,4$ Hz), 7,86 (*d*, 1H, H β , $J = 15,6$ Hz), 7,70 (*d*, 1H, H α , $J = 15,0$ Hz), 7,63 (*d*, 2H, H2 e H6, $J = 8,4$ Hz), 7,21 (*s*, 2H, H2' e H6'), 5,41 (*t*, 1H, H2'', $J = 7,2$ Hz), 4,43 (*d*, 2H, H1'', $J = 7,2$ Hz), 3,85 (*s*, 6H, 3'-OCH3 e 5'-OCH3), 1,68 (*s*, 3H, H4''), 1,60 (*s*, 3H, H5'').

4.1.3 Dados de RMN de ^1H da chalcona 11



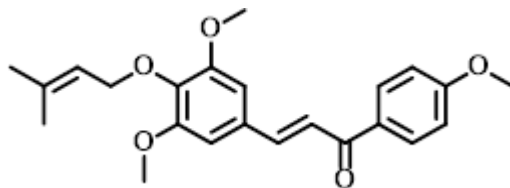
RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6): H (ppm), 8,33 (*d*, 1H, H2, $J = 1,9$ Hz), 8,12 (*dd*, 1H, H6, $J = 8,4$ Hz, $J = 1,9$ Hz), 7,86 (*d*, 1H, H β , $J = 15,5$ Hz), 7,84 (*d*, 1H, H5, $J = 8,4$ Hz), 7,73 (*d*, 1H, H α , $J = 15,5$ Hz), 7,23 (*s*, 2H, H2' e H6'), 5,41 (*t*, 1H, H2'', $J = 7,02$ Hz), 4,44 (*d*, 2H, H1'', $J = 7,08$ Hz), 3,85 (*s*, 6H, 3'-OCH3 e 5'-OCH3), 1,69 (*s*, 3H, H4''), 1,60 (*s*, 3H, H5'').

4.1.4 Dados de RMN de ^1H da chalcona 12



RMN ^1H (600 MHz, CDCl $_3$): H (ppm), 7,93 (*d*, 2H, H2 e H6, $J = 8,4$ Hz), 7,72 (*d*, 1H, H β , $J = 15,6$ Hz), 7,41 (*d*, 1H, H α , $J = 15,0$ Hz), 7,31 (*d*, 2H, H3 e H5, $J = 8,4$ Hz), 7,12 (*s*, 2H, H2' e H6'), 5,58–5,54 (*m*, 1H, H2''), 4,55 (*d*, 2H, H1'', $J = 7,2$ Hz), 3,91 (*s*, 6H, 3'-OCH3 e 5'-OCH3), 2,10 (*s*, 3H, 4-CH3), 1,74 (*s*, 3H, H4''), 1,67 (*s*, 3H, H5'').

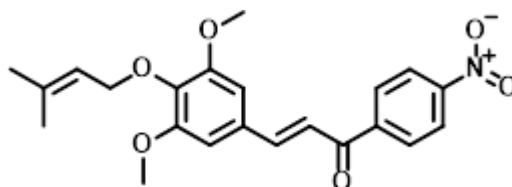
4.1.5 Dados de RMN de ^1H da chalcona 13



A substância foi sintetizada, porém não foi possível obter a purificação.

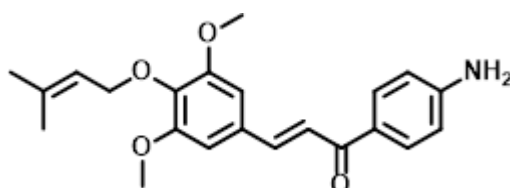
RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6): H (ppm), 8,33 (*d*, 1H, H2, $J = 1,9$ Hz), 8,12 (*dd*, 1H, H6, $J = 8,4$ Hz, $J = 1,9$ Hz), 7,86 (*d*, 1H, H β , $J = 15,5$ Hz), 7,84 (*d*, 1H, H5, $J = 8,4$ Hz), 7,73 (*d*, 1H, H α , $J = 15,5$ Hz), 7,23 (*s*, 2H, H2' e H6'), 5,41 (*t*, 1H, H2'', $J = 7,02$ Hz), 4,44 (*d*, 2H, H1'', $J = 7,08$ Hz), 3,87 (*s*, 3H, 4-OCH3), 3,85 (*s*, 6H, 3'-OCH3 e 5'-OCH3), 1,69 (*s*, 3H, H4''), 1,60 (*s*, 3H, H5'').

4.1.6 Dados de RMN de ^1H da chalcona 14



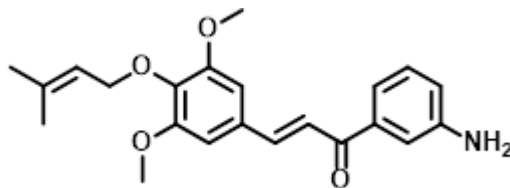
RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6): H (ppm), 8,38 (*d*, 2H, H3 e H5, $J = 9,0$ Hz), 8,34 (*d*, 2H, H2 e H6, $J = 9,0$ Hz), 7,86 (*d*, 1H, H β , $J = 15,6$ Hz), 7,74 (*d*, 1H, H α , $J = 15,6$ Hz), 7,23 (*s*, 2H, H2' e H6'), 5,41 (*t*, 1H, H2'', $J = 7,2$ Hz), 4,44 (*d*, 2H, H1'', $J = 7,2$ Hz), 3,85 (*s*, 6H, 3'-OCH3 e 5'-OCH3), 1,68 (*s*, 3H, H4''), 1,60 (*s*, 3H, H5'').

4.1.7 Dados de RMN de ^1H da chalcona 15



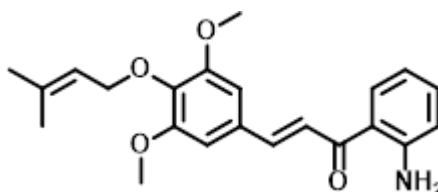
A substância foi sintetizada, porém não foi possível obter a purificação.

4.1.8 Dados de RMN de ^1H da chalcona 16



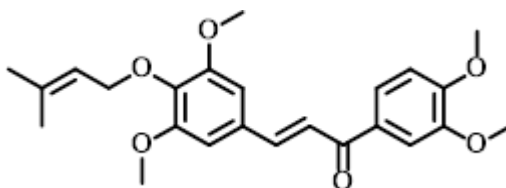
A substância foi sintetizada, porém não foi possível obter a purificação.

4.1.9 Dados de RMN de ^1H da chalcona 17



RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3): H (ppm), 7,87 (*dd*, 1H, H₃, $J = 7,2$ Hz, $J = 1,2$ Hz), 7,66 (*d*, 1H, H β , $J = 15,6$ Hz), 7,49 (*d*, 1H, H α , $J = 15,6$ Hz), 7,32–7,29 (*m*, 1H, H₆), 6,84 (*s*, 2H, H_{2'} e H_{6'}), 6,73–6,70 (*m*, 2H, H₄ e H₅), 5,57 (*t*, 1H, H_{2''}, $J = 7,2$ Hz), 4,55 (*d*, 2H, H_{1''}, $J = 7,2$ Hz), 3,92 (*s*, 6H, 3'-OCH₃ e 5'-OCH₃), 1,76 (*s*, 3H, H_{4''}), 1,68 (*s*, 3H, H_{5''}).

4.1.10 Dados de RMN de ^1H da chalcona 18



RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3): H (ppm), 7,71 (*d*, 1H, H β , $J = 15,6$ Hz), 7,66 (*dd*, 1H, H₆, $J = 7,8$ Hz, $J = 1,2$ Hz), 7,53 (*d*, 1H, H₂, $J = 1,2$ Hz), 7,37 (*d*, 1H, H α , $J = 15,6$ Hz), 6,91 (*d*, 1H, H₅, $J = 8,4$ Hz), 6,85 (*s*, 2H, H_{2'} e H_{6'}), 6,08 (*s*, 3H, -OCH₃), 5,57 (*t*, 1H, H_{2''}, $J = 7,2$ Hz), 4,56 (*d*, 2H, H_{1''}, $J = 7,2$ Hz), 3,91 (*s*, 6H, 3'-OCH₃ e 5'-OCH₃), 1,75 (*s*, 3H, H_{4''}), 1,68 (*s*, 3H, H_{5''}).

4.2 Avaliação da atividade antiviral das chalconas *O*-preniladas

Sete chalconas *O*-preniladas (9-12, 14, 17 e 18) e o seringaldeído (7) foram submetidos aos ensaios de citotoxicidade e atividade antiviral contra OROV e MAYV (Figuras 15 e 16). As substâncias foram avaliadas em concentrações que variaram de 2,4 μ M a 300 μ M.

Os ensaios de toxicidade contra células Vero E6 indicam que as chalcona *O*-preniladas causaram baixas porcentagem de viabilidade celular, principalmente quando ensaiadas nas concentrações de 18,7 μ M a 300,0 μ M. Contudo, o seringaldeído *O*-prenilado (10) provocou maior viabilidade celular quando comparado às chalconas, evidenciando que a estrutura geral chalcônica possui toxicidade intrínseca. Nas concentrações mais baixas (2,4 μ M e 4,7 μ M) foi observado maior viabilidade celular, o que permitiu avançar nas observações da inibição da replicação viral de OROV e MAYV.

Figura 1-8. Avaliação da citotoxicidade e atividade antiviral contra o OROV das chalconas *O*-preniladas

Chalcona (9)

RL-01 ORO, RL-01 MAY

Chalcona (11)

RL-02 ORO, RL-02 MAY

Chalcona (10)

RL-03 ORO, RL-03 MAY

Chalcona (12)

RL-04 ORO, RL 04 MAY

Chalcona (14)

RL-05 ORO, RL-05 MAY

Chalcona (17)

RL-06 ORO, RL-06 MAY

Chalcona (18)

RL- 07 ORO, RL-07 MAY

Aldeído *O*-geranilado (7)

RL-08 ORO, RL-08 MAY

Figura 1.

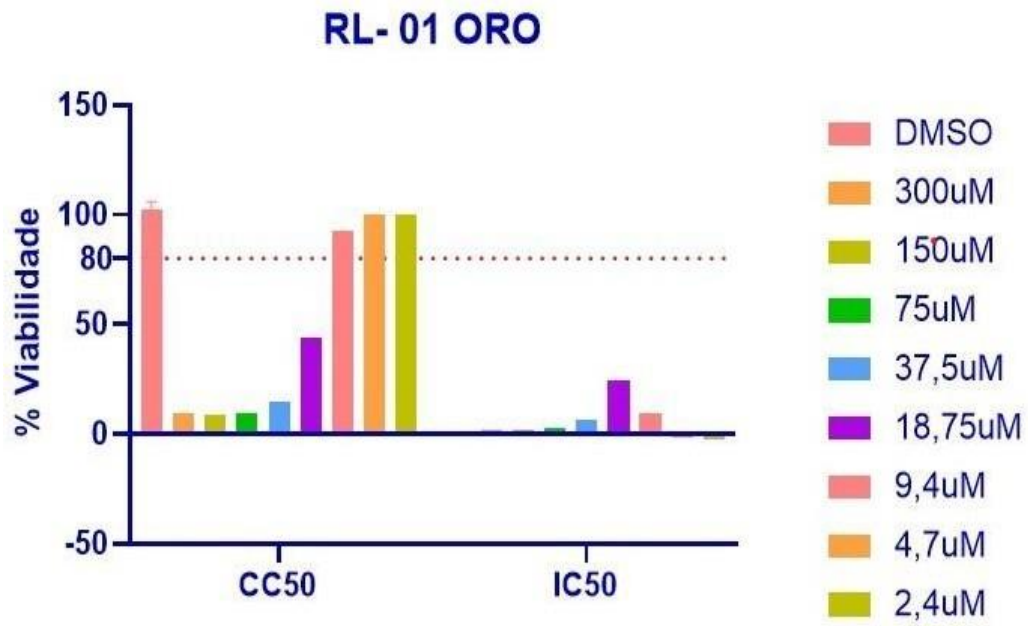


Figura 2.

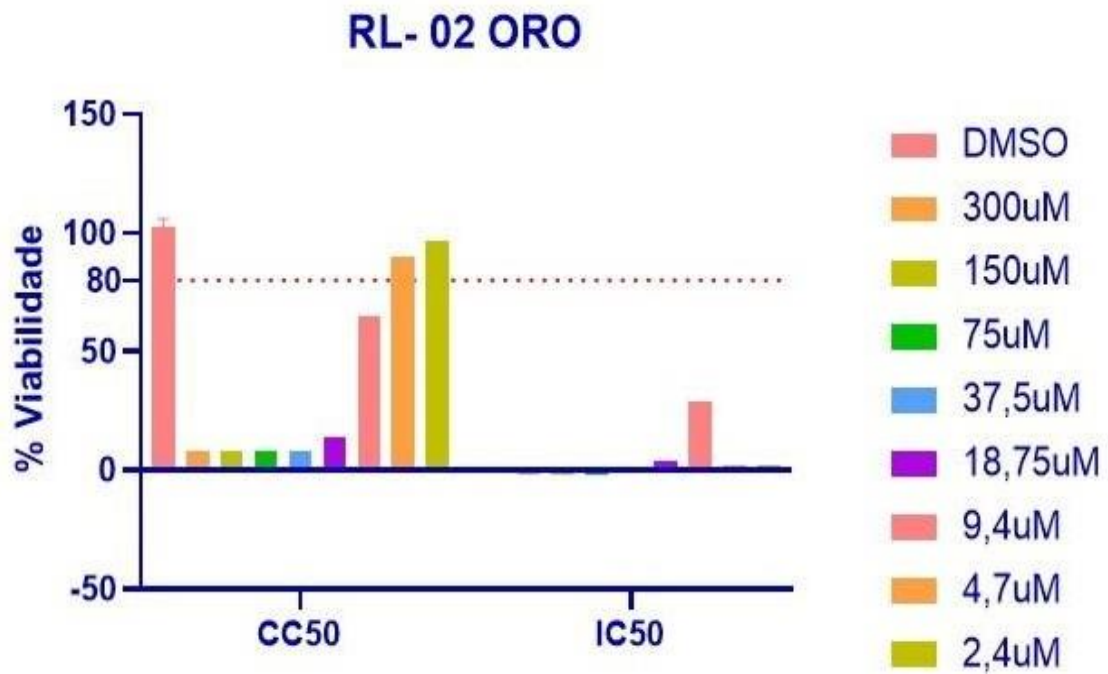


Figura 3.

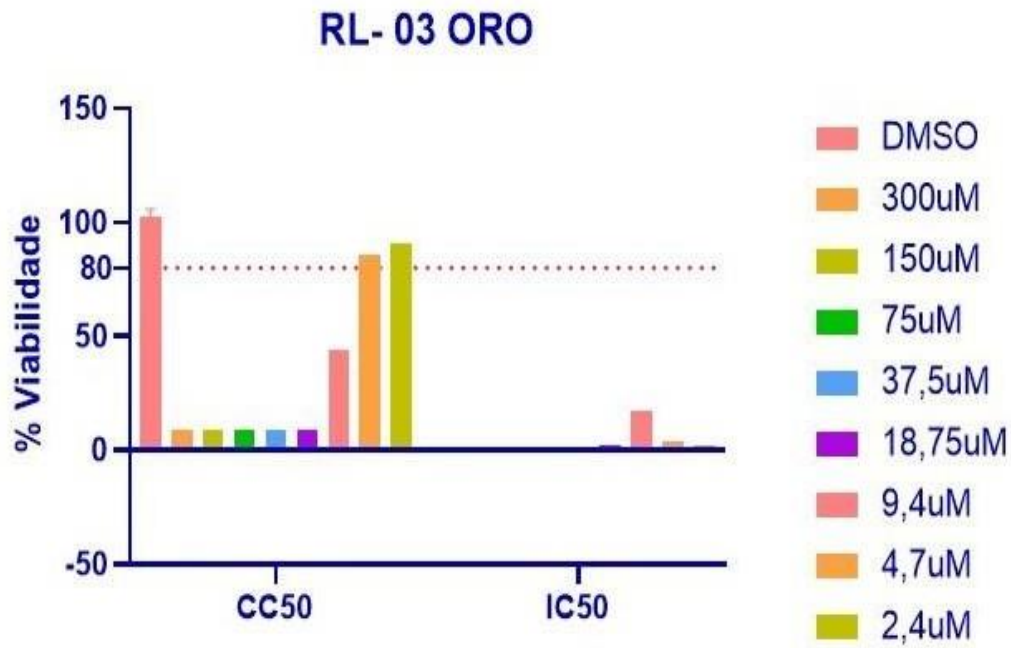


Figura 4.

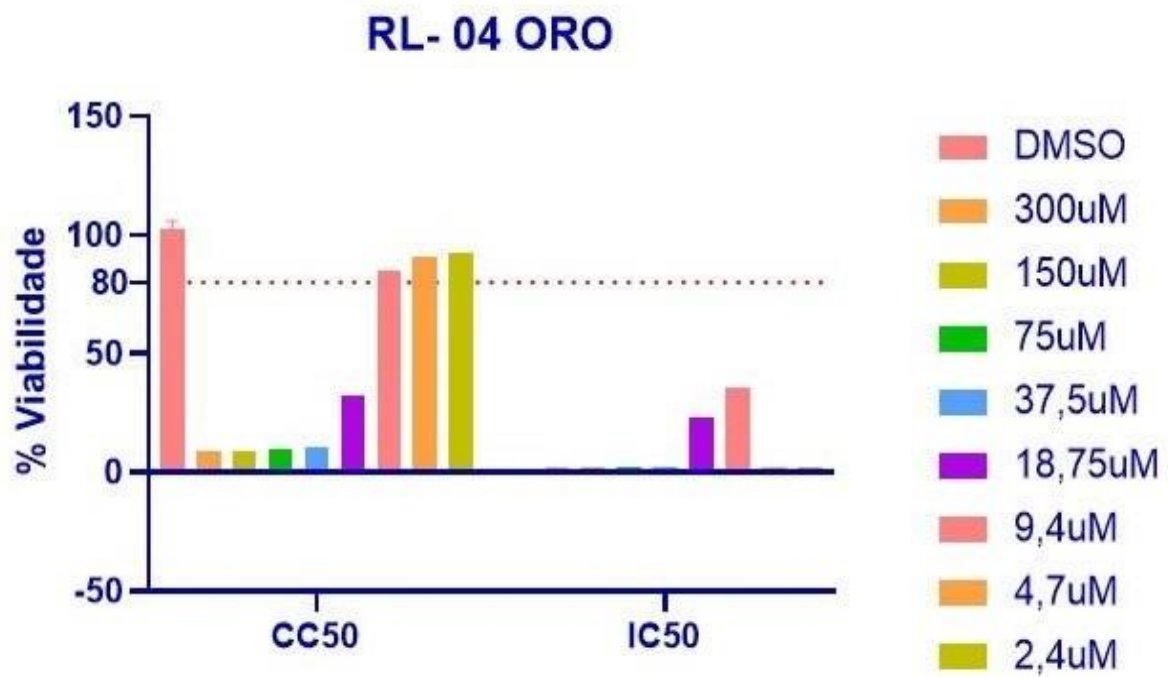


Figura 5.

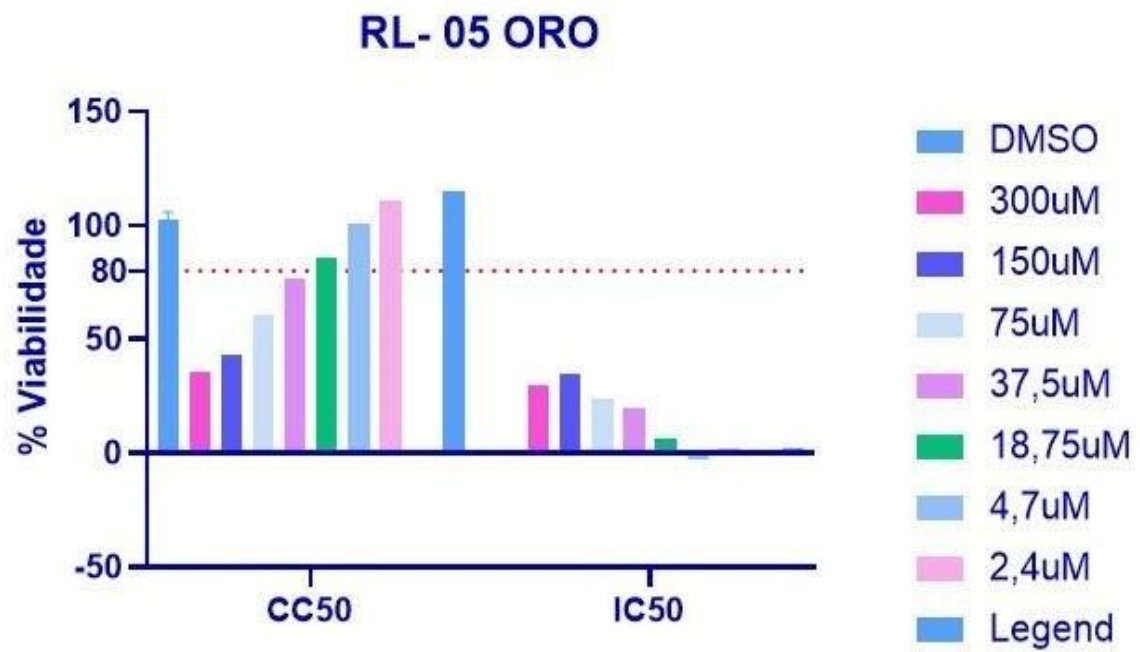


Figura 6.

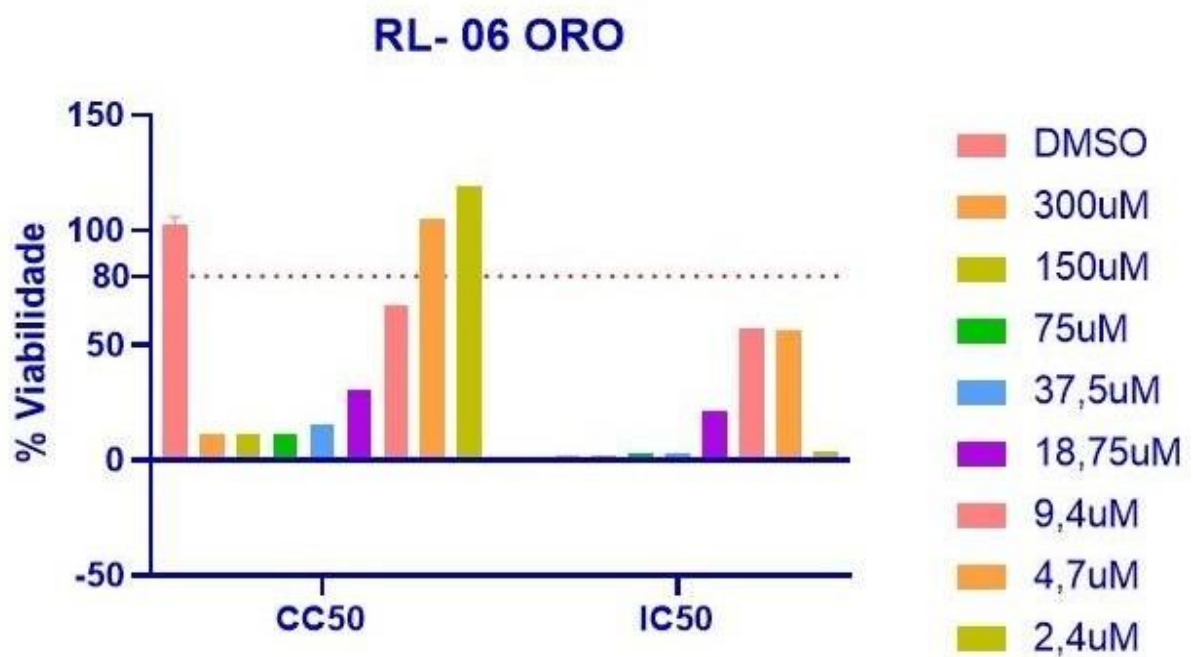


Figura 7.

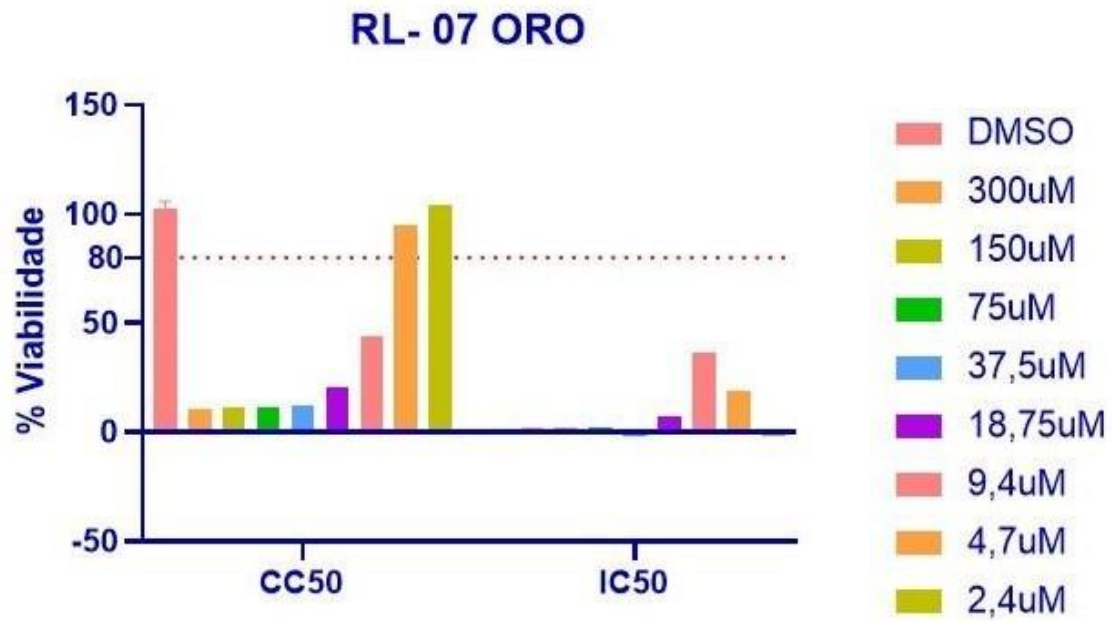


Figura 8.

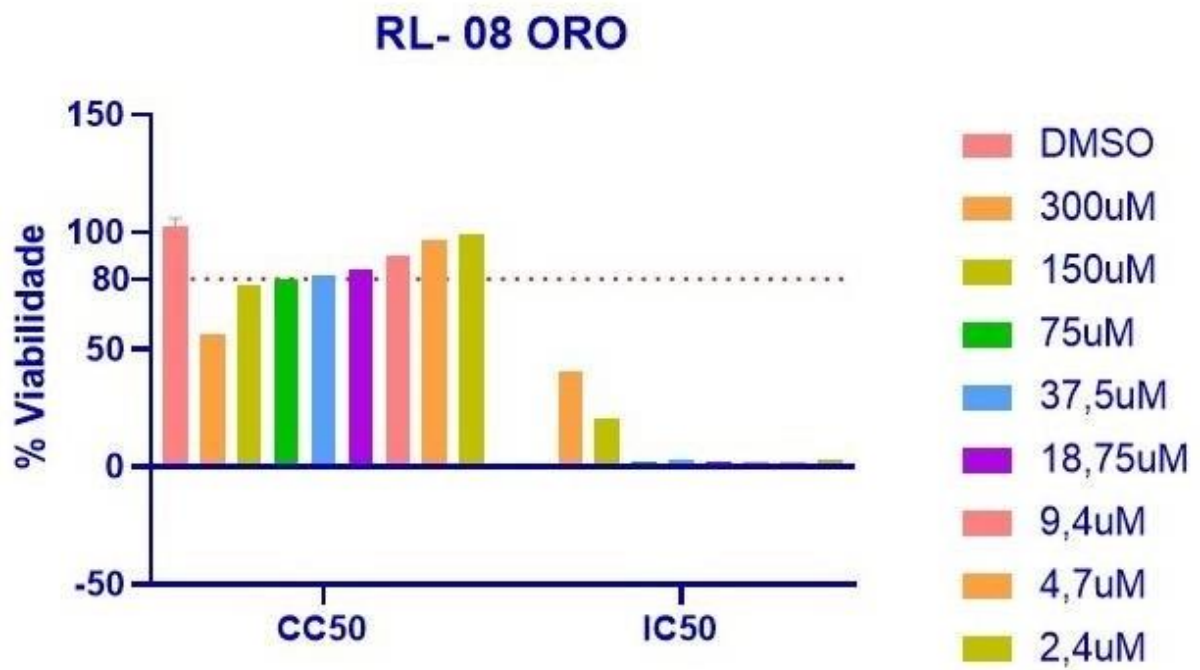


Figura 1-8. Ensaios de citotoxicidade e atividade antiviral contra o MAYV das chalconasO-preniladas

Figura 1.

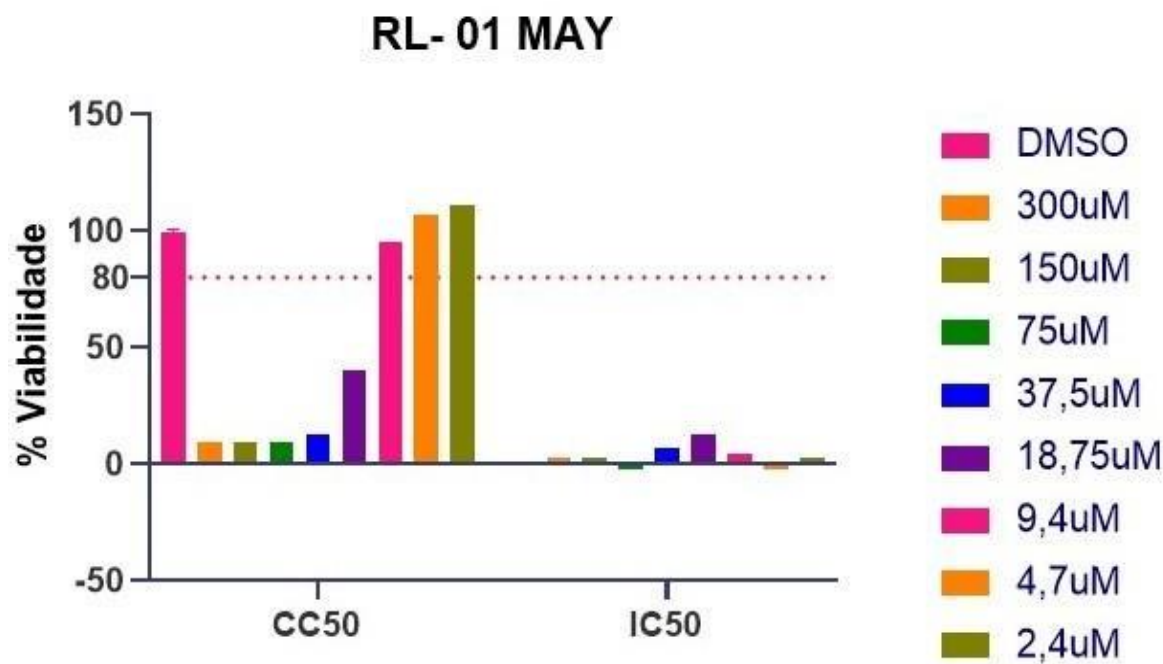


Figura 2

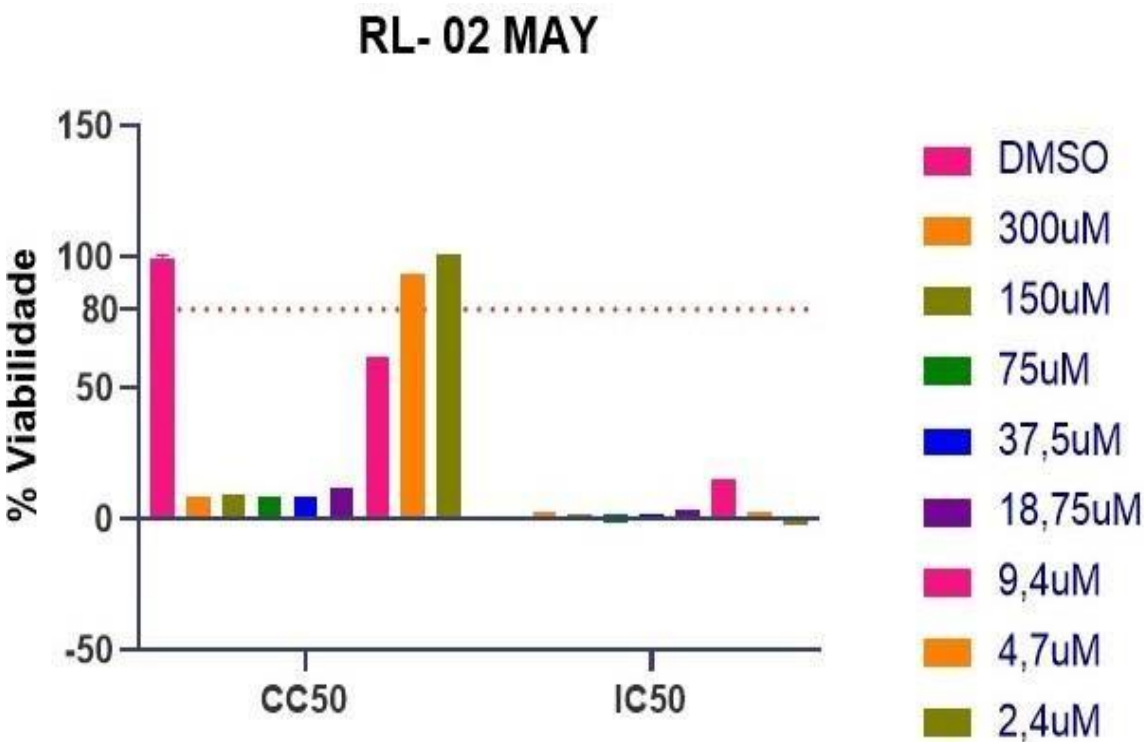


Figura 3.

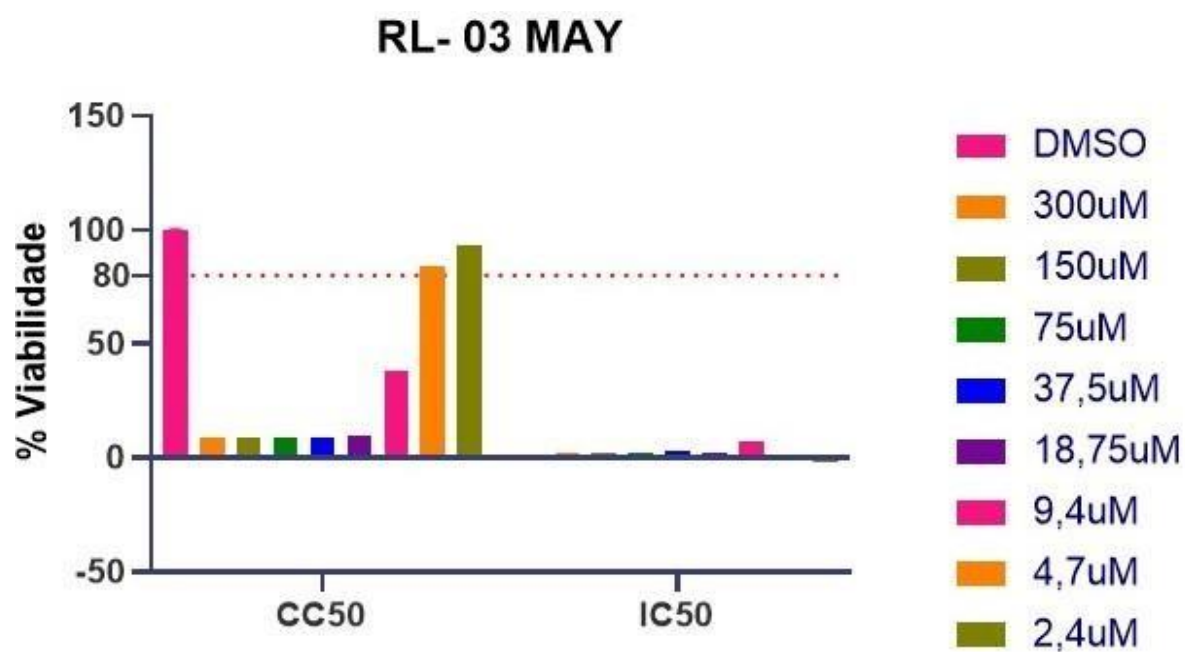


Figura 4

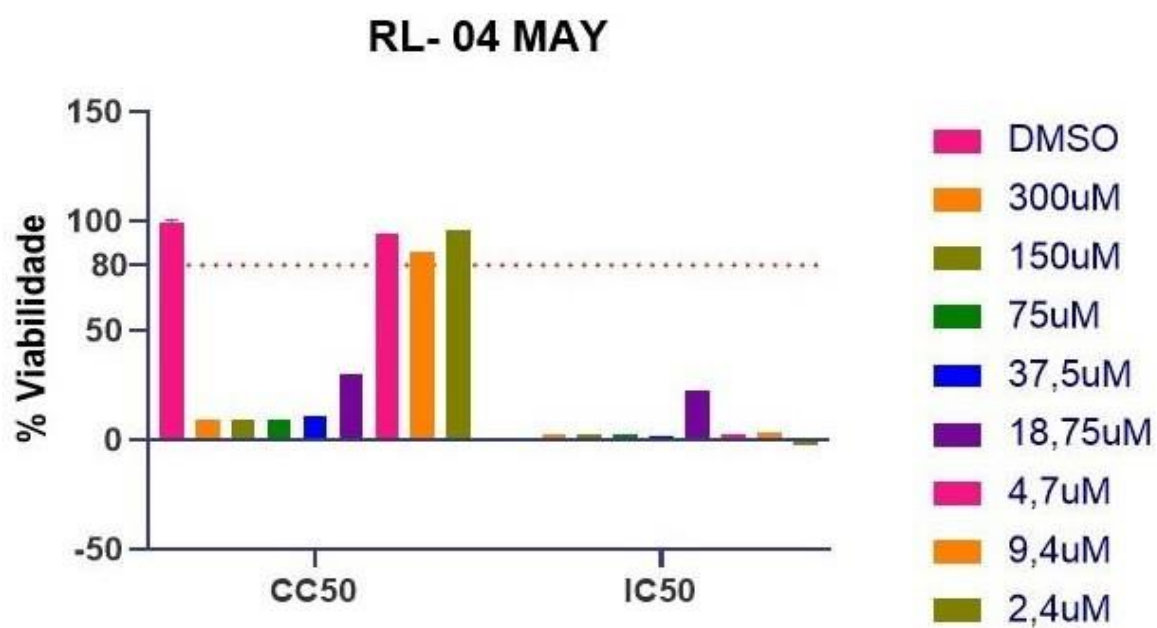


Figura 5.

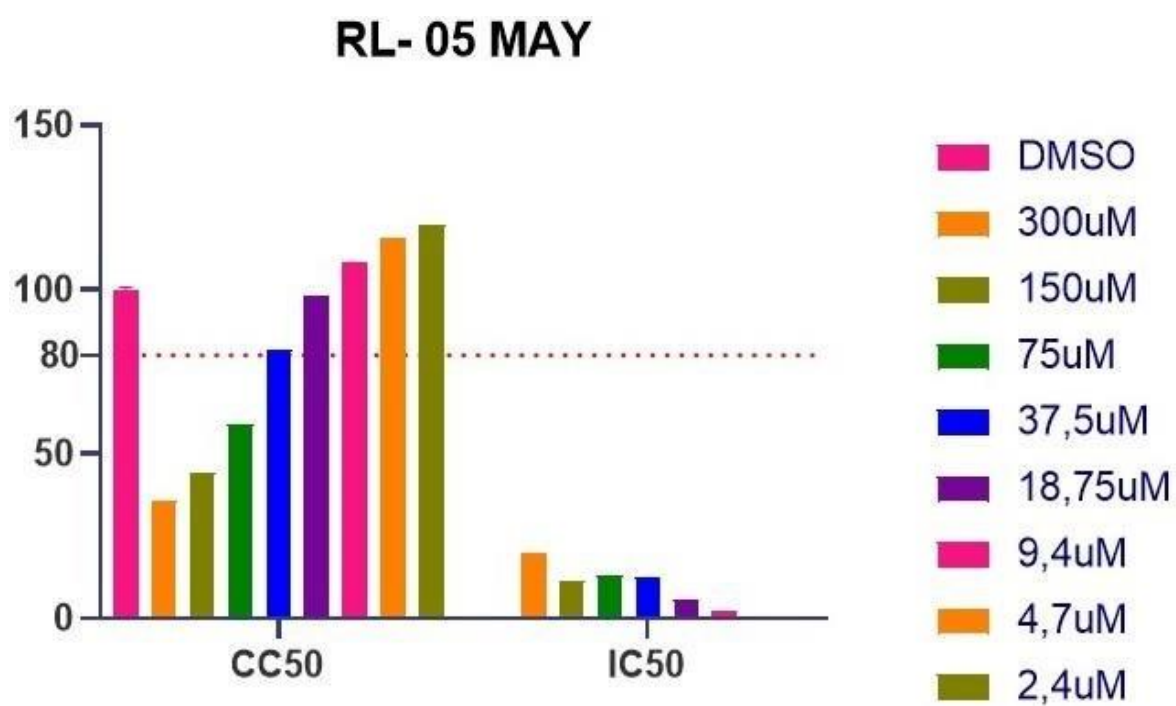


Figura 6.

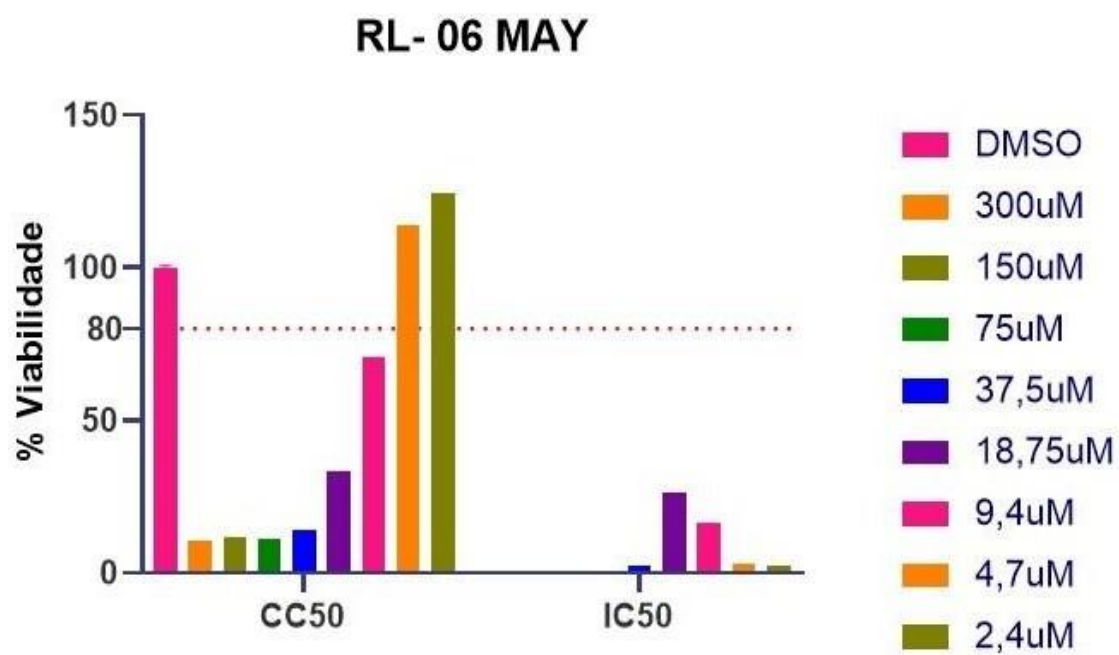


Figura 7.

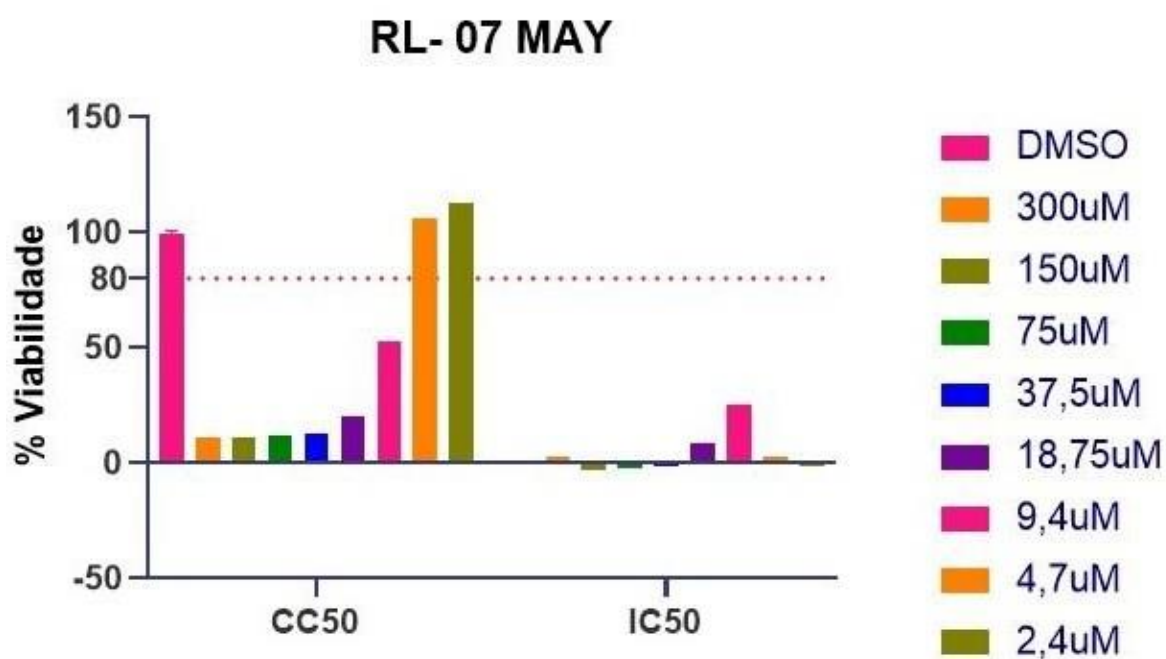
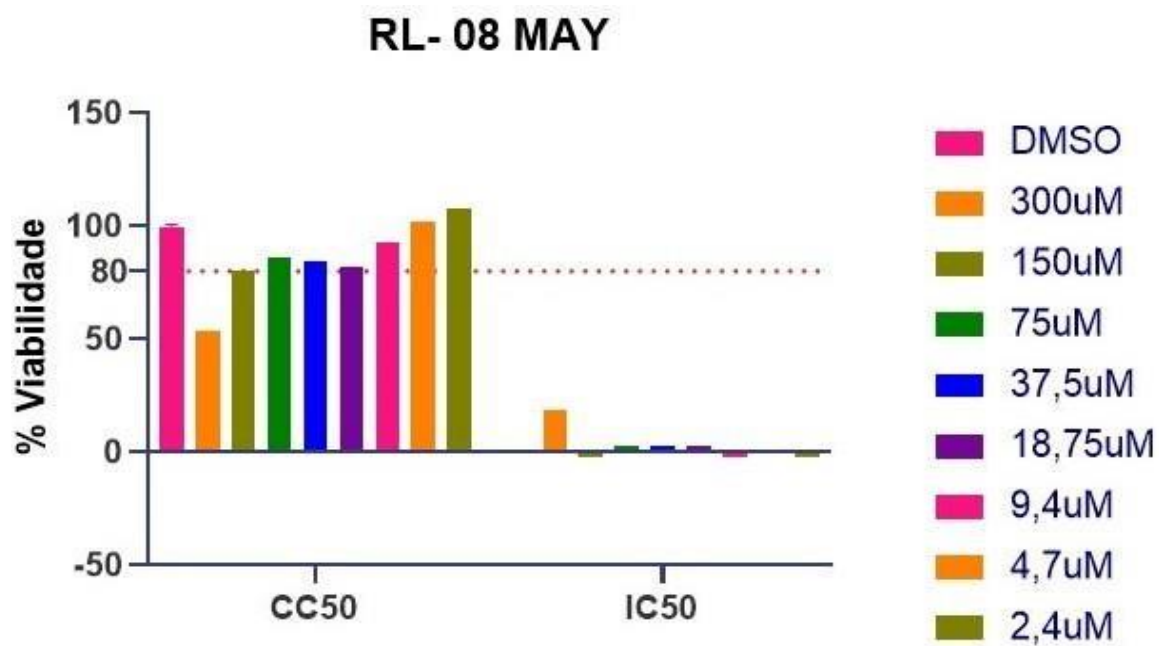


Figura 8.



4. CONCLUSÕES

A rota sintética adotada para as chalconas *O*-preniladas, envolvendo duas etapas, se demonstrou eficiente com rendimentos globais dos produtos isolados, variando de 3% a 17%. As técnicas de separação envolvendo cromatografia em coluna de fase normal e de permeação em gel permitiram isolar as chalconas *O*-preniladas com pureza e quantidades adequadas para os ensaios de citotoxicidade e antiviral. Sete chalconas *O*-preniladas demonstraram toxicidade contra células Vero E6 na maioria das concentrações testadas e ausente ou fraca inibição da replicação de OROV e MAYV.

5. REFERÊNCIAS

- ABAD-FRANCH, F.; GRIMMER, G. H.; PAULA, V. S.; FIGUEIREDO, L. T. M.; BRAGA, W. S. M.; LUZ, S. L. B. Mayaro Virus Infection in Amazonia: A Multimodel Inference Approach to Risk Factor Assessment. **Neglected Tropical Diseases**, v. 6, p. 1-9, 2012.
- ACRANI, G. O.; GOMES, R.; PROENCA-MÓDENA, J. L.; SILVA, A. F.; CARMINATI, P. O.; SILVA, M.-L.; MARQUES, R. I.; ARRUDA, S. E. Apoptosis induced by Oropouche vírus infection in HeLa cells is dependente on vírus protein expression. **VirusResearch**, v. 149, p. 56–63, 2010.
- ACRANI, G. O.; TILSTON-LUNEL, N. L.; SPIEGEL, M.; WEIDMANN, M.; DILCHER, M.; DA SILVA, D. E. A.; NUNES, M. R.T.; ELLIOTT, R. M. Establishment of a minigenome system for Oropouche virus reveals the S genome segment to be significantly longer than reported previously. **Journal General Virology**, v. 96, p. 513–523, 2015.
- ALENCAR, J.; PACHECO, J. B.; CORREA, F. F.; SILVA, J. S.; GUIMARÃES, A. E.; New report on the bionomics of *Coquillettidia venezuelensis* in temporary breeding sites (Diptera: Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p. 247-248, 2011.
- ANDERSON, C. R.; DOWNS, W. G.; WATTLEY, G.H.; AHIN, N. W.; REESE, A. A.; Mayaro virus: a new human disease agent. II. Isolation from blood of patients in Trinidad. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 6, p.1012–1016, 1957.
- ANDERSON, C. R.; SPENCE, L.; DOWNS, W. G.; AITKEN, T. H. Oropouchevirus: a new human disease agent from Trinidad, West Indies. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 10, p. 574-578, 1961.
- ANDRADE, J. T.; SANTOS, F. R. S.; LIMA, W. G.; SOUSA, C. D. F.; OLIVEIRA, L. S. F. M.; RIBEIRO, R. I. M. A.; GOMES, A. J. P. S.; ARAÚJO, M. G. F.; VILLAR, J. A. F. P.; FERREIRA, J. M. S. Design, synthesis, biological activity and structure-activity relationship studies of chalcone derivatives as potential anti-Candida agents. **The Journal of Antibiotics**, v.71, p. 702-712, 2018.
- AQUINO, V. H.; FIGUEIREDO, L. T. M. Linear amplification followed by single primer polymerase chain reaction to amplify unknown DNA fragments: complete nucleotide sequence of Oropouche virus M RNA segment. **Journal of Virological Methods**, v.115, p. 51-57, 2004.
- ARAÚJO, R.; DIAS, L. B.; ARAÚJO, M. T.; PINHEIRO, F.; OLIVA, O. F. Ultrastructural changes in the hamster liver after experimental inoculation with Oropouche arbovirus (type BeAn 19991). **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 20, p. 45-54, 1978.
- AVRAM, S. I.; CRISAN, L.; PACURENAU, L. M.; BORA, A.; SECLAMAN, E.; BALINT, M.; KURUNCZI L. G. Challenges in docking 2'-hydroxy and 2',4'-dihydroxychalcones. **Medicinal Chemistry Research.**, v. 22, p. 3589-3605, 2013.

AZEVEDO, R. S. S.; SILVA, E. V. P.; CARVALHO, V. L.; RODRIGUES, S. G.; NETO, J. P. N.; MONTEIRO, H. A. O.; PEIXOTO, V. S.; CHIANG, J. O.; NUNES, M. R. T.; VASCONCELOS, P. F. C. Mayaro Fever Virus, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases.**, v. 15, p. 1830-1832, 2009.

BRIOLANT, S.; GARIN, D.; SCARAMOZZINO, N.; JOUAN, A.; CRANCE, J. M. *In vitro* inhibition of chikungunya and Semliki Forest viruses replication by antiviral compounds: synergistic effect of interferon-alpha and ribavirin combination. **Antiviral Research.**, v.61, p. 111–117 2004.

BRONZONI, R. V.; MORELI, M. L.; CRUZ, A. C.; FIGUEIREDO, L. T. Multiplex nested PCR for Brazilian alphavirus diagnosis. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene.**, v. 98. p. 456- 461, 2004.

CARDOSO, J. C.; ALMEIDA, M. A. B.; SANTOS, E.; FONSECA, D. F.; SALLUM, M. A. M.; NOLL, C. A.; MONTEIRO, H. A. O.; CRUZ, A. C. R.; CARVALHO, V. L.; PINTO, E. V.; CASTRO, F. C.; NETO, J. P. N.; SEGURA, M. N. O.; VASCONCELOS, P. F. C. Yellow fever virus. In.: *Haemagogus leucocelaenus* and *Aedes serratus* mosquitoes. **Emerging Infectious Diseases**, v.16, p. 1918-1924, 2010.

CARPENTER, S.; GROSCHUP, M.H.; GARROS, C.; FELIPPE-BAUER, M.L.; PURSE, B.V. *Culicoides* biting midges, arboviruses and public health in Europe. **Antiviral Research**, v. 100, p. 102– 113, 2013.

CHEN, Z.; LANG, D. The effectiveness of disease management interventions on health-related quality of life of patients with established arthritogenic alphavirus infections: a systematic review protocol. **Rev. Implement. Rep.**, v. 11, p. 56-72, 2013.

CRUZ, A. C. R.; PRAZERES, A. S. C.; GAMA, E. C.; LIMA, M. F.; AZEVEDO, R. S. L.; CASSEB, L. M. N.; NETO, J. P. N.; MARTINS, L. C.; CHIANG, J. O.; RODRIGUES, S. G.; VASCONCELOS, P. F. C. Serological survey to arboviruses in Juruti, Pará State, Brazil. **Cadernos de Saude Pública.**, v. 25, p. 2517-2523, 2009.

CULQUICHICÓN, C.; CARDONA-OSPINA, J.A.; PATIÑO-BARBOSA, A.M.; RODRIGUEZ-MORALES, A. J. Bibliometric analysis of Oropouche research: Impact on the surveillance of emerging arboviruses in Latin America. **F1000 Research**, v. 6, p. 194, 2017.

DE FIGUEIREDO, M. L.; FIGUEIREDO, L. T. Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.**, v. 47, p. 677-683, 2014.

DENG, J.; KELLEY, J. A.; BARCHI, J. J.; SANCHEZ, T.; DAYAM, R.; POMMIER, Y.; NEAMATIA, N. Mining the NCI antiviral compounds for HIV-1 integrase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry.**, v. 14, p. 3785-3792, 2006.

DE THOISY B, GARDON J, SALAS RA, MORVAN J, KAZANJI M. Mayaro virus in wild mammals, French Guiana. **Emerging Infectious Diseases.**, v. 9, p. 1326–9, 2003.

DE SOUZA LUNA, L.K.; RODRIGUES, A.H.; SANTOS, R.I.; SESTI-COSTA, R.; CRIADO, M.F.; MARTINS, R.B.; SILVA, M.L.; DELCARO, L.S.; PROENCA-MODENA, J.L.;

FIGUEIREDO, L.T.M.; ET AL. Oropouche virus is detected in peripheral blood leukocytes from patients. **Journal of Medical Virology**, v. 89, p. 1108–1111, 2017.

DIETZGEN, R. G.; CALISHER, C.H.; KURATH, G.; KUZMAN, I. V.; RODRIGUEZ, L. L.; STONE, D. M.; TESH, R. B.; TORDO, N.; WALKER, P. J.; WETZEL, T.; WHITFIELD, A. E. **Virus Taxonomy**. King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ, eds. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego, CA: Elsevier, 654–681, 2012.

DUTRA, H.L.; CARAGATA, E.P.; MOREIRA, L.A. The re-emerging arboviral threat: Hidden, enemies: The emergence of obscure arboviral diseases, and the potential use of *Wolbachia* in their control. **Bioessays**, v. 39, p. 1600175, 2017.

ELLIOTT, R.; BLAKQORI, G. **Molecular Biology of Orthobunyaviruses. In Bunyaviridae: Molecular and Cellular Biology**. Eds.; Caister Academic Press: Norfolk, UK. p. 1–39, 2011.

EPIFANO, F.; GENOVESE, S.; SQUIRES, E. J.; GRAY, M. A. NELUMAL A, the active principle from *Ligularia nelumbifolia*, is a novel farnesoid X receptor agonist. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, p. 3130-3135, 2012.

ESPINOZA-HICKS., J. C.; CHACON-VARGAS., K. F.; HERNANDEZ-RIVERA., J. L.; NOGUEDA-TORRES., B.; TAMARIZ., J.; SANCHEZ-TORRES., L. E.; CAMACHO-DAVILA., A. Novel prenyloxy chalcones as potential leishmanicidal and trypanocidal agents: Design, synthesis and evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 167, p. 402- 413, 2019.

FIGUEIREDO, L. T. The use of *Aedes albopictus* C6/36 cells in the propagation and classification of arbovirus of the Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae and Rhabdoviridae families. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.23, p. 13-18, Jan-Mar 1990.

FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviruses in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 224-229, 2007.

FORSHEY, M. B.; GUEVARA, C.; LAGUNA-TORRES, V. A., CESPEDES, M.; VARGAS., J.; GIANELLA, A.; VALLEJO, E.; MADRID, C.; AGUAYO, N., GOTUZZO, E.; SUAREZ, V.; MORALES, A. M.; BEINGOLEA, L.; REYES, N.; PEREZ, P.; NEGRETE, M.; ROCHA, C.; MORRISON, A. C.; RUSSELL, K. L.; BLAIR, P. J.; OLSON, J. G.; KOCHER, T. J. Arboviral Etiologies of Acute Febrile Illnesses in Western South America, 2000–2007. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, p. 787, 2010.

FU, Y.; LIU D.; ZENG H.; REN X.; SONG B.; HU D.; Gan X. New chalcone derivatives: synthesis, antiviral activity and mechanism of action. **Royal Society Chemistry of Advances**, v. 10, p. 24483, 2020.

OLSON, J. G.; KOCHER, T. J. Arboviral Etiologies of Acute Febrile Illnesses in Western South America, 2000–2007. **Neglected Tropical Diseases**, v. 4, p. 787, 2010.

HALSEY, E. S.; SILES, C.; GUEVARA, C.; VILCARROMERO, S.; JHONSTON, E. J.; RAMAL, C.; AGUILAR, P. V.; AMPUERO, J. S. Mayaro Virus Infection, Amazon Basin Region, Peru, 2010–2013. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, p. 1830-1832, 2013.

HAN, X.; PENG, B.; XIAO, B. B.; CAO, S. L.; YANG, C. R.; WANG, W. Z.; WANG, F. C.; LI, H. Y.; YUAN, X. L.; SHI, R.; LIAO, J.; WANG, H.; LI, J.; XU, X. Synthesis and evaluation of chalcone analogues containing a 4-oxoquinazolin-2-yl group as potential anti-tumor agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 162, p. 586-601, 2019.

IZURIETA, R. O.; MACALUSO, M.; WATTS, D. M.; TESH, R. B.; GUERRA, B.; CRUZ, L. M.; GALWANKAR, S.; VERMUND, S. H. Hunting in the Rainforest and Mayaro Virus Infection: An emerging Alphavirus in Ecuador. **Journal of Global Infections Diseases**, v. 3, p. 317-323, 2011.

JONES, P. H.; MARIC, M.; MADISON, M. N.; MAURY, W.; ROLLER, R. J.; OKEOMA, C. M. BST-2/tetherin-mediated restriction of chikungunya (CHIKV) VLP budding is counteracted by CHIKV non-structural protein 1 (nsP1). **Virology**, v. 438, p. 37-49, 2013.

KING, A. M. Q.; LEFKOWITZ, E.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B. Family togaviridae. In: *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Science, CA, USA, 1103–1110 (2011).

KNIPE, D. M.; HOWLEY P. M.; **Fields Virology**. 6. ed. Philadelphia: Lippincott, p.320, 2013.

ROSA, J. F. T.; SOUZA, W. M.; PINHEIRO, F. P.; FIGUEIREDO, M. L.; CARDOSO, J. F.; ACRANI, G. O.; NUNES, M. R. T. Oropouche Virus: Clinical, Epidemiological, and Molecular Aspects of a Neglected Orthobunyavirus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 96, p. 1019–1030, 2017.

RUST, R. S. Human Arboviral Encephalitis. **Seminars in Pediatric Neurology**, v. 19, p.130- 151, 2012.

KNIPE, D. M.; HOWLEY P. M.; **Fields Virology**. 6. ed. Philadelphia: Lippincott, p. 1245, 2013.

KONDURU, N. K.; DEY, S.; SAJID, M.; OWAIS, M.; AHMED, N. Synthesis and antibacterial and antifungal evaluation of some chalcone based sulfones and bisulfones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, p. 23-30, 2013.

LIVONESI, M. C.; DE SOUSA, R. L.; BADRA, S. J.; FIGUEIREDO, L. T. *In vitro* and *in vivo* studies of ribavirin action on Brazilian Orthobunyavirus. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, p. 1011–1016, 2006.

LORENZ, C.; AZEVEDO, T. S.; VIRGINIO, F.; AGUIAR, B. S.; CHIARAVALLOTI-NETO, F.; SUESDEK, L. Impact of environmental factors on neglected emerging arboviral diseases. *Neglected Tropical Diseases.*, v. 11, p. 1-19, 2017.

LUNA, L. K. S.; RODRIGUES, A. H.; SANTOS, R. I. M.; SESTI-COSTA, R.; CRIADO, M. F.; MARTINS, R. B.; SILVA, M. L.; DELCARO, L. S.; PROENCA-MODENA, J. L.; FIGUEIREDO, L. T. M.; ACRANI, G.O.; ARRUDA, E. Oropouchevirus is detected in peripheral blood leukocytes from patients. **Journal of Medical Virology**, v. 89, p. 1108–1111, 2017.

LUNA, J. M.; VALLE-MENDOZA, J. D.; SILVA-CASO, W.; SANDOVAL, I.; VALLE, L. J. D.; REYES, C. P.; CARRILLO-NG, H.; PENA-TUESTA, I.; AGUILAR-LUIS, M. A. Oropouche infection a neglected arbovirus in patients with acute febrile illness from the Peruvian coast. **BMC Research Notes.**, v. 13, p. 67, 2020.

MACAEV, F.; BOLDESCU, V.; POGREBNOI, S.; DUCA, G. Chalcone Scaffold based Antimycobacterial Agents. **Medicinal chemistry.**, v. 4, p. 487-493, 2014.

MARTINS, P. G. A.; MENEGATTI, A. C. O.; CHIARADIA-DELATORRE, L. D.; OLIVEIRA, K. N.; GUIDO, R.; V.; C. ANDRICOPULO, A. D.; VERNAL, J.; YUNES, R. A.; NUNES, R. J.; TERENCE, H. Synthetic chalcones and sulfonamides as new classes of *Yersinia enterocolitica* YopH tyrosine phosphatase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry.**, v. 64, p. 35-41, 2013.

MAYOR, S.; PAGANO R. E. Pathways of clathrin independent endocytosis. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 8, p. 603–612, 2007.

MARTINS, P. G. A. et al. Synthetic chalcones and sulfonamides as new classes of *Yersinia enterocolitica* YopH tyrosine phosphatase inhibitors. **European journal of medicinal chemistry**, v. 64, p. 35-41, 2013.

MCGILL, P. E. Viral infections: alpha-viral arthropathy. **Bailliere's Clinical Rheumatology.**, v. 9, p. 145-150, 1995.

MEI-YU, L.; ZHONG-LAN, Y.; DAN-DAN H.; GAN-HAI, H.; RI-LI, Z.; HUA, Z.; LAN, Y.; YUAN-YING, J.; JUAN, S.; YAN, W. Effect of loureirin A against *Candida albicans* biofilms. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v.17, p. 616-623, 2019.

MELLOR, P. S.; BOORMAN, J.; BAYLIS, M. Culicoides Biting Midges: Their Role as Arbovirus Vectors. **Annual Review of Entomology.**, v. 45, p. 307-340, 2000.

METSELAAR, D. Isolation of arboviruses of group A and group C in Surinam. **Trop Geogr Med.**, v. 18, p. 42-137, 1966.

MORELI, M.L.; AQUINO, V.H.; CRUZ, A.C.; FIGUEIREDO, L.T. Diagnosis of Oropouche virus infection by RT-nested-PCR. **Journal of Medical Virology.**, v. 66, p. 139–142, 2002.

MOTA, M. T. O.; RIBEIRO, M. R.; VEDOVELLO, D.; NOGUEIRA, M. L.; Mayaro virus: a

neglected arbovirus of the Americas. **Future virology**, v.10.2217, p. 1746-1794, 2015.

MOURÃO, M.P.; BASTOS, M.S.; GIMAQU, J.B.; MOTA, B.R.; SOUZA, G.; GRIMMER, G.H.; GALUSSO, E.; ARRUDA, E.; FIGUEIREDO, L.T. Oropouche fever outbreak, Manaus, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 15, p. 2063–2064, 2009.

MOURÃO, M. P. G.; BASTOS, M. S.; FIGUEIREDO, R. P.; GIMAQUE, J. B. L.; GALUSSO, E. S.; KRAMER, V. M.; OLIVEIRA, C. M. C.; NAVECA, F. G.; FIGUEIREDO, L. T. M. Mayaro Fever in the City of Manaus, Brazil, 2007–2008. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, p. 1, 2012.

MUÑOZ, M.; NAVARRO, J. C. Virus Mayaro: um arbovírus reemergente en Venezuela y Latinoamérica. **Biomédica**, v. 32, p. 286-302, 2012.

NATASHA, L; LUNEL, T; ACRANI, G. O; RANDALL, R. E; ELLIOTT, R. M. Generation of Recombinant Oropouche Viruses Lacking the Nonstructural Protein NSm or NSs. **Journal of Virology**, V. 90, p. 5, 2016.

PINHEIRO, F.; PINHEIRO, M.; BENSABATH, G.; CAUSEY, O. R.; SHOPE, R.E. Epidemia de vírus Oropouche em Belém. **Revista do Serviço Especial de Saúde Pública**, v. 12, p. 13–23, 1962.

PINHEIRO, F.; FREITAS, R. B.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F.; GABBAY, Y. B.; MELLO, W. A.; LEDUC. J. W. An Outbreak of Mayaro Virus Disease in Belterra, Brazil I. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 30, p. 674-681, 1981.

PINHEIRO, F.; TRAVASSOS DA ROSA, A.; TRAVASSOS DA ROSA, J.; ISHAK, R.; FREITAS, R.B.; GOMES, L.M.C.; LEDUC, J.W.; OLIVA, O.F.P. OropoucheVirus I. A Review of Clinical, Epidemiological, and Ecological Findings. **Am. Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 30, p. 149– 160, 1981.

PINHEIRO, F, P.; TRAVASSOS DA ROSA, A, P.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F.; BENSABATH, G. Anout break of Oropouche vírus disease in the vicinity of Santarem, Para Brazil. **Trop em med Parasitol**, v. 27, p. 213–223, 1976.

PINHEIRO F, TRAVASSOS DA ROSA A, VASCONCELOS PF, ARBOVIROSES. VERONESI R, FOCACCIA R, eds. **Tratado de Infectologia**. São Paulo, Brazil: Atheneu, 169– 180, 1996.

PURSE, B.V.; CARPENTER, S.; VENTER, G.J.; BELLIS, G.; MULLENS, B.A. Bionomics of temperate and tropical *Culicoides* midges: Knowledge gaps and consequences for transmission of *Culicoides*-borne viruses. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 60, p. 373–392, 2015.

POWERS, C. N.; SETZER, W. N. An *In-Silico* Investigation of Phytochemicals as Antiviral Agents Against Dengue Fever. **Bentham Science**, v. 19, p. 516-536, 2016.

RAVICHANDRAN, R.; MANIAN, M. Ribavirin therapy for chikungunya arthritis. **J. Infect. Debv. Ctries**, v. p. 140–142, 2008.

SAEED, M. F.; WANG, H.; SUDERMAN, M.; BEASLEY, D. W.; TRAVASSOS DA ROSA, A.; LI, L.; SHOPE, R. E.; TESH, R. B.; BARRETT, A. D. Jatobal virus is a reassortant containing the small RNA of Oropouche virus. **Virus Research.**, v. 77, p. 25–30, 2001.

SANTOS, R. I.; BUENO-JÚNIOR, L. S.; RUGGIERO, R. N.; ALMEIDA, M. F.; SILVA, M. L.; PAULA, F. E.; CORREA, V. M. A.; ARRUDA, E. Spread of OropoucheVirus in to the Central Nervous System in Mouse. **Viruses**, v. 6, p. 3827-3836, 2014.

SCHROTEROVA, L.; KRALOVA, V.; VORACOVA, A.; HAŠKOVA, P.; RUDOLF, E.; CERVINKA, M. Antiproliferative effects of selenium compounds in colon cancer cells: Comparison of different cytotoxicity assays. **Toxicology in Vitro.**, v. 23, p. 1406- 1411, 2009.

SILVA-CASO, W.; AGUILAR-LUIS, M. A.; PALOMARES-REYESA, C.; MAZULISA, F.; WEILGA, C.; VALLEE, L. J. D.; ESPEJO-EVARISTOF, J.; SOTO-FEBRESG, F.; MARTINS-LUNAA, J.; VALLE-MENDOZAA J. D. First outbreak of Oropouche Fever reported in a non-endemic western region of the Peruvian Amazon: Molecular diagnosis and clinical characteristics. **International Journal of Infectious Diseases.**, v. 83, p. 139-144, 2019.

STRAUSS, J. H.; STRAUSS, E. G. The Alphaviruses: Gene Expression, Replication, and Evolution. **Microbiological Reviews.**, v. 58, p. 491-562, 1994.

SUROENGRIT, A.; YUTTITHAMNON, W.; SRIVARANGKUL, P.; PANKAEW, S.; KINGKAEW, K.; CHAVASIRI, W.; BOONYASUPPAYAKORN, S. Halogenated Chrysins Inhibit Dengue and Zika Virus Infectivity. **Scientific Reports**, v. 7, p. 13696, 2017.

TALARMIN, A.; CHANDLER, L. J.; KAZANJI, M.; THOISY, B.; DEBON, P.; LELARGE, J.; LABEAU, B.; BOURREAU, E.; VIÉ, J. C.; SHOPE R. E.; SARTHOU, J. L. Mayaro Virus Fever in French Guiana: Isolation, Identification, and Seroprevalence. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene.**, v. 59, p. 452-456, 1998.

TAUBITZ, W.; CRAMER, J. P.; KAPAUN, A.; PFEFFER, M.; DROSTEN, C.; DOBLER, G.; BURCHARD, G. D.; LOSCHER, T. Chikungunya fever in travelers: clinical presentation and course. *Clinical Infectious Disease*, v. 45, p. 1-4, 2007.

THEILACKER, C.; HELD, J.; ALLERING, L.; EMMERICH, P.; SCHMIDT-CHANASIT, J.; KERN, W. V.; PANNING, M. Prolonged polyarthralgia in a German traveller with Mayaro virus infection without inflammatory correlates. **Infectious Disease.**, v. 13, p. 369, 2013.

TORRES, J. R.; RUSSELL, K. L.; VASQUEZ, C.; BARRERA, R.; TESH, R. B.; SALAS, R.; WATTS, D. M. Family Cluster of Mayaro Fever, Venezuela. **Emerging Infectious Diseases.**, v. 10, p. 7, 2004.

TRAVASSOS DA ROSA, J.F.; DE SOUZA, W.M.; PINHEIRO, F.P.; FIGUEIREDO, M.L.;

CARDOSO, J.F.; ACRANI, G.O.; NUNES, M.R.T. Oropouche Virus: Clinical, Epidemiological, and Molecular Aspects of a Neglected Orthobunyavirus. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, p. 1019–1030, 2017.

TEMMAM, S.; MONTEIL-BOUCHARD, S.; ROBERT, C.; BAUDOIN, J.P.; SAMBOU, M.; AUBADIE-LADRIX, M.; LABAS, N.; RAOULT, D.; MEDDIANIKOV, O.; DESNUES, C. Characterization of Viral Communities of Biting Midges and Identification of Novel Thogoto virus Species and Rhabdovirus Genus. **Viruses**, v. 8, p. 77, 2016.

TILSTON-LUNEL, N. L.; ACRANI, G. O.; RANDALL, R. E.; ELLIOTT, R. M. Generation of Recombinant Oropouche Viruses Lacking the Nonstructural Protein NSm or NSs. **Journal of Virology**, v. 90, p. 2616–2627, 2016.

TRIPS, M.; HAUSERMANN, W. Genetics of house-entering behaviour in East African populations of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) and its relevance to speciation. **Bulletin of Entomological Research**, v. 68, p. 521–532, 1978.

VASCONCELOS, H. B.; NUNES, M. R.; CASSEB, L. M.; CARVALHO, V. L.; PINTODA SILVA, E. V.; SILVA, M.; CASSEB, S. M.; VASCONCELOS, P. F. Molecular epidemiology of Oropouche virus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, p. 800–806, 2011.

VASCONCELOS, P. F.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F.; GUERREIRO, S. C.; DEGALLIER, N.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. 1st register of an epidemic caused by Oropouche virus in the states of Maranhão and Goiás, Brazil. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v.31, p. 271– 278, 1989.

VERNAL, S.; MARTINI, C. C. R.; FONSECA, B. A. L. Oropouche Virus–Associated Aseptic Meningo encephalitis, Southeastern Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, p. 2, 2019.

VERONESI, R., FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. 5ª ed. São Paulo: Ed Atheneu; 2015.

VIEIRA, C. J. S. P.; SILVA, D. J. F.; BARRETO, E. S.; SIQUEIRA, C. E. H.; COLOMBO, T. E.; OZANIC, K.; SCHIMIDT, D. J.; DRUMOND B. P.; MONDINI, A.; NOGUEIRA, M. L.; BRONZONI, R. V. M. Detection of Mayaro virus infections during a dengue outbreak in Mato Grosso, Brazil. **Acta Tropica**, v. 147, p. 12–16, 2015.

WANG, Y.; XUE, S.; LI, R.; ZHENG, Z.; YI, H.; LI, Z. Synthesis and biological evaluation of novel synthetic chalcone derivatives as anti-tumor agents targeting Cat L and Cat **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, p. 8–16, 2018.

WEAVER, S. C.; REISEN, W. K., Present and future arboviral threats. **Antiviral Research**, v. 85, p.328–345, 2010.

WEISE, W. J.; HERMANCE, M. E.; FORRESTER, N.; ADAMS, A. P.; LANGSJOEN, R.; GORCHAKOV, R.; WANG, E.; ALCORN, M. D. H.; TSETSKARKIN, K.; WEAVER, S. C. A Novel Live-Attenuated Vaccine Candidate for Mayaro Fever. **Neglected Tropical Diseases**, v. 8, p. 2969, 2014.

WEN, R.; HAI-NING, L. V.; JIANG, Y.; TU, P. F. Anti-inflammatory flavone and chalcone derivatives from the roots of *Pongamiapinnata* (L.) Pierre. **Phytochemistry**, v.149, p. 56-63, 2018.

WINTACHAI, P.; WIKAN, N.; KUADKITKAN, A.; JAIMIPUK, T.; UBOL, S.; PULMANAUSAHAHAKUL, R.; AUEWARAKUL, P.; KASINRERK, W.; WENG, W. Y.; PANYASRIVANIT, M.; PAEMANEE, A.; KITTISENACHAI, S.; ROYTRAKUL, S.; SMITH, D. R. Identification of Prohibitin as a Chikungunya Virus Receptor Protein. *Journal of Medical Virology*, v. 84, p. 1757-1770, 2012.

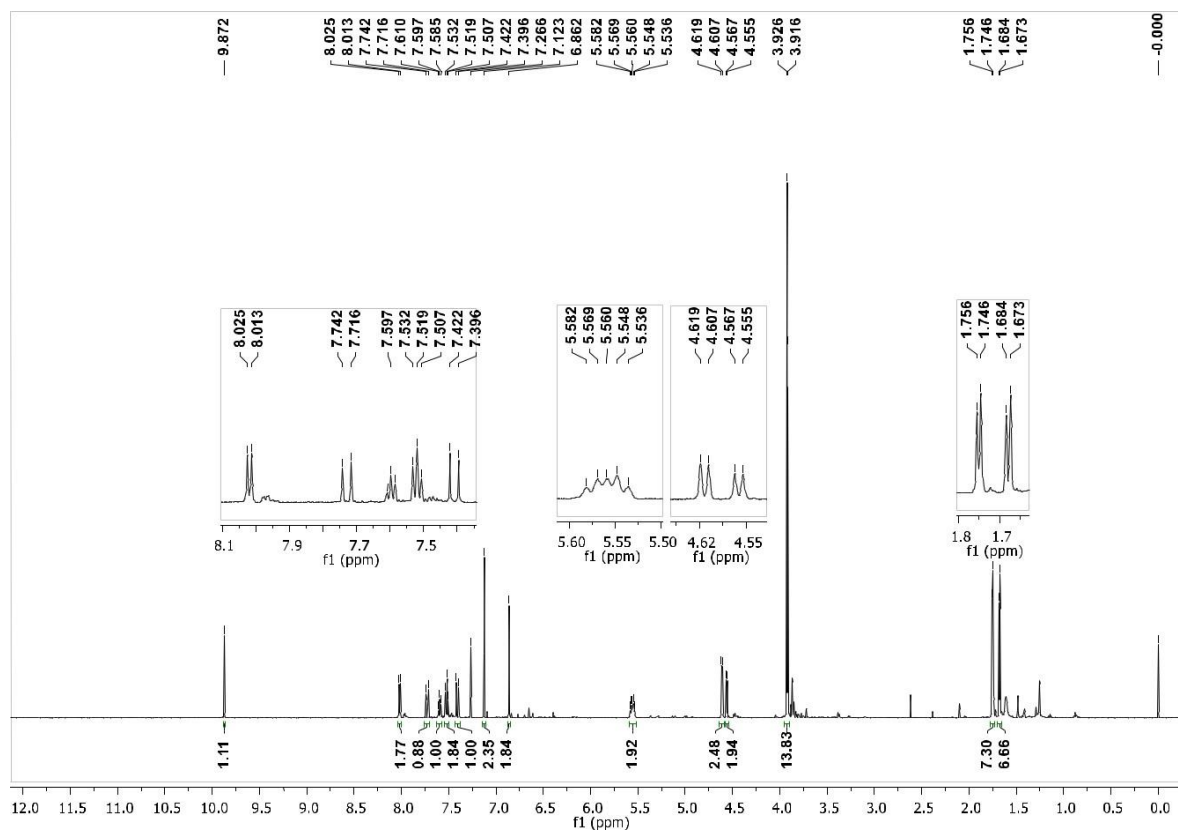
ZHAO, X.; MEI, W.; GONG, M.; ZUO, W.; BAI, H.; DAI, H. Antibacterial Activity of the Flavonoids from *Dalbergia odorifera* on *Ralstonias Solanacearum*. **Molecules**, v. 16, p. 9775- 9782, 2011.

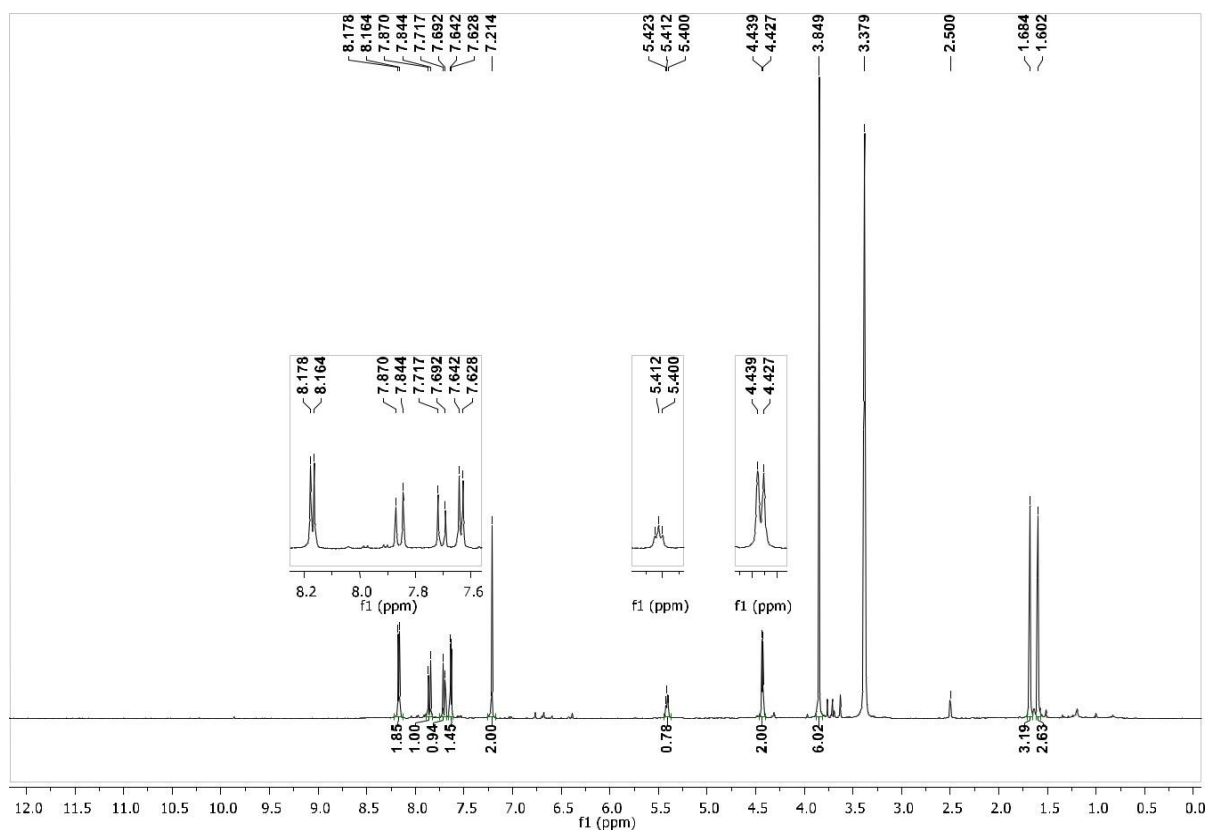
ZHOU, D.; XIE, D.; HE, F.; SONG, B.; HU, D. Antiviral properties and interaction of novel chalcone derivatives containing a purine and benzenesulfonamide moiety. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 28, p. 2091-2097, 2018.

ZHOU, W.; ZHANG, W.; PENG, Y.; JIANG, Z. H.; ZHANG, L.; DU, Z. Design, Synthesis and Anti-Tumor Activity of Novel Benzimidazole-Chalcone Hybrids as Non-Intercalative Topoisomerase II Catalytic Inhibitors. **Molecules**, v. 25, p. 3180, 2020.

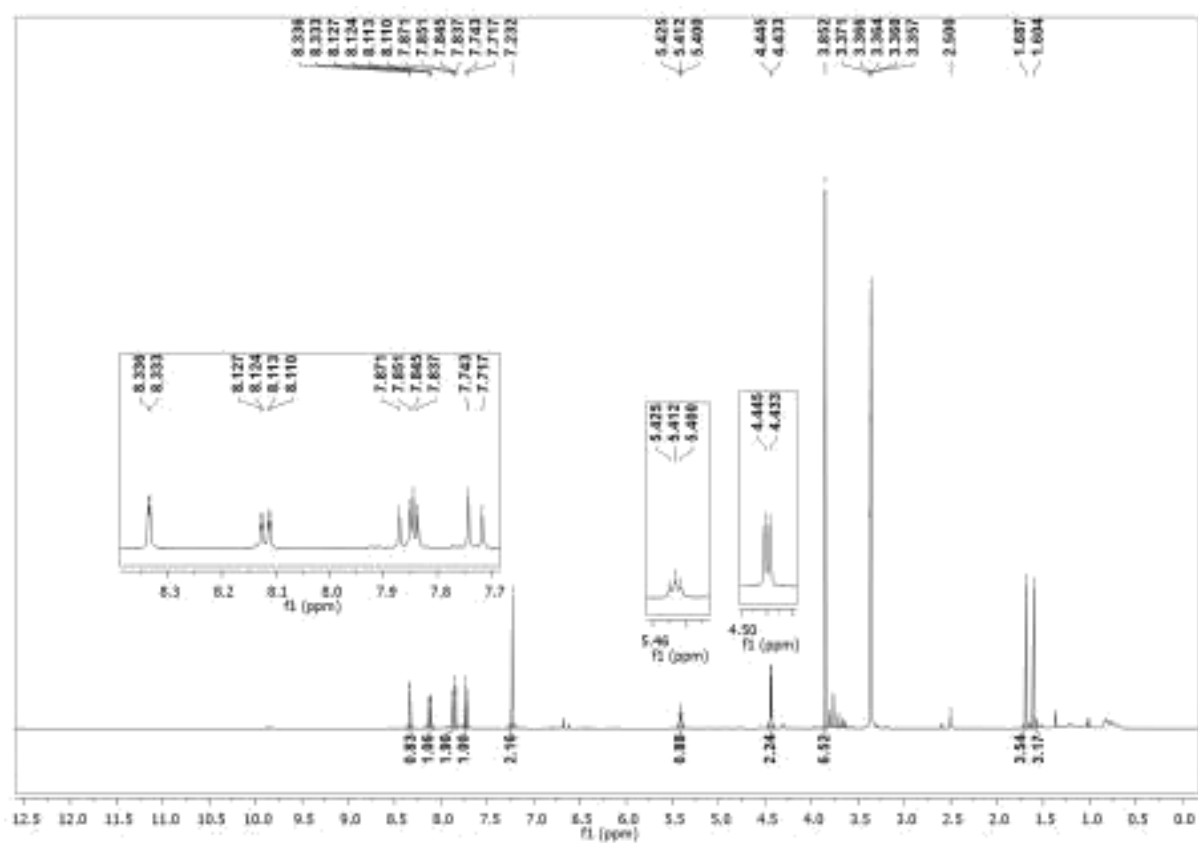
ZUCHI, N.; HEINEN, L. B. S.; SANTOS, M. A. M.; PEREIRA, F. C.; SLHESSARENKO, R. D. Molecular detection of Mayaro virus during a dengue outbreak in the state of Mato Grosso, Central-West Brazil. **Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, p. 820-823, 2014.

APÊNDICES

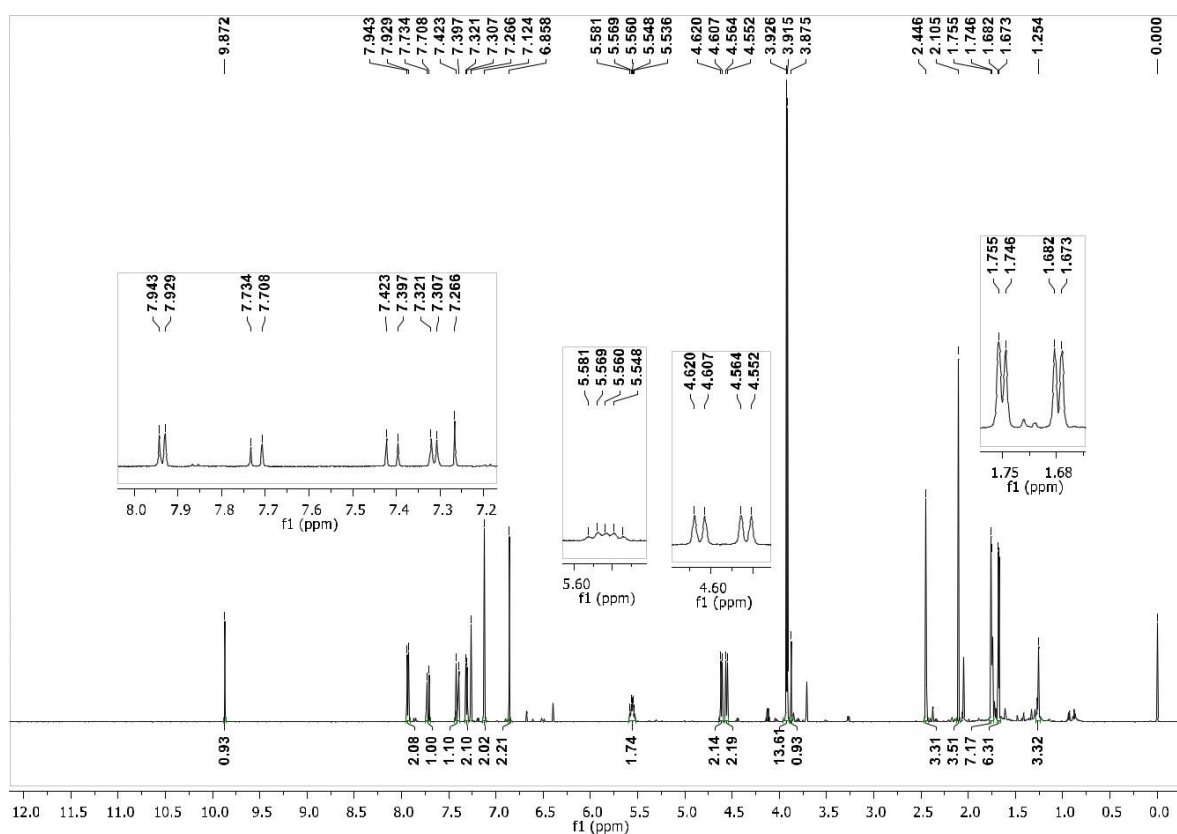
Apêndice 1: Espectro de RMN de ¹H (600 MHz, CDCl₃) da chalcona 9



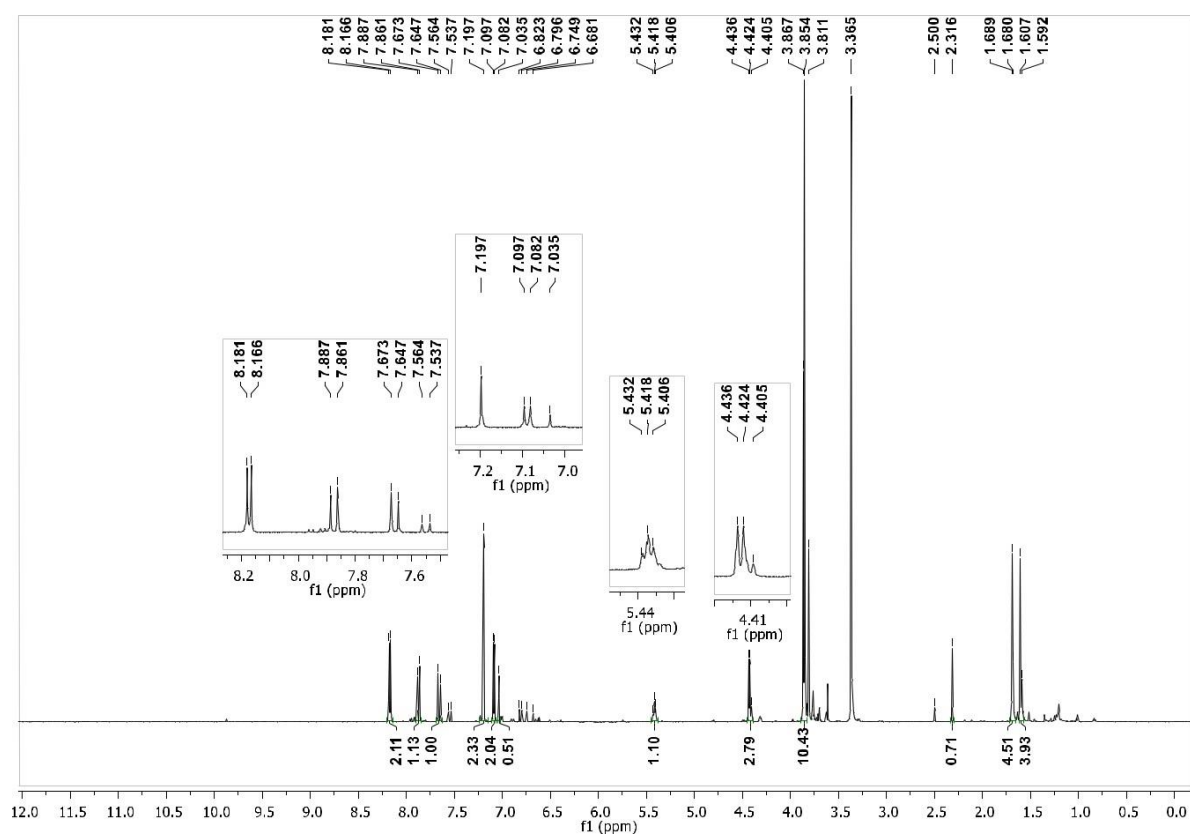
Apêndice 2: Espectro de RMN de ¹H (600 MHz, CDCl₃) da chalcona 10



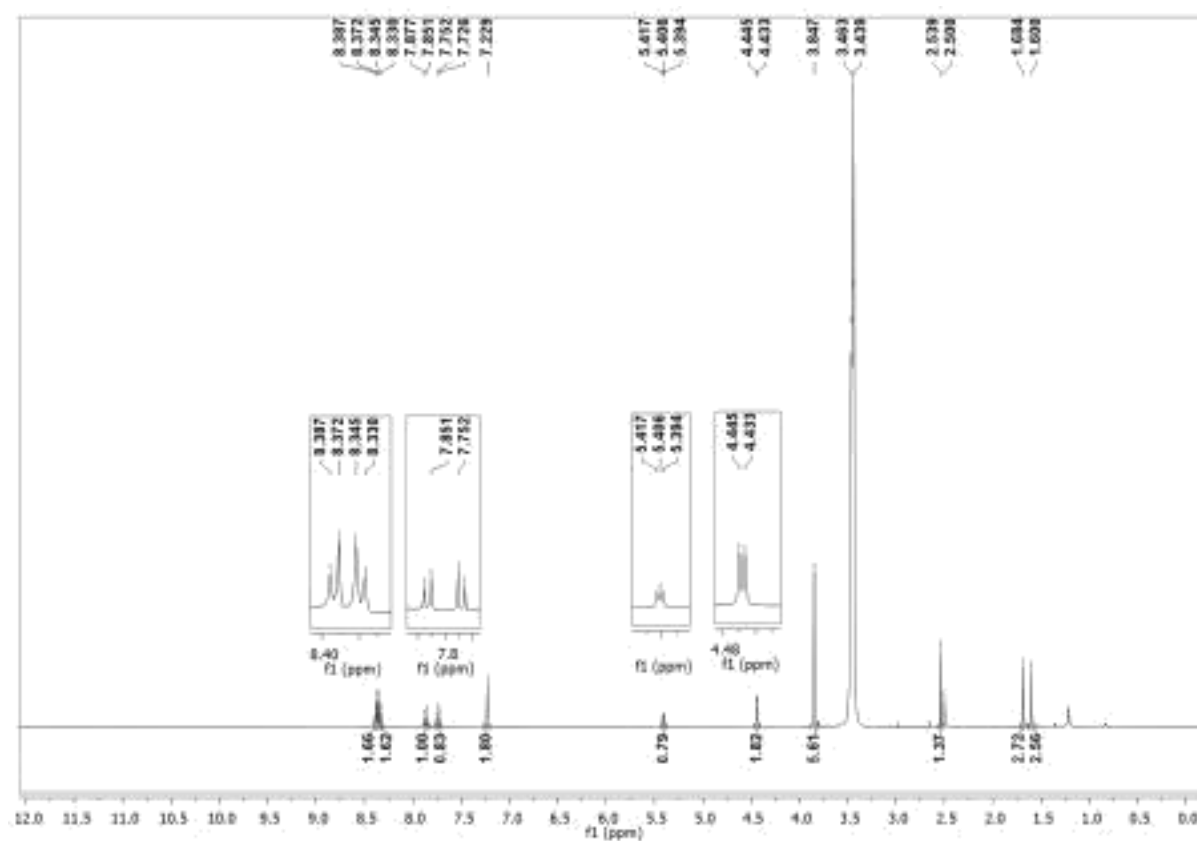
Apêndice 3: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) da chalcona 11



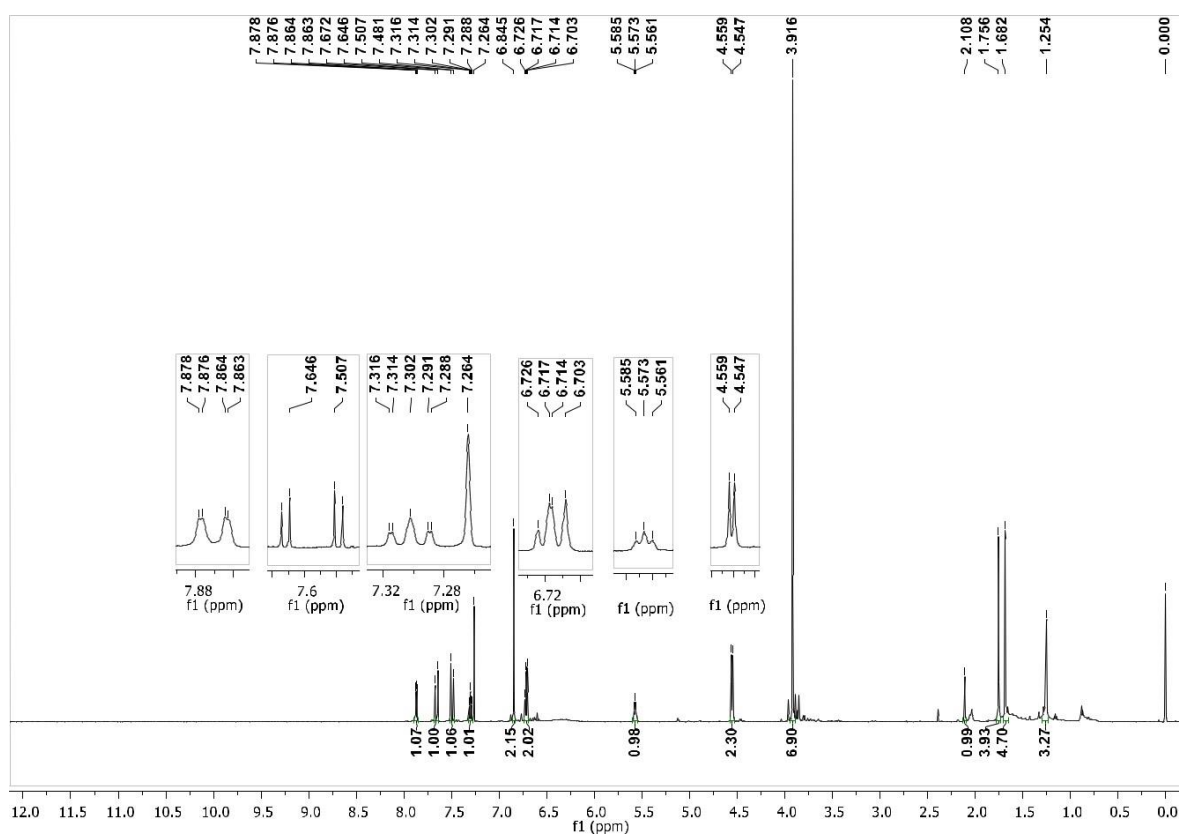
Apêndice 4: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da chalcona 12



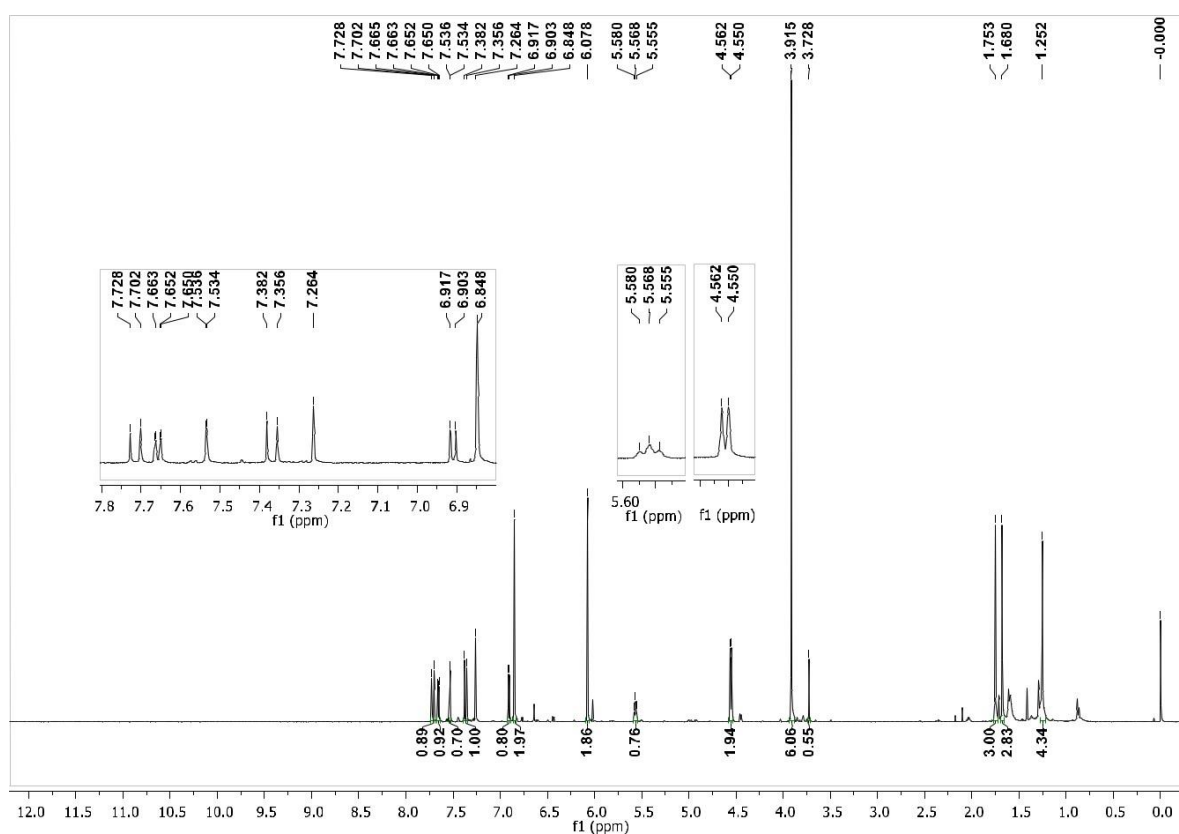
Apêndice 5: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, DMSO-*d*₆) da chalcona 13



Apêndice 6: Espectro de RMN de ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆) da chalcona 14

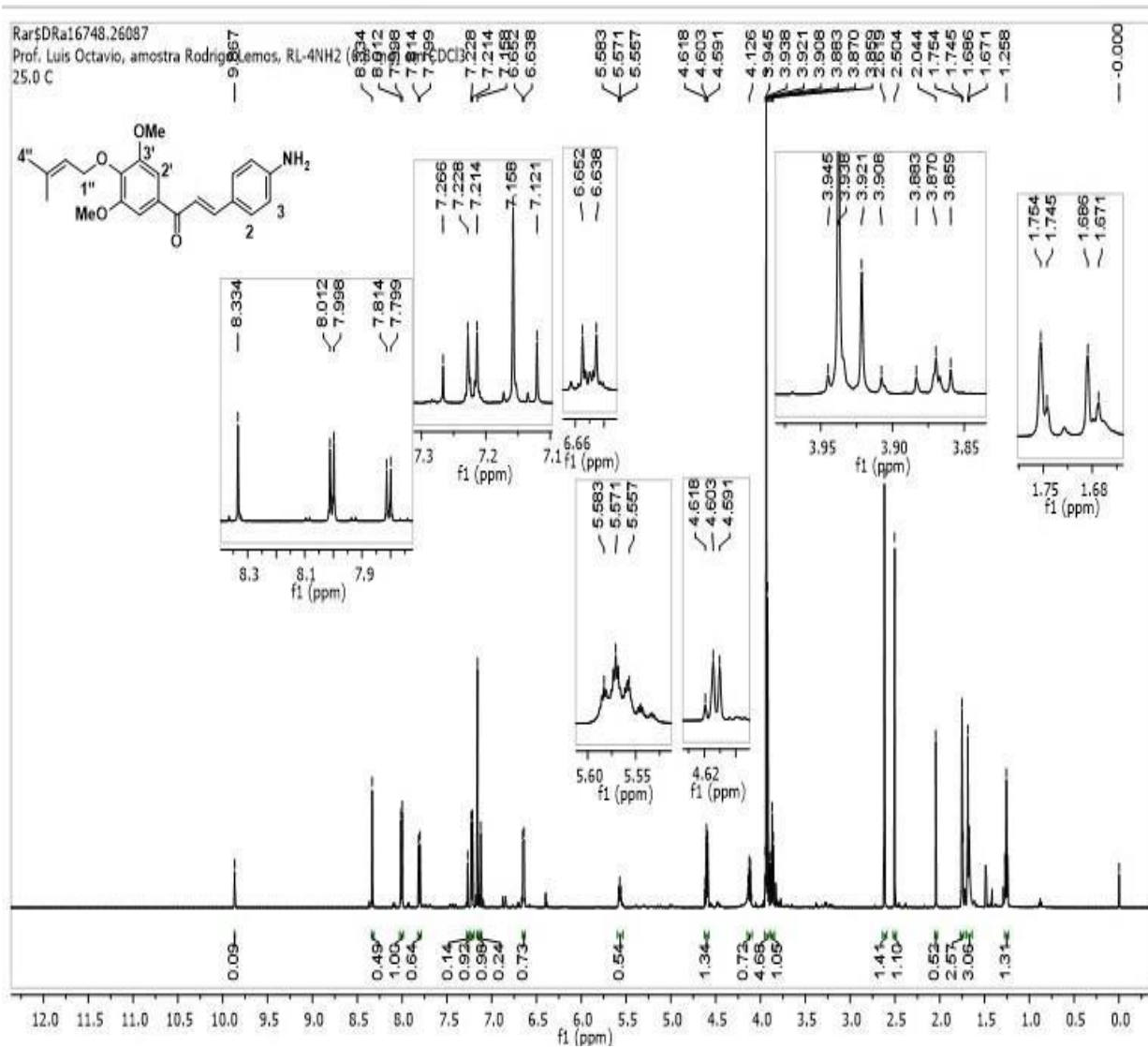


Apêndice 7: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da chalcona 17



Apêndice 8: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da chalcona 18

Apêndice 9: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da chalcona 16



Apêndice 10: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da chalcona 15

