



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

KEVIN HENRIQUE SOUZA LIMA

**Síntese e avaliação de xinjiachalcona A e seus análogos como
potenciais agentes antibacterianos de amplo espectro**

São José do Rio Preto

2023

KEVIN HENRIQUE SOUZA LIMA

**Síntese e avaliação de xinjiachalcona A e seus análogos como
potenciais agentes antibacterianos de amplo espectro**

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

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Luis Octavio Regasini

São José do Rio Preto

2023

L732s

Lima, Kevin Henrique Souza

Síntese e avaliação de xinjiachalcona A e seus análogos como potenciais agentes antibacterianos de amplo espectro / Kevin Henrique Souza Lima. -- São José do Rio Preto, 2023

37 p. : il., tabs.

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

1. Química. 2. Alquilação. 3. Bactérias. 4. Micobactérias. 5. Química farmacêutica. 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.

KEVIN HENRIQUE SOUZA LIMA

**Síntese e avaliação de xinjiachalcona A e seus análogos como
potenciais agentes antibacterianos de amplo espectro**

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

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

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

Prof^a. Dr^a. Debora Cristina Baldoqui
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Daniel Fabio Kawano
UNICAMP

São José do Rio Preto

27 de abril de 2023

Senhores, aprendamos a sonhar, e talvez então encontraremos a verdade [...]

Friedrich August Kekulé von Stradonitz

(ROCKE, 1985, p.356)

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Neide e Vanderlei, e aos meus irmãos, em especial a minha irmã, Neire, que sempre me apoiaram e estimularam a decisão de ingressar na universidade e na pós-graduação.

À minha companheira de vida, Giulia, com quem compartilho momentos mais difíceis da minha formação e estive ao meu lado durante os momentos finais deste trabalho.

Ao meu orientador e grande amigo, Prof. Dr. Luis Octávio Regasini pela confiança e por todos os conselhos durante essa jornada acadêmica.

À minha psicoterapeuta, Fabíola, que tem me oferecido um suporte imprescindível, pela dedicação ao meu processo terapêutico e a minha saúde mental.

Aos meus colegas de laboratório que tanto colaboraram com este trabalho, em especial ao Me. Patrick Ozanique e Me. Alvaro Helena, que foram fiéis companheiros de trabalho e grandes amigos que não me deixaram desistir frente às adversidades da vida.

A todos meus amigos pessoais, em especial à Samanta Camargo, ao Leonardo Rossi, Gabriel Grandi, Mariana Francelino e Ana Clara Souto que estiveram sempre ao meu lado e me deram suporte necessário para continuar em frente.

Ao Me. Murillo Donizeti, amigo de longa data que contribuiu muito com conhecimentos acadêmicos para execução deste trabalho.

Ao IBILCE e toda a UNESP, pelos 6 anos de formação contínua, que tanto tem contribuído para a minha formação pessoal e profissional.

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e o Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos (LAQ).

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

RESUMO

A resistência microbiana tem se mostrado uma iminente ameaça à saúde pública, onde cerca de 4,95 milhões de mortes foram associadas a este fenômeno em 2019. Em 2017 a Organização Mundial da Saúde (OMS) elaborou uma lista de prioridade para desenvolvimento de novos antibióticos contra certos patógenos, alguns destes que se mostram resistentes aos métodos convencionais de tratamento. Nesse sentido, a descoberta por agentes antibacterianos inovadores se torna premente. A xinjiachalcona A (**XCA**) é uma retrochalcona *O*-isoprenilada de *Glycyrrhiza inflata* que apresentou atividade contra *Helicobacter pylori*, com concentração inibitória mínima (CIM) contra cepas padrão e isolados clínicos variando de 12,5 a 50,0 µM. Este trabalho tem como objetivo a síntese de **XCA** e de análogos simplificados com modificações no anel B, a fim de analisar a relação estrutura-atividade e a obtenção de análogos com amplo espectro de atividades antibacteriana e antimicobacteriana potencializadas. A estratégia sintética incluiu reações de *O*-alquilação (prenilação e metilação), bem como proteção/desproteção com/de tetraidropirano (THP) e condensações aldólicas de Claisen-Schmidt. **XCA**, equinatina (**ECH**) e **Di-OMe** apresentaram valores de concentração inibitória mínima de 147,7 µM, 115,6 µM e 175,8 µM, respectivamente contra *H. pylori*, o composto **As2** apresentou concentração inibitória mínima de 162,1 µM contra *E. faecium*. O protótipo (**XCA**) e **Di-OMe** se mostraram ativas contra *M. tuberculosis* com valores de concentração inibitória mínima de 46,15 µM e 55 µM, respectivamente.

Palavras-chave: Xinjiachalcona A. *O*-alquilação. Condensação de Claisen-Schmidt. Tetraidropirano. Bactérias. Microbactérias.

ABSTRACT

Microbial resistance has proven to be an imminent threat to public health, with around 4.95 million deaths associated with this phenomenon in 2019. In 2017, the World Health Organization (WHO) prepared a priority list for the development of new antibiotics against certain pathogens, some of which are resistant to conventional treatment methods. In this sense, the discovery of innovative antibacterial agents becomes urgent. Xinjiachalcone A (**XCA**) is an *O*-isoprenylated retrochalcone from *Glycyrrhiza inflata* that showed activity against *Helicobacter pylori*, with minimal inhibitory concentration (MIC) against standard strains and clinical isolates ranging from 12.5 to 50.0 μM . This work aimed at the synthesis of **XCA** and simplified analogs with modifications in the B ring, in order to analyze the structure-activity relationship and obtain analogues with a broad spectrum of potentiated antibacterial and antimycobacterial activities. The synthetic strategy included *O*-alkylation reactions (prenylation and methylation), as well as protection/deprotection with/from tetrahydropyran (THP) and Claisen-Schmidt aldol condensations. **XCA**, echinatin (**ECH**) and **Di-OMe** presented minimum inhibitory concentration values of 147.7 μM , 115.6 μM and 175.8 μM , respectively against *H. pylori*, the compound **As2** presented minimum inhibitory concentration of 162.1 μM against *E. faecium*. The prototype (**XCA**) and **Di-OMe** are found to be active against *M. tuberculosis* with minimum inhibitory concentration values of 46.15 μM and 55 μM , respectively.

Keywords: Xinjiachalcone A. *O*-alkylation. Claisen-Schmidt Condensations. Tetrahydropyran. Bacterium. Mycobacterium.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Estrutura geral do núcleo chalcônico – p.12
- Figura 2.** Estrutura da Xinjiachalcona A – p.12
- Figura 3.** Estrutura geral para identificação dos hidrogênios dos espectros – p.27
- Figura 4.** Espectro de RMN de ^1H de XCA. (600MHz – acetona- d_6) – p.27
- Figura 5.** Espectro de RMN de ^1H de As1. (600MHz – acetona- d_6) – p.28
- Figura 6.** Espectro de RMN de ^1H de As2. (600MHz – acetona- d_6) – p.29
- Figura 7.** Espectro de RMN de ^1H de ECH. (600MHz – acetona- d_6) – p.30
- Figura 8.** Espectro de RMN de ^1H de Di-OMe. (600MHz – CDCl_3) – p.31
- Figura 9.** Espectro de RMN de ^{13}C de XCA (Acetona- d_6 , 151MHz) – p. 32
- Figura 10.** Espectro de RMN de ^{13}C de As1 (Acetona- d_6 , 151MHz) – p. 33
- Figura 11.** Espectro de RMN de ^{13}C de As2 (Acetona- d_6 , 151MHz) – p. 34
- Figura 12.** Espectro de RMN de ^{13}C de ECH (Acetona- d_6 , 151MHz) – p. 35
- Figura 13.** Espectro de RMN de ^{13}C de Di-OMe (CDCl_3 , 151MHz) – p. 36
- Esquema 1.** Planejamento Molecular dos Análogos de XCA – p.13
- Esquema 2.** Rota sintética de XCA proposta por Fiorito e colaboradores (Fiorito et al., 2013) – p.14
- Esquema 3.** Rota sintética utilizada para obtenção de XCA – p.14
- Esquema 4.** Mecanismo de reação de proteção – p.15
- Esquema 5.** Mecanismo de reação de O-prenilação – p.16
- Esquema 6.** Mecanismo proposto para reação de metilação – p.16
- Esquema 7.** Mecanismo de reação de Condensação aldólica de Claisen-Schmidt - p.17
- Esquema 8.** Mecanismo proposto para reação de desproteção – p.17
- Tabela 1.** Rendimentos Globais de síntese de XCA e seus análogos – p.17
- Tabela 2.** Atividade antibacteriana de XCA e seus análogos expressa em valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM em μM) – p.19

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

XCA	Xinjiachalcona A
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
δ	Deslocamento químico
<i>J</i>	Constante de acoplamento
s	Simpleto
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
t	Tripleto
q	Quadrupleto
dt	Duplo tripleto
m	Multipleto
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
R_f	Retention factor
LEA	Laboratório de Ensaios Antimicrobianos
UFU	Universidade Federal de Uberlândia

LISTA DE SÍMBOLOS

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

Sumário

1.	INTRODUÇÃO.....	11
1.1.	Resistência microbiana.....	11
1.2.	Chalconas.....	11
1.3.	Xinjiachalcona A.....	12
2.	OBJETIVOS.....	13
3.	METODOLOGIA.....	13
3.1.	Planejamento molecular de análogos chalcônicos de XCA.....	13
3.2.	Estratégias sintéticas para obtenção de XCA.....	13
3.2.1.	Estratégia sintética utilizada nesse trabalho.....	14
3.3.	Ensaio biológico	14
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	15
4.1.	Ensaio biológico	18
5.	CONCLUSÃO.....	19
6.	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	20
6.1.	Procedimentos gerais de O-alkilação (reação em <i>one-pot</i>).....	20
6.2.	Procedimentos gerais para as reações de proteção com thp	20
6.3.	Procedimentos gerais de condensação aldólica de claisen-schmidt.....	21
6.4.	Procedimentos gerais para a reação de desproteção	22
6.5.	Procedimento geral para obtenção de As1	22
6.6.	Procedimento geral para obtenção de As2	23
6.7.	Procedimento geral para obtenção de ECH.....	24
6.8.	Procedimento geral para obtenção de Di-OMe.....	24
7.	ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	25
7.1.	Ensaio antibacteriano	25
7.2.	Ensaio contra <i>Helicobacter pylori</i>	25

REFERÊNCIAS	26
ANEXOS	27

1. INTRODUÇÃO

1.1. Resistência Microbiana

Atualmente, a resistência microbiana está incluída dentre as dez principais ameaças à saúde pública, visto que em 2019 o número de mortes associadas à resistência microbiana foi estimado em 4,95 milhões e o número de mortes atribuídas a esse mesmo fenômeno foi de 1,27 milhões. Neste cenário, seis patógenos seguem liderando as mortes associadas com resistência microbiana, incluindo: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*, que foram responsáveis por 929 mil mortes atribuídas, e 3,57 milhões de mortes associadas à resistência microbiana (The Lancet, 2022).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) organizou em 2017 uma lista de prioridade para a descoberta e desenvolvimento de fármacos antibióticos contra certos patógenos, como por exemplo *Pseudomonas aeruginosa* com prioridade crítica; *Enterococcus faecium*, *S. aureus* e *Helicobacter pylori* com prioridade alta, e *Streptococcus pneumoniae* com prioridade média (WHO, 2017). Em 2020, a tuberculose, infecção causada por *Mycobacterium tuberculosis*, foi apontada no relatório anual da Organização Mundial da Saúde como prioridade global para a busca de fármacos inovadores, visto o aumento do número de óbitos relacionados à tuberculose, fenômeno resultante da negligência em relação à infecção durante a pandemia de COVID-19, na qual houve a diminuição de cerca de 25% dos diagnósticos para tuberculose (WHO, 2021).

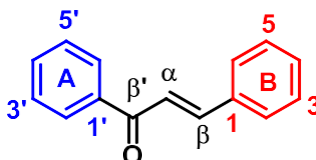
Nesse contexto, os produtos naturais vêm se mostrando como alternativas aos tratamentos convencionais, apresentando-se como potenciais agentes terapêuticos contra diversos patógenos humanos (Dai, 2020). Por esse motivo, o Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos (LAQ) do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – UNESP / São José do Rio Preto, explora produtos naturais e suas atividades biológicas, otimizando as propriedades biológicas com o planejamento e síntese de análogos.

1.2. Chalconas

Dentre os produtos naturais as chalconas se destacam, uma vez que possuem diversos estudos relacionados envolvendo suas bioatividades. As chalconas constituem uma importante subclasse de flavonoide, com distribuição ampla nas plantas, sendo precursores biossintéticos centrais dos demais flavonoides (Di Carlo et al., 1999).

Estruturalmente são formadas por duas unidades fenílicas (anéis A e B), separadas por uma cetona α,β -insaturada (**Figura 1**) (Dewick, 2009). São consideradas compostos privilegiados pela Química Medicinal, apresentando amplo espectro de bioatividades e estruturas que permitem sínteses concisas e versáteis. (Zhuang et al., 2017).

Figura 1. Estrutura geral do núcleo chalcônico



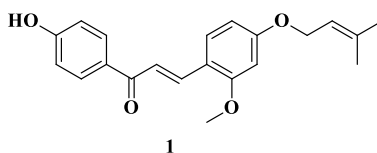
Fonte: Elaborado pelo autor.

Dentre as chalconas, destaca-se a subclasse das retrochalconas, que são fenóis que revelam a ausência do grupo hidroxila na posição *orto* do anel A (C-2'), presença de metoxila na posição *orto* do anel B (C-2) e grupos oxigenados nas posições *para* dos dois anéis (C-4 e C-4'), diferindo-as das chalconas convencionais (Mittal, 2021).

1.3. Xinjiachalcona A

Por séculos, a medicina tradicional chinesa se utilizou de extratos de raízes e rizomas de plantas do gênero *Glycyrrhiza* devido a sua ação antibiótica, anti-inflamatória e antitussígena. Atualmente tais raízes e rizomas são empregados como adoçantes e saborizantes pela indústria alimentícia, e vêm ganhando a atenção da indústria farmacêutica devido aos aspectos benéficos de seus usos. A fim de compreender a fonte das propriedades farmacológicas destas raízes e rizomas, algumas chalconas foram isoladas. Em específico, a xinjiachalcona A (**Figura 2**), uma retrochalcona das raízes de *Glycyrrhiza inflata*, demonstrou potente atividade antibacteriana contra *H. pylori* com valores de concentração inibitória mínima (CIM) variando entre 12,5 e 50,0 μM (Bodet et al., 2014).

Figura 2. Estrutura da Xinjiachalcona A (XCA)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Possuindo estrutura relativamente simples, ausência de centros estereogênicos, **XCA** apresenta alta versatilidade para construção de um conjunto de análogos com uma alta quimiodiversidade, assim como síntese em poucas etapas. (Fiorito et al., 2013).

2. OBJETIVOS

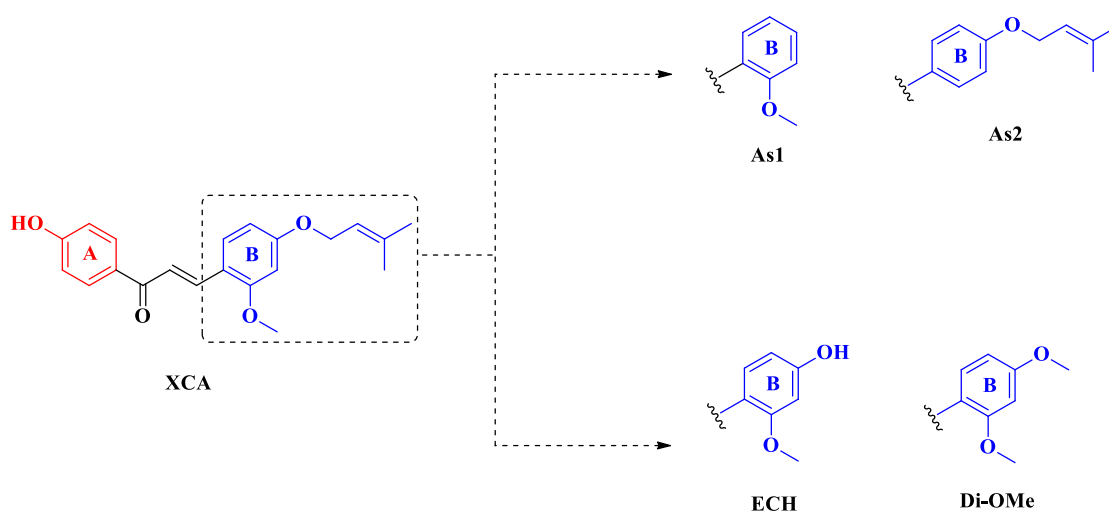
O presente estudo tem como objetivo geral a síntese total de **XCA** e análogos, bem como suas avaliações contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e micobactérias.

3. METODOLOGIA

3.1. Planejamento Molecular de Análogos Chalcônicos de XCA

A fim de analisar a relação entre estrutura química e atividade biológica de **XCA**, foi estabelecido o planejamento molecular partindo de modificações nos substituintes do anel B. A avaliação dos análogos **As1** e **As2** visam entender o efeito da supressão dos grupos em *para*-*O*-isoprenila e *orto*-metoxila, respectivamente, para a atividade antibacteriana. Os análogos equinatina (**ECH**) e 2',2'-dimetoxilado (**Di-OMe**), visam investigar a influência da remoção do grupo isoprenila, e da ausência da insaturação em relação a bioatividade (pela permuta com uma metila), respectivamente.

Esquema 1: Planejamento Molecular dos Análogos de **XCA**



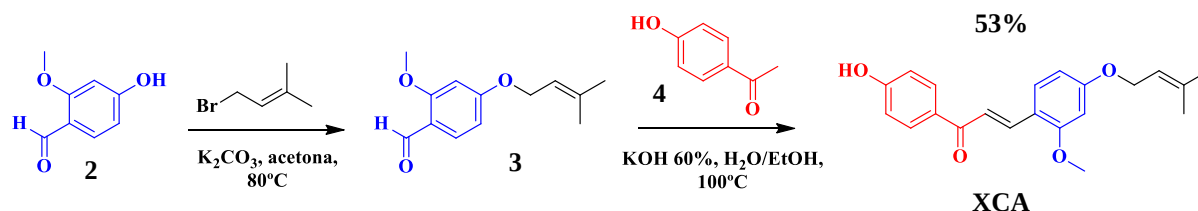
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2. Estratégias Sintéticas para Obtenção de XCA

Seguindo a metodologia de síntese de **XCA** descrita por Fiorito e colaboradores (Fiorito et al., 2013), as reações de *O*-alquilação consistiriam apenas a *O*-isoprenilação (**Esquema 2**), tendo 4-hidroxi-2-metoxibenzaldeído (**2**) como material de partida, que embora esteja disponível comercialmente, apresenta elevado custo econômico (R\$ 545,00/g, disponível em <[4-Hydroxy-2-methoxybenzaldehyde = 98.0 HPLC 18278-34-7 \(sigmaaldrich.com\)](https://www.sigmaaldrich.com)> (Acessado dia 24 de maio de 2023). Posteriormente, o aldeído *O*-

isoprenilado (3) foi submetido a reação de condensação aldólica de Claisen-Schmidt com a 4'-hidroxiacetofenona (4), resultando em xinjiachalcona A com 53% de rendimento global.

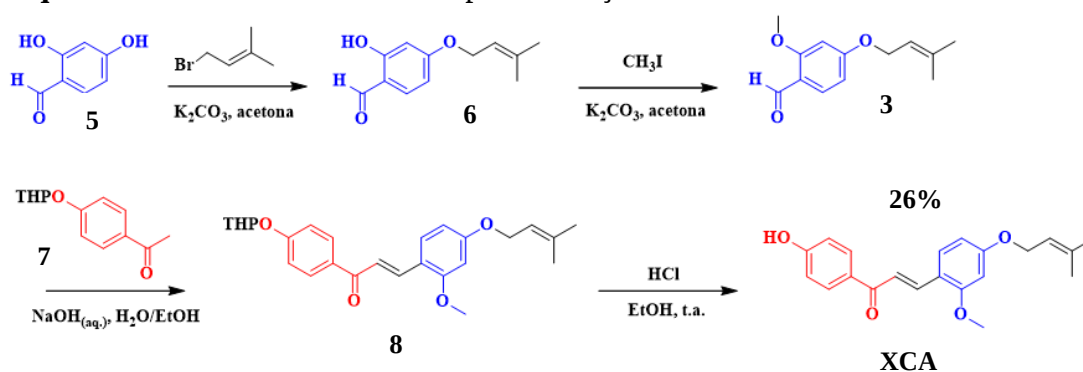
Esquema 2. Rota sintética de XCA proposta por Fiorito e colaboradores (Fiorito et al., 2013).



3.2.1. Estratégia Sintética utilizada nesse trabalho

Para contornar o problema do elevado custo econômico do material de partida, deu-se a proposta da síntese de XCA partindo do 2,4-dihidroxibenzoaldeído (5), submetendo-o à uma reação de *O*-prenilação seguida por uma reação de metilação *one-pot*. A seleção por um procedimento *one-pot* deve-se ao composto 3 ter se mostrado altamente instável. O produto foi submetido a uma reação de condensação aldólica de Claisen-Schmidt com 4 que foi, previamente, protegida com tetraidropirano (THP) para contornar a formação de subprodutos e favorecer a redução do tempo de reação (Esquema 3).

Esquema 3. Rota sintética utilizada para obtenção de XCA



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3. Ensaios Biológicos

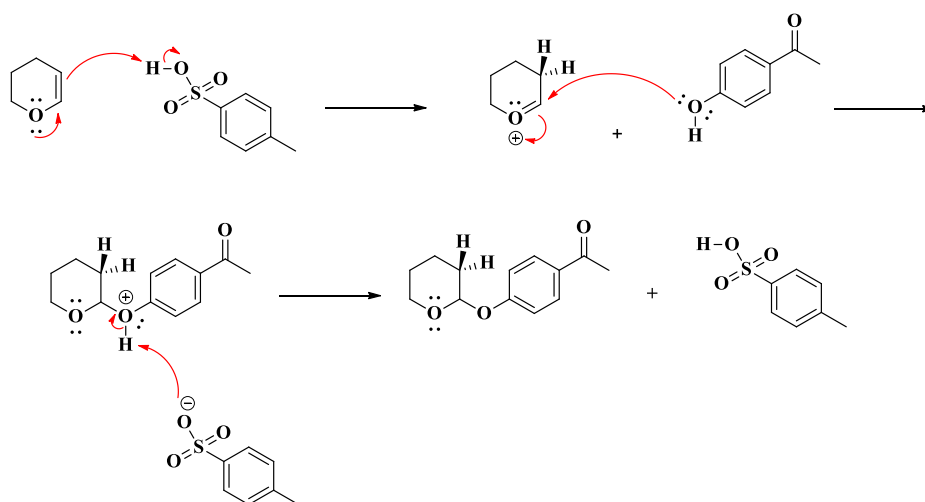
Foram empregadas cepas bacterianas da American Type Culture Collection (ATCC). As cepas foram preservadas sob criogenia a $-20^\circ C$ na coleção de culturas do Laboratório de Ensaios Antimicrobianos (LEA) do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), com colaboração do Professor Dr. Carlos Henrique Gomes Martins. Os testes foram realizados com as bactérias *Staphylococcus*

aureus (ATCC 6538), *Staphylococcus aureus* (ATCC BAA44), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 6305), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556), *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Enterococcus faecium* (ATCC 700221), *Helicobacter pylori* (ATCC 43526), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27453), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), e micobactérias *Mycobacterium tuberculosis* (ATCC 27294), *Mycobacterium kansasii* (ATCC 12478) e *Mycobacterium avium* (ATCC 25291).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A seguir foram propostos, os mecanismos das reações que compõem a rota sintética adotada para a obtenção de **XCA** e seus análogos. A reação de proteção de **4** foi catalisada com PTSA (ácido *para*-toluenossulfônico), sendo acompanhada por cromatografia em camada delgada e demonstrou ter uma conversão total, não havendo a necessidade de uma etapa de purificação (**Esquema 4**).

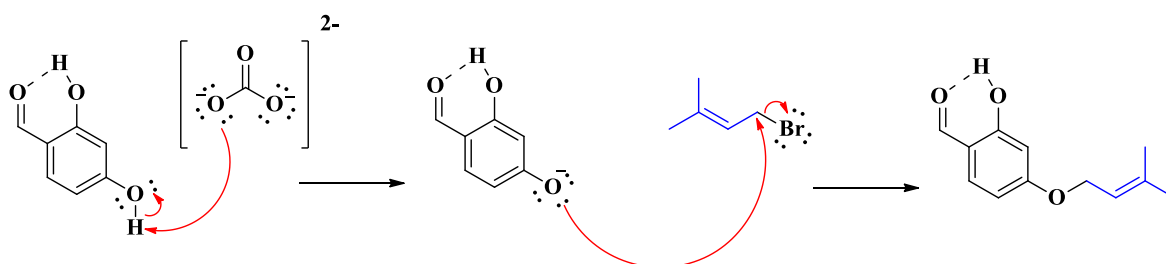
Esquema 4. Mecanismo de reação de proteção.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O aldeído **5** foi submetido às etapas de *O*-alquilação, a fim de sintetizar o intermediário **3**. A reação produziu o intermediário **6** e o aldeído di-prenilado como coproduto em baixa quantidade devido à dificuldade de desprotonar a hidroxila na posição 2 pela base (carbonato de potássio), pela presença de ligação de hidrogênio intramolecular entre o hidrogênio da hidroxila em 2 e o oxigênio carbonílico, formando um pseudo-anel (**Esquema 5**).

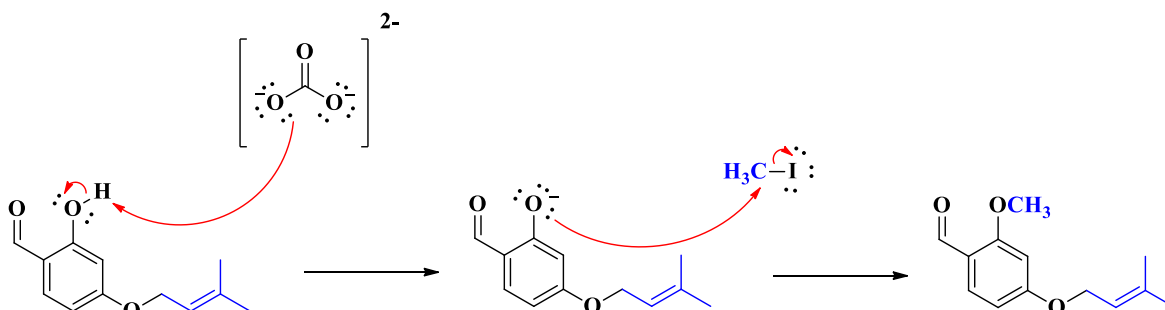
Esquema 5. Mecanismo de reação de *O*-prenilação.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nesta etapa, o produto é submetido a reação de metilação, com iodeto de metila, a fim de converter a hidroxila na posição 2 para metoxila, conforme mostra o composto **3** (**Esquema 6**). Pela instabilidade do produto **6** e devido ao meio reacional ser igual nas duas etapas de *O*-alquilação, essa reação se trata de um procedimento *one-pot*, portanto não envolveu etapas de purificação ou *work-up*. Considerando que a reação de *O*-prenilação não consome totalmente o material de partida, de acordo com monitoramento por cromatografia em camada delgada, temos o **3** como produto majoritário, o benzaldeído di-prenilado e o benzaldeído di-metoxilado.

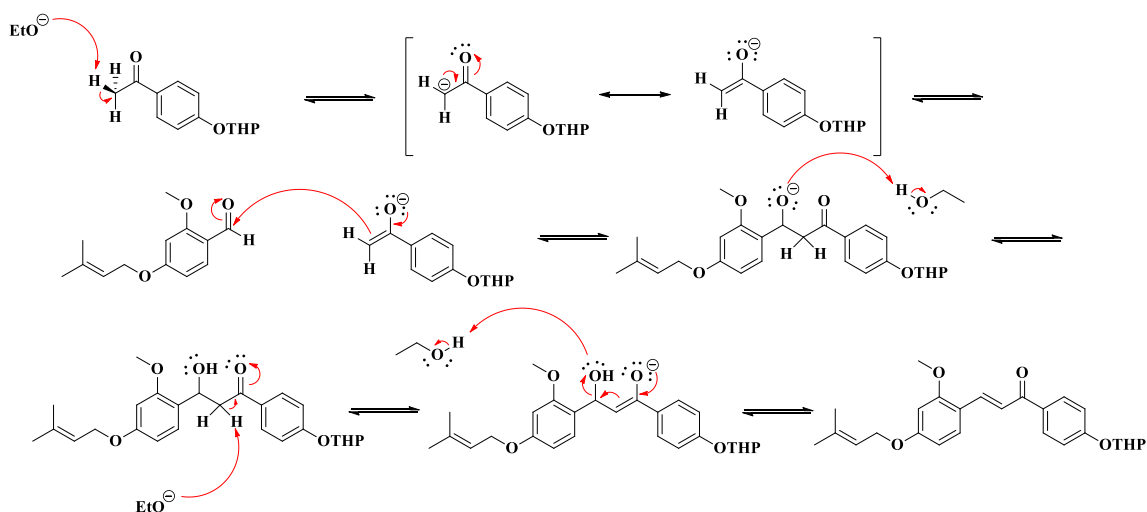
Esquema 6. Mecanismo proposto para reação de metilação.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Na reação de condensação aldólica de Claisen-Schmidt, o aldeído **3** foi adicionado em alíquotas, promovendo um rendimento maior ao se observar uma menor formação de coprodutos, que tornavam a etapa de purificação complexa. (**Esquema 7**)

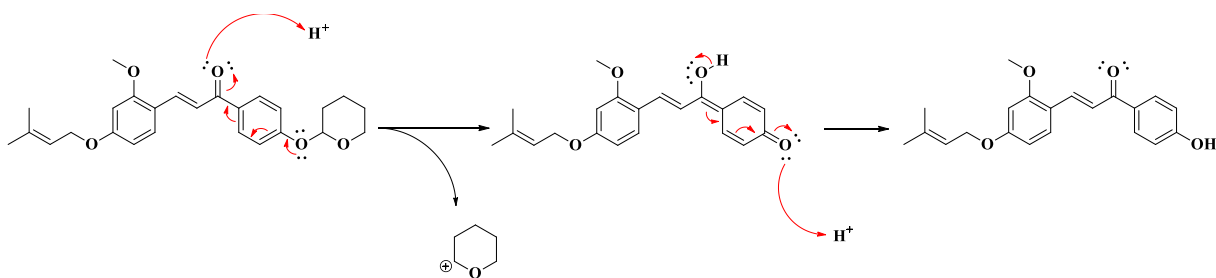
Esquema 7. Mecanismo de reação de condensação aldólica de Claisen-Schmidt.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Então com o intermediário **8**, resultante da condensação aldólica de Claisen-Schmidt, a etapa seguinte da rota sintética de **XCA** envolveu a desproteção do grupo THP. A reação de desproteção com EtOH e HCl se mostrou rápida, em 30 minutos. (**Esquema 8**).

Esquema 8. Mecanismo proposto para reação de desproteção.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A purificação do produto **XCA** por cromatografia em coluna de gel de sílica apresentou problemas, devido a co-eluição de substâncias. Então a purificação foi realizada em cromatografia em camada delgada preparativa, com fase móvel composta por hexano, acetato de etila, acetona e diclorometano (5:1:0,5:0,5) que após 5 desenvolvimentos foi possível extrair a faixa do produto desejado, utilizando MeOH grau HPLC.

Tabela 1. Rendimentos globais da síntese de **XCA** e seus análogos

Composto	Rendimento
XCA	26%
As1	73%
As2	28%
ECH	20%
Di-OMe	34%

Fonte: Elaborado pelo autor.

Podemos observar uma grande diferença entre os rendimentos mostrados na **Tabela 1**. O baixo rendimento de substâncias se deve à perda de massa, tanto durante o *work-up* quanto pela dificuldade encontrada em etapas de purificação cromatográfica, como por exemplo **As2** que apresentou coeluição de subprodutos em coluna de gel de sílica, o que resultou em mais de um processo de purificação a fim de otimizar a fase móvel. Outro baixo rendimento pode ser observado na amostra **Di-OMe**, devido a esta ter sido purificada por recristalizações sucessivas. Entretanto o alto rendimento **As1** pode ser explicado pela síntese relativamente simples (em duas etapas) e uma etapa de purificação otimizada que resultou na cristalização do produto em forma de cristais aciculares.

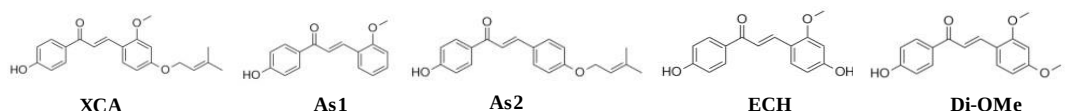
A elucidação dos espectros de RMN de ^1H confirmou a síntese de **XCA** e dos análogos que foram analisados, porém, além dos sinais já esperados para os compostos, alguns espectros apresentaram sinais de impurezas. Podemos observar também a presença de água no espectro de **ECH**, representada pela banda mais larga em aproximadamente 3,4 ppm. No espectro de **As2** encontramos dificuldade para determinação e identificação do hidrogênio referente ao carbono β da ponte cetônica.

4.1. Ensaios Biológicos

Os resultados dos ensaios biológicos (**Tabela 2**) indicam que os compostos **XCA**, **ECH** e **Di-OMe** causam efeitos inibitórios consideráveis contra *H. pylori*, sendo **ECH** mais ativa não só contra *H. pylori*, como contra outras bactérias Gram-positivas. Observa-se que **XCA** e **Di-OMe** mostraram potente atividade contra *M. tuberculosis* em comparação com as demais substâncias. Todavia a inibição de **XCA** causada contra *H.*

pylori foi menor que a de **ECH**, o que pode indicar que o grupo isoprenila não desempenhou a função importante para a bioatividade.

Tabela 2. Atividade antibacteriana de **XCA** e seus análogos expressa em valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM em μM).

													
Código	μM												
	<i>S.a.</i> ¹	<i>S.a.</i> ²	<i>S.p.</i>	<i>S.so.</i>	<i>S.sa.</i>	<i>S.m.</i>	<i>E.f.</i>	<i>P.a.</i>	<i>K.p.</i>	<i>H.p.</i>	<i>M.a.</i>	<i>M.k.</i>	<i>M.t.</i>
XCA	>1182	1182	1182	>1182	>1182	>1182	>1182	>1182	>1182	147,7	369,4	2955,1	46,15
As1	>1573	>1573	>1573	>1573	1573	>1573	1573	>1573	>1573	>1573	3932,6	3932,6	245,8
As2	>1297	>1297	>1297	>1297	1297	>1297	162,1	>1297	>1297	648,6	1621,4	3242,8	202,7
ECH	185	185	>1480	370	185	370	nd	>1480	>1480	115,6	115,6	231,2	115,6
Di-OMe	>1407	>1407	>1407	>1407	>1407	>1407	>1407	>1407	>1407	175,8	>3517	>3517	55
Tetraciclina	13,3	0,2	0,4	–	–	–	1,8	13,3	3,3	3,3	–	–	–
Clorexidina	–	–	–	3,6	1,8	0,9	–	–	–	–	–	–	–
Isoniazida	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	7,3	7,3	3,6

*S. a.*¹ : *Staphylococcus aureus* ATCC (BAA44) (MRSA); *S. a.*² : *Staphylococcus aureus* ATCC (6538); *S. p.* : *Streptococcus pneumoniae* ATCC (6305); *S. so.* : *Streptococcus sobrinus* ATCC (33478); *S. sa.* : *Streptococcus sanguinis* ATCC (10556); *S. m.* : *Streptococcus mutans* ATCC (25175); *E. f.* : *Enterococcus faecium* ATCC (700221); *P. a.* : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC (27453); *K. p.* : *Klebsiella pneumoniae* ATCC (13883); *H. p.* : *Helicobacter pylori* ATCC (43526); *M. a.* : *Mycobacterium avium* ATCC (25291); *M. k.* : *Mycobacterium kansasii* ATCC (12478); *M. t.* : *Mycobacterium tuberculosis* ATCC (27294).

nd : Ensaios não determinados.

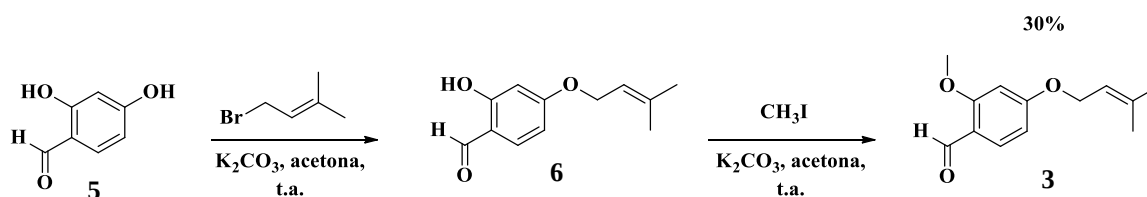
Fonte: Elaborado pelo autor.

5. CONCLUSÃO

As substâncias planejadas neste trabalho foram sintetizadas a partir da rota sintética inédita, utilizando proteção/desproteção com THP, condensação aldólica de Claisen-Schmidt e síntese de Williamson, com rendimentos globais entre 20% e 73%. Os compostos **XCA**, **ECH**, **Di-OMe** apresentaram valores de concentração inibitória mínima de 147,7 μM , 115,6 μM e 175,8 μM , respectivamente, contra *H. pylori* e o composto **As2** apresentou valor de concentração inibitória mínima de 162,1 μM contra *E. faecium*, ambos patógenos integrantes da lista de prioridade de desenvolvimento de novos fármacos antibióticos da Organização Mundial da Saúde (OMS). Além disso, podemos apontar também os valores de concentração inibitória mínima contra *M. tuberculosis* das substâncias **XCA** e **Di-OMe** de 46,15 μM e 55 μM , respectivamente.

6. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

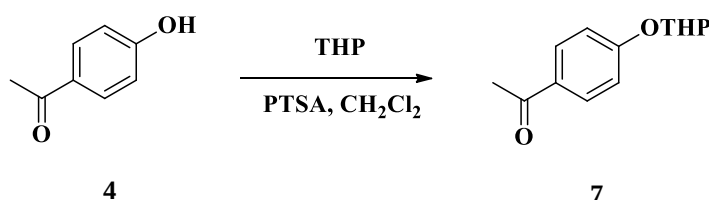
6.1. Procedimentos gerais de *O*-alquilação (Reação em *one-pot*)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Síntese de 3: Primeiro, submeteu-se o **10** à reação de *O*-isoprenilação. Para isso adicionou-se 250 mg do **10** (1,8 mmol) em um balão e fora solubilizado em 5 mL de acetona anidra e levou-se para agitação magnética juntamente com 363 mg de carbonato de potássio. Após solubilização completa, adicionou-se 200 μL de brometo de isoprenila (1,8 mmol). A reação foi mantida à temperatura ambiente, sendo monitorada por cromatografia em camada delgada por 4,5 h. Após esse período, foram adicionados 112 μL de iodeto de metila (1,8 mmol) e mais 250 mg de carbonato de potássio, favorecendo a reação de metilação por mais 3,5 h. O *work-up* deu-se por extrair o produto bruto por partição líquido-líquido com acetato de etila, água destilada (10 mL) e solução saturada de cloreto de sódio (10mL). Posteriormente a fase orgânica foi seca com adição de sulfato de magnésio, filtrada e o solvente foi removido por rota-evaporação. O produto foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica, utilizando hexano e acetato de etila (9:1) como fase móvel, obtendo-se um sólido branco com rendimento de 30%.

6.2. Procedimentos gerais para as reações de proteção com THP

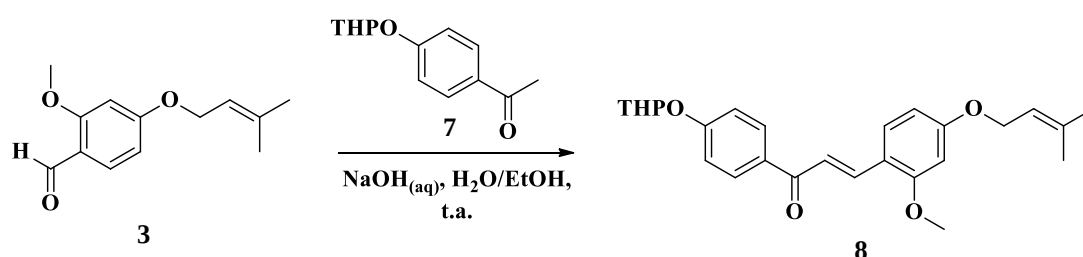


Fonte: Elaborado pelo autor.

Síntese de 7: A reação de proteção com THP se deu pela pesagem de 500 mg de **4** (3,67 mmol) num balão com 0,4 mL de tetraidropirano (THP) (4,4 mmol) dissolvidos em 12 mL de diclorometano. Após a solubilização dos reagentes, foram adicionados 92

mg de PTSA (0,367 mmol). Após 1,5 h, foram adicionados 10 mL de bicarbonato de sódio e então a reação foi finalizada. O *work-up* deu-se pela extração do produto bruto com diclorometano, o qual foi lavado com água destilada (10 mL) e com solução saturada de cloreto de sódio (10 mL). Posteriormente a fase orgânica foi seca com adição de sulfato de magnésio, filtrada e o solvente foi removido por rota-evaporação. Não houve a necessidade de purificação por técnicas cromatográficas devido à alta taxa de conversão dos reagentes e sem a detecção de coprodutos. Um sólido cristalino branco foi obtido com rendimento de 90%.

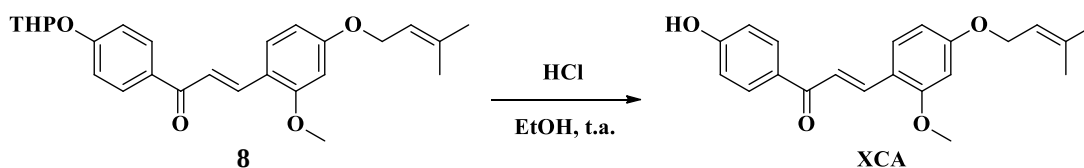
6.3. Procedimentos gerais de condensação aldólica de Claisen-Schmidt



Fonte: Elaborado pelo autor.

Síntese de 8: Em um balão reacional foram pesados 143 mg de **7** (0,68 mmol), os quais foram solubilizados em etanol (5 mL) sob banho de gelo. Foram adicionados 54 mg de hidróxido de sódio (1,36 mmol) solubilizados em etanol (2 mL) e após 20 min foram adicionados 150 mg de **3** (0,68 mmol) em 3 alíquotas. A reação foi monitorada por cromatografia em camada delgada e após 12 h, o meio reacional foi vertido em gelo. O *work-up* se deu pela extração do produto bruto com acetato de etila, sendo a fase orgânica lavada com água destilada (10 mL) e com solução saturada de cloreto de sódio (10 mL). A fase acetato de etila foi seca com adição de sulfato de magnésio, filtrada e o solvente foi removido por rota-evaporação. A tentativa de purificação se deu por cromatografia em coluna de gel de sílica, eluída com hexano e acetato de etila (7:1). Contudo, a purificação não foi efetiva e o produto bruto foi submetido à desproteção, a fim de favorecer a separação de subprodutos chalcônicos em CCD.

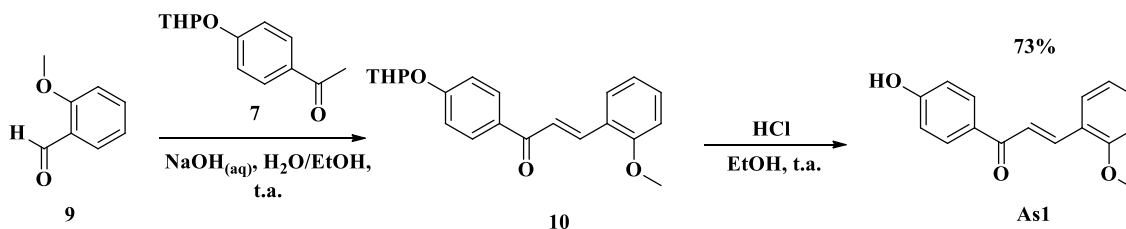
6.4. Procedimentos gerais para a reação de desproteção



Fonte: Elaborado pelo autor.

Síntese de XCA: A amostra **8** foi solubilizada em 5 mL de etanol em um balão reacional sob banho de gelo. Então foram adicionados 0,1 mL de HCl 1 mol L⁻¹ e após 30 min a reação foi interrompida, pois o monitoramento cromatográfico mostrava que o reagente estava completamente desprotegido, então a solução foi vertida em gelo e 12 h depois foi extraído 3 × com uma mistura de hexano e acetato de etila (2:3). O solvente foi removido por rota-evaporação e o produto bruto foi purificado por cromatografia em camada delgada preparativa desenvolvida com hexano, acetato de etila, acetona e diclorometano (5:1:0,5:0,5), posteriormente a sílica foi submetida à maceração com metanol (3 ×). A solução extrativa foi seca por rota-evaporação, obtendo-se um sólido amarelo com rendimento global de 26%.

6.5. Procedimento geral para obtenção de As1

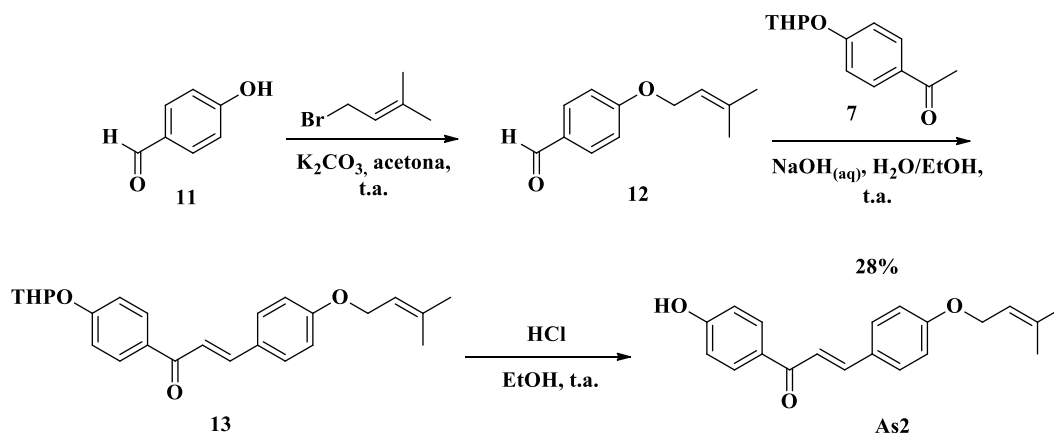


Fonte: Elaborado pelo autor.

Síntese de As1: Em um balão reacional foram adicionados 242 mg de **7** (1,1 mmol), a qual foi solubilizada em etanol (5 mL) sob banho de gelo e agitação para adição de 88 mg de hidróxido de sódio (2,2 mmol) solubilizado em etanol (2 mL). Após 20 min foram adicionados 150 mg de **9** em 3 alíquotas, sendo a conversão monitorada por cromatografia em camada delgada. Após 12 h, o meio reacional foi vertido no gelo. O *work-up* se deu pela extração do produto bruto com acetato de etila, sendo a fase orgânica particionada com água destilada (10 mL) e com solução saturada de cloreto de sódio (10 mL). A fase orgânica foi seca com adição de sulfato de magnésio, filtrada e o solvente foi removido por rota-evaporação. O produto **10** foi submetido ao procedimento usual de desproteção e purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica, eluída com hexano

e acetato de etila (4:1), obtendo-se cristais aciculares translúcidos com rendimento de 73%.

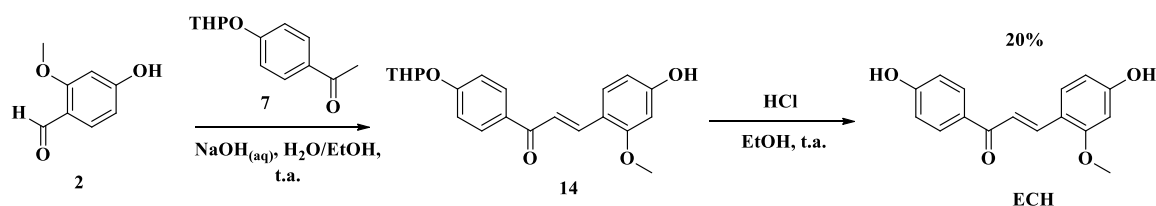
6.6. Procedimento geral para obtenção de As2



Fonte: Elaborado pelo autor.

Síntese de As2: Colocou-se em um balão sob banho de gelo 202 mg de carbonato de potássio e 5 mL de acetona, seguido de 122 mg de **11** (1,0 mmol) solubilizados em 2 mL de acetona. Posteriormente, foi adicionado 137 μ L de brometo de isoprenila (1,2 mmol) em quatro alíquotas em intervalos de 10 min. Após 2 h, todo o material de partida foi consumido. A reação foi interrompida e o produto da reação foi lavado com água destilada (10 ml) e depois foi extraído 3 $\times$ com uma mistura de hexano e acetato de etila (2:3), depois o solvente foi removido por rota-evaporação obtendo-se o composto **12** caracterizado por um óleo amarelado. Em seguida, foi realizada a reação de Claisen-Schmidt, onde o primeiro passo da reação é adicionar em um balão, 184 mg de **7** (0,84 mmol) solubilizada em 5 mL de etanol. Em seguida foi adicionado 56 mg de hidróxido de sódio (1,4 mmol) dissolvidos em 2 ml de etanol. Após 20 min, o aldeído **12** foi adicionado em 4 alíquotas em intervalos de 20 min. Após 24 h, a reação foi interrompida após o consumo total do aldeído **12** ser detectado por cromatografia em camada delgada. O produto bruto foi extraído com acetato de etila e lavado de com água destilada (10 mL) e com solução saturada de cloreto de sódio (10 mL). A fase orgânica foi seca com adição de sulfato de magnésio, filtrada e o solvente removido por rota-evaporação. O produto foi submetido ao procedimento usual de desproteção e purificado por meio de cromatografia em coluna de gel de sílica com uma hexano e acetato de etila (4:1), obtendo um sólido amarelo, rendimento 28%.

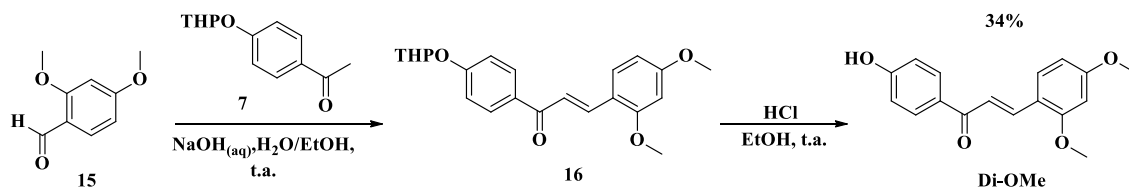
6.7. Procedimento geral para obtenção de ECH



Fonte: Elaborado pelo autor.

Síntese de ECH: Colocou-se em um balão 200 mg de **7** (0,91 mmol) solubilizado em etanol (5 mL) sob banho de gelo para adição de 80 mg de hidróxido de sódio (2,0 mmol) dissolvidos em 2 mL de etanol. Após 20 min foram adicionados 180 mg de **2** (0,92 mmol) em 4 alíquotas em intervalos de 20 min. Monitorada por CCD, a reação foi interrompida após 10 h e o meio reacional foi vertido no gelo. O produto bruto foi submetido ao procedimento de lavagem com água destilada e solução saturada de cloreto de sódio, secagem com sulfato de magnésio, filtração e remoção do solvente por rota-evaporação. Após isso o produto **14** foi submetido ao procedimento de desproteção e purificação por cromatografia em coluna de gel de sílica com fase móvel de hexano e acetato de etila (3:2), obtendo-se um cristal amarelado com rendimento global de 20%.

6.8. Procedimento geral para obtenção de Di-OMe



Fonte: Elaborado pelo autor.

Síntese de Di-OMe: Pesou-se 264 mg de **7** em um balão reacional, solubilizou-se em etanol (5 mL) sob banho de gelo, então foi adicionado hidróxido de sódio (1,8 mmol) dissolvidos em 2 mL de etanol. Após 20 min foram adicionados 200 mg do aldeído **15** (1,2 mmol) em 4 alíquotas em intervalos de 20 minutos. A reação foi monitorada por CCD e interrompida após 14h, posteriormente o meio reacional foi vertido em gelo triturado, seguido pelo processo de lavagem com água destilada e acetato de etila, a secagem se deu por lavagem com solução saturada de cloreto de sódio, depois foi adicionado sulfato de magnésio como agente secante. Houve então uma filtração e o solvente foi removido por rota-evaporação. Após isso o produto **16** foi submetido a

desproteção e a purificação se deu por recristalização EtOH/H₂O, obtendo-se um sólido amarelo com rendimento global de 34%.

7. ENSAIOS BIOLÓGICOS

7.1. Ensaios antibacterianos

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 96 microplacas, usando resazurina como colorimétrico da viabilidade da célula. As substâncias foram solubilizadas em DMSO (Synth, Diadema-SP, Brasil), com concentração 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 5×10^5 unidades de formação de colônia (CFU mL⁻¹), 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 utilizadas como controle positivo. 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 o crescimento dos microorganismos, indicado pela mudança da cor azul da resazurina para rosa.

7.2. Ensaios contra *Helicobacter pylori*

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 µg 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.

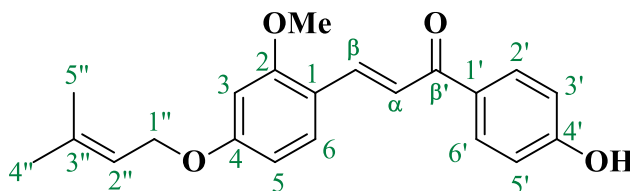
REFERÊNCIAS

- ❖ BODET, C. et al. Antibacterial activities of oxyprenylated chalcones and naphthoquinones against *Helicobacter pylori*. *Nat. Prod. Commun.*, v. 9, p. 1299–1301, 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.
- ❖ FIORITO, S. et al. In vitro antiproliferative effect of naturally occurring oxyprenylated chalcones. *Nat. Prod. Commun.*, v. 8, p. 1089–1092, 2013.
- ❖ MITTAL, A. et al. A theoretical assessment of the structural and electronic features of some retrochalcones. *Int J Quantum Chem.*, 26797, 2021.
- ❖ ROCKE, A. J. Hypothesis and experiment in the early development of Kekulé's Benzene theory, *Annals of Science*, 42:4, 355-381, 1985.
- ❖ THE LANCET. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. v. 339, p. 629 - 655, 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: 25 abril 2023.
- ❖ WHO, World Health Organization. Global Tuberculosis Report. Geneva: 2021. Disponível em: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/. Acesso em: 17 maio 2023.
- ❖ ZHUANG, C. et al. Chalcone: A Privileged Structure in Medicinal Chemistry. *Chem. Rev.*, v. 117, p. 7762–7810, 2017.

ANEXOS

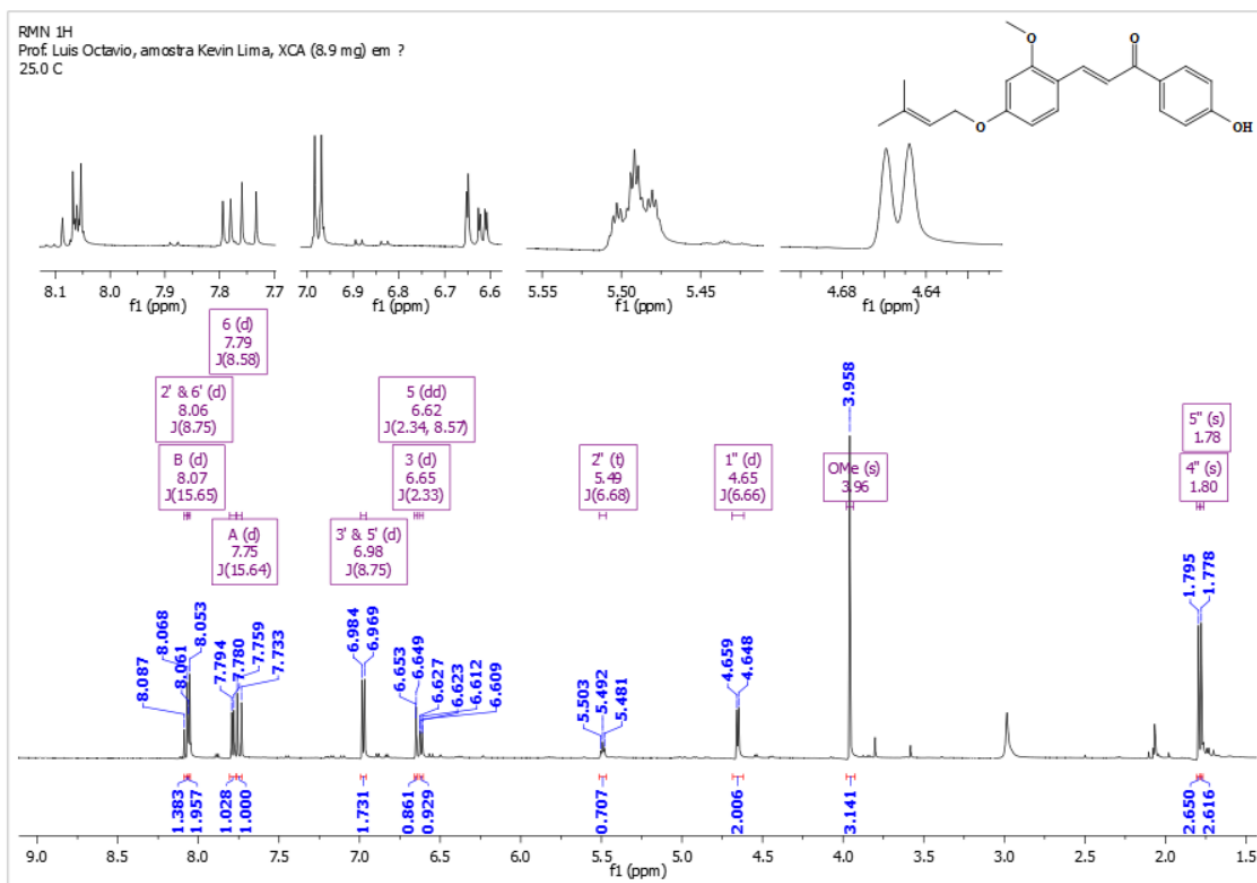
Espectros de RMN de ^1H

Figura 3. Estrutura geral para identificação dos hidrogênios dos espectros



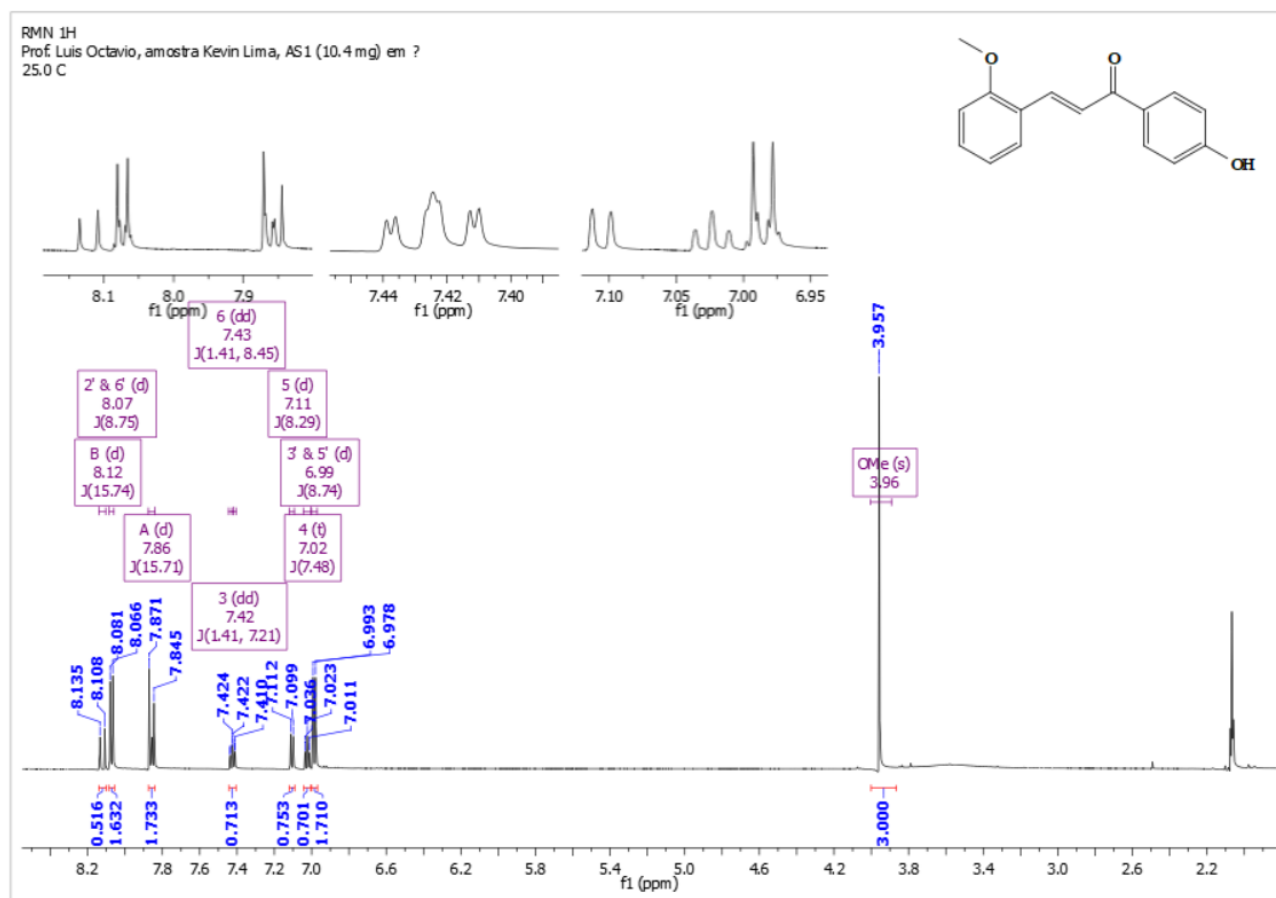
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 4. Espectro de RMN de ^1H de XCA. (600MHz – acetona- d_6)



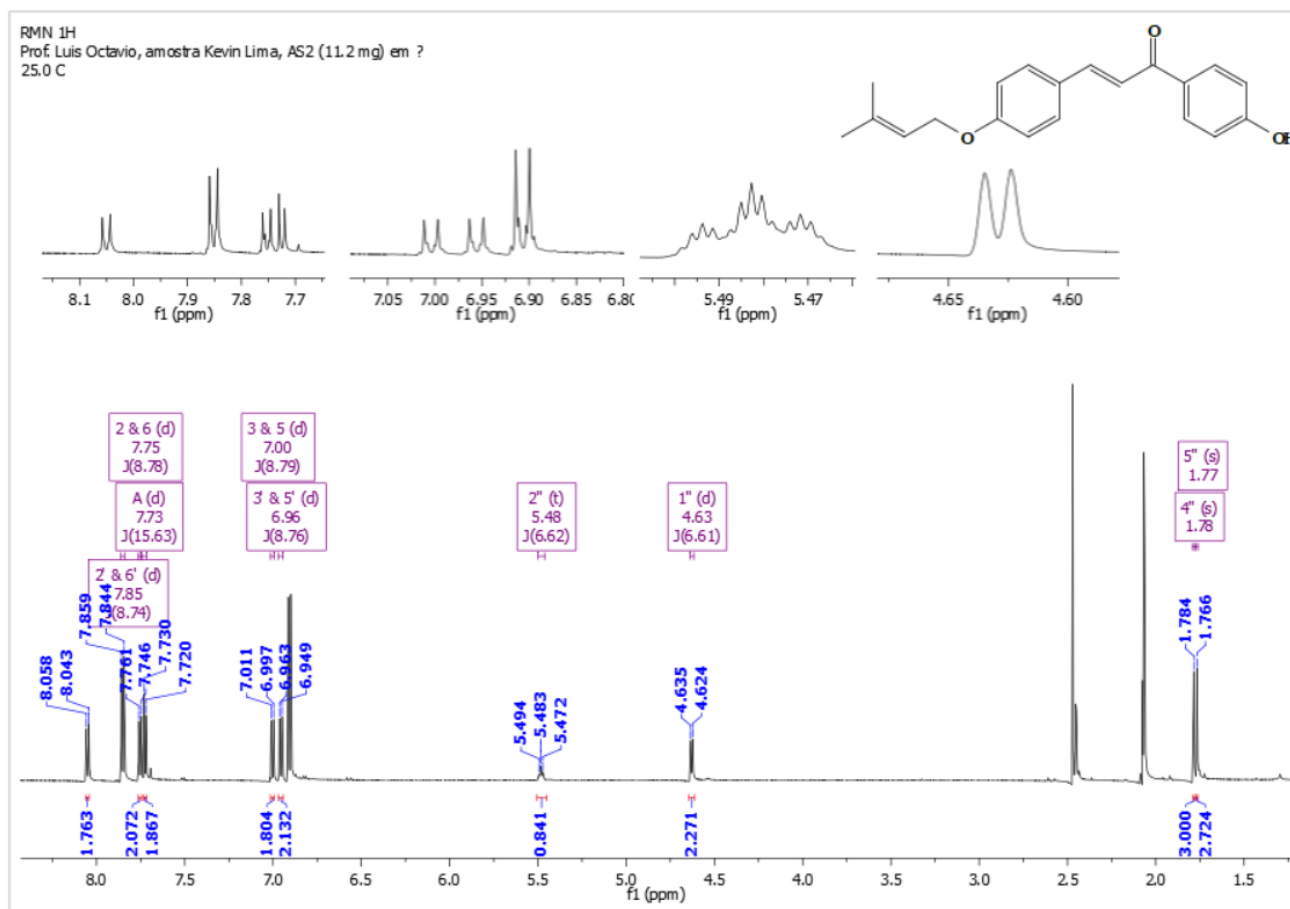
^1H NMR (600 MHz, Acetona) δ 8.07 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H), 8.06 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.79 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.75 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H), 6.98 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.65 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 6.62 (dd, $J = 8.6, 2.3$ Hz, 1H), 5.49 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H), 4.65 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H), 3.96 (s, 3H), 1.80 (s, 3H), 1.78 (s, 3H).

Figura 5. Espectro de RMN de ^1H de **As1**. (600MHz – acetona- d_6)



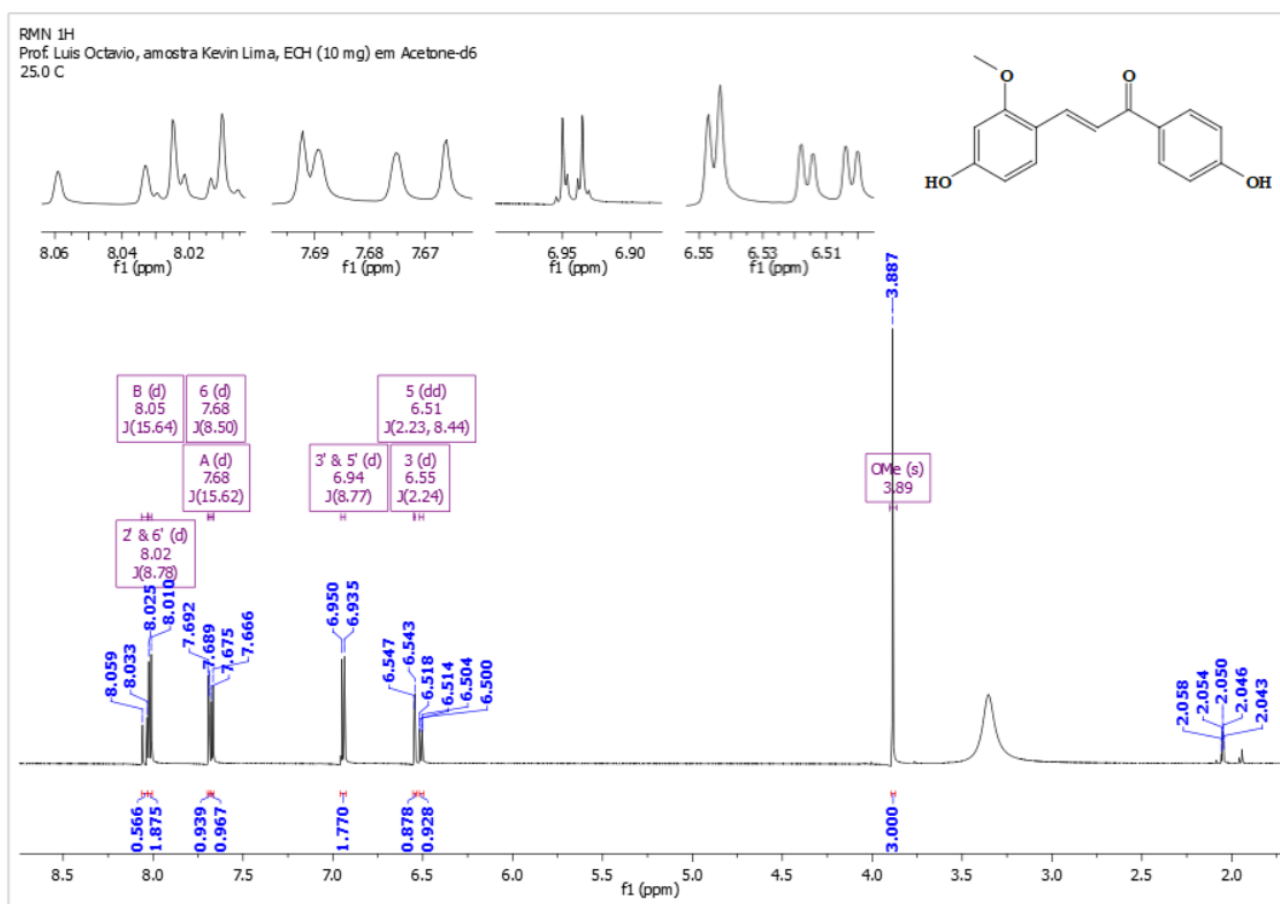
^1H NMR (600 MHz, Acetona) δ 8.12 (d, $J = 15.7$ Hz, 1H), 8.07 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.86 (d, $J = 15.7$ Hz, 2H), 7.43 (dd, $J = 8.4, 1.4$ Hz, 1H), 7.42 (dd, $J = 7.2, 1.4$ Hz, 1H), 7.11 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.02 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 6.99 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 3.96 (s, 3H).

Figura 6. Espectro de RMN de ^1H de **As2**. (600MHz – acetona- d_6)



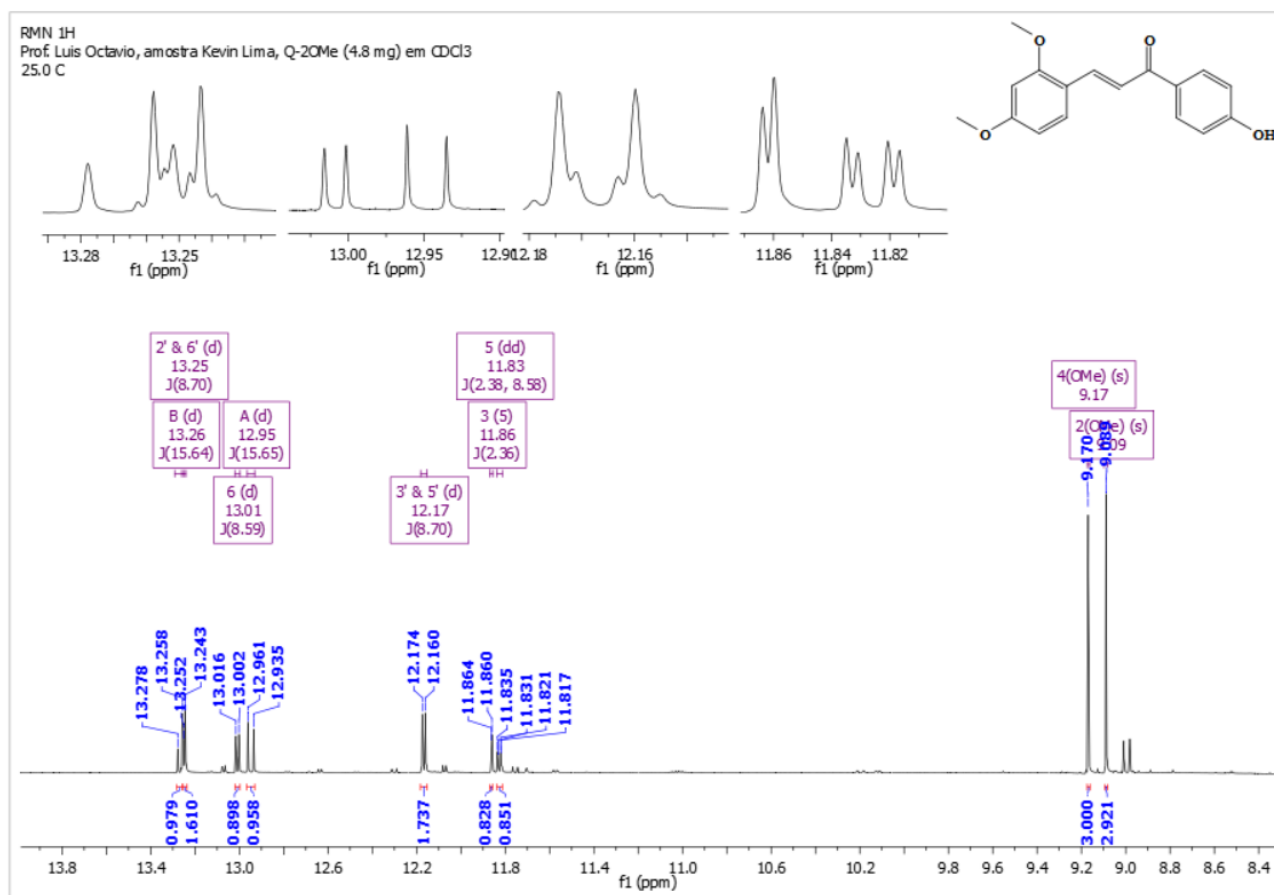
^1H NMR (600 MHz, Acetona) δ 7.85 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.75 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.73 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 7.00 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 6.96 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 5.48 (t, J = 6.6 Hz, 1H), 4.63 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 1.78 (s, 1H), 1.77 (s, 1H).

Figura 7. Espectro de RMN de ^1H de ECH. (600MHz – acetona- d_6)



^1H NMR (600 MHz, Acetona) δ 8.05 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 8.02 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.68 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.68 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 6.94 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.55 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 6.51 (dd, J = 8.4, 2.2 Hz, 1H), 3.89 (s, 3H).

Figura 8. Espectro de RMN ^1H de **Di-OMe** (600MHz – CDCl_3)



^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 13.26 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H), 13.25 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 13.01 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 12.95 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H), 12.17 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 11.86 (s, $J = 2.4$ Hz, 1H), 11.83 (dd, $J = 8.6, 2.4$ Hz, 1H), 9.17 (s, 3H), 9.09 (s, 3H).

Espectros de RMN de ^{13}C

Figura 9. Espectro de RMN de ^{13}C de **XCA** (Acetona- d_6 , 151MHz)

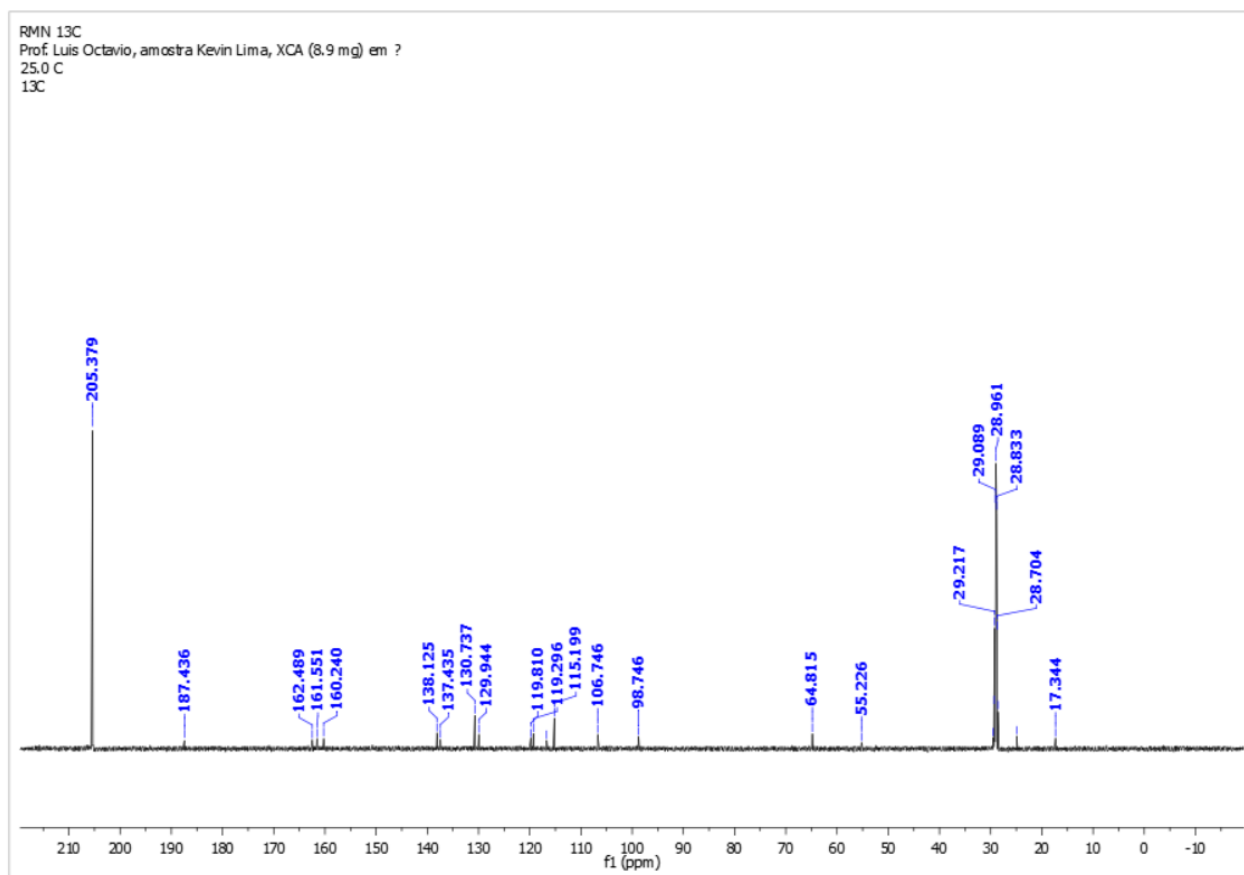


Figura 10. Espectro de RMN de ^{13}C de **As1** (Acetona- d_6 , 151MHz)

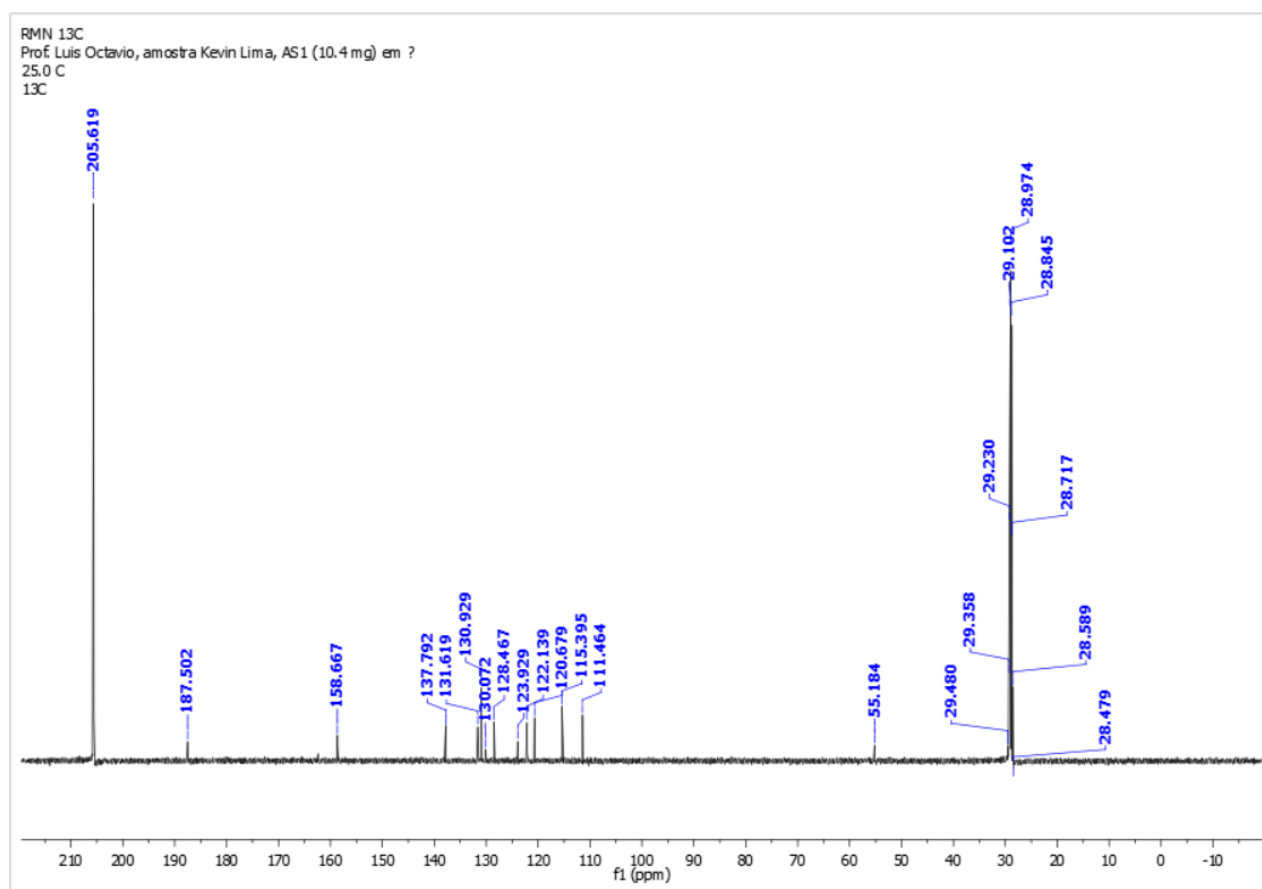


Figura 11. Espectro de RMN de ^{13}C de As2 (Acetona- d_6 , 151MHz)

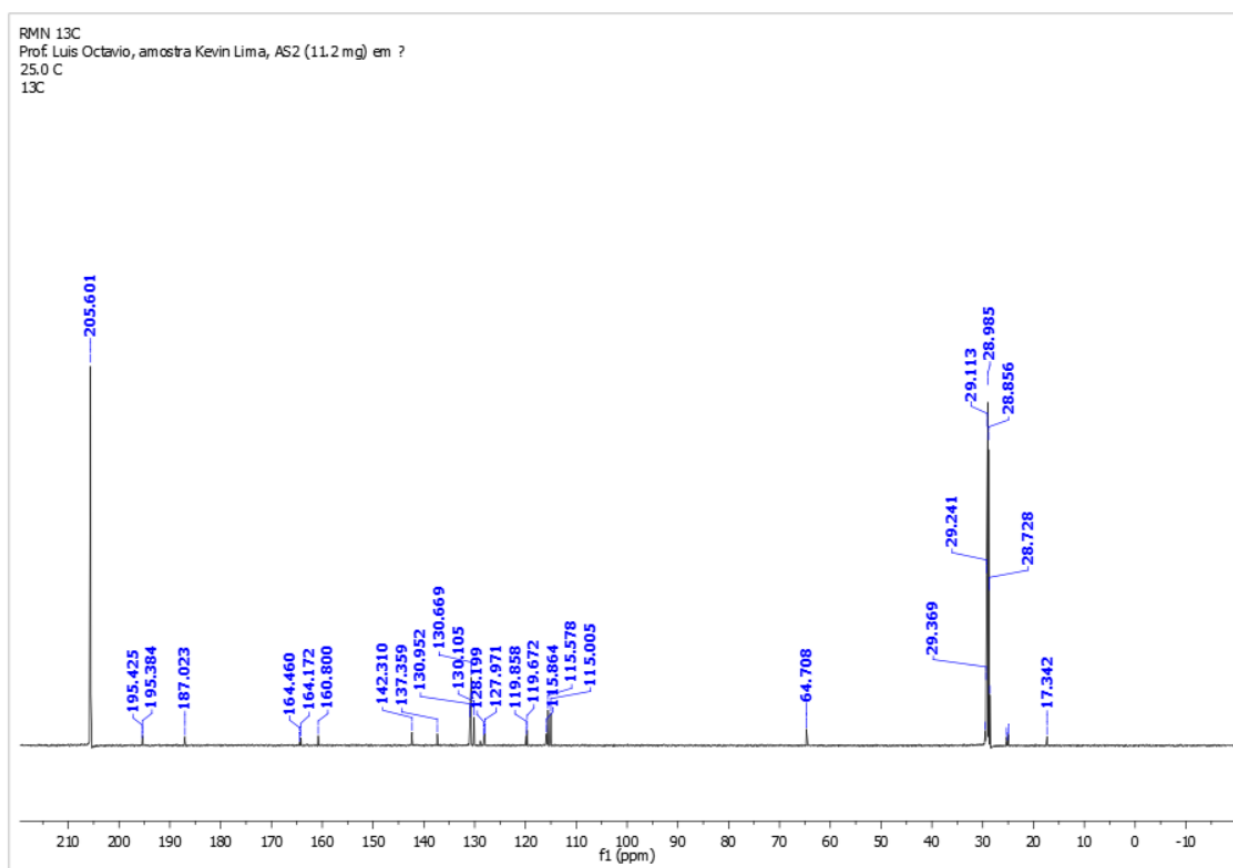


Figura 12. Espectro de RMN de ^{13}C de ECH (Acetona- d_6 , 151MHz)

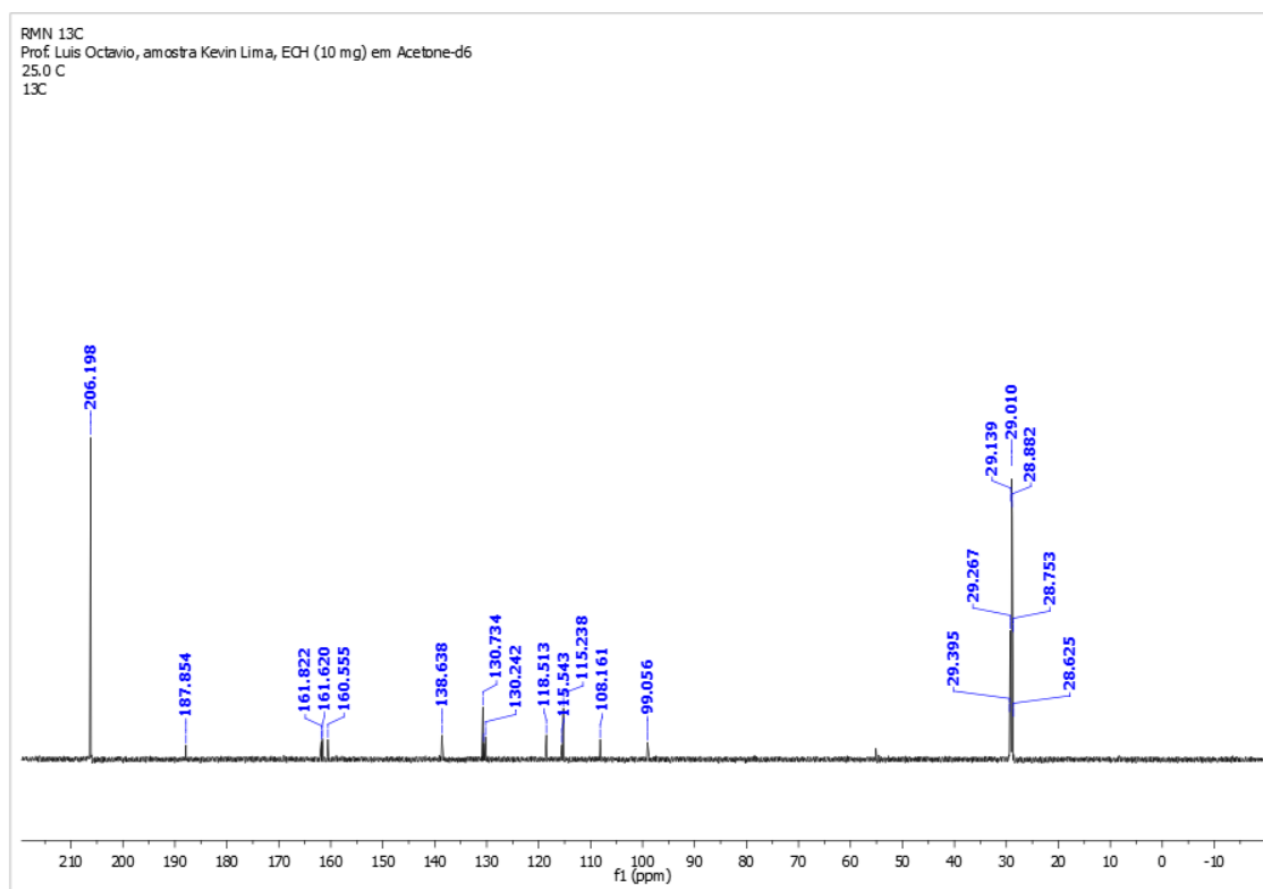


Figura 13. Espectro de RMN de ^{13}C de **Di-OMe** (CDCl_3 , 151MHz)

