



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE BIOLÓGICA DE NITROCHALCONAS E DE
CHALCONAS DERIVADAS DA
6-ACETIL-2H-1,4-BENZOXAZIN-3(4H)-ONA**

Marlon Norberto Sechini Cordeiro

Florianópolis
2013

Marlon Norberto Sechini Cordeiro

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE BIOLÓGICA DE NITROCHALCONAS E DE
CHALCONAS DERIVADAS DA
6-ACETIL-2H-1,4-BENZOXAZIN-3(4H)-ONA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Química**.

Área de concentração: Química Orgânica e Medicinal

Orientador: Prof. Dr. Ricardo José Nunes

Co-orientadora: Dra. Louise Domeneghini

Chiaradia Delatorre

Florianópolis, SC, Brasil

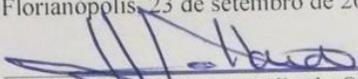
2013

Marlon Norberto Sechini Cordeiro

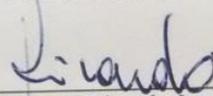
**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE BIOLÓGICA DE NITROCHALCONAS E DE
CHALCONAS DERIVADAS DA
6-ACETIL-2H-1,4-BENZOXAZIN-3(4H)-ONA**

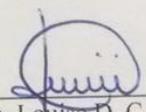
Esta Dissertação de Mestrado foi julgada e aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Química** no **Programa de Pós-Graduação em Química** da Universidade Federal de Santa Catarina.

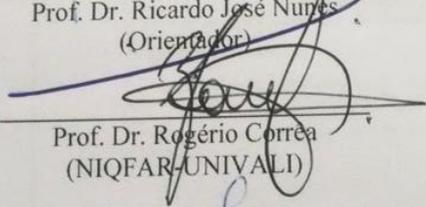
Florianópolis, 23 de setembro de 2013.


Prof. Dr. Hugo Alejandro Gallardo Olmedo
(Coordenador do Programa)

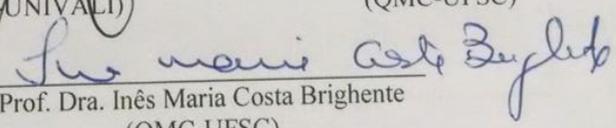
BANCA EXAMINADORA:


Prof. Dr. Ricardo José Nunes
(Orientador)


Dra. Louise D. C. Delatorre
(Co-orientadora)


Prof. Dr. Rogério Correa
(NIQFAR-UNIVALI)

Prof. Dr. José Carlos Gesser
(QMC-UFSC)


Prof. Dra. Inês Maria Costa Brighente
(QMC-UFSC)

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Cordeiro, Marlon Norberto Sechini

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
BIOLÓGICA DE NITROCHALCONAS E DE CHALCONAS DERIVADAS DA 6-
ACETIL-2H-1,4-BENZOXAZIN-3(4H)-ONA / Marlon Norberto
Sechini Cordeiro ; orientador, Ricardo José Nunes ; co-
orientador, Louise Domeneghini Chiaradia Delatorre. -
Florianópolis, SC, 2013.

122 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas.
Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Chalconas. 3. Tuberculose. 4.
Leishmaniose. I. Nunes, Ricardo José. II. Delatorre,
Louise Domeneghini Chiaradia. III. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. IV.
Título.

Gostaria de agradecer imensamente a meus pais pelo apoio durante todo o período de estudos e aprendizagem, por todo o carinho e amor incondicional, pela dedicação e compreensão em todos os momentos que não pude estar por perto.

A Bruna por toda a atenção, carinho, compreensão e amor nas mais diversas situações, principalmente nos momentos de adversidade onde conseguiu me fazer perceber que nunca devemos desistir e que dias melhores sempre são possíveis, basta batalharmos para isso.

A amiga, quase uma irmã, que sempre me apoiou e confiou no trabalho. Lou por todos os conselhos, debates ao longo da realização do trabalho e também pelas broncas e chamadas de atenção sem as quais certamente o trabalho não teria sido concluído só posso dizer meu obrigado de coração.

Aos amigos e colegas dos mais diversos grupos que foram compreensivos quando me ausentei de eventos e sociais, quero agradecer pela compreensão.

Aos meus colegas de laboratório, obrigado pelas conversas e pela jornada que trilhamos juntos, certo de que estas resultaram em bons frutos para todos.

Ao meu orientador Ricardo, só posso agradecer pela compreensão nos momentos de dificuldade, pelo apoio no trabalho e pela confiança na realização deste projeto.

Agradeço aos membros da banca avaliadora, Prof. Dr. Rogério Correa, Prof. Dr. José Carlos Gesser e Prof. Dra. Inês Maria Costa Brighente, por terem aceito o convite e pelas contribuições ao trabalho.

A Central de Análises do Departamento de Química da UFRJ pelas análises espectroscópicas das chalconas, e aos funcionários do Departamento de Química da UFRJ, Grace e Judir, pelo apoio ao longo do mestrado, meu muito obrigado.

Aos professores Hernan Terenzi e Mário Steindel, assim como à suas alunas Angela Carminatti e Milene Moraes meu agradecimento pelo suporte e pela realização dos ensaios biológicos.

A todos aqueles que não citei, mas que de alguma forma passaram por esta jornada ao meu lado, meu muito obrigado.

Dedico este trabalho a pessoa que mais me apoiou em todos os momentos, que compreendeu minhas falhas e defeitos e conseguiu me fazer crescer a cada momento. Bruna, toda batalha fica mais simples ao seu lado...

"Os químicos são uma estranha classe de mortais, impelidos por um impulso quase insano a procurar seus prazeres em meio a fumaça e vapor, fuligem e chamas, veneno e pobreza, e no entanto, entre todos esses males, tenho a impressão de viver tão agradavelmente que preferiria morrer a trocar de lugar com o rei da Pérsia. "

Johann Joachim Becher,

Physica Subterranea (1667).

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo a síntese e caracterização de duas séries de chalconas, uma derivada da CH8 (previamente patenteada pelo grupo), contendo o grupo nitro na posição 3 ou 3' (série ML) e a outra derivada da 6-acetil-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona (série MN), bem como a posterior avaliação biológica de todos os compostos obtidos. Os compostos da série ML foram avaliados como inibidores das proteínas tirosina fosfatase PtpA e PtpB de *Mycobacterium tuberculosis*, e não apresentaram atividades significativas. Foram também avaliados como agentes anti-leishmania, e de modo geral observou-se que apresentaram inibição superior a 60% para as formas amastigotas de *Leishmania amazonensis*, sendo (2E)-1-(4-metoxifenil)-3-(2-nitrofenil)prop-2-en-1-ona (ML3) o mais promissor, devido ao seu elevado índice de seletividade quando comparado aos outros compostos do estudo (IS = 15,58). A avaliação dos compostos da série MN revelou 3 chalconas com promissora atividade inibitória das proteínas PtpA e PtpB de *Mycobacterium tuberculosis*, para os quais foram determinados os valores de IC₅₀: (2E)-6-(3-(3,4-diclorofenil)acrilóil)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona (MN1) (IC₅₀ = 18,44 ± 4,71 para PtpB e IC₅₀ = 28,11 ± 0,33 para PtpA), (2E)-6-(3-(4-bromofenil)acrilóil)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona (MN5) (IC₅₀ = 16,71 ± 0,29 para PtpA) e (2E)-6-(3-(3nitrofenil)acrilóil)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona (MN10) (IC₅₀=12,04 ± 1,90 para PtpB). O composto com melhor atividade frente a PtpB foi MN10 e frente a PtpA foi MN5.

ABSTRACT

This work aimed to objective the synthesis and characterization of two series of chalcones, a derivative of CH8 (previously patented by the group), containing the nitro group in position 3 or 3' (ML series) and the other derived from 6-acetyl-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (MN series), as well as subsequent biological evaluation of all the compounds obtained. The compounds of ML series were evaluated as inhibitors of proteins tyrosine phosphatase PtpA and PtpB of *Mycobacterium tuberculosis*, and no present significant activities. Also were evaluated as anti-leishmania agents and in general was observed that they presented 60% inhibition superior to amastigote forms of *L. amazonensis*, being (2E)-1-(4-methoxyphenyl)-3-(2-nitrophenyl)prop-2-en-1-one (ML3) most promising due to their high selectivity index as compared to the other compounds of the study (IS=15.58). The evaluation of the compounds of MN series showed 3 chalcones with promising inhibitory activity of the proteins PtpA and PtpB of *Mycobacterium tuberculosis*, for which were determined IC₅₀ values: (2E)-6-(3-(3,4-dichlorophenyl)acryloyl)-2H-benzo [b][1,4]oxazin-3(4H)-one (MN1) (IC₅₀= 18.44 ± 4.71 for PtpB and IC₅₀= 28.11 ± 0.33 for PtpA), (2E)-6-(3-(4-bromophenyl)acryloyl)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-one (MN5) (IC₅₀= 16.71 ± 0.29 PtpA) and (2E)-6-(3-(3nitrophenyl)acryloyl)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-one (MN10) (IC₅₀= 12.04 ± 1.90 for PtpB). The compound with better activity in relation to PtpB was MN10 and in relation to PtpA was MN5.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	14
ÍNDICE DE TABELAS	16
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS	18
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVAS	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1 Chalconas.....	22
2.1.2 Síntese de Chalconas	23
2.2 Tuberculose.....	27
2.2.1 Proteínas Tirosina Fosfatase PtpA e PtpB de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	30
2.2.2 Compostos Inibidores das Ptps de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	32
2.3 Leishmanioses.....	36
2.3.1 Chalconas ativas em Leishmaniose	41
3 OBJETIVOS	45
3.1 Objetivo Geral.....	45
3.2 Objetivos Específicos.....	45
4. Materiais e MÉTODOS	46
4.1 Síntese das Nitrochalconas (Série ML).....	47
4.2 Síntese das Chalconas Derivadas da 6-acetil-2h-1,4-benzoxazin-3(4h)-ona (Série MN).....	49
4.3 Atividade Inibitória e Seletividade das Chalconas Sintetizadas Frente às Enzimas PtpA e PtpB de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	51
4.3.1 PtpA de <i>M. tuberculosis</i> WT (Wildtype): Expressão e Purificação.....	51
4.3.2 PtpB de <i>M. tuberculosis</i> WT (wildtype): Expressão e Purificação.....	52
4.3.3 Avaliação da atividade residual das enzimas PtpA e PtpB.....	52
4.3.4 Determinação dos valores de IC ₅₀ das chalconas.....	53
4.4 Avaliação da atividade de chalconas contra formas amastigotas de <i>Leishmania Amazonensis</i> e contra formas promastigotas de <i>Leishmania Braziliensis</i>	53
4.4.1 Ensaio de citotoxicidade	54
4.4.2 Ensaio colorimétrico para triagem de compostos leishmanicidas	54

4.4.3 Indução da diferenciação de células THP-1.....	55
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
5.1 Discussão dos resultados das sínteses.....	56
5.1.1 Série ML (Nitrochalconas).....	56
5.1.2 Série MN (derivados da 6-acetil-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona).....	70
5.2 Discussão dos resultados de atividade biológica.....	78
5.2.1 - Chalconas como inibidores da PtpA e PtpB de Mycobacterium tuberculosis.....	78
5.2.2. Chalconas com atividade em macrófagos infectados com formas amastigotas de Leishmania amazonensis e com formas promastigotas de Leishmania Braziliensis.....	83
6 CONCLUSÕES.....	86
7 PERSPECTIVAS.....	87
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
ANEXOS.....	103

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-	Núcleo fundamental das chalconas.	22
Figura 2-	Síntese de chalcona através da condensação aldólica.	23
Figura 3-	Mecanismo da reação de condensação.	24
Figura 4-	Mecanismo de desidratação do produto de condensação e formação da chalcona.	25
Figura 5-	Síntese de chalconas pelo acoplamento cruzado de trifluorborato e cloreto de benzoila.	25
Figura 6-	Síntese de chalconas pelo acoplamento de Suzuki.	26
Figura 7-	Síntese de chalconas com o uso de $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$, proposta por Narender and Reddy.	26
Figura 8-	Estimativa de novos casos de TB por 100mil habitantes em 2011.	28
Figura 9-	Fármacos de primeira escolha contra Tuberculose. (a) Isoniazida, (b) Pirazinamida, (c) etambutol e (d) Rifampicina.	29
Figura 10-	Perfil do progresso mundial de cobertura dos casos de resistência aos fármacos entre 1994 e 2011.	29
Figura 11-	Estrutura 3D das proteínas PtpA (A) e PtpB (B).	30
Figura 12-	Inibidores da PtpA de <i>M. tuberculosis</i> : (a) análogo da estevastelina, (b) análogo da roseofilina, e (c) análogo da nonilprodigiosina.	32
Figura 13-	Inibidores de PtpB de <i>M. tuberculosis</i> : (a) OMTS, (b) derivado indólico, (c) carboxilato de isoxazol e (d) indolin-2-on-3-espirotiazolidinonas.	33
Figura 14-	Chalconas inibidoras de PtpA de <i>M.tuberculosis</i> .	34
Figura 15-	Modelo de interação das naftilchalconas bioativas no sítio ativo da PtpA. Estrutura da proteína destacando a cadeia principal dos resíduos de aminoácidos. As ligações hidrogênio estão ilustradas como linhas tracejadas azuis.	34
Figura 16-	Sulfonil-hidrazonas inibidoras da PtpB.	35
Figura 17-	Inibidor da PtpB (a) e inibidor da PtpA (b). Na imagem podem ser vistos os modelos de interação dos inibidores no sítio ativo das proteínas.	35
Figura 18-	Formas evolutivas de <i>Leishmania donovani</i> : (a) formas promastigotas fixadas com corante Giemsa, e	36

	(b) formas amastigotas, em corante Giemsa.	
Figura 19-	Manifestações clínicas das leishmanioses. (A) Leishmanios cutânea e (B) Leishmaniose visceral.	37
Figura 20-	Distribuição da Leishmaniose visceral no mundo.	39
Figura 21-	Distribuição da Leishmaniose cutânea no mundo.	39
Figura 22-	Estruturas químicas dos fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose. Estibogluconato de sódio (a), antimoniato de meglumina (b), isetionato de pentamidina (c), anfotericina B (d) e miltefosina (e)..	41
Figura 23-	Compostos ativos em <i>leishmania Amazonensis</i> . (a) Licochalcona A, (b) e (c) chalconas isoladas de <i>Piper hispidum</i> , (d) DMC e (e) CH8.	42
Figura 24-	Chalconas sintéticas publicadas por Bello e colaboradores. Atividade leishmanicida (IC_{50}) em formas promastigotas de <i>L. Braziliensis</i> . Perfil de citotoxicidade (CC_{50}) em células VERO. Índice de seletividade (IS) calculado como CC_{50}/IC_{50}	43
Figura 25-	Estrutura dos precursores da série ML e estrutura base da série. (a) Inibidor publicado por Belo e col. 2011. (b) Composto CH8 patentado pelo grupo (Bergmann e col. 2004). (c) Estrutura base da série ML.	56
Figura 26-	Espectro de RMN 1H da chalcona ML7.	59
Figura 27-	Espectro RMN de ^{13}C da chalcona ML7.	60
Figura 28-	RMN de 1H composto MN12.	71
Figura 29-	Árvore de decisão de Topliss, para a otimização de substituintes aromáticos: M, é mais ativo; E, é igualmente ativo; L, é menos ativo que o composto anterior da chave.	81

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	Formas de Leishmania encontradas em humanos e seu agente causador.	38
Tabela 2	Condições reacionais e dados dos compostos da série ML.	48
Tabela 3	Condições reacionais e dados dos compostos da série MN.	50
Tabela 4	Informações sobre os compostos da série ML.	61
Tabela 5	Caracterização por RMN ^1H dos compostos ML1, ML2 e ML3.	62
Tabela 6	Caracterização por RMN ^{13}C dos compostos ML1, ML2 e ML3.	63
Tabela 7	Caracterização por RMN ^1H dos compostos ML4, ML5 e ML6.	64
Tabela 8	Caracterização por RMN ^{13}C dos compostos ML4, ML5 e ML6.	65
Tabela 9	Caracterização por RMN ^1H dos compostos ML9, ML11 e ML14.	66
Tabela 10	Caracterização por RMN ^{13}C dos compostos ML9, ML11 e ML14.	67
Tabela 11	Caracterização por RMN ^1H dos compostos ML18, ML20 e ML24.	68
Tabela 12	Caracterização por RMN ^{13}C dos compostos ML18, ML20 e ML24.	69
Tabela 13	Informações sobre os compostos série MN	73
Tabela 14	Caracterização por RMN ^1H dos compostos MN1, MN2 e MN3.	74
Tabela 15	Caracterização por RMN ^1H dos compostos MN4, MN5 e MN8.	75
Tabela 16	Caracterização por RMN ^1H dos compostos MN10, MN11 e MN14.	76
Tabela 17	Caracterização por RMN ^1H dos compostos MN20 e MN22.	77
Tabela 18	Resultados da atividade das chalconas como inibidores das proteínas PtpA e PtpB de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	79
Tabela 19	Valores de IC_{50} para os compostos que foram	80

	considerados melhores no estudo inicial.	
Tabela 20	Resultados de inibição dos compostos da Série ML em formas amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> e formas promastigotas de <i>Leishmania braziliensis</i> .	84

Lista de Abreviaturas, símbolos e siglas

µg – micrograma

µL – microlitro

µM – micromolar

AcOEt – Acetato de Etila

ADMET - Administração, distribuição, metabolização, excreção e toxicidade

CC₅₀ - Concentração Citotóxica para 50% da amostra

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

Col. – Colaboradores

DMSO – Dimetilsulfóxido

Hex – Hexano

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

VERO - Linhagem celular utilizada nos testes.

Hz – Hertz

IC₅₀ – Concentração Inibitória de 50%

IS - Índice de seletividade

IUPAC - União internacional de química pura e aplicada

J – Constante de Acoplamento

K_i - Constante de dissociação.

LV - Leishmaniose visceral

MHz – Mega hertz

MS - Ministério da Saúde

Mtb - *Mycobacterium tuberculosis*

N – Concentração Normal

nM – Nanomolar

OMS - Organização Mundial da saúde

PDB - *Protein data bank*.

PtpA - Proteína tirosina fosfatase A

PtpB - Proteína tirosina fosfatase B

PTPs - Proteínas tirosina fosfatases

LC - Leishmaniose cutânea

q.s.p – Quantidade Suficiente Para

RMN ¹³C - Ressonância Magnética Nuclear de ¹³C

RMN ¹H - Ressonância Magnética Nuclear de ¹H

SAR - Relação estrutura química atividade biológica

SIDA - Síndrome de imunodeficiência adquirida

TB - Tuberculose

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVAS

Durante muito tempo a sociedade baseou suas escolhas para o uso de medicamentos em observações, utilizando fatores como o humor das pessoas após seu uso ou então a fluidez do sangue do paciente. Um avanço nesta área começou durante a Idade Média, momento em que começaram a surgir hospitais e cursos de Medicina nas primeiras universidades. Somente no início do século XVIII a farmácia foi reconhecida como uma ciência empírica, baseada nos dados da medicina tradicional, e neste momento esta ciência começou a avaliar os extratos e poções existentes na época para compreender os seus efeitos (CHAST, 2008).

Após mais de dois séculos, podemos dizer que a química medicinal pode ser classificada como um ramo desta ciência que surgiu no passado, uma vez que, assim como a farmacologia, a química medicinal se refere ao estudo dos fármacos, substâncias que já eram descritas em 1857 como agentes que deixavam o organismo em uma condição particular, modificando fisicamente e quimicamente processos que apresentavam alguma alteração (WERMUTH, 2008; BARREIRO, 2008).

Por definição da IUPAC, a química medicinal é uma disciplina baseada na química, envolvendo aspectos das ciências biológicas, médica e farmacêutica, cuja missão é o planejamento, descoberta, invenção, identificação e preparação de compostos biologicamente ativos (protótipos), além do estudo do metabolismo, interpretação do mecanismo de ação a nível molecular e a construção das relações entre a estrutura química e a atividade farmacológica (SAR) (WERMUTH, 2008).

A pesquisa e o desenvolvimento de um fármaco podem ser divididos em três grandes etapas (WERMUTH, 2008):

- Descoberta - onde são escolhidos os alvos terapêuticos e realizadas as avaliações da atividade biológica das novas moléculas.
- Otimização - onde são estudados métodos de melhoramento dos protótipos escolhidos na etapa anterior, preocupando-se com o aumento da potência, seletividade e redução da toxicidade; deste modo, a etapa normalmente é conhecida como ADMET, por estar diretamente relacionada à forma de administração,

distribuição, metabolização, excreção e toxicidade do composto.

- Desenvolvimento - nesta etapa busca-se aperfeiçoar ainda mais os parâmetros ADMET de um candidato a fármaco, bem como suas características farmacêuticas (sabor, odor, solubilidade), para que seja possível o seu uso clínico. São realizados os estudos de formulações, microemulsões, entre outras formas de administração.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a prioridade para a pesquisa e o desenvolvimento de novos fármacos devem ser as doenças tropicais consideradas negligenciadas, como Doença de Chagas, dengue, leishmanioses, lepra, filariose, entre outras (WHO, 2013). Além disto, a OMS ainda recomenda a pesquisa por novos agentes para o tratamento da tuberculose, considerada um dos maiores problemas de saúde pública do mundo, sendo a segunda maior causa de mortes por doenças infecciosas, atrás apenas da síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA) (WHO, 2012).

Estas recomendações da OMS surgem em um momento em que é possível observar um aumento na disseminação dos casos de leishmaniose no Brasil. Segundo o Ministério da Saúde, há no país uma endemia de leishmaniose, uma vez que a doença era relatada em 19 unidades da federação em 2003, saltando para 22 unidades federadas em 2011, sendo observado um decréscimo nos casos registrados no Nordeste (90% dos casos em 1990 para 47% dos casos em 2009), associado a surtos em regiões urbanizadas como o Rio de Janeiro, Curitiba, Campo Grande e Palmas (MS, 2011).

Aliada à crescente preocupação com os casos de leishmania, uma publicação do mesmo órgão federativo chama atenção para os casos de tuberculose no país e para o Plano Global para o combate à tuberculose (WHO, 2010), o qual tem o objetivo de reduzir pela metade a incidência da enfermidade até 2015, comparado aos casos relatados em 1990. No Brasil foram notificados aproximadamente 70 mil novos casos de tuberculose em 2012, o que deixa o país em 17º lugar em relação ao número de casos em todo o mundo (MS, 2013).

Com base neste panorama mundial e nacional, este trabalho se justifica pela busca de novos compostos orgânicos que apresentem significativa atividade biológica frente a leishmania e tuberculose, compreendendo neste caso a primeira etapa da busca por novos agentes

para o tratamento destas enfermidades (WERMUTH, 2008). A escolha da classe de compostos para este estudo é justificável pelo fato das chalconas serem estruturas químicas amplamente conhecidas por sua diversidade de atividades biológicas (DIMMOCK *et al.*, 1999; NI *et al.*, 2004; NOWAKOWSKA *et al.*, 2007), entre elas anti-leishmania (NIELSEN *et al.*, 1998; BOECK *et al.*, 2006; BERGMANN *et al.*, 2004) e anti-tuberculose (SIVAKUMAR, 2010; CHIARADIA *et al.*, 2008; MASCARELLO *et al.*, 2010; CHIARADIA *et al.*, 2012).

2. Revisão da Literatura

2.1 Chalconas

Chalconas são moléculas de cadeia aberta que contêm dois anéis aromáticos ligados por um fragmento enona de três carbonos, ou seja, são cetonas α,β -insaturadas que apresentam o núcleo 1,3-diarilprop-2-en-1-ona (AVILA *et al.*, 2008) (Figura 1) e o esqueleto C₆-C₃-C₆, considerado privilegiado no desenho de fármacos (POLINSKY *et al.*, 2008), o que vem lhes conferindo uma grande atenção na química medicinal (ANSARI *et al.*, 2005).

Seus dois estereoisômeros, *Z* e *E*, são precursores comuns na biossíntese de flavonóides e isoflavonóides. São encontradas em cascas de árvores, frutos, folhas e em raízes de diversas plantas (NI *et al.*, 2004), e em maior concentração nas pétalas das flores, onde tem um importante papel na polinização das plantas, pois sua cor amarela atrai insetos e pássaros (ZUANAZZI *et al.*, 2001).

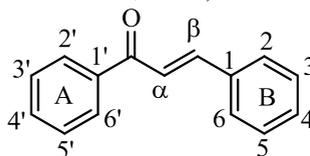


Figura 1. Núcleo fundamental das chalconas.

A grande atenção recebida por estes compostos não se restringe a sua estrutura química considerada simples, mas também é resultado da diversidade de atividades farmacológicas que apresentam (DIMMOCK *et al.*, 1999; NI *et al.*, 2004; NOWAKOWSKA *et al.*, 2007). Dentre as atividades biológicas observadas para esta classe de compostos podemos citar antibacteriana (DIMMOCK *et al.*, 1999; NIELSEN *et al.*, 2004), anti-inflamatória (ALCARAZ *et al.*, 2004 ; CHIARADIA *et al.*, 2008), antiviral (NINOMIYA *et al.*, 1990), inibidora das proteínas tirosina fosfatase A e B de *Mycobacterium tuberculosis* (CHIARADIA *et al.*, 2008; MASCARELLO *et al.*, 2010; CHIARADIA *et al.*, 2012), antifúngica (BOECK *et al.*, 2005; OPLETALOVA & SEDIVY, 1999; LOPEZ *et al.*, 2001; LOPEZ *et al.*, 2003), antimalárica (LI *et al.*, 1995; RAM *et al.*, 2000; DOMINGUEZ *et al.*, 2001; LIU *et al.*, 2001; DOMINGUEZ *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2003), anti-leishmania (NIELSEN *et al.*, 1998; KAYSER & KIDERLEN, 2001; BOECK *et al.*,

2006; BERGMANN *et al.*, 2004) antioxidante (GACCHE *et al.*, 2008), sequestradora de radicais livres (LEBEAU *et al.*, 2000), antitumoral (NAM *et al.*, 2003), citotóxico (LAWRENCE *et al.*, 2006; SALUM *et al.*, 2013), anti-mitótico (CHEN *et al.*, 2001; HERENCIA *et al.*, 1998), bem como a propriedade de mediação da glicoproteína P na resistência a múltiplas drogas (DUCKI *et al.*, 1998).

Esta vasta gama de atividades é em grande parte atribuída às inúmeras possibilidades de substituições nos anéis aromáticos das chalconas, pois a metodologia de síntese das mesmas, baseada na condensação de Claisen-Schmidt, possibilita a obtenção de uma grande variedade de compostos, uma vez que existem inúmeros benzaldeídos e acetofenonas comerciais que podem ser combinados, fornecendo a variedade estrutural pretendida (DUCKI *et al.*, 1998).

Estes compostos também tem despertado atenção de cientistas devido a possibilidade de serem utilizados como intermediários para a síntese de sistemas cíclicos mais complexos, como benzodiazepinas, benzotiazepinas, oxazóis, pirazolininas, pirrolinas, pirimidinas e pirazinas (ANSARI *et al.*, 2005).

2.1.2 Síntese de Chalconas

Diversos métodos de síntese de chalconas são descritos na literatura, porém a metodologia mais utilizada é a condensação aldólica (ou de Claisen-Schmidt) (CALVINO *et al.*, 2006). Neste método, realiza-se a condensação de um benzaldeído com uma cetona apropriada em um solvente polar como metanol, com o uso de uma base como catalisador (Figura 2). É um método bastante versátil e conveniente, que confere rendimentos muito variados, desde 5% até 90% (GO *et al.*, 2005).

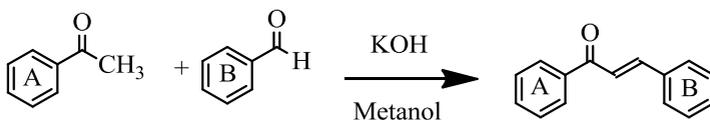


Figura 2. Síntese de chalcona através da condensação aldólica.

O mecanismo proposto para esta condensação pode ser visto na Figura 3, que é seguida da desidratação em meio básico (Figura 4).

Inicialmente o catalisador básico remove um hidrogênio alfa ácido da cetona, formando assim um carbânion, que pode ser estabilizado por ressonância. A reação continua através de um ataque nucleofílico do carbânion ao carbono da carbonila do aldeído, formando assim um intermediário tetraédrico (íon alcóxido). Ao ser protonado por um hidrogênio da água o íon alcóxido é convertido no produto de condensação e o meio básico é regenerado (Figura 3).

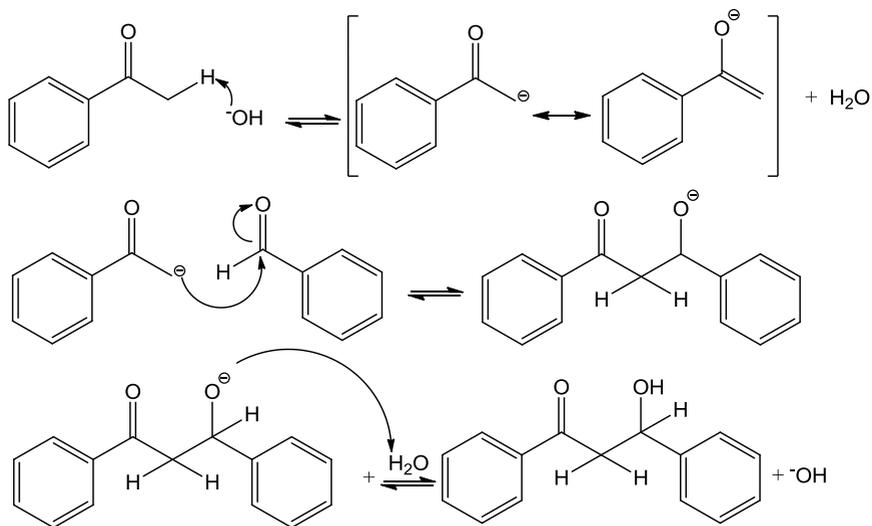


Figura 3. Mecanismo da reação de condensação.

Em seguida, o produto de condensação sofre desidratação básica. Para que isso ocorra, um hidrogênio ácido é abstraído da posição alfa, resultando assim no íon enolato, que por equilíbrio elimina o grupo OH^- , formando assim a chalcona (Figura 4).

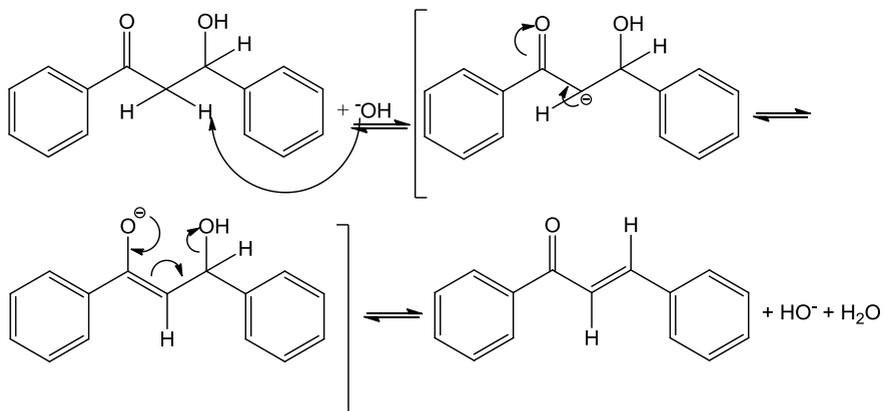


Figura 4. Mecanismo de desidatação do produto de condensação e formação da chalcona.

Diversos outros métodos tem sido estudados por grupos de pesquisas ao redor do mundo para a síntese de chalconas. A obtenção de chalconas através da reação de acoplamento cruzado é uma das novas técnicas que vem sendo utilizada (AL-MASUM *et al.*, 2011). Nesta síntese, um cloreto de benzoíla e estiriltrifluorborato de potássio são acoplados diretamente com o uso de cloreto de paládio como catalisador e aquecimento em microondas, formando a chalcona (Figura 5).

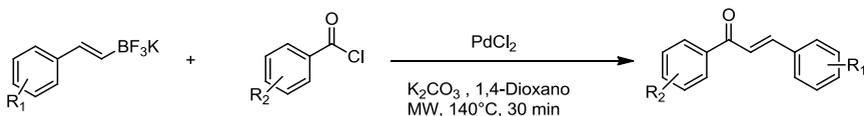


Figura 5. Síntese de chalconas pelo acoplamento cruzado de trifluorborato e cloreto de benzoíla.

Outra metodologia para a obtenção das chalconas baseia-se no acoplamento de Suzuki, onde são empregados cloreto de benzoíla e um ácido fenilvinilborônico (Figura 6). Eddarir *et al.*, (2003) estudaram diferentes condições reacionais para este acoplamento, entre elas as condições propostas por McCarthy, em que são utilizados tolueno anidro como solvente, trifenilfosfina de paládio como catalisador e carbonato de céσιο como base. Nesta proposta reacional os rendimentos

observados pelos pesquisadores variaram entre 41 e 93%, indicando ser uma metodologia viável para a síntese de chalconas (Figura 6).

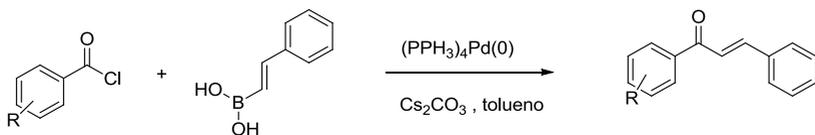


Figura 6. Síntese de chalconas pelo acoplamento de Suzuki.

Narender e Reddy (2007) propuseram a síntese de chalconas através do uso de borotrifluoreterato ($\text{BF}_3 - \text{Et}_2\text{O}$) como catalisador (Figura 7). Os pesquisadores defendem que sua metodologia apresenta diversas vantagens em relação aos métodos clássicos de síntese de chalconas, como a condensação aldólica, que utiliza hidróxido de potássio ou sódio como catalisador, apresenta tempos reacionais elavados (2 a 4 dias) e alta possibilidade de reações paralelas (como a reação de Canizzaro, por exemplo). Na metodologia proposta por Narender and Reddy, os tempos observados para as reações foram de 15 a 150 minutos e não foram observadas reações paralelas. Além disso, o método permite a síntese sem solvente quando os reagentes forem líquidos e possibilita a síntese de compostos que apresentem funções orgânicas sensíveis a reações com bases, como por exemplo, ésteres e amidas (NARENDER *et al.*, 2007).

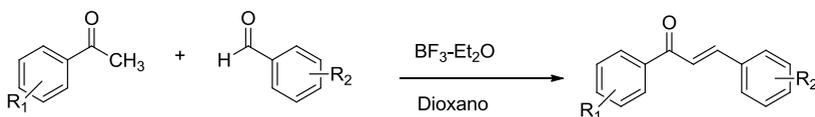


Figura 7. Síntese de chalconas com o uso de $\text{BF}_3 - \text{Et}_2\text{O}$, proposta por Narender e Reddy.

Indo de encontro aos princípios da química verde, Srivastava *et al.*, (2008) propuseram uma metodologia de síntese de chalconas com o uso de microondas, usando carbonato de potássio e irradiação com tempos variando de 3-5 minutos. Após este tempo o meio reacional foi dissolvido em etanol e filtrado, e os rendimentos observados variaram entre 80 e 90% (SRIVASTAVA *et al.*, 2008).

Diversas variações da metodologia clássica de síntese de chalconas pela condensação aldólica também foram propostas, nas quais o objeto de estudo normalmente é o catalisador utilizado. Sabe-se que aproximadamente 75% das chalconas sintéticas são obtidas com uso de catalisadores básicos, normalmente soluções de hidróxido de sódio ou potássio com concentrações que variam de 10 a 70%_(m/m) (BUKHARI *et al.*, 2013). Entre estas modificações pode-se observar a proposta de Sebti e col. (2001) que usaram um catalisador sólido, preparado com fosfato e nitrato de sódio a altas temperaturas (900°C), o qual, segundo os autores, conferiu aumentos expressivos nos rendimentos das reações (SEBTI *et al.*, 2001). Outros catalisadores que são reportados na literatura são óxidos básicos, como óxido de alumínio-magnésio, (CLIMENT *et al.*, 2004) e SOCl₂/EtOH que produz HCl *in situ* e portanto promove a síntese pela via ácida (PETROV *et al.*, 2008), além do uso de catalisadores sólidos como sílica funcionalizada (ROMANELLI *et al.*, 2011).

2.2 Tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (ou bacilo de Koch), que geralmente afeta os pulmões (TB pulmonar), mas pode também afetar outros locais do organismo (TB extrapulmonar) (WHO, 2012).

É caracterizada por tosse prolongada por mais de três semanas, inicialmente sem febre, seguida de escarro, dores no tórax, fraqueza, perda de peso, febre e suores noturnos. É transmitida pelo ar quando pessoas que estão doentes com TB pulmonar expulsam bactérias através da tosse (WHO, 2012).

Estima-se que no final do século XIX cerca de 20% da população mundial desenvolvia a doença, sendo que em média metade dos enfermos ia a óbito, período no qual a enfermidade chegou a ser conhecida como "a grande peste branca". A descoberta do *Mycobacterium tuberculosis* em 1882 por Robert Koch, a melhoria nas condições sanitárias na década de vinte, e a descoberta do ácido *para*-aminosalicílico e da isoniazida na década de cinquenta, possibilitaram que surgisse esperança quanto à eliminação da doença (DOMINGOS & BARBADO, 2003).

Entretanto, apesar de todos os avanços tecnológicos, a TB ainda é considerada um grave problema de saúde pública em todo o mundo.

Segundo dados do relatório anual da Organização Mundial da Saúde (OMS) sobre a enfermidade em 2012, cerca de 9 milhões de novos casos e 1,4 milhões de óbitos foram registrados no ano de 2011 em decorrência da doença. Dentre os óbitos, aproximadamente 440 mil casos estavam associados a pacientes HIV positivos, o que coloca a TB como a segunda maior causa de mortes por doença infecciosa no mundo, ficando atrás apenas da própria síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (WHO, 2012).

No Brasil, aproximadamente 97 mil novos casos da doença foram registrados no ano de 2011, e destes, 17 mil pessoas eram HIV positivos. Foram reportados aproximadamente 5,6 mil óbitos relacionados à TB no mesmo período (WHO, 2012).

Existe a estimativa de que cerca de 200 milhões de pessoas desenvolverão a doença e 35 milhões virão a óbito devido a tuberculose em todo o mundo até o ano de 2020 (NEONAKIS *et al.*, 2008). A Figura 8 mostra a incidência estimada dos casos da doença no mundo para cada 100 mil habitantes.

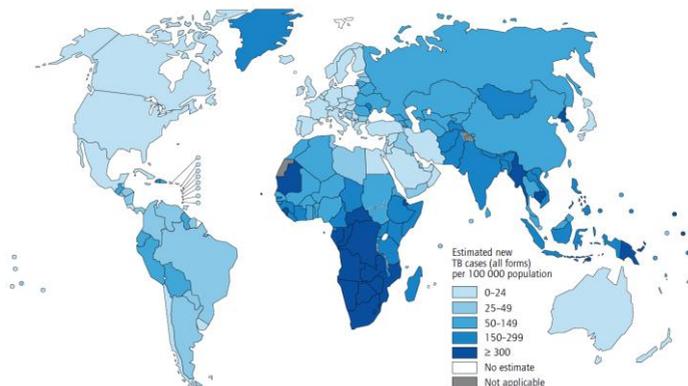


Figura 8. Estimativa de novos casos de tuberculose por 100mil habitantes em 2011. Fonte: WHO, 2012.

O tratamento quimioterápico atual para a cura da TB associa 4 antibióticos por um período de 6 a 9 meses, tendo como consequência a falta de adesão dos pacientes aos longos regimes prescritos, e devido a isso, a aparição de bacilos resistentes aos antimicrobianos (RUIZ-MANZANO *et al.*, 2008). Dentre os fármacos de primeira escolha utilizados na clínica estão a isoniazida e o etambutol (que agem inibindo

a síntese da parede celular bacteriana), a rifampicina (que inibe a síntese de RNA) e a pirazinamida (que tem sua ação devida a um mecanismo ainda desconhecido) (Figura 9).

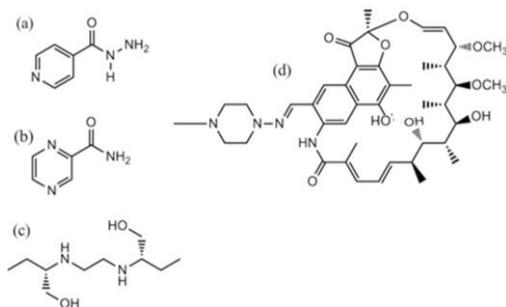


Figura 9. Fármacos de primeira escolha contra tuberculose. (a) isoniazida, (b) pirazinamida, (c) etambutol e (d) rifampicina.

A Figura 10 mostra o perfil mundial dos casos de resistência aos fármacos de primeira escolha no tratamento da TB. Devido a este elevado número de casos de resistência, novas abordagens para o tratamento da TB precisam ser desenvolvidas.

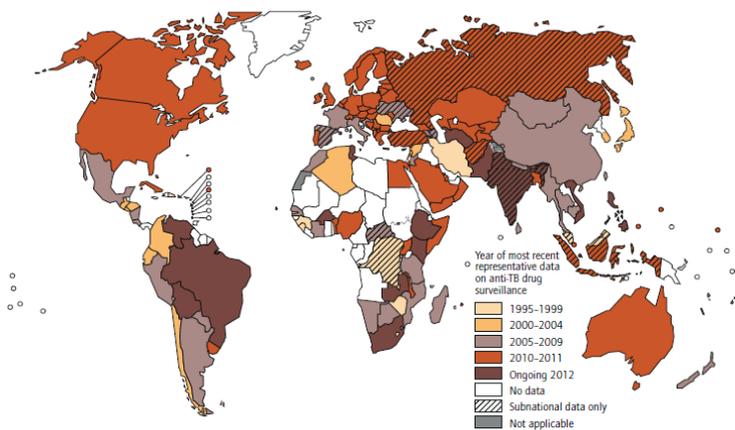


Figura 10. Perfil do progresso mundial de cobertura dos casos de resistência aos fármacos entre 1994 e 2011. Fonte: Global Tuberculosis Report 2012.

2.2.1 Proteínas tirosina fosfatase PtpA e PtpB de *Mycobacterium tuberculosis*

As fosfatases podem ser definidas como hidrolases que tem como substrato fosfomonoésteres, sendo amplamente distribuídas na natureza (FERREIRA *et al.*, 1999; AOYAMA *et al.*, 2003). Podem ser divididas em 3 grupos principais: as fosfatases alcalinas, as fosfatases ácidas e as proteínas fosfatase (AOYAMA *et al.*, 2003).

As proteínas tirosina fosfatases (PTPs) representam um grande grupo de enzimas responsáveis pela hidrólise dos grupos fosfato ligados a resíduos de tirosina em proteínas. Estruturalmente diversas, estas enzimas podem incluir as do tipo citoplasmática e tipo receptor, que tem a capacidade de transmitir sinais diretamente a enzimas de membrana e citoplasma, controlando diversos processos (ZHANG, 2002).

Diversos estudos bioquímicos e genéticos mostram que as PTPs podem exercer efeitos positivos ou negativos nas vias de sinalização, participando de papéis fisiológicos cruciais em uma variedade de células e tecidos. Uma única PTP pode regular múltiplas vias de sinalização, ou uma via chave pode ser regulada por diversas PTPs (ZHANG, 2001). Com a publicação do genoma do *Mycobacterium tuberculosis*, foi possível identificar a presença de genes de duas proteínas tirosina fosfatases, a proteína tirosina fosfatase A (PtpA) e a proteína tirosina fosfatase B (PtpB) (Figura 11) (COLE *et al.*, 1998).

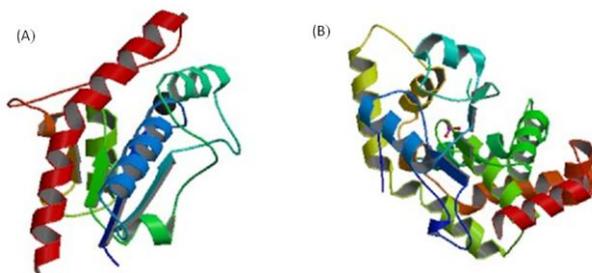


Figura 11. Estrutura 3D das proteínas PtpA (A) e PtpB (B).

Fonte: PtpA (PDB code 1U2Q) (MADHURANTAKAM *et al.*, 2005) e PtpB (PDB code 1YWF) (GRUNDER *et al.*, 2005).

Koul e colaboradores (2004) mostraram que estas duas proteínas são secretadas pelo *M. tuberculosis* em macrófagos humanos

infectados, e estão envolvidas em sua sobrevivência no hospedeiro. Alguns elementos críticos na patogenia do *M. tuberculosis* são a sua entrada em macrófagos e a evasão de mecanismos de destruição intracelular. Para cumprir estes objetivos, o *M. tuberculosis* secreta diversas proteínas que modificam as vias de sinalização do hospedeiro, entre elas a PtpA, uma tirosina fosfatase de baixo peso molecular (MADHURANTAKAM *et al.*, 2005).

Bach e colaboradores (2008) relatam que a remoção da PtpA atenua o crescimento do *M. tuberculosis* nos macrófagos humanos, assim como a produção de anticorpos para a PtpA também acarreta neste efeito. O grupo de pesquisas ainda identificou o substrato natural da PtpA no hospedeiro humano, a proteína citoplasmática VPS33B (BACH *et al.*, 2008).

Esta associação entre a PtpA e a VPS33B permitiu aos pesquisadores concluir que a PtpA interfere diretamente no tráfico vesicular, prejudicando a fusão fago-lisossomal em macrófagos infectados por *M. tuberculosis*, através da desfosforilação da VPS33B, uma vez que este é necessário para a entrega do fagossomo ao lisossomo. Estes resultados demonstram que a PtpA é essencial para a persistência intracelular do *M. tuberculosis* (BACH *et al.*, 2008).

Outra proteína tirosina fosfatase secretada pelo *M. tuberculosis* é a PtpB, caracterizada como uma proteína de tripla especificidade que catalisa a desfosforilação de resíduos serina/treonina ou tirosina e fosfoinosítídeos (GRUNDER *et al.*, 2005; BERESFORD *et al.*, 2009). Estudos realizados por Zhou e colaboradores (2010) sugeriram o modo de atuação da PtpB em macrófagos, no qual esta proteína pode interferir na via de sinalização ativada por INF- γ . Deste modo, a PtpB evita a morte do macrófago ativando a via Akt e bloqueando a atividade da caspase-3, e essa manutenção da célula hospedeira viva parece favorecer a sobrevivência do *M. tuberculosis* e garantir a sua replicação dentro dos macrófagos.

A importância das PTPs na regulação de vários eventos celulares as qualifica como alvos terapêuticos para a descoberta de novos fármacos. Deste modo, devido à importância de PtpA e da PtpB na virulência do *M. tuberculosis*, estas enzimas são alvos promissores para o desenvolvimento de novos agentes para melhorar o tratamento da tuberculose (ZHOU *et al.*, 2010).

2.2.2 Compostos inibidores das PTPs de *Mycobacterium tuberculosis*

O primeiro estudo apresentando inibidores de PtpA foi publicado por Manger e col. no ano de 2005, que em sua pesquisa estudaram análogos dos produtos naturais estevastelinas, roseofilinas e prodigiosinas, obtendo valores de IC_{50} entre 8,8 e 28,7 μM (Figura 12) (MANGER *et al.*, 2005). Estudos posteriores de inibição da PtpA revelaram que os compostos molibdato, ortovanadato e tungstenado de sódio também são inibidores desta proteína, com valores de IC_{50} de 24,5, 28,0 e 30,8 μM , respectivamente (MADHURANTAKAM *et al.*, 2008).

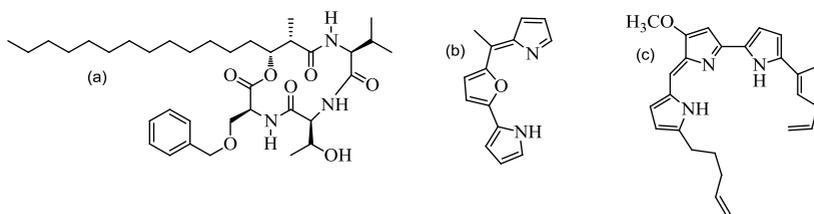


Figura 12. Inibidores da PtpA de *M. tuberculosis*: (a) análogo da estevastelina, (b) análogo da roseofilina, e (c) análogo da nonilprodigiosina. Fonte: MANGER *et al.*, 2005.

A busca por inibidores de PtpB levou GRUNDNER e col. (2007) a identificar uma sulfonamida com alta especificidade e seletividade para esta enzima, a (oxalilamino-metileno)-tiofeno sulfonamida (OMTS), com IC_{50} de 0,44 μM (GRUNDNER *et al.*, 2007). Um estudo realizado por Nören-Müller e col. no ano de 2006, apresentou alguns inibidores da PtpB, dentre eles um derivado indólico com IC_{50} de $0,36 \pm 0,12 \mu M$. Soellner e col. (2007) apresentaram um carboxilato de isoxazol com IC_{50} $0,22 \pm 0,3 \mu M$, sendo este composto o mais ativo inibidor de PtpB publicado até o momento. No ano de 2010, indolin-2-on-3-espirotiazolidinonas foram identificadas como uma nova classe de inibidores potentes, seletivos e competitivos para PtpB, onde o melhor composto apresentou IC_{50} de $0,32 \pm 0,12 \mu M$ (VINTONYAK *et al.*, 2010) (Figura 13).

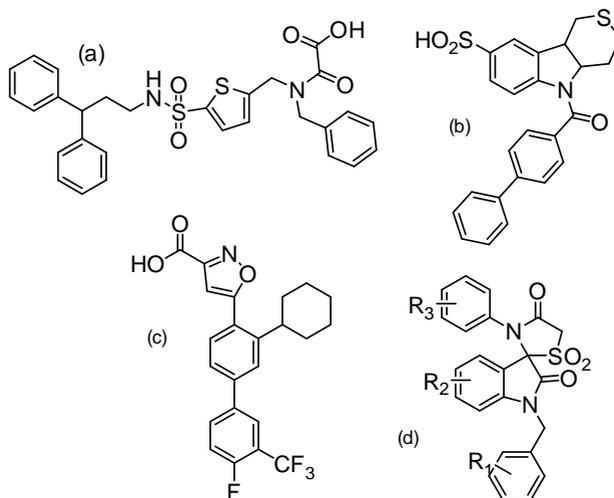


Figura 13. Inibidores de PtpB de *M. tuberculosis*: (a) OMTS, (b) derivado indólico, (c) carboxilato de isoxazol e (d) indolin-2-on-3-epirotiazolidinonas.

Em 2008, nosso grupo de pesquisas publicou um trabalho com o estudo de 38 chalconas como possíveis inibidores de PtpA de *M. tuberculosis* (CHIARADIA *et al.*, 2008). Dentre os compostos avaliados, cinco se mostraram mais ativos, com valores de IC₅₀ variáveis entre 8,4 e 53,7 μM (Figura 14). Estas chalconas apresentavam os grupos 1- ou 2-naftil em sua estrutura, o que sugeriu a necessidade de uma parte hidrofóbica e plana no anel A do composto e a presença de um grupo que aumentasse a densidade eletrônica no anel B para a melhor atividade inibitória da PtpA. A continuidade dos estudos com estes compostos mostrou que o modo de inibição da PtpA provocado por estas naftilchalconas é competitivo (com valores de K_i entre 4,9 e 21,3 μM), e assim foi possível construir modelos de interação entre os compostos e o sítio catalítico da PtpA (Figura 15) (MASCARELLO *et al.*, 2010).

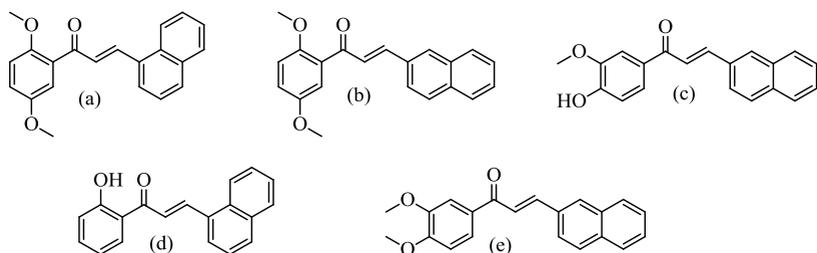


Figura 14. Chalconas inibidoras da PtpA de *M.tuberculosis*.

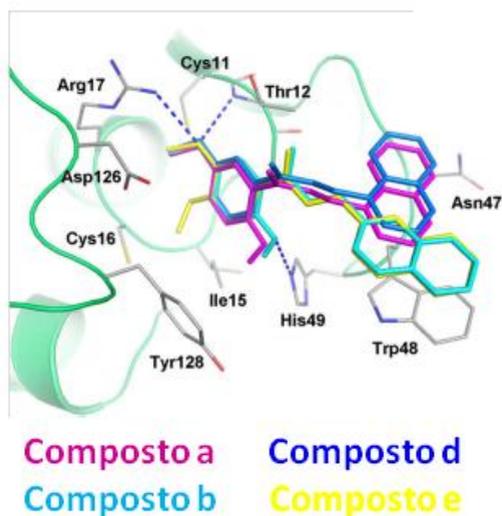


Figura 15. Modelo de interação das naftilchalconas bioativas no sítio ativo da PtpA. Estrutura da proteína destacando a cadeia principal dos resíduos de aminoácidos. As ligações hidrogênio estão ilustradas como linhas tracejadas azuis (MASCARELLO *et al.*, 2010).

Em 2011, nosso grupo de pesquisas identificou quatro sulfonil-hidrazonas derivadas da *N*-fenilmaleimida (Figura 16) como inibidoras de PtpB de *M. tuberculosis* (OLIVEIRA *et al.* 2011), compostos que apresentaram mecanismo de inibição competitivo, resultando assim em

uma nova classe de compostos com potencial interesse para o desenvolvimento de moléculas para o tratamento da tuberculose.

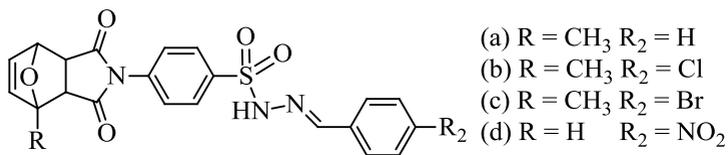


Figura 16. Sulfonil-hidrazonas inibidoras da PtpB.

No mais recente trabalho do nosso grupo, 100 chalconas foram avaliadas como possíveis inibidores de PtpA e da PtpB de *M. tuberculosis*, e 25 foram descritas como inibidores de PtpA e 11 como inibidores de PtpB (CHIARADIA *et al.*, 2012). Dois compostos (Figura 17) apresentaram excelente atividade e seletividade, respectivamente para PtpB (a) (CI₅₀ = 12 ± 2) e para PtpA (b) (15 ± 4), e foram identificados como inibidores competitivos destas proteínas, sendo possível a realização de estudos de *docking molecular*.

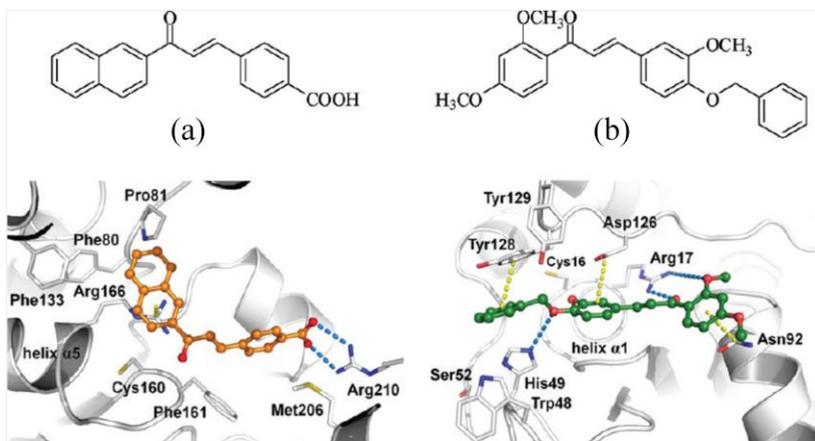


Figura 17. Inibidor da PtpB (a) e inibidor da PtpA (b). Na imagem podem ser vistos os modelos de interação dos inibidores no sítio ativo das proteínas.

A versatilidade, atividade e seletividade desta classe de compostos sugere que as chalconas podem ser consideradas estruturas promissoras para o desenvolvimento de compostos líderes na busca por novos agentes para o tratamento da tuberculose.

Deste modo a idealização da série MN (derivada 6-acetil-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona), vai de encontro com o que foi apresentado, uma vez que a busca pela versatilidade é um dos objetivos desta série. A escolha desta variação pode se justificar pelo acréscimo de um sistema bicíclico contendo uma amida ciclica e um heteroátomo, o que proporciona uma ampla variedade estrutural.

2.3 Leishmanioses

As leishmanioses são consideradas um grande problema de saúde pública, pois representam um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica (MS, 2007).

São provocadas pela contaminação do organismo por protozoários do gênero *Leishmania*, que são transmitidos ao homem pela picada de fêmeas do mosquito da subfamília *Phlebotominae* infectadas após se alimentarem com sangue contaminado de certos vertebrados que agem como reservatórios da doença (WHO, 2008).

Durante seu ciclo de vida, o protozoário passa por duas formas evolutivas (Figura 18): promastigotas (forma não replicativa, infectante, encontrada no intestino do mosquito) e amastigotas (forma replicativa, não-infectante, encontrada na célula fagocítica do hospedeiro vertebrado) (NEVES, 2005).

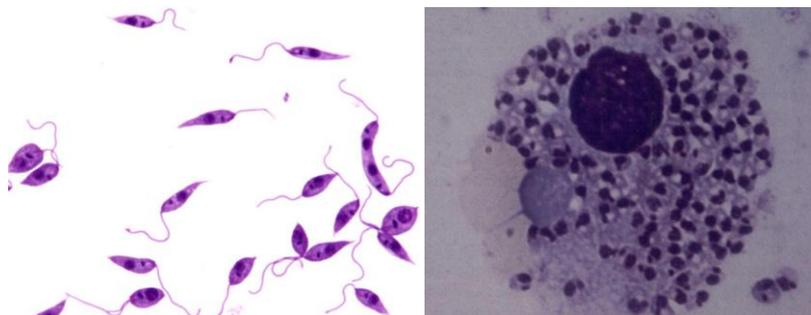


Figura 18. Formas evolutivas de *Leishmania donovani*: (a) formas promastigotas fixadas com corante Giemsa, e (b) formas amastigotas, em corante Giemsa (Fonte: Domínio Público).

A manifestação clínica da doença depende da espécie infectante. As duas principais manifestações clínicas são:

- *leishmaniose cutânea* (LC): forma mais comum da doença, caracterizada pelo surgimento de lesões ulcerativas, em diferentes quantidades, na pele e regiões expostas do enfermo. A LC ainda tem duas subdivisões: *leishmaniose cutâneo-difusa* e *leishmaniose mucocutânea*.

- *leishmaniose visceral* (LV): forma mais grave da doença, caracterizada por períodos irregulares de febre, perda considerável de peso, anemia, hepatomegalia e esplenomegalia. Conhecida também como Calazar, é chamada em algumas regiões da Índia de "febre negra" ou "febre mortal".

A Figura 19 apresenta as diferentes manifestações clínicas da doença e a Tabela A mostra as espécies do protozoário que as causam.



Figura 19. Manifestações clínicas das leishmanioses. (A) Leishmaniose cutânea e (B) Leishmaniose visceral. Fonte: Domínio Público.

A forma cutânea deixa cicatrizes e, dependendo da espécie de *Leishmania* infectante, pode evoluir para a *leishmaniose cutânea difusa*, ou leishmaniose tegumentar americana, com consequências desastrosas para a estética do paciente. A leishmaniose visceral, a forma mais grave, é fatal em quase todos os casos se não for tratada, o que pode causar surtos epidêmicos com alta mortalidade (WHO,2008).

Considerada uma doença endêmica em 98 países, a OMS estima que cerca de 35 milhões de pessoas se encontram em risco de contrair leishmaniose, sendo observados cerca de dois milhões de novos casos ao ano, sendo 1,5 milhão destes da forma cutânea e 500 mil da

doença na forma visceral. Provoca aproximadamente 50 mil mortes por ano, além de deixar 2,4 milhões de pessoas incapacitadas devido as complicações (deformações) da forma cutânea (WHO, 2010).

Tabela 1. Manifestações clínicas das leishmanioses encontradas em humanos e seu agente causador (Fonte: WHO, 2010).

Formas de Leishmania encontrada em humanos				
Subgênero	L. (Leishmania)	L. (Leishmania)	L.(Viannia)	L.(Viannia)
Velho Mundo	<i>L. dovani</i>	<i>L. major</i>		
	<i>L. infantum</i>	<i>L. tropica</i>		
		<i>L. aethiopica</i>		
Novo Mundo	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L.braziliensis</i>	<i>L.</i>
		<i>L. mexicana</i>	<i>L.guyanensis</i>	<i>braziliensis</i>
		<i>L. venezuelensis</i>	<i>L.panamensis</i>	<i>L.</i>
		<i>L. amazonensis</i>	<i>L. shawi</i>	<i>panamensis</i>
			<i>L. naiffi</i>	
			<i>L. lainsoni</i>	
			<i>L. lindenberg</i>	
	<i>L.peruviana</i>			
Manifestação Clínica	<i>Visceral</i>	<i>Cutânea</i>	<i>Cutânea</i>	<i>Muco- cutânea</i>

Em torno de 90% dos casos relatados de leishmania visceral ocorrem no Brasil, Bangladesh, Etiópia, Índia, Nepal e Sudão (Figura 20). Como a distribuição da doença é dinâmica, pode-se observar que fatores climáticos, sociais e econômicos podem ampliar a abrangência dos vetores e conseqüentemente o números de casos.

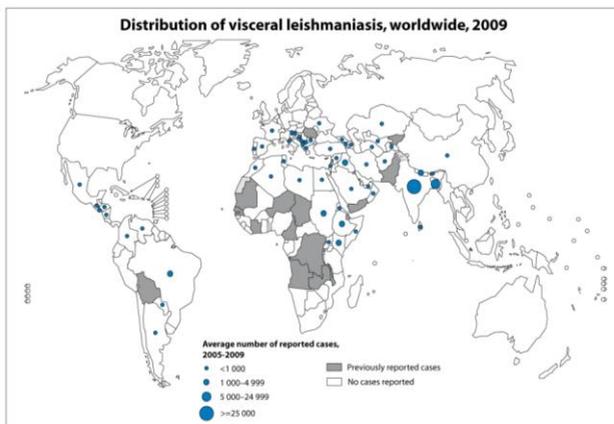


Figura 20. Distribuição da Leishmaniose visceral no mundo.

Fonte: WHO, 2009a.

Segundo a WHO cerca de 90% dos casos de Leishmaniose cutânea do mundo estão concentrados na Bolívia, Brasil e no Peru. A distribuição dos casos relatados entre 2005 e 2009 no mundo pode ser observada na Figura 21.

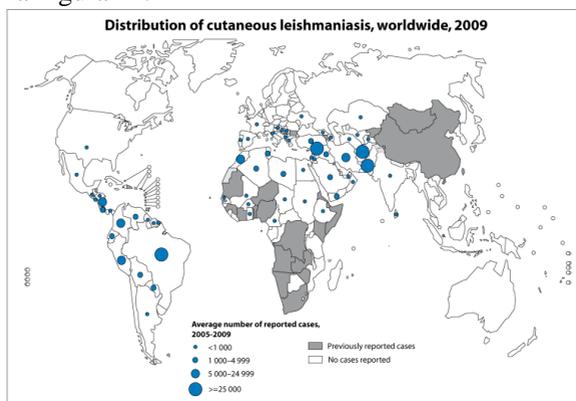


Figura 21. Distribuição da Leishmaniose cutânea no mundo. Fonte:

WHO, 2009b.

No Brasil, só no ano de 2008, foram registrados 3852 novos casos de LV, sendo 136 casos de co-infecção LV/HIV. Um fator que chama atenção das autoridades do país é o crescente número de casos nas regiões Norte, Sudeste e Centro-oeste, que no ano 2000 representavam apenas 17% dos casos de LV e que passaram a 43% no

ano de 2008. Neste mesmo ano foram registrados aproximadamente 20mil novos casos de leishmaniose tegumentar no país, sendo 95% na forma cutânea, abrangendo todas as regiões do país (SVS, 2010).

O tratamento da leishmaniose é um desafio para os serviços de saúde pública, pois como regra geral, os pacientes infectados residem em regiões isoladas, e precisam enfrentar problemas logísticos como longas distâncias para o centro de tratamento, a falta de transporte, além do custo elevado dos medicamentos (SVS, 2010).

O tratamento de primeira linha, especialmente para a leishmaniose visceral, é caro e deve ser administrado via intravenosa no hospital. Os fármacos de primeira escolha são compostos de antimônio pentavalente como o estibogluconato de sódio e o antimoniato de meglumina (Figura 22). No caso de recaídas ou desenvolvimento de resistência a estes fármacos, os doentes necessitam de tratamento com medicamentos mais tóxicos e mais caros, os medicamentos de segunda escolha, como a Anfotericina B ou a Pentamidina (Figura 22). A Anfotericina B lipossomal quase não tem nenhum efeito colateral, mas é inviável em países em desenvolvimento como o Brasil, devido ao seu elevado custo (cerca de U\$ 1500 ou mais por paciente, segundo dados da OMS (WHO,2010).

Devido a sua incidência predominantemente em países subdesenvolvidos e por acometer principalmente a população pobre, as leishmanioses não despertam o interesse das grandes companhias farmacêuticas para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para esta enfermidade, e assim, a maior parte dos tratamentos é feita com os medicamentos desenvolvidos há várias décadas.

Um medicamento mais recente que vem sendo utilizado para o tratamento das leishmanias é a miltefosina (hexadecilfosfocolina) (Figura 22), originalmente desenvolvido como antineoplásico (COSTA FILHO *et al.*, 2008).

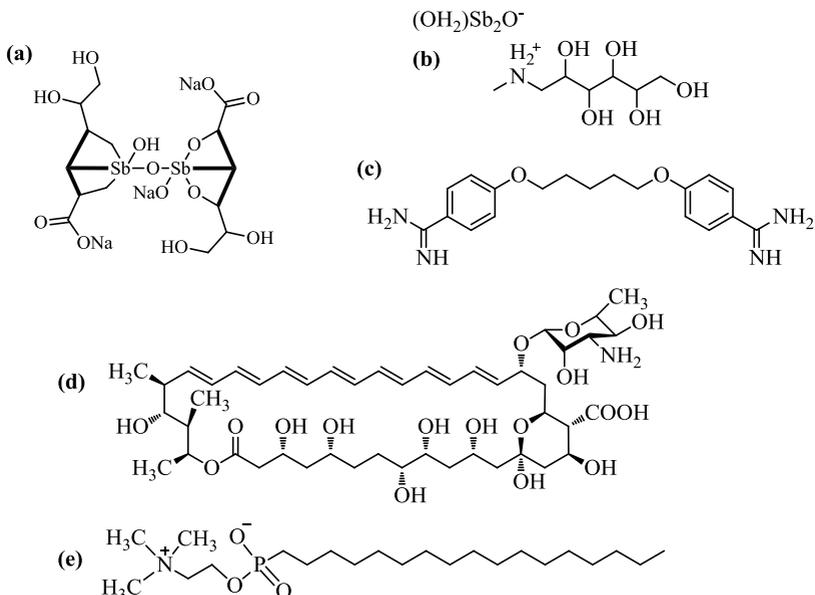


Figura 22. Estruturas químicas dos fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose: estibogluconato de sódio (a), antimoniato de meglumina (b), isetionato de pentamidina (c), anfotericina B (d) e miltefosina (e).

A leishmaniose é uma das doenças tropicais mais negligenciadas, e a OMS definiu como estratégia a necessidade do desenvolvimento de novos medicamentos, que sejam mais baratos, com ciclos de tratamento mais curtos, e que possam ser administrados de forma oral, parental ou tópica.

2.3.1 Chalconas ativas em Leishmaniose

Os primeiros estudos da atividade anti-leishmania de chalconas foram realizados com a licochalcona A (Figura 23), que apresentou efeito inibitório no crescimento das formas amastigota e promastigota de *Leishmania major* e *L. donovani* em macrófagos humanos parasitados, com baixa citotoxicidade (CHEN *et al.*, 1993; CHEN *et al.*, 1994). O mecanismo de ação desta chalcona foi identificado apenas em estudos posteriores, nos quais se concluiu que o composto atua inibindo as enzimas fumarato redutase e succinato desidrogenase, alterando a

estrutura e conseqüentemente a função das mitocôndrias do protozoário (CHEN *et al.*, 1993; ZHAI *et al.*, 1995; CHEN *et al.*, 2001).

Em 1999, estudos fitoquímicos da planta *Piper aduncum*, conhecida como pimenta de macaco no norte do Brasil, permitiram o isolamento da 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona (DMC, Figura 23). Estudos *in vitro* desta chalcona natural contra formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* mostraram tratar-se de um composto com atividade significativa, além de ser seletivamente tóxico para os protozoários por não ativar o metabolismo oxidativo dos macrófagos (TORRES-SANTOS *et al.*, 1999).

Estudos posteriores foram realizados com a DMC para a determinação do seu mecanismo de ação em formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, que mostraram que este composto altera a biossíntese de esteroides, o que sugere que seu alvo de ação é diferente de outros inibidores conhecidos (TORRES-SANTOS *et al.*, 2009).

Outro trabalho mostrou a atividade frente a formas amastigota de *Leishmania* de duas chalconas isoladas da fração etanólica de *Piper hispidum*, 2',4'-dihidroxi-6'-metoxichalcona e 2'-hidroxi-3',4',6'-trimetoxichalcona (Figura 23). O composto trimetoxilado foi o mais ativo, e ambos apresentaram leve citotoxicidade (RUIZ *et al.*, 2011).

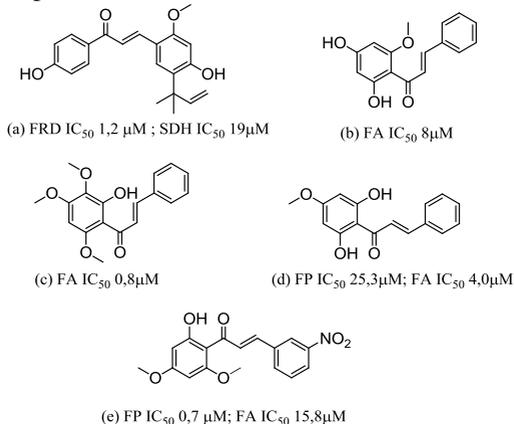


Figura 23. Compostos ativos em *leishmania amazonensis*. (a) licochalcona A, (b) e (c) chalconas isoladas de *Piper hispidum*, (d) DMC e (e) CH8. FRD = Fumarato redutase, SDH = succinato desidrogenase, FP = formas promastigotas de *L. amazonensis*; FA = formas amastigotas de *L. amazonensis*.

Chalconas sintéticas derivadas da xantoxilina, e muito semelhantes à DMC, foram patenteadas por nosso grupo de pesquisas em 2003, por terem apresentado excelente atividade *in vitro* contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*. O composto CH8 (Figura 23) foi o mais ativo, uma vez que tratamentos com pequenas doses deste composto em ratos infectados apresentaram melhores resultados que o tratamento com Pentostan (fármaco referência no tratamento de leishmaniose cutânea) (BERGMAM *et al.*, 2004). Os estudos mostraram que as chalconas derivadas da DMC com um grupo nitro na posição 3 do anel B conferiram aumento significativo da atividade leishmanicida (BOECK *et al.*, 2006).

A continuidade dos estudos com chalconas metoxiladas por nosso grupo de pesquisa revelou outros cinco compostos (Figura 24) com atividade significativa em *Leishmania braziliensis* e bons índices de seletividade (BELLO *et al.*, 2011). Os resultados publicados no trabalho mostraram que a posição das metoxilas no anel A, especialmente em *orto*, e a presença de um átomo de cloro no anel B, são importantes para a atividade leishmanicida dos compostos.

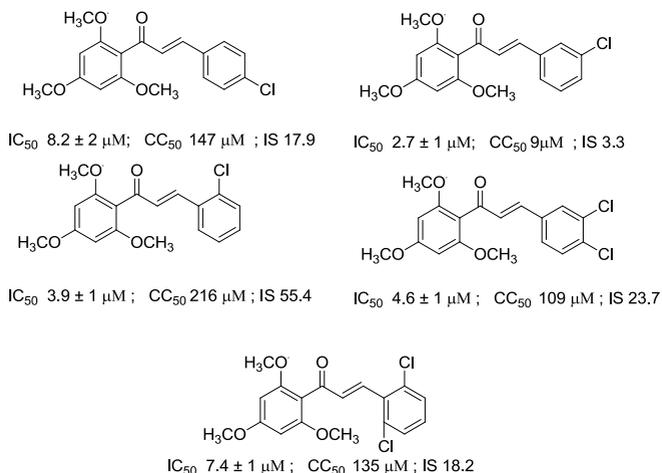


Figura 24. Chalconas sintéticas com atividade leishmanicida (IC_{50}) em formas promastigotas de *L. braziliensis*. Perfil de citotoxicidade (CC_{50}) em células VERO (linhagem celular utilizada em culturas). Índice de seletividade (IS), calculado como CC_{50}/IC_{50} .

Os resultados obtidos neste último trabalho estão de acordo com o previamente publicado por Lunardi e col. (2003), que observaram que grupos cloro na posição 4 do anel B aumentavam a atividade das chalconas frente a formas promastigotas de *L. braziliensis* (LUNARDI *et al.*, 2003).

Recentemente, foi realizado um novo estudo, envolvendo 70 chalconas como potenciais agentes leishmanicidas, e dentre os compostos avaliados, 35 apresentaram atividade biológica significativa, com valores de IC₅₀ entre 1,31 a 32,54 µM, onde 8 compostos apresentaram elevado índice de seletividade. A presença de grupos doadores de elétrons (como metoxilas e hidroxilas) no anel A, e grupos retiradores de elétron (como halogênios e grupamento nitro) no anel B, favoreceram a atividade leishmanicida das chalconas (NUNES, 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo geral a síntese e caracterização de duas séries de chalconas, uma derivada da 6-acetil-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona e outra derivada do composto previamente patenteado CH8 (contendo o grupamento nitro na posição 3 do anel A), através de condensação aldólica, para posterior avaliação da atividade biológica dos compostos sintetizados.

3.2 Objetivos específicos

- Obtenção e purificação de nitrochalconas derivadas da CH8, com a presença do grupamento nitro na posição 3 do anel A ou anel B.
- Obtenção e purificação de chalconas derivadas da 6-acetil-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona.
- Caracterização química dos compostos obtidos por leitura do ponto de fusão, RMN de ^{13}C e ^1H .
- Análise da atividade inibitória das proteínas tirosina fosfatase PtpA e PtpB de *Mycobacterium tuberculosis* pelas duas séries de compostos sintetizados.
- Determinação da IC_{50} dos compostos mais ativos nas proteínas tirosina fosfatase PtpA e PtpB de *Mycobacterium tuberculosis*.
- Análise da atividade das nitrochalconas (derivados da CH8) frente a formas amastigotas de *Leishmania amazonensis* e promastigotas de *L. braziliensis*.
- Determinação da IC_{50} das nitrochalconas mais ativas em formas amastigotas de *Leishmania amazonensis*.
- Discussão das relações entre a estrutura química e a atividade biológica dos compostos (REA).

4. Materiais e Métodos

O progresso das reações, bem como a pureza preliminar dos compostos sintetizados, foram monitorados por cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando como comparação os reagentes de partida, em placas de alumínio com sílica gel 60 GF 254 da Merck. Em todos os procedimentos cromatográficos foram utilizados sistemas de gradiente de polaridade de solventes, como Hex/AcOEt (80:20, 75:25 e 50:50). As placas de CCD foram visualizadas com o auxílio de luz ultravioleta ($\lambda = 254$ e 366 nm), e posteriormente reveladas com pulverização de anisaldeído sulfúrico (0,5 mL anisaldeído, 5 mL ácido sulfúrico concentrado, 10 mL ácido acético glacial e metanol q.s.p. 100 mL).

Os procedimentos de purificação dos compostos obtidos incluíram recristalização com solventes adequados.

O ponto de fusão não corrigido dos compostos foi determinado em aparelho digital de ponto de fusão, MGAPF-301, Microquímica Equipamento Ltda.

As análises químicas necessárias para a caracterização dos compostos foram realizadas na Central de Análises do Departamento de Química da UFSC, sendo os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H (200 e 400 MHz) e de ^{13}C (100 MHz) obtidos em equipamento BRUKER AC-200F ou VARIAN OXFORD AS-400, em clorofórmio deuterado (CDCl_3), acetona deuterada (acetona- d_6) ou dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6).

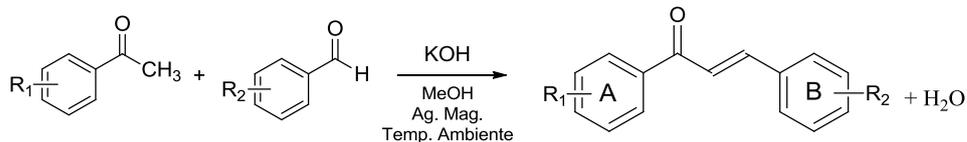
Os reagentes e solventes utilizados neste trabalho apresentam padrão analítico, sendo das marcas comerciais Sigma-Aldrich, Merck e Vetec.

4.1 Síntese das nitrochalconas (série ML)

Foram propostas 16 nitrochalconas (Tabela 2) para a obtenção, através da condensação aldólica entre os respectivos aldeídos e cetonas aromáticas, utilizando 1 mmol de cada reagente, metanol como solvente e hidróxido de potássio (50%_{p/v}) como catalisador, sob agitação magnética, com tempos reacionais variando de 4 a 24 horas, à temperatura ambiente, conforme descrito por Vogel (1989).

Após o término do período reacional, os compostos foram vertidos em água destilada, e a reação tratada com ácido clorídrico 10% até pH levemente ácido. Os compostos obtidos foram filtrados em funil de Büchner e avaliados por CCD.

As condições reacionais, rendimentos e ponto de fusão dos compostos obtidos, além das estruturas não obtidas, estão relacionados na Tabela 2. As chalconas foram caracterizadas por ponto de fusão, e por ressonância magnética (RMN) de ¹H e de ¹³C. A nomenclatura dos compostos obtidos nesta série pode ser vista no anexo 1.

Tabela 2. Condições reacionais e dados dos compostos da série ML.

Composto	R ₁	R ₂	MeOH (mL)	KOH _{50%} (gotas)	Tempo (horas)	Rend. (%)	Pf. (°C)
ML1	2,5-diOCH ₃	3-NO ₂	10	10	5	72	102-104
ML2	2,4-diOCH ₃	3-NO ₂	10	10	4	87	166-167
ML3	4-OCH ₃	3-NO ₂	10	11	24	58	178-179
ML4	3,4-diOCH ₃	3-NO ₂	13	10	24	67	130-132
ML5	3,5-diOCH ₃	3-NO ₂	10	10	24	94	146-148
ML6	2-OCH ₃	3-NO ₂	10	12	24	34	102-103
ML7	H	3-NO ₂	10	10	12	78	145-147
ML8	3,5-diOCH ₃ ,4-OH	3-NO ₂	10	15	34	Composto não obtido.	
ML9	3-OCH ₃	3-NO ₂	10	10	20	86	160-162
ML10	3-OCH ₃ ,4-OH	3-NO ₂	10	15	36	Composto não obtido.	
ML11*	3,4,5-triOCH ₃	3-NO ₂	10	13	24	95	144,2-146,3
ML12	2-OH	3-NO ₂	10	15	36	Composto não obtido.	
ML14	3-NO ₂	4-OCH ₃	10	8	12	69	156-159
ML18	3-NO ₂	2,5-diOCH ₃	10	5	24	58	130-132
ML20**	3-NO ₂	3,4-OCH ₂ O-	10	10	6	35	143-145
ML24	3-NO ₂	2,6-diOCH ₃	15	10	24	65	124-127

*Chalcona sintetizada durante o trabalho de conclusão de curso (CORDEIRO, 2010). **Chalcona sintetizada na tese de Doutorado de Louise D. Chiaradia (CHIARADIA, 2010).

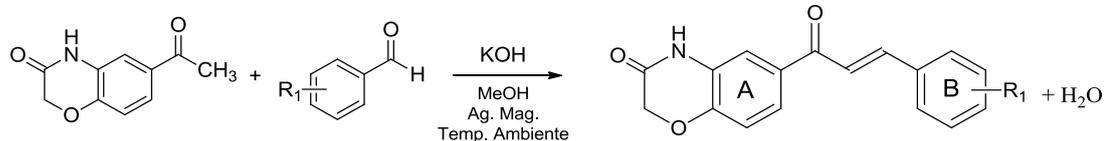
4.2 Síntese das chalconas derivadas da 6-acetil-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona (série MN)

Foram propostas 16 chalconas derivadas da 6-acetil-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona, através da condensação aldólica entre 1 mmol da 6-acetil-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona e 1 mmol dos respectivos aldeídos, utilizando metanol como solvente e hidróxido de potássio (50%_{m/m}) como catalisador, sob agitação magnética, com tempos reacionais variando de 13 a 36 horas, à temperatura ambiente, conforme descrito por Vogel (1989).

Após o término do período reacional, os compostos foram vertidos em água, e a reação tratada com ácido clorídrico 10% até pH levemente ácido. Os compostos obtidos foram filtrados e avaliados por CCD.

As condições reacionais, rendimentos e ponto de fusão dos compostos obtidos, além das estruturas não obtidas, estão relacionados na Tabela 3. As chalconas obtidas foram caracterizadas por ponto de fusão, e por ressonância magnética (RMN) de ¹H. A nomenclatura dos compostos obtidos nesta série pode ser vista no anexo 1.

Tabela 3. Condições reacionais e dados dos compostos da série MN.



Composto	R ₁	MeOH (mL)	KOH _{50%} (gotas)	Tempo (horas)	Rend. (%)	Pf. (°C)
MN1	3,4-diCl	10	10	14	74	189-192
MN2	4Cl	10	10	15	55	194-196
MN3	4-CH ₃	10	15	36	36	185-186
MN4	2,6-diCl	10	10	16	80	198-200
MN5	4-Br	10	10	16	62	203-204
MN6	4-NO ₂	10	10	48	Composto não obtido.	
MN7	4-N(CH ₃) ₂	10	10	48	Composto não obtido.	
MN8	4-F	10	10	13	37	175-176
MN9	4-O(CH ₂) ₃ CH ₃	10	15	48	Composto não obtido.	
MN10	3-NO ₂	10	11	24	88	212-213
MN11	4-OCH ₃	10	15	36	71	234-235
MN12	H	10	15	24	71	198-196
MN14	3,4,5-triOCH ₃	10	10	24	52	252-254
MN17	2,4-diCl	10	12	24	68	187-188
MN20	4-CN	10	10	24	77	170-172
MN22	2,5-diOCH ₃	10	10	24	64	158-159

4.3 Atividade inibitória e seletividade das chalconas sintetizadas frente às enzimas PtpA e PtpB de *Mycobacterium tuberculosis*

Os experimentos de avaliação da inibição da atividade das enzimas tirosina-fosfatase PtpA e PtpB de *Mycobacterium tuberculosis* pelas chalconas sintetizadas, foram desenvolvidos pela Dra. Louise Domeneghini Chiaradia Delatorre no Centro de Biologia Molecular Estrutural da Universidade Federal de Santa Catarina, sob coordenação do Prof. Dr. Hernán Terenzi. A expressão e purificação das enzimas foram realizadas pela aluna de Doutorado Ângela Camila Orbem Menegatti.

4.3.1 PtpA de *M. tuberculosis* WT (wildtype): expressão e purificação

O vetor de expressão pRT28a (QIAGEN), contendo o gene da proteína PtpA de *M. tuberculosis*, foi cedido pelo PhD. Pedro M. Alzari, do Institut Pasteur, Paris. Este vetor foi inserido em *Escherichia coli* BL21(DE3) para produzir proteínas recombinantes com uma cauda de 6 histidinas. As bactérias com o vetor de expressão foram incubadas por 16 horas (*overnight*) em 10 mL de meio Luria-Bertani (LB), contendo 50 µg/mL de canamicina a 37°C.

Para a expressão da proteína, 5 ml de cultura *overnight* foi transferida para 250 ml de meio LB e incubou-se a 37°C com agitação (140 rpm) até a fase de crescimento exponencial, correspondente a uma densidade ótica de 0,6-0,8 nm. Em seguida, as bactérias foram colocadas a 15°C por 20 min e depois adicionou-se 0,5 mM de isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) para a indução da síntese da proteína. As culturas foram incubadas *overnight* a 15°C e então recolhidas por centrifugação a 5.000 *xg* por 30 min; o sedimento foi resuspendido em tampão *lysis* (20 mM Tris-HCl pH=8,0, 0,5 M NaCl, 10 mM imidazol e 10% glicerol) contendo inibidores de proteases (Amersham Biosciences). As células foram lisadas por sonicação em gelo (Fischer Scientific Model 60 Sonic Dismembrator) e depois centrifugadas a 12.000 *xg* por 1 hora, a 4°C. As proteínas recombinantes com cauda de histidina na porção *N*-terminal (*His-tag*) foram purificadas em condições nativas por cromatografia de afinidade com metal imobilizado (IMAC) (PORATH, 1992). Foram utilizadas colunas His-trap (*His Trap HP Kit for purification of histidine tagged proteins*,

Amersham Biosciences), carregadas com níquel, conectadas a um sistema ÄKTA (GE Healthcare). A resina foi inicialmente equilibrada com o tampão de lise, e o sobrenadante obtido após a lise e centrifugação dos cultivos foi incubado com a coluna, à temperatura ambiente. Em seguida, a coluna foi lavada com concentrações crescentes de imidazol, desde um tampão sem imidazol até uma concentração final de 500 mM. O imidazol compete quimicamente com a cauda de histidina da proteína recombinante e, ao serem aumentadas as concentrações do imidazol, a proteína é eluída da coluna (MARTINS *et al.*, 2000).

A pureza das frações foi analisada por SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamidodecil sulfato de sódio) e as frações contendo proteína purificada foram reunidas e dializadas a 4°C, em 4 etapas por 2h em tampão de diálise (tampão D), com concentrações decrescentes de imidazol (150 mM, 75 mM, 35 mM e sem imidazol). O último tampão (tampão D) contém 20 mM Tris-HCl pH=8,0, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 20% glicerol e 5 mM DTT (DL-ditiotreitol). As proteínas foram concentradas por ultrafiltração, usando membrana porosa de 10 kDa (Amicon Ultra-15 Millipore) e armazenadas a -80°C.

A concentração da proteína foi determinada por ensaio de Bradford usando, albumina soro bovina como padrão (BRADFORD, 1976).

4.3.2 PtpB de *M. tuberculosis* WT (wildtype): expressão e purificação

O vetor de expressão pET28 (QIAGEN), contendo o gene da proteína PtpB de *M.tuberculosis*, foi cedido pelo PhD. Pedro M. Alzari, do Institut Pasteur, Paris. Este vetor foi inserido em *Escherichia coli* BL21(DE3) para produzir proteínas recombinantes com uma cauda de 6 histidinas. As bactérias com o vetor de expressão foram incubadas por 16 horas (*overnight*) em 10 ml de meio Luria-Bertani (LB), contendo 50 g/ml de canamicina a 37°C.

Os procedimentos de expressão, purificação e análise da pureza da proteína recombinante PtpB foram idênticos aos descritos para a PtpA. As frações contendo PtpB recombinante foram associadas, concentradas por centrifugação e armazenadas a -80°C.

4.3.3 Avaliação da atividade residual das enzimas PtpA e PtpB

Os testes de avaliação da inibição enzimática pelas chalconas foram realizados em placas de 96 poços, contendo 5 µl do composto diluído a $1,0 \times 10^{-3}$ M (concentração final de 25 µM), 20 µl de imidazol 200 mM pH=7,0 (concentração final de 20 mM), água MilliQ q.s.p 198 µl em cada poço, e 2 µl de proteína recombinante diluída. A placa foi mantida por 10 minutos a temperatura ambiente (nos ensaios com a PtpA) ou em estufa a 37°C (nos ensaios com a PtpB), sendo adicionado em seguida 10 µl de *p*-nitrofenilfosfato [pNPP] 400 mM (concentração final de 40 mM) a cada poço, para início da reação. As enzimas clivam o substrato (pNPP), liberando *p*-nitrofenol, de cor amarela. A absorbância do *p*-nitrofenol foi medida em espectrofotômetro UV-VIS para placas de ELISA (TECAN Infinite M200), por 10 minutos a 37°C (a 410 nm com leituras a cada 1 minuto). As proteínas foram usadas nas seguintes concentrações: *i*) PtpA 115,0 ng/µL e *ii*) PtpB 93,3 ng/µL, ambas em Tampão D, que contém 20 mM Tris-HCl pH=8,0, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 20% glicerol e 5 mM DTT).

Controles negativos foram feitos na ausência de enzima ou de compostos, e controles positivos na presença de enzima e DMSO 100% no lugar do composto. O percentual de atividade residual foi calculado pela diferença de Absorbância entre os tempos 7 minutos e 2 minutos, obtido pela média de dois experimentos feitos em triplicata.

4.3.4 Determinação dos valores de IC₅₀ das chalconas

A inibição dos compostos foi determinada por cálculos de IC₅₀ (concentração necessária para um composto inibir 50% a atividade da enzima original). Os valores de IC₅₀ foram determinados usando concentrações crescentes de inibidor (1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 80 e 100 µM) *versus* % de inibição, obtidos pela mesma metodologia do item anterior.

A atividade enzimática foi expressa em valores de percentual de atividade residual comparada ao controle sem inibidor. Os dados experimentais foram analisados com o programa Microsoft Office Excel 7.0 e os valores de IC₅₀ determinados graficamente através da regressão linear de melhor ajuste.

4.4 Avaliação da atividade de chalconas contra formas amastigotas de Leishmania amazonensis

Os experimentos para verificação da atividade leishmanicida dos compostos sintetizados foram desenvolvidos pela aluna Doutorado Milene Hoehr de Moraes no Laboratório de Protozoologia, no Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina, sob coordenação do Prof. Dr. Mário Steindel.

4.4.1 Ensaio de citotoxicidade

Células THP-1 foram semeadas em placas de 96 poços (4×10^4 células/poço) em 180 μL de RPMI completo (suplementado com 10% (v/v) de SBF, 12,5 mM de tampão HEPES (GIBCO, BRL), 100 U/mL penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ estreptomicina (GIBCO, BRL), 2 mM de Glutamax®, (GIBCO, BRL) 1mM de Piruvato de Sódio (GIBCO, BRL). Em seguida, 20 μL dos compostos diluídos em meio de cultura em concentrações decrescentes de 500 a 15,6 μM foram adicionados sobre as células. Estas foram cultivadas por 72 horas a 37°C e 5% de CO_2 . As placas foram, então, centrifugadas (2.700xg/10 minutos), o sobrenadante foi removido e o sedimento ressuspendido em 50 μL de uma solução de MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis) a 3 mg/mL. Na seqüência, as placas foram incubadas a 37°C no escuro durante 4 horas e depois centrifugadas (2.700xg/10 minutos). O sobrenadante foi, então, retirado e o sedimento (sal de formazan) solubilizado em DMSO (100 $\mu\text{L}/\text{orifício}$) por uma hora sob agitação. A densidade óptica foi determinada a 540 nm em equipamento Tecan® modelo Infinite M200. Poços contendo apenas meio de cultura foram utilizados como branco para cada concentração dos compostos ou controles. DMSO 1% (v/v) foi o controle negativo de inibição celular. DMSO 50% foi o controle positivo.

4.4.2 Ensaio colorimétrico para triagem de compostos leishmanicidas

Células THP-1 aderentes, diferenciadas em placas de 96 poços foram infectadas com *L. amazonensis* expressando a enzima β -galactosidase. Após 24 horas de incubação, para permitir a transformação dos promastigotas em amastigotas, as células foram tratadas com 20 μL dos compostos diluídos em meio de cultura em diferentes concentrações e as células cultivadas 48 horas a 34°C e 5% de

CO₂. O sobrenadante foi removido e acrescentado 250 µL de PBS contendo CPRG (100 µM) e NP-40 0,1% (v/v). A reação foi desenvolvida durante 16 horas a 37°C e lida a 570 nm com referência em 630 nm em equipamento Tecan® Modelo Infinite M200. Poços contendo células não infectadas foram utilizados como branco para cada concentração de compostos ou controles. DMSO 1% (v/v) foi o controle negativo de inibição de *L. amazonensis*. Anfotericina B 1 µM foi o controle positivo.

4.4.3 Indução da diferenciação de células THP-1

Células THP-1 coletadas no 3º ou 4º dia de crescimento foram quantificadas e induzidas à diferenciação em fagócitos aderentes semelhantes a macrófagos conforme descrito por Schwende e col. (1996). Em resumo, em placas de 96 poços, cultivamos 3 x10⁴ células/poço em 200 µL de meio RPMI completo acrescido de 100 µg/mL de Forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) por 72 horas a 37°C e 5% de CO₂.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Discussão dos resultados das sínteses

5.1.1 Série ML (nitrochalconas)

As estruturas propostas nesta série (Figura 25) foram baseadas na estrutura da chalcona CH8, previamente patenteada por nosso grupo de pesquisa e na estrutura de outra chalcona publicada por Belo e col. (2011) (Figura 25). Propuseram-se variações no número de metoxilas e na posição das mesmas, bem como a remoção do grupo hidroxila presente na estrutura da CH8. Além disso, para 4 compostos, foi proposta também a mudança do grupamento nitro da posição 3 do anel B para a posição 3 do anel A.

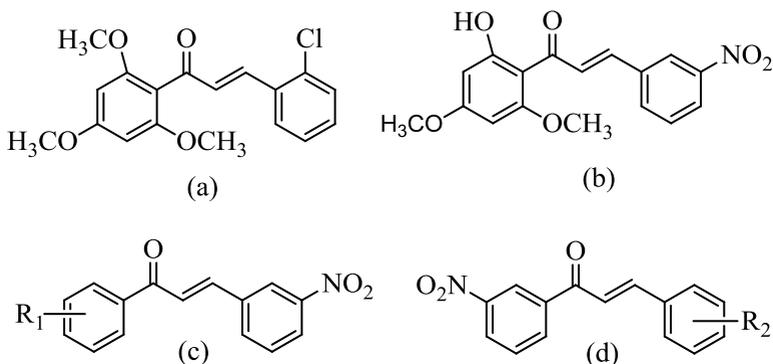


Figura 25. Chalconas com atividade anti-leishmania: (a) publicada em Belo e col., 2011. (b) CH8, patenteada pelo grupo (Bergmann e col., 2004); (c) e (d) estruturas base da série ML.

Foram realizadas 16 reações na tentativa de obtenção das chalconas propostas, obtendo-se 13 dos compostos previamente planejados. Os resultados podem ser observados na Tabela 4. Das 13 chalconas obtidas, ML24 é inédita, ML18 possui número de registro no CAS (mas não está publicada em nenhum trabalho científico), e 11 estruturas já foram reportadas na literatura (WANG *et al.*, 2009; CAVILL *et al.*, 1954; MEHRA *et al.*, 1956; SINGH *et al.*, 2010; BEGUN *et al.*, 2011; KUMAR *et al.*, 2008; BATOVSKA *et al.*, 2007;

FUN *et al.*, 2011; MULCHANDANI *et al.*, 1924; NECKERS *et al.*, 2012).

As 13 chalconas obtidas foram caracterizadas por RMN de ^{13}C e ^1H , além de leitura do ponto de fusão. Os espectros de RMN ^1H dos compostos inéditos encontram-se no anexo II. As Tabelas 5 a 12 apresentam as atribuições dos sinais dos espectros de RMN para todos os compostos desta série.

As 3 estruturas que não foram obtidas, compostos ML8, ML10 e ML12, apresentam em comum a presença de grupos substituintes hidroxila no anel da acetofenona, o que poderia ser um indício do insucesso, uma vez que nestes compostos poderia ser formado o ânion fenolato que por sua vez pode atacar o benzaldeído. Porém em um trabalho anterior (CORDEIRO, 2010) também não foi obtido sucesso na síntese dos compostos com grupos OH nesta posição, o que reforça que para este padrão de substituição maiores estudos se fazem necessários.

Observando-se as tabelas de caracterização (Tabela 5 a 12), é possível verificar que, de modo geral, os espectros apresentam semelhança em relação aos deslocamentos químicos, com pequenas variações apenas em função dos substituintes e de suas posições.

Optou-se, portanto, por discutir detalhadamente a caracterização química de apenas um composto, o ML7, produto da condensação da acetofenona com o 3-nitrobenzaldeído. Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C da chalcona ML7 podem ser observados nas Figuras 26 e 27, respectivamente.

Conforme esperado, o espectro de RMN de ^1H do composto ML7 (Figura 26) apresenta um singlete proveniente do hidrogênio 2 em 8,52 ppm; este deslocamento elevado se deve à vizinhança desta posição ser ocupada por um grupo nitro, o qual desblinda a posição vizinha devido a seu efeito retirador de elétrons. O mesmo efeito pode ser observado no duplo duplete do hidrogênio 4 em 8,26 ppm, o qual apresentou constantes de acoplamento 8,21 Hz e 1,96 Hz, sendo seu desdobramento ocasionado por um acoplamento a longa distância com o hidrogênio 2 (responsável pela menor constante de acoplamento), e a curta distância com o hidrogênio 5 (responsável pela maior constante de acoplamento). O hidrogênio 5 aparece como um multiplete em 7,63 ppm, e o hidrogênio 6 é observado em 7,93 ppm como um duplete com constante de acoplamento 7,81 Hz.

Os hidrogênios 2' e 6' do anel A são observados como um duplete em 8,06 ppm com constante de acoplamento de 7,03 Hz, e os

hidrogênios 3' e 5' são observados como um tripleto em 7,55 ppm com constantes de acoplamento de 7,42 e 7,43 Hz. O hidrogênio da posição 4' aparece no mesmo multiplete em 7,63 ppm no qual se observou o sinal do hidrogênio 5 do anel B.

Os hidrogênios α e β da dupla ligação aparecem como dubletos respectivamente em 7,67 ppm e 7,84 ppm, com constante de acoplamento de 15,63 Hz, caracterizando a configuração *E* da dupla ligação.

No espectro de RMN de ^{13}C da ML7 (Figura 27), foi possível identificar todos os carbonos da estrutura. O carbono quaternário 1' aparece em 133,95 ppm, os carbonos 2' e 6' em 128,59 ppm, os carbonos 3' e 5' em 128,81 ppm e o carbono 4' em 133,31 ppm. Os carbonos do anel B são encontrados em 136,64 ppm (carbono 1), 124,60 ppm (carbono 2), 151,16 ppm (carbono 3), 124,66 ppm (carbono 4), 130,05 ppm (carbono 5) e 134,33 ppm (carbono 6). O sinal da carbonila, conforme esperado para uma carbonila de cetona conjugada, foi observado em 189,66 ppm, e os carbonos α e β apresentaram deslocamentos de 122,32 ppm e 141,62 ppm, respectivamente.

Observando os valores de ponto de fusão obtidos experimentalmente para os compostos da série ML, todos apresentaram faixa de variação menor do que 2°C, o que pode servir como indicativo da pureza dos compostos (Tabela 4). Dentre as chalconas que apresentam ponto de fusão reportado na literatura, ML4, ML7 e ML14 apresentam valores distintos aos obtidos experimentalmente, porém, a caracterização pelos espectros de RMN comprova que os compostos são as estruturas propostas. Para os demais compostos, o ponto de fusão experimental foi muito próximo ao valor descrito na literatura. Para os compostos ML6, ML8, ML9 e ML10 não foram encontrados dados de ponto de fusão reportados na literatura.

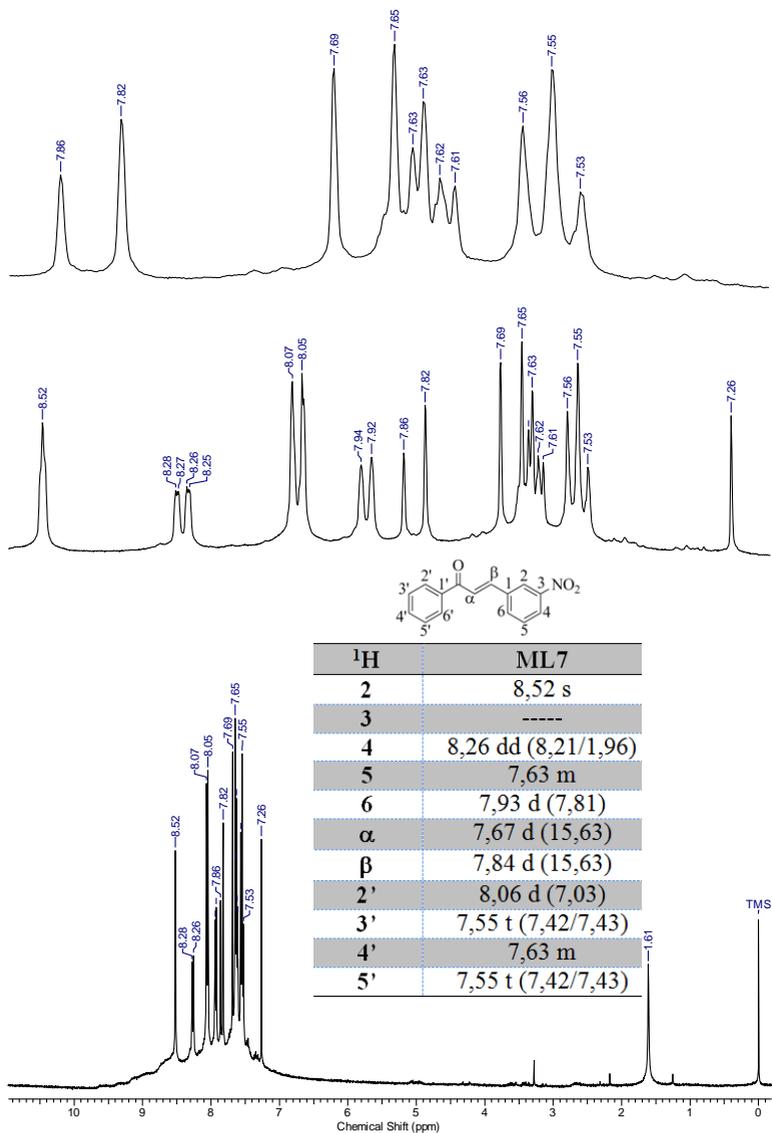


Figura 26. Espectro de RMN ¹H da chalcona ML7. Deslocamento químico em relação ao TMS, solvente utilizado: CDCl₃. () = J (constante de acoplamento, em Hertz).

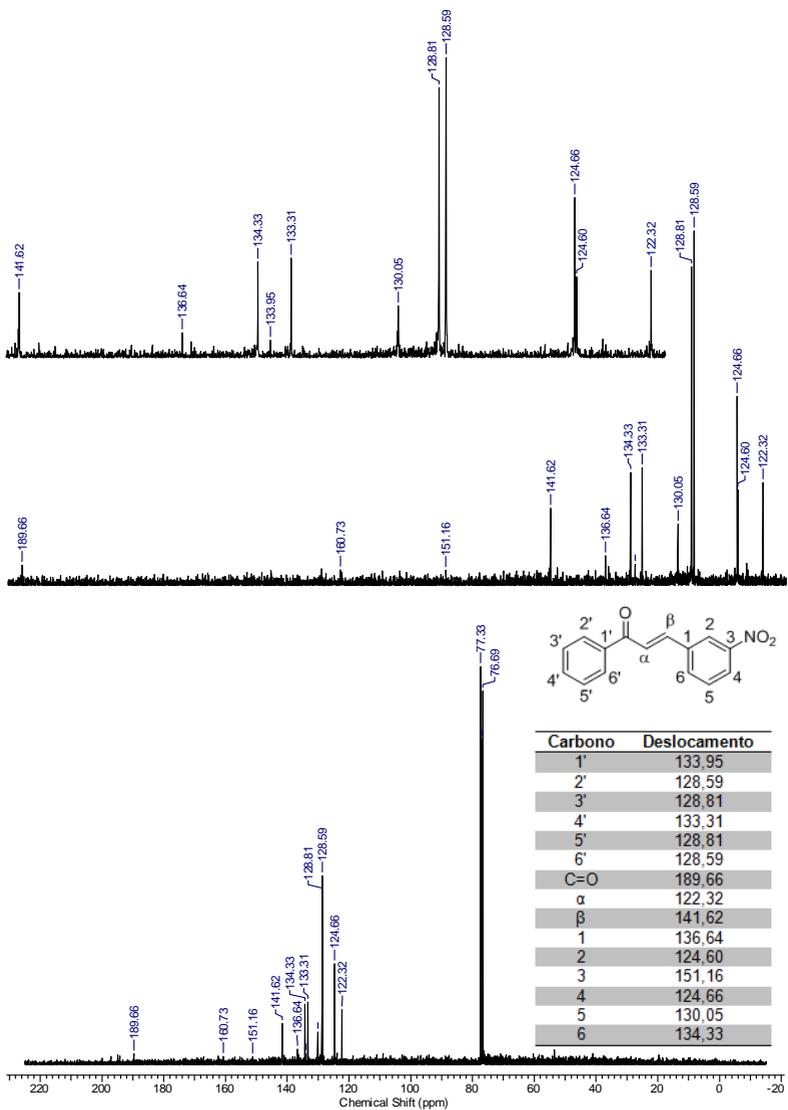
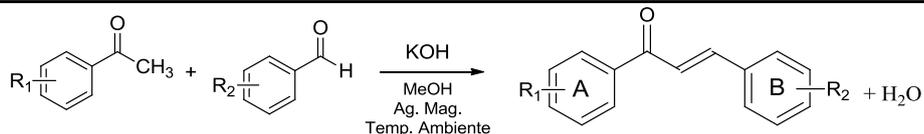


Figura 27. Espectro RMN de ^{13}C da chalcona ML7. Deslocamento químico em relação ao TMS, solvente utilizado: CDCl_3 .

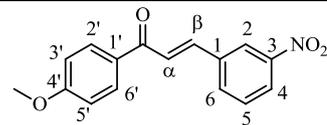
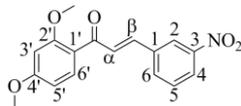
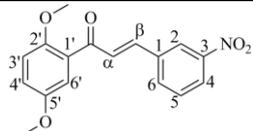
Tabela 4. Informações sobre os compostos da série ML.



Chalc.	R ₁	R ₂	PM (g.mol ⁻¹)	Rend. (%)	Pf. Exp (°C)	Pf. Lit. (°C)	CAS
ML1	2,5-di-OCH ₃	3-NO ₂	313,31	72	102-104	104-106	130671-90-8
ML2	2,4-di-OCH ₃	3-NO ₂	313,31	87	166-167	168-170	115043-98-6
ML3	4-OCH ₃	3-NO ₂	283,28	58	178-179	182	68063-55-8
ML4	3,4-di-OCH ₃	3-NO ₂	313,31	67	130-132	126 - 127	130671-92-0
ML5	3,5-di-OCH ₃	3-NO ₂	313,31	94	146-148	147-148	1365644-01-4
ML6	2-OCH ₃	3-NO ₂	283,28	34	102-103	N.R.	263240-83-1
ML7	H	3-NO ₂	253,26	78	145-147	142-145	614-48-2
ML8	3,5-di-OCH ₃ ,4-OH	3-NO ₂	32,31	NO	---	---	Inédita
ML9	3-OCH ₃	3-NO ₂	283,28	86	160-162	N.R.	59826-48-1
ML10	3-OCH ₃ ,4-OH	3-NO ₂	299,28	NO	---	N.R.	1287403-14-8
ML11*	3,4,5-tri-OCH ₃	3-NO ₂	343,33	95	144-146	147-148	127034-16-6
ML12	2-OH	3-NO ₂	269,26	NO	---	164	111425-75-3
ML14	3-NO ₂	4-OCH ₃	283,28	69	156-159	167-169	73911-01-0
ML18	3-NO ₂	2,5-di-OCH ₃	313,31	58	130-132	N.R.	351339-40-7
ML20**	3-NO ₂	3,4-OCH ₂ O	297,27	35	143-145	144-146	215778-54-4
ML24	3-NO ₂	2,6-di-OCH ₃	313,31	65	124-127	---	Inédita

*Chalcona sintetizada durante o trabalho de conclusão de curso (CORDEIRO, 2011). **Chalcona sintetizada na tese de Doutorado de Louise D. Chiaradia (CHIARADIA, 2010). NO = composto não obtido. N.R.= não registrado.

Tabela 5. Caracterização por RMN ^1H dos compostos ML1, ML2 e ML3.



^1H	ML1	ML2	ML3
2	8,45 s	8,45 s	8,51 s
3	-----	-----	-----
4	8,23 dd (8,20/1,17)	8,21 dd (8,20/1,18)	8,25 dd (8,20/1,95)
5	7,59 t (8,20/7,82)	7,58 t (7,80/8,20)	7,61 t (7,82/8,20)
6	7,89 d (7,82)	7,87 d (7,80)	7,92 d (7,82)
α	7,58 d (16,02)	7,65 d (16,02)	7,67 d (15,63)
β	7,69 d (16,02)	7,70 d (16,02)	7,82 d (15,63)
2'	-----	-----	8,07 d (8,60)
3'	6,97 (d)(8,99)	6,52 d (2,34)	7,01 d (8,60)
4'	7,07 dd (8,99/3,13)	-----	-----
5'	-----	6,58 dd (8,60/3,24)	7,01 d (8,60)
6'	7,24 d (3,13)	7,81 d (8,60)	8,07 d (8,60)
<i>o</i> -OCH ₃	3,82 s	3,89 s	-----
<i>m</i> -OCH ₃	3,90 s	-----	-----
<i>p</i> -OCH ₃	-----	3,94 s	3,91 s

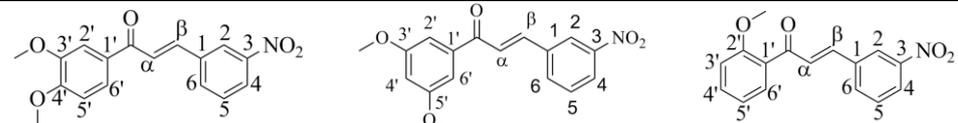
δ ppm em relação ao TMS, *Multiplidade* (J em Hz). Solvente CDCl₃

Tabela 6. Caracterização por RMN ^{13}C dos compostos ML1, ML2 e ML3.

^{13}C	ML1	ML2	ML3
1	137,05	137,37	136,85
2	124,32	124,04	124,45
3	152,92	164,73	140,79
4	129,45	129,86	124,48
5	129,90	129,86	129,99
6	134,11	134,11	134,33
α	122,43	122,21	122,18
β	139,45	138,45	140,79
C=O	191,30	189,33	187,77
1'	128,81	121,49	130,49
2'	152,92	160,71	130,97
3'	114,42	98,54	114,01
4'	120,07	164,73	163,81
5'	153,67	105,51	114,01
6'	113,35	133,18	130,97
<i>o</i>-OCH₃	56,45	55,60	-----
<i>m</i>-OCH₃	55,86	-----	-----
<i>p</i>-OCH₃	-----	55,82	55,56

δ ppm em relação ao TMS, Solvente CDCl_3

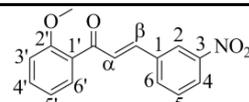
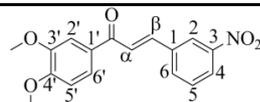
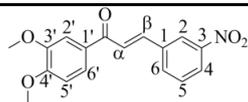
Tabela 7. Caracterização por RMN ^1H dos compostos ML4, ML5 e ML6.



^1H	ML4	ML5	ML6
2	8,51 s	8,71 s	8,44 s
3	-----	-----	-----
4	8,24 dd (8,21/1,95)	8,31 d (8,20)	8,23 dd (8,21/2,34)
5	7,61 t (8,21/7,42)	7,78 t (8,21/7,82)	7,59 t (8,21/7,81)
6	7,92 d (7,42)	8,31 d (8,20)	7,88 d (7,81)
α	7,68 d (15,63)	7,90 d (15,63)	7,53 d (15,63)
β	7,82 d (15,63)	8,10 d (15,63)	7,67 d (15,63)
2'	7,64 s	7,31 d (1,95)	-----
3'	-----	-----	7,03 d (8,60)
4'	-----	6,78 t (2,35/1,95)	7,52 m
5'	6,96 d (8,60)	-----	7,07 t (7,43/7,81)
6'	7,73 dd (8,60/1,95)	7,31 d (1,95)	7,68 m
<i>o</i> -OCH ₃	-----	-----	3,94 s
<i>m</i> -OCH ₃	3,98 s	3,88 s	-----
<i>p</i> -OCH ₃	3,99 s	-----	-----

δ ppm em relação ao TMS, *Multiplicidade* (J em Hz). Solvente CDCl₃

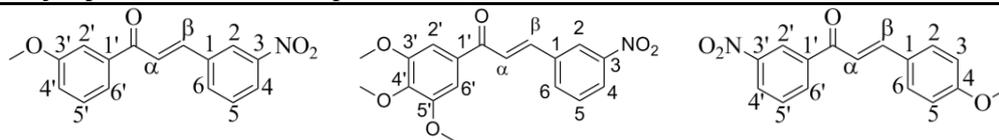
Tabela 8. Caracterização por RMN ^{13}C dos compostos ML4, ML5 e ML6.



^{13}C	ML4	ML5	ML6
1	136,82	ND	137,04
2	124,21	ND	124,31
3	149,39	ND	150,53
4	124,43	ND	129,57
5	129,97	ND	129,91
6	134,33	ND	34,13
α	122,18	ND	122,39
β	140,77	ND	139,43
C=O	187,62	ND	187,76
1'	130,71	ND	130,64
2'	109,99	ND	158,40
3'	153,69	ND	111,68
4'	162,11	ND	133,61
5'	110,64	ND	120,92
6'	123,33	ND	124,31
<i>o</i>-OCH₃	----	ND	55,82
<i>m</i>-OCH₃	56,07	ND	-----
<i>p</i>-OCH₃	56,14	ND	-----

δ ppm em relação ao TMS, Solvente CDCl_3 . ND = Espectro não obtido.

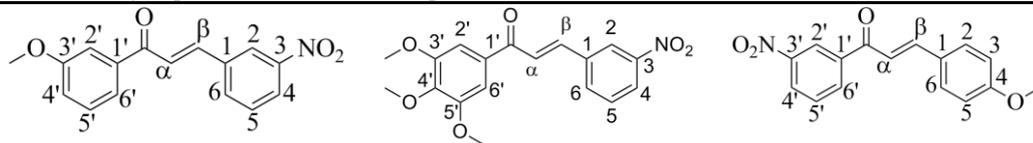
Tabela 9. Caracterização por RMN ^1H dos compostos ML9, ML11 e ML14.



^1H	ML9	ML11	ML14
2	8,51 s	8,53 s	7,65 d (8,60)
3	-----	-	6,97 d (8,99)
4	8,26 dd (7,82/2,35)	8,27 d (6)	-----
5	7,62 t (7,82)	7,63 m	6,97 d (8,99)
6	7,93 d (7,82)	7,93 d (8)	7,65 d (8,60)
A	7,64 d (15,63)	7,60 d (16)	7,42 d (15,63)
B	7,84 d (15,63)	7,81 d (16)	7,87 d (15,63)
2'	7,56 s	7,30 s	8,83 s
3'	-----	-----	-----
4'	7,17 dd (8,20/2,73)	-----	8,43 dd (8,21/2,35)
5'	7,45 t (8,20/7,81)	-----	7,71 t (8,21/7,82)
6'	7,62 t (7,81)	7,30 s	8,35 d (7,82)
<i>m</i> -OCH ₃	3,90 s	3,98 s	-----
<i>p</i> -OCH ₃	-----	3,96 s	3,88 s

δ ppm em relação ao TMS, *Multiplicidade* (J em Hz). Solvente CDCl₃.

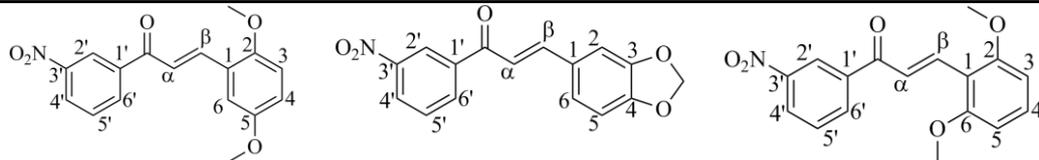
Tabela 10. Caracterização por RMN ^{13}C dos compostos ML9, ML11 e ML14.



^{13}C	ML9	ML11	ML14
1	136,62	136,66	127,05
2	124,60	124,24	130,66
3	141,65	148,72	114,56
4	124,67	124,66	162,22
5	129,75	134,41	130,66
6	134,30	132,84	114,56
A	122,38	122,32	123,17
B	141,65	141,62	146,63
C=O	189,39	188,29	187,93
1'	138,92	130,03	139,82
2'	112,88	106,24	118,20
3'	160,00	153,26	146,63
4'	121,16	143,00	126,84
5'	119,82	153,26	129,83
6'	130,04	106,24	134,05
<i>m</i>-OCH₃	55,53	56,46	-----
<i>p</i>-OCH₃	-----	61,06	55,47

δ ppm em relação ao TMS. Solvente CDCl_3 .

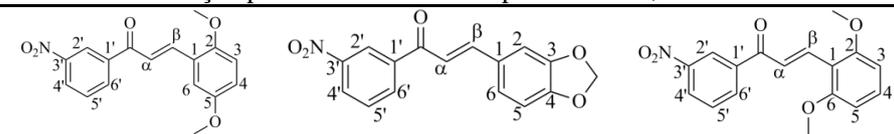
Tabela 11. Caracterização por RMN ^1H dos compostos ML18, ML20 e ML24.



^1H	ML18	ML20	ML24
2	-----	7,20 s	-----
3	6,89 d (8,99)	-----	6,76 d (8,60)
4	6,98 dd (8,99/2,74)	-----	7,41 t (8,60)
5	-----	6,87 d (7,81)	6,76 d (8,60)
6	7,17 d (2,74)	7,17 dd (7,81/1,95)	-----
α	7,59 d (16,02)	7,37 d (15,63)	8,12 d (15,63)
β	8,13 d (16,02)	7,82 d (15,63)	8,34 d (15,63)
2'	8,82 s	8,82 s	8,78 s
3'	-----	-----	-----
4'	8,42 dd (8,21/2,34)	8,44 dd (8,20/1,96)	8,47 m
5'	7,71 t (7,82/8,21)	7,71 t (7,82/8,20)	7,87 t (7,42/7,43)
6'	8,33 d (7,82)	8,34 d (7,82)	8,47 m
<i>o</i> -OCH ₃	3,89 s	-----	3,98 s
<i>m</i> -OCH ₃	3,83 s	-----	-----
<i>O</i> -CH ₂ - <i>O</i>	-----	6,06 s	-----

δ ppm em relação ao TMS, *Multiplicidade* (J em Hz). Solvente CDCl₃.

Tabela 12. Caracterização por RMN ^{13}C dos compostos ML18, ML20 e ML24.



^{13}C	ML18	ML20	ML24
1	123,81	128,78	123,52
2	153,49	106,74	161,57
3	121,69	150,52	104,83
4	114,01	148,54	133,47
5	153,57	108,78	104,83
6	112,47	118,53	161,57
α	123,30	125,95	123,52
β	142,11	146,59	137,49
C=O	188,59	187,78	187,83
1'	139,74	139,69	137,49
2'	118,01	123,71	123,88
3'	142,11	146,59	153,54
4'	126,82	126,91	127,45
5'	129,79	129,85	131,2
6'	134,13	134,02	134,88
<i>o</i>-OCH₃	56,09	-----	56,43
<i>m</i>-OCH₃	55,86	-----	-----
CH₂	-----	101,82	-----

δ ppm em relação ao TMS, Solvente CDCl_3 .

5.1.2 Série MN (derivados da 6-acetil-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona)

A escolha em sintetizar esta série de chalconas foi visando a ampliação da diversidade estrutural da biblioteca de chalconas atualmente disponível em nosso grupo de pesquisas, através da inserção de um novo anel A heteroaromático fixo. Para os padrões de substituição do anel B, foram utilizados os substituintes indicados no Método Manual de Topliss, além de outros considerados importantes em trabalhos anteriores do grupo. Esta variação de substituintes no anel B das chalconas buscou incluir grupos doadores e retiradores de elétrons, grupos com diferentes polaridades, bem como diferentes posições dos mesmos substituintes, o que poderia facilitar as discussões de relação estrutura-atividade.

Foram realizadas 16 tentativas de reações para obtenção das chalconas propostas desta série, sendo obtidas 13 chalconas. Destas, MN22 é um composto inédito, MN1, MN4, MN5, MN10, MN14, MN17 e MN20 apresentam registro no CAS (mas nenhuma citação em artigos científicos) e MN2, MN3, MN8, MN11 e MN12 foram previamente reportados na literatura (REDDY *et al.*, 2004 (A) ; REDDY *et al.*, 2004 (B); MICHELLYS *et al.*, 2006; HASUI *et al.*, 2011; FUKUMOTO *et al.*, 2007).

Os resultados experimentais da obtenção dos compostos da série MN estão listados na Tabela 13, na qual é possível observar que para nenhuma das chalconas propostas foram encontrados os valores de ponto de fusão na literatura. Portanto, neste trabalho foi realizada a primeira descrição desta importante propriedade física dos compostos.

Os 13 compostos obtidos foram caracterizados pela leitura de seu ponto de fusão e pelo RMN de ^1H . As tabelas 14 a 17 apresentam a caracterização das chalconas da série MN por RMN de ^1H , e por se tratarem de compostos pouco relatados na literatura, optou-se por inserir todos os espectros de RMN ^1H desta série como anexos deste trabalho (Anexo II). Devido às semelhanças estruturais, os espectros apresentaram deslocamentos químicos semelhantes, e deste modo optou-se pela discussão detalhada da caracterização apenas da chalcona MN12, derivada da condensação do benzaldeído com a 6-acetil-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona.

O espectro de RMN de ^1H do composto MN12 pode ser observado na Figura 28.

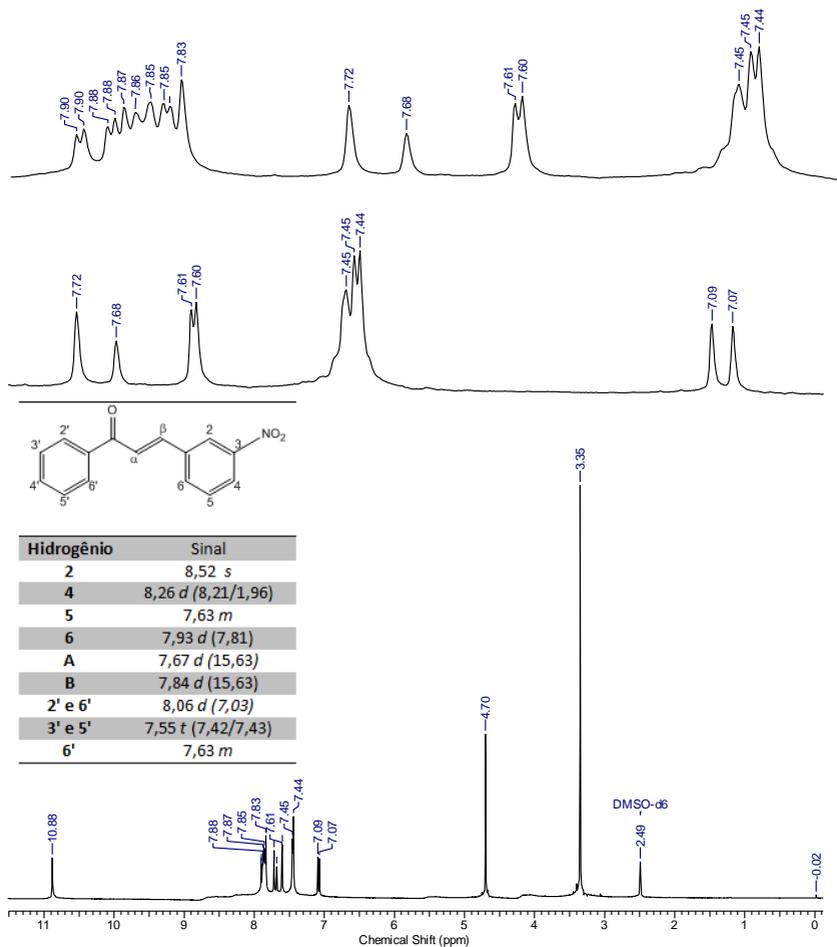


Figura 28. RMN de ^1H composto MN12. Deslocamento químico em relação ao TMS, solvente utilizado: DMSO-deuterado. () = J (constante de acoplamento, em Hertz).

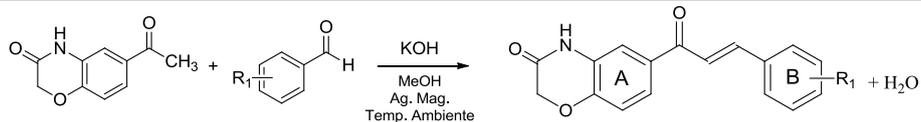
Durante a caracterização dos compostos derivados da 6-acetil-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona, uma dúvida surgiu inicialmente em relação ao singlete observado em 10,88 ppm, pois este deslocamento é característico do hidrogênio de aldeídos. Para sanar a dúvida foi realizado um espectro de RMN ^1H do reagente, no qual foi possível observar que o sinal em 10,88 ppm existia porém existia também um sinal em 11,13 ppm o qual foi atribuído ao hidrogênio do aldeído, pois este sumia após a realização das sínteses, se mantendo apenas o sinal em 10,88 ppm, o singlete atribuído ao hidrogênio ligado ao nitrogênio.

É possível também observar o sinal característico dos dois hidrogênios do grupo CH_2 vizinho à carbonila e ao oxigênio como um singlete em 4,70 ppm. Os hidrogênios α e β podem ser observados, respectivamente, com deslocamentos de 7,70 e 7,85 ppm, ambos como um duplete com constante de acoplamento igual a 15,63 Hz, o que sugere tratar-se do isômero *E* desta chalcona. O hidrogênio 2' aparece como um duplete com deslocamento de 7,61 ppm e constante de acoplamento de 1,96 Hz, referente a seu acoplamento a longa distância com o hidrogênio 6' do mesmo anel, o qual aparece como um duplo duplete com deslocamento de 7,89 ppm e constantes de acoplamento de 8,60 Hz com o hidrogênio 5' e 1,96 Hz com o hidrogênio 2'.

Pode-se observar que os sinais dos hidrogênios 2, 4 e 6 aparecem sobrepostos como um duplo duplete em 7,45 ppm, com constantes de acoplamento de 5,47 Hz e 2,45 Hz. O sinal referente aos hidrogênios 3 e 5 aparece em 7,86 ppm como um multiplete.

Devido à baixa solubilidade destes compostos em solventes deuterados, a realização dos espectros de RMN de ^{13}C foi prejudicada, uma vez que não foi possível solubilizar mais do que 2 miligramas destas chalconas na quantidade de solvente necessária para uma análise. Deste modo, é necessária a realização de análises de RMN de ^{13}C noturnas, e devido à alta demanda da Central de Análises do Departamento de Química nos últimos meses, estas análises não puderam ser realizadas até o momento.

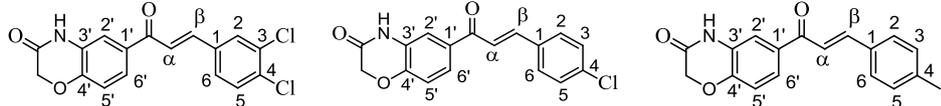
Tabela 13. Informações sobre os compostos da série MN.



Chalc.	R ₁	PM (g.mol ⁻¹)	Rend. (%)	Pf. Exp (°C)	Pf. Lit. (°C)	CAS
MN1	3,4-diCl	348,18	74	189-192	N.R.	875421-04-8
MN2	4-Cl	313,74	55	194-196	N.R.	749924-20-7
MN3	4-CH ₃	293,32	35	185-186	N.R.	750624-48-7
MN4	2,6-diCl	348,18	80	198-200	N.R.	1014775-98-4
MN5	4-Br	358,19	62	203-204	N.R.	897290-62-9
MN6	4-NO ₂	324,29	NO	-----	N.R.	941221-08-5
MN7	4-N(CH ₃) ₂	322,36	NO	-----	N.R.	211914-82-7
MN8	4-F	297,28	37	175-176	N.R.	750624-49-8
MN9	4-O(CH ₂) ₃ CH ₃	351,40	NO	-----	N.R.	879729-59-6
MN10	3-NO ₂	324,29	88	212-213	N.R.	949677-58-1
MN11	4-OCH ₃	309,32	71	234-235	N.R.	749924-18-3
MN12	H	279,29	71	198-196	N.R.	665021-94-3
MN14	3,4,5-triOCH ₃	369,37	52	252-254	N.R.	875421-01-5
MN17	2,4-diCl	348,18	68	187-188	N.R.	875421-03-7
MN20	4-CN	304,30	77	170-172	N.R.	949851-98-3
MN22	2,5-diOCH ₃	339,34	64	158-159	N.R.	Inédita

NO = composto não obtido. N.R. = não registrado.

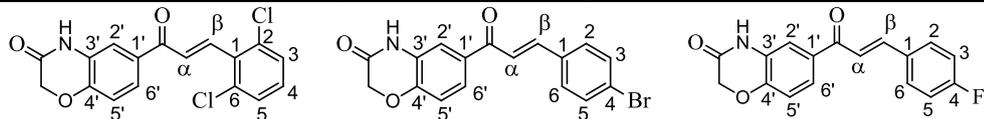
Tabela 14. Caracterização por RMN ^1H dos compostos MN1, MN2 e MN3.



^1H	MN1	MN2	MN3
2	7,61 s	7,93 m	7,77 d (8,21)
3	---	7,53 d (8,60)	7,09 d (8,21)
4	---	---	---
5	7,73 d (8,20)	7,53 d (8,60)	7,09 d (8,21)
6	7,97 d (8,20)	7,93 m	7,77 d (8,21)
α	7,68 d (16,00)	7,70 d (15,63)	7,69 d (15,63)
β	8,00 d (16,00)	7,93 m	7,82 d (15,63)
2'	8,28 s	7,61 s	7,61 d (1,95)
5'	7,11 d (8,20)	7,10 d (8,21)	7,29 d (7,82)
6'	7,87 d (8,20)	7,93 m	7,90 dd (8,60 / 1,95)
CH₂	4,72 s	4,72 s	4,71 s
NH	10,91 s	10,91 s	10,90 s
CH₃	---	---	2,36 s

δ ppm em relação ao TMS, *Multiplicidade* (J em Hz). Solvente DMSO- d_6 .

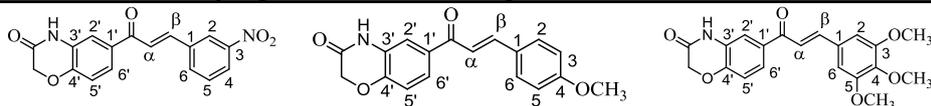
Tabela 15. Caracterização por RMN ^1H dos compostos MN4, MN5 e MN8.



^1H	MN4	MN5	MN8
2	--	7,67 d (8,21)	7,96 dd (8,60 / 2,73)
3	7,61 d (8,21)	7,84	7,31 t (8,60 / 8,98)
4	7,45 t (8,21/8,21)	---	---
5	7,61 d (8,21)	7,84	7,31 t (8,60 / 8,98)
6	---	7,67 d (8,21)	7,96 dd (8,60 / 2,73)
α	7,67 d (16,02)	7,68 d (16,81)	7,72 d (15,64)
β	7,75 d (16,02)	7,88 d (16,81)	7,85 d (15,64)
2'	7,60 s	7,61 d (1,95)	7,61 d (1,96)
5'	7,72 m	7,11 d (8,59)	7,10 d (8,60)
6'	7,10 s (8,20)	7,92 dd (8,59/1,59)	7,92 dd (8,60/1,96)
CH₂	4,72 s	4,72 s	4,72 s
NH	10,94 s	10,90 s	10,90 s

δ ppm em relação ao TMS, *Multiplicidade* (J em Hz). Solvente DMSO- d_6 .

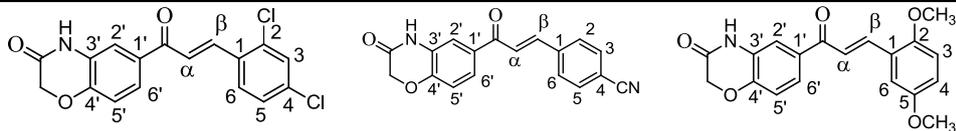
Tabela 16. Caracterização por RMN ^1H dos compostos MN10, MN11 e MN14.



^1H	MN10	MN11	MN14*
2	8,76 s	7,84 d (8,60)	7,21 s
3	---	7,02 d (8,60)	---
4	8,32 d (7,80)	---	---
5	7,75 t (8,20/7,80)	7,02 d (8,60)	---
6	8,27 d (8,20)	7,84 d (8,60)	7,21 s
α	7,82 d (15,63)	7,69 d (15,63)	7,65 d (15,54)
β	8,10 d (15,63)	7,74 d (15,63)	7,82 d (15,54)
2'	7,63 d (1,96)	7,60 d (1,95)	7,60 d (2,05)
5'	7,11 d (8,20)	7,09 d (8,21)	7,10 d (8,47)
6'	8,00 dd (8,20/1,96)	7,89 dd (8,21/1,95)	7,92 dd (8,47/2,05)
CH₂	4,72 s	4,71 s	4,71 s
NH	10,91 s	10,89 s	10,90 s
<i>p</i>-OCH₃	---	3,83 s	3,71 s
<i>m</i>-OCH₃	---	---	3,86 s

δ ppm em relação ao TMS, *Multiplicidade* (J em Hz). Solvente DMSO- d_6 . * RMN 200MHz

Tabela 17. Caracterização por RMN ^1H dos compostos MN17, MN20 e MN22.



^1H	MN17	MN20*	MN22
2	---	7,92 d (8,33)	---
3	7,75 d (1,95)	8,07 d (8,34)	7,05 d (2,34)
4	---	---	7,05 d (2,34)
5	8,22 d (8,60)	8,07 d (8,34)	---
6	7,55 d/d (8,60/1,95)	7,92 d (8,33)	7,51 d (2,34)
α	7,97 d (15,60)	7,73 d (15,79)	7,85 d (15,63)
β	7,92 d (15,60)	7,95 d (15,79)	7,98 d (15,63)
2'	7,61 d (1,95)	7,61 d (2,05)	7,61 d (1,96)
5'	7,10 d (8,20)	7,97 m	7,09 d (8,21)
6'	7,94 m	7,97 m	7,89 d (8,21/1,96)
CH₂	4,72 s	4,71 s	4,71 s
NH	10,92 s	10,89 s	10,90 s
<i>o</i>-OCH₃	---	---	3,80 s
<i>m</i>-OCH₃	---	---	3,85 s

δ ppm em relação ao TMS, *Multiplicidade* (J em Hz). Solvente DMSO- d_6 . * RMN 200MHz

5.2 Discussão dos resultados de atividade biológica

5.2.1 - Chalconas como inibidores da PtpA e PtpB de *Mycobacterium tuberculosis*

Inicialmente, foi realizado um *screening* em triplicada, com uma única concentração dos compostos (25 μ M) para determinar a atividade residual das proteínas PtpA e PtpB de *Mycobacterium tuberculosis*. As chalconas foram incubadas com as proteínas e tampão por 10 minutos a temperatura ambiente (nos testes realizados com a PtpA) ou 37°C (nos testes realizados com a PtpB). Após este período, adicionou-se o substrato (pNPP) e realizaram-se leituras de absorbância a cada 1 minuto, durante 10 minutos, a 37°C.

Os resultados obtidos após a análise dos dados para as duas séries de compostos sintetizados podem ser observados na Tabela 18, na qual estão apresentados os valores da atividade residual (%) para ambas as proteínas tirosina fosfatase, bem como o erro associado aos experimentos.

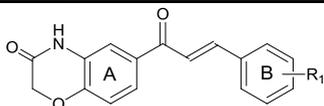
A análise dos resultados da Tabela 18 permite observar que os melhores inibidores da PtpB foram os compostos MN1 e MN10, derivados da 6-acetil-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona, tendo como substituintes do anel B os grupamentos 3,4-diCl₂ a 3-NO₂, respectivamente. MN1 e MN10 apresentaram inibição da PtpB superior a 50%, considerando-se o desvio padrão.

O composto MN1 também foi um dos melhores inibidores da PtpA, acompanhado por MN5, também derivado da 6-acetil-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona, com o grupo 4-Br como substituintes do anel B. MN1 e MN5 também apresentaram atividade inibitória da PtpA de aproximadamente 50%.

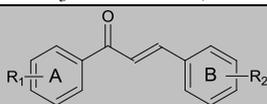
A avaliação dos resultados também permite observar que os compostos da série ML não apresentaram atividade como inibidores de ambas as proteínas tirosina fosfatase (PtpA e PtpB).

Os compostos que apresentaram atividade inibitória de ambas as PTPs superior a 50%, foram escolhidos para determinação de sua IC₅₀ (Tabela 19).

Tabela 18. Resultados da atividade das chalconas como inibidores das proteínas PtpA e PtpB de *Mycobacterium tuberculosis*.

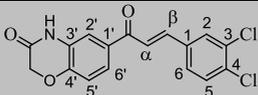
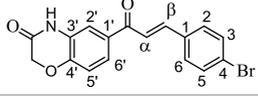
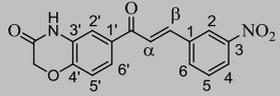


Chalcona	Substituinte	Atividade residual PtpB (% ± erro)	Atividade residual PtpA (% ± erro)
MN1	3,4-di-Cl	49,81 ± 14,11	40,54 ± 6,84
MN2	4-Cl	69,59 ± 3,69	60,31 ± 9,75
MN3	4-CH ₃	72,94 ± 1,16	69,41 ± 17,67
MN4	2,6-di-Cl	63,36 ± 4,72	54,90 ± 7,46
MN5	4-Br	72,38 ± 6,89	48,27 ± 6,91
MN8	4-F	76,22 ± 4,90	69,85 ± 0,48
MN10	3-NO ₂	47,66 ± 13,75	53,28 ± 0,18
MN11	4-OCH ₃	87,27 ± 1,01	72,80 ± 0,37
MN12	H	75,63 ± 11,19	71,68 ± 8,82
MN14	3,4,5-tri-OCH ₃	69,92 ± 9,77	87,05 ± 2,74
MN17	2,4-di-Cl	77,49 ± 4,41	77,67 ± 4,62
MN20	4-CN	63,79 ± 6,03	70,88 ± 15,45
MN22	2,5-di-OCH ₃	90,13 ± 0,18	92,79 ± 0,65



Chalcona	Substituinte		Atividade residual PtpB (% ± erro)	Atividade residual PtpA (% ± erro)
	R ₁	R ₂		
ML1	2,5-di-OCH ₃	3-NO ₂	>100	>100
ML2	2,4-di-OCH ₃	3-NO ₂	>100	>100
ML3	4-OCH ₃	3-NO ₂	>100	>100
ML4	3,4-di-OCH ₃	3-NO ₂	>100	>100
ML5	3,5-di-OCH ₃	3-NO ₂	92,93 ± 6,10	>100
ML6	2-OCH ₃	3-NO ₂	>100	97,36 ± 9,55
ML7	H	3-NO ₂	>100	>100
ML9	3-OCH ₃	3-NO ₂	>100	93,19 ± 13,32
ML14	3-NO ₂	4-OCH ₃	93,71 ± 11,99	>100
ML18	3-NO ₂	2,5-di-OCH ₃	88,89 ± 10,71	>100
ML24	3-NO ₂	2,6-di-OCH ₃	95,30 ± 1,22	85,83 ± 17,31

Tabela 19. Valores de IC₅₀ para os compostos que apresentaram inibição das Ptps superior a 50% no ensaio inicial.

Chalcona	Estrutura	IC ₅₀ (μM) PtpB	IC ₅₀ (μM) PtpA
MN1		18,44 ± 4,71	28,11 ± 0,33
MN5		ND	16,71 ± 0,29
MN10		12,04 ± 1,90	ND

ND = Não determinado

A análise da atividade inibitória proporcionada pela série MN pode ser feita baseando-se na Árvore de Decisão de Topliss (Figura 29), uma vez que é possível observar uma tendência na atividade inibitória das chalconas, que vai de acordo com um dos ramos da árvore.

Esta tendência na árvore de Topliss pode ser observada se compararmos a atividade do composto MN12 (sem substituinte) com o composto MN2 (4-Cl). Realizando-se esta comparação é possível observar que o composto MN2 foi mais ativo que MN12, porém, como o erro experimental do composto MN12 foi determinado, seria possível que a atividade do composto MN2 fosse semelhante à atividade do composto MN12.

Para melhorar a compreensão e confirmar a escolha de um dos ramos da Árvore de Decisão, resolveu-se comparar os resultados obtidos pela segunda linha de substituição da mesma. Deste modo, foi realizada uma comparação entre os compostos MN11 (4-metoxi), MN3 (4-metil) e MN1 (3,4-dicloro), sendo possível observar que o composto MN11 foi o de menor atividade. Assim, a escolha entre o ramo central ou o ramo da direita do modelo de Topliss foi auxiliada por esta etapa. É possível observar que o composto MN1 apresentou uma atividade superior ao composto MN3 para ambas as proteínas.

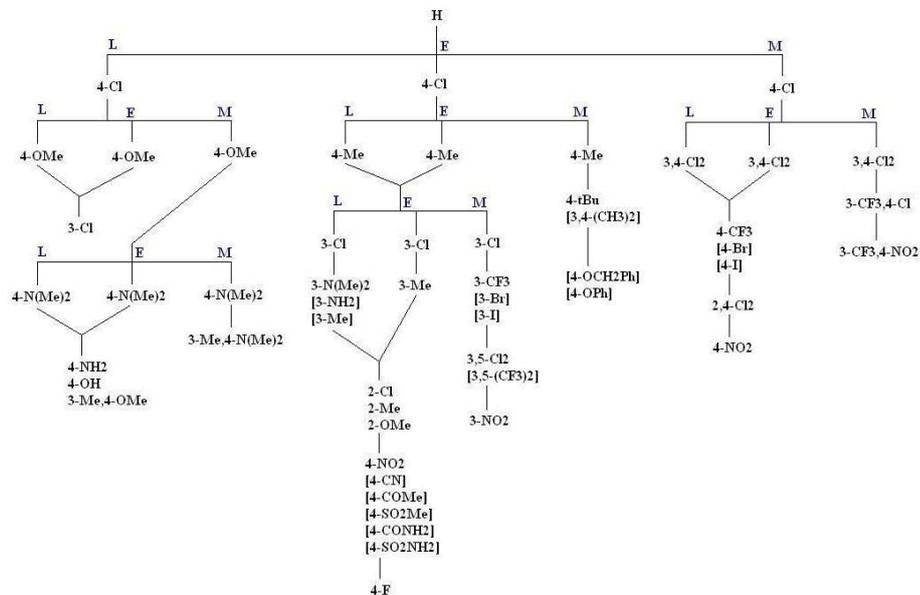


Figura 29. Árvore de decisão de TOPLISS, para a otimização de substituintes aromáticos: M, é mais ativo; E, é igualmente ativo; L, é menos ativo que o composto anterior da chave. Os grupos entre colchetes ([]) representam substituintes alternativos. As linhas descendentes indicam substituições seqüenciais (Adaptado de Topliss, 1972 e de De Waterbeemd, 1996).

Analisando a atividade inibitória da PtpA, e continuando pelo ramo da direita da Árvore de Decisão de Topliss, podemos comparar a atividade da chalcona MN1 ($IC_{50} = 28,11 \pm 0,33$, com o substituinte 3,4-diCl₂ no anel B) com a atividade da chalcona MN2 (com um átomo de cloro na posição 4 do anel B), onde pode-se observar um aumento na atividade do composto subsequente da chave, MN1. Dessa forma, seria esperado que o composto do ramo da direita (com substituinte 3-CF₃,4-Cl) fosse o mais ativo, porém, este composto não foi inicialmente planejado. Seguindo os substituintes do grande ramo da direita da Árvore de Decisão de Topliss, a atividade do composto MN5 ($IC_{50} = 16,71 \pm 0,29$, com um átomo de bromo na posição 4 do anel B) foi superior à atividade do composto MN1.

Analisando a atividade inibitória da PtpB, observa-se o mesmo resultado observado para a PtpA, quando comparamos a atividade dos compostos MN1 ($IC_{50} = 18,44 \pm 4,71$, com o substituinte 3,4-diCl₂ no anel B) com a atividade da chalcona MN2 (com um átomo de cloro na posição 4 do anel B), onde MN1 foi mais ativo que MN2. Entretanto, a chalcona mais ativa para a PtpB foi MN10 ($IC_{50} = 12,04 \pm 1,90$, com o substituinte 3-NO₂ no anel B), pertencente ao ramo central da Árvore de Decisão de Topliss, e portanto, a determinação da IC_{50} de outros compostos precisa ser realizada para analisarmos a relação estrutura-atividade de forma mais completa.

Outra observação que foi possível durante os estudos foi quanto ao perfil eletrônico dos substituintes que apresentaram melhor atividade. Para os 3 compostos mais ativos foi possível observar a presença de grupos retiradores de elétrons na estrutura, ou seja, grupos que diminuem a densidade eletrônica no anel aromático. Isto poderia sugerir outra característica de interesse para os novos protótipos candidatos a inibidores destas proteínas.

Dentre os compostos da série ML avaliados é possível observar que apenas 6 apresentaram alguma atividade, porém nenhum deles apresentou atividade inibitória maior que 25%, o que sugere que os compostos não são inibidores promissores.

Dessa forma, foram avaliadas 26 chalconas quanto à sua atividade inibitória das proteínas PtpA e PtpB de *Mycobacterium tuberculosis*, sendo que MN5 ($IC_{50} = 16,71 \pm 0,29$) apresentou a melhor atividade para a PtpA e MN10 a melhor atividade para a PtpB ($IC_{50} = 12,04 \pm 1,90$), podendo ser previamente considerados compostos líderes para o desenvolvimento de novos inibidores destas proteínas.

Outro fator considerado interessante para esta série se deve ao fato de utilizar um padrão de substituição pouco explorado pelo grupo de pesquisa. Uma vez que a inserção do anel que possui a amida e o heteroátomo podem mostrar novos modos de ação, até mesmo possibilitando que um dos compostos venha a agir como um pró-fármaco.

Estudos posteriores com estes compostos devem ser realizados para que sejam conhecidos os modos de ação destas chalconas, determinação dos parâmetros cinéticos e dos índices de seletividade deverão ser realizados. Deste modo o trabalho com esta série de compostos mostra uma linha de sequencia na pesquisa permitindo a continuidade dos estudos.

5.2.2. Chalconas com atividade em macrófagos infectados com formas amastigotas de *Leishmania amazonensis* e com formas promastigotas de *Leishmania braziliensis*

Inicialmente foi realizada uma triagem com uma concentração fixa de 50 μ M de compostos. Esta triagem foi realizada com células THP-1 infectadas com *L. amazonensis* expressando β -galactosidase. Para os compostos que foram selecionados para os estudos de citotoxicidade, foram determinados os valores de índice de seletividade (IS). Os resultados preliminares obtidos nesta etapa podem ser visualizados na Tabela 20.

Uma análise nos resultados preliminares da atividade anti-leishmania sugere que dos 11 compostos testados, apenas dois não apresentaram atividade inibitória, sendo estes compostos os que apresentam o grupo nitro na posição 3 do anel A, o que pode indicar que a inversão do substituinte nitro para o grupo A do anel não seja algo desejável para a atividade anti-leishmania. Por outro lado, no *screening* inicial, foram identificados 6 compostos com o grupamento nitro na posição 3 do anel B que apresentaram inibição superior a 84%.

Observando os valores de CI_{50} para as formas amastigotas intracelulares de *Leishmania amazonensis*, é possível identificar que o composto ML6 ($CI_{50} = 0,12 \mu$ M) apresentou atividade semelhante ao fármaco de referência Anfotericina ($CI_{50} = 0,13 \mu$ M). Já para as formas promastigotas de *Leishmania braziliensis*, os compostos ML6 ($CI_{50} 0,019\mu$ M) e ML1($CI_{50} 0,02\mu$ M) apresentaram melhor atividade que a

Anfotericina ($CI_{50} = 0,08\mu M$). Entretanto, ambos os compostos (ML1 e ML6) apresentaram-se muito citotóxicos ($IS < 1$).

De modo geral, os compostos ML2, ML3, ML4, ML7, ML9 e ML18 também eram interessantes devido aos seus resultados frente às duas formas de leishmania, e assim determinou-se o índice de seletividade para estes compostos levando-se em conta os experimentos frente às formas amastigotas intracelulares. O composto ML3, mesmo não apresentando valores de IC_{50} excelentes, pode ser considerado o mais promissor dentre todos os avaliados, pois apresentou índice de seletividade superior a 10 ($IS = 15,58$), devendo servir de base para futuras otimizações estruturais.

Tabela 20. Resultados de inibição dos compostos da série ML em formas amastigotas de *Leishmania amazonensis* e formas promastigotas de *Leishmania braziliensis*.

Chalcona	% inibição ($50\mu M$)	CI_{50} amastigotas <i>Leishmania</i> <i>amazonensis</i> (μM)	CI_{50} promastigotas <i>Leishmania</i> <i>braziliensis</i> (μM)	CC_{50} (μM)	IS
ML1	89,94	2,18	0,02	**	-
ML2	84,99	8,73	4,34	36,26	4,15
ML3	64,88	21,14	29,84	329,5	15,58
ML4	90,96	4,67	0,42	8,78	1,88
ML6	88,97	0,12	0,019	0,02	0,16
ML7	87,89	11,23	1,75	60,09	5,35
ML9	90,93	11,68	4,73	56	4,79
ML14	SA	-	-	-	-
ML18	63,03	74,58	80,82	343,4	4,60
ML20	3,75	-	-	-	-
ML24	SA	-	-	-	-
Anfo- tericina	92,19	0,13	0,08		

** Composto citotóxico. SA = Sem atividade. IS = obtido pela razão CI_{50}/CC_{50} frente às formas amastigotas.

Deste modo, foram testadas 11 chalconas contra formas amastigotas de *Leishmania amazonensis* e contra formas promastigotas

de *L. braziliensis*, sendo ML3 a mais promissora, devido a sua melhor seletividade.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho foram obtidos 26 compostos dos 32 inicialmente propostos. Todas as chalconas da série ML foram identificadas e caracterizadas através do ponto de fusão e do RMN de ^1H e de ^{13}C . As chalconas da série MN foram caracterizadas por RMN ^1H e leitura do ponto de fusão. Os compostos foram obtidos com rendimentos variando de 34 a 95% para a série derivada da CH8 e 37 a 88% para os compostos derivados da 6-acetil-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona, valores que foram considerados satisfatórios.

A avaliação dos compostos forneceu 3 chalconas derivadas da 6-acetil-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona (série MN) com promissora atividade inibitória das proteínas PtpA e PtpB de *Mycobacterium tuberculosis*. para os quais foram determinados os valores de IC_{50} : compostos MN1 ($\text{IC}_{50} = 18,44 \pm 4,71$ para PtpB e $\text{IC}_{50} = 28,11 \pm 0,33$ para PtpA), MN5 ($\text{IC}_{50} = 16,71 \pm 0,29$ para PtpA) e MN10 ($\text{IC}_{50} = 12,04 \pm 1,90$ para PtpB). O composto mais ativo frente à PtpB foi MN10 e frente à PtpA foi o MN5.

Já entre os compostos derivados da chalcona CH8 (série ML), foi observado que a maioria apresentou inibição superior a 60% para as formas amastigotas de *Leishmania amazonensis*. Foram determinados os valores de IC_{50} para células infectadas com *Leishmania amazonensis* e também para formas promastigotas de *Leishmania braziliensis*, sendo o composto ML3 considerado o mais promissor, devido ao seu melhor índice de seletividade dentre todas as estruturas avaliadas ($\text{IS} = 15,58$).

7. PERSPECTIVAS

Como perspectivas futuras deste trabalho, podemos relacionar:

- Completar a caracterização dos compostos da série MN com os dados de RMN ^{13}C .
- Realizar análise de CHN dos compostos inéditos.
- Realizar estudos cinéticos para os compostos mais ativos em PtpA e PtpB, buscando compreender seu mecanismo de inibição.
- Realizar a avaliação de testes de seletividade dos compostos ativos nas proteínas PtpA e PtpB frente a outras Ptps.
- Planejar e sintetizar novos compostos baseados nos substituintes indicados pela Árvore de Decisão de Topliss.
- Planejar e sintetizar compostos derivados dos mais ativos, na busca pela otimização estrutural.
- Utilizar novas metodologias para a síntese dos compostos que não foram obtidos pela condensação aldólica usual, e também para obter melhores resultados para os compostos obtidos com baixos rendimentos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ALCARAZ, M. J.; VICENTE, A. M.; ARAICO, A.; DOMINGUEZ, J. N.; TERCENIO, M. C.; FERRANDIZ, M. L.; Role of nuclear factor- κ B and heme oxygenase-1 in the mechanism of action of an anti-inflammatory chalcone derivative in RAW 264.7 Cells. *British Journal of Pharmacology*, 142, 1191–1199, **2004**.

AL-MASUM M. ; NG. E.; WAI M. C. Palladium-catalyzed direct cross-coupling of potassium styryltrifluoroborates and benzoyl chlorides: a one step method for chalcone synthesis. *Tetrahedron Letters*, 52, 1008-1010, **2011**.

ANSARI F. L.; NAZIR S.; NOUREEN H.; MIRZA B. Combinatorial Synthesis and Antibacterial Evaluation of an Indexed Chalcone Library *Chemistry & Biodiversity*, 2, 1652 , **2005**

AOYAMA, H.; SILVA, T. M. A.; MIRANDA, M. A.; FERREIRA, C. V. Proteínas tirosina fosfatases: propriedades e funções biológicas *Química Nova*, 26, (6), 896-900, **2003**.

ÁVILA, H.P.; SMÂNIA, E. F.; MONACHE, F.D.; JÚNIOR, A.S.; Structure-activity relationship of antibacterial chalcones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16, 9790-9794, **2008**.

BACH, H.; PAPA VINASASUNDARAM, K. G.; WONG, D.; HMAMA, Z.; AV-GAY, Y. *Mycobacterium tuberculosis* Virulence is Mediated by PtpA Dephosphorylation of Human Vacuolar Protein Sorting 33B. *Cell Host & Microbe*, 3(5), 316-322, **2008**.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. *Química Medicinal – As bases moleculares da ação dos fármacos*. 2 ed. Porto Alegre, Brasil: Artmed, **2008**. 536 p.

BATOVSKA, D.; PARUSHEV, ST.; SLAVOVA, A.; BANKOVA, V.; TSVETKOVA, I.; NINOVA, M.; NAJDENSKI, H. Study on the substituents' effects of a series of synthetic chalcones against the yeast *Candida albicans*. *European Journal of Medicinal Chemistry* , 42(1), 87-92, **2007**.

BELLO, M. L.; CHIARADIA, L. D.; DIAS, L. R. S.; PACHECO, L. K.; STUMPF, T. R.; MASCARELLO, A.; STEINDEL, M.; YUNES, R. A.; CASTRO, H. C.; NUNES, R. J.; RODRIGUES, C. R. Trimethoxy-chalcone derivatives inhibit growth of *Leishmania braziliensis*: Synthesis, biological evaluation, molecular modeling and structure activity relationship (SAR). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19, 5046-5052, **2011**.

BERESFORD, N. J.; MULHEARN, D.; SZCZEPANKIEWICZ, B.; LIU, G.; JOHNSON, M. E.; FORDHAM-SKELTON, A.; ABAD-ZAPATERO, C.; CAVET, J. S.; TABERNERO, L. Inhibition of MptpB phosphatase from *Mycobacterium tuberculosis* impairs mycobacterial survival in macrophages. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63, 928-936, **2009**.

BEGUM, N. A.; ROY, N.; LASKAR, R. A.; ROY, K., Mosquito larvicidal studies of some chalcone analogues and their derived products: structure–activity relationship analysis. *Medicinal Chemistry Research*, 20(2), 184-191, **2011**.

BERGMANN, B. R.; TORRES-SANTOS, E. C.; YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V.; BOECK, P. Preparation of chalcones for the treatment of parasitic diseases. Brazil *PI 0204079-4*. **2004**. 40 p.

BOECK, P.; FALCÃO, C. A. B.; LEAL, P. C.; YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V.; TORRESSANTOS, E. C.; BERGMANN, B. R. Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 14(5), 1538-1545, **2006**.

CALVINO, V.; PICALLO, M.; LÓPEZ-PEINADO, A. J.; MARTÍN-ARANDA, R. M.; DURÁN-VALLE, C. J. Ultrasound accelerated Claisen-Schmidt condensation: a green route to chalcones. *Applied Surface Science*, 252, 6071-6074, **2006**.

CAVILL, G. W. K.; DEAN, F. M.; MCGOOKIN, A.; MARSHALL, B. M.; ROBERTSON, A. The oxidation of chromanones and flavanones with lead tetra-acetate, *Journal of the Chemical Society*, 4573-81, **1954**.

CHAST, F. A History of Drug Discovery . In: Wermuth, C. G. (org.). *The Practice of Medicinal Chemistry*. 3 ed. Illkirch, France: Elsevier, **2008**. Cap. 1. p.3 -62.

CHEN, M.; CHRISTENSEN, S. B.; BLOM, J.; LEMMICH, E.; NADELMANN, L.; FICH, K.; THEANDER, T. G.; KHARAZMI, A. Licochalcone A, a novel antiparasitic agent with potent activity against huma pathogenic protozoan species of *Leishmania*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(12), 2550-2556, **1993**.

CHEN, M.; CHRISTENSEN, S. B.; THEANDER, T. G.; KHARAZMI, A. Antileishmanial activity of licochalcone A in mice infected with *Leishmania major* and in hamsters infected with *Leishmania donovani*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38(6), 1339-1344, **1994**.

CHEN, M.; ZHAI, L.; CHRISTENSEN, S. B.; THEANDER, T. G.; KHARAZMI, A. Inhibition of fumarate reductase in *Leishmania major* and *L. donovani* by chalcones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(7), 2023-2029, **2001**.

CHIARADIA, L. D.; MARTINS, P. G. A.; CORDEIRO, M. N. S.; GUIDO, R. V. C.; ECCO, G.; ANDRICOPULO, A. D.; YUNES, R. A.; VERNAL, J.; NUNES, R. J.; TEREZI, H. Synthesis, Biological Evaluation, And Molecular Modeling of Chalcone Derivatives As Potent Inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* Protein Tyrosine Phosphatases (PtpA and PtpB). *Journal of Medicinal Chemistry*, 55, 390-402, **2012**.

CHIARADIA, L. D. ; MASCARELLO, A. ; PURIFICACAO, M. ; VERNAL, J. ; CORDEIRO, M. N. S. ; ZENTENO, M. E. ; VILLARINO, A. ; NUNES, R. J. ; YUNES, R. A. ; TEREZI, H. Synthetic chalcones as efficient inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase PtpA. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (Print), v. 18, p. 6227-6230, **2008**.

CHIARADIA, L. D.; SANTOS, R. dos; VITOR, C. E.; VIEIRA, A. A.; LEAL, P. C.; NUNES, R. J.; CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. Synthesis and pharmaco-logical activity of chalcones derived from 2,4,6-trimethoxyacetophenone in RAW 264.7 cells stimulated by LPS:

Quantitative structure-activity relationships. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16, 658-667, **2008**.

CHIARADIA, L.D. *Síntese, caracterização e estudo da relação estrutura-atividade (REA) de chalconas e de compostos heterocíclicos biologicamente ativos em doenças negligenciadas, hiperglicemia e leucemia*. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, **2010**. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/88830/233077.pdf?sequence=1>>. Acesso em 10 janeiro 2013.

CLIMENT, M.; CORMA, A.; IBORRA, S.; VELTY, A. Activated hydrotalcites as catalysts for the synthesis of chalcones of pharmaceutical interest. *Journal of Catalysis*, 221(2), 474-482, **2004**.

COLE, S. T.; BROSCHE, R.; PARKHILL, J.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; GORDON, S. V.; EIGLMEIER, K.; GAS, S.; 3RD BARRY, C. E.; TEKAIA, F.; BADCOCK, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R.; DEVLIN, K.; FELTWELL, T.; GENTLES, S.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; HORNSBY, T.; JAGELS, K.; KROGH, A.; MCLEAN, J.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; OSBORNE, J.; QUAIL, M. A.; RAJANDREAM, M. A.; ROGERS, J.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; SULSTON, J. E.; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B. G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 393, 537-544, **1998**.

DIMMOCK, J. R.; ELIAS, D. W.; BEAZELY, M. A.; KANDEPU, N. M. Bioactivities of chalcones. *Current Medicinal Chemistry*, 6(12), 1125-1149, **1999**.

DOMINGOS, A. & BARBADO, A., *Tratamento da tuberculose multirresistente* in: Tratado de pneumologia, 1ª ed. PERMAYNER, PORTUGAL, LISBOA, **2003**.

DOMÍNGUEZ, J. N.; CHARRIS, J. E.; LOBO, G.; DOMÍNGUEZ, N. G. de; MORENO, M. M.; RIGGIONE, F.; SANCHEZ, E.; OLSON, J.,

ROSENTHAL, P. J. Synthesis of quinolinyl chalcones and evaluation of their antimalarial activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 36(6), 555-560, **2001**.

DOMÍNGUEZ, J. N.; LEÓN, C.; RODRIGUES, J.; DOMÍNGUEZ, N. G. de; GUT, J.; ROSENTHAL, P. J. Synthesis and antimalarial activity of sulfonamide chalcone derivatives. *Il Farmaco*, 60, 307-311, **2005**.

DUCKI, S.; FORREST, R.; HADFIELD, J. A.; KENDALL, A.; LAWRENCE, N. J.; McGROWN, A. T.; RENNISON, D. Potent antimetabolic and cell growth inhibitory properties of substituted chalcones. *Bioorganic & Medicinal Chemical Letters*, 8, 1051-1056, **1998**.

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

EDWARDS, MICHAEL L.; STEMERICK, DAVID M.; SUNKARA, PRASAD S. *Journal of Medicinal Chemistry*, 33(7), 1948-54, **2009**.

ENRIZ, R. D.; López, S. N.; Castelli, M.V.; Zacchino, S. A.; Domínguez, J. N.; Lobo, G.; Charris-Charris, J.; Cortés, J. C.G.; Ribas, J.C.; Devia, C.; Rodríguez, A. M., *In vitro* antifungal evaluation and structure-activity relationships of a new series of chalcone derivatives and synthetic analogues, with inhibitory properties against polymers of the fungal cell wall. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 9,(8), 1999-2013, **2001**.

FERREIRA, C. V.; TAGA, E. M.; AOYAMA, H. Glycolytic intermediates as substrates of soybean acid phosphatase isoforms, *Plant Science*, 147, 1, **1999**, p.49-54.

FILHO A. V. C.; LUCAS, Í. C.; SAMPAIO R. R. N. Comparative study between oral miltefosine and parenteral N-metil glucamine antimoniate for the treatment of experimental leishmaniasis caused *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41(4): 424-427, **2008**.

FUN, H.; CHIA, T. S.; NARAYANA, B.; NAYAK, P. S.; SAROJINI, B. K. *Acta Crystallographica, Section E: Structure Reports Online*, 67(11), **2011**.

GACCHE, R. N.; DHOLE, N. A.; KAMBLE, S. G.; BANDGAR, B. P. *In vitro* evaluation of selected chalcones for antioxidant activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 23(1), 28-31, **2008**.

GO, M. L.; WU, X.; LIU, X. L. Chalcones: an update on cytotoxic and chemoprotective properties. *Current Medicinal Chemistry*, 12, 483-499, **2005**.

GRUNDNER, C.; NG, H.; ALBER, T. *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase PtpB structure reveals a diverged fold and a buried active site. *Structure*, 13, 1625-1634, **2005**.

GRUNDNER, C.; PERRIN, D.; Van HUIJSDUIJNEN, R. H.; SWINNEN, D.; GONZALEZ, J.; GEE, C. L.; WELLS, T. N.; ALBER, T. Structural basis for selective inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* Protein Tyrosine Phosphatase PtpB. *Structure*, 15(4), 499-509, **2007**.

HERENCIA, F.; FERRÁNDIZ, M.L.; UBEDA, A.; DOMÍNGUEZ, J.N.; CHARRIS, J.E.; LOBO, G.M.; ALCARAZ, M.J.; Synthesis and anti-inflammatory activity of chalcone derivatives. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, 8(10), 1169-74, **1998**.

HONGSHE; ZENG, JUNE, Iodine-catalyzed efficient synthesis of chalcones by grinding under solvent-free conditions *Canadian Journal of Chemistry*, 87(9), 1209-1212, **2009**.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A. F. *In vitro* leishmanicidal activity of naturally occurring chalcones. *Phytother Research*, 15(2): 148-52, **2001**.

KOUL, A.; HERGET, T.; KLEBL, B.; ULLRICH, A. Interplay between mycobacteria and host signaling pathways. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 189-202, **2004**.

KUMAR, S.; LAMBA, M. S.; MAKRANDI, J. K. An efficient green procedure for the synthesis of chalcones using C-200 as solid support under grinding conditions. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 1(2-4), 123-125, **2008**.

LAWRENCE, N. J.; PATTERSON, R. P.; OOI, L. L.; COOK, D.; DUCKI, S. Effects of α - substitutions on structure and biological activity of anticancer chalcones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16, 5844-5848, **2006**.

LEBEAU, J.; FURMAN, C.; BERNIER, J.; DURIEZ, P.; TEISSIER, E.; COTELLE, N. Antioxidant properties of di-tert-butylhydroxylated flavonoids. *Free Radical Biology Medicine*, 29(9): 900-12, **2000**.

LI, R.; KENYON, G. L.; COHEN, F. E.; CHEN, X.; GONG, B.; DOMINGUEZ, J.; DAVIDSON, E.; KURZBAN, G.; MILLER, R. E.; NUZUM, E. O.; ROSENTHAL, P.; MCKERROW, J. H. *In vitro* antimalarial activity of chalcones and their derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, 38, 5031-5037, **1995**.

LIU, M.; WILAIRAT, P.; CROFT, S. L.; TAN, A. L. C.; GO, M. L. Structure-Activity Relationships of Antileishmanial and Antimalarial Chalcones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 11, 2729-2738, **2003**.

LIU, M.; WILAIRAT, P.; GO, M. L. Antimalarial alkoxyated and hydroxylated chalcones: structure-activity relationship analysis. *Journal of Medicinal Chemistry*, 44, 4443-4452, **2001**.

LOPEZ, S. N.; CASTELLI, M. V.; ZACCHINO, S. A.; DOMINGUEZ, J. N.; LOBO, G.; CHARRIS-CHARRIS, J.; CORTES, J. C. G.; RIBAS, J. C.; DEVIA, C.; RODRIGUEZ, A. M.; ENRIZ, R. D. *In vitro* antifungal evaluation and structure-activity relationships of a new series of chalcone derivatives and synthetic analogues, with inhibitory properties against polymers of the fungal cell wall. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 9, 1999-2013, **2001**.

LOPEZ, S. N.; SORTINO, M.; ESCALANTE, A.; DE CAMPOS, F.; CORREA, R.; CECHINELFILHO, V.; NUNES, R. J.; ZACCHINO, S. A. Antifungal properties of novel *N*- and *alfa,beta*-substituted

succinimides against dermatophytes. *Arzneimittel-Forschung*, 53 (4), 280-288, **2003**.

LUNARDI, F.; GUZELA, M.; RODRIGUES, A. T.; CORRÊA, R.; MNGRICH, I. E.; STEINDEL, M.; GRISARD, E. C.; ASSREUY, J.; CALIXTO, J. B.; SANTOS, A. R. S. Trypanocidal and leishmanicidal properties of substitution-containing chalcones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47, 1449-1451, **2003**.

MADHURANTAKAM, C.; RAJAKUMARA, E.; MAZUMBAR, P. A.; SAHA, B.; MITRA, D.; WIKER, H. G.; SANKARANARAYANAN, R.; DAS, A. K. Crystal structure of low-molecularweight protein tyrosine phosphatase from *Mycobacterium tuberculosis* as 1.9 Å resolution. *Journal of Bacteriology*, 187, 2175-2181, **2005**.

MANGER, M.; SCHECK, M.; PRINZ, H.; VON KRIES, J. P.; LANGER, T.; SAXENA, K.; SCHWALBE, H.; FÜRSTNER, A.; RADEMANN, J.; WALDMANN, H. Discovery of *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosinase phosphatase A (MptpA) inhibitors based on natural products and a fragment-based approach. *Chem Bio Chem*, 6, 1749-1753, **2005**.

MASCARELLO, A.; CHIARADIA, L. D.; VERNAL, J.; VILLARINO, A.; GUIDO, R.V.C.; PERIZZOLO, P.; POIRIER, V.; WONG, D.; MARTINS, P. G. A.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A.; ANDRICOPULO, A. D.; AV-GAY, Y.; TERENZI, H. Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* tyrosine phosphatase PtpA by synthetic chalcones: kinetics, molecular modeling, toxicity and effect on growth. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18, 3783-3789, **2010**.

MICHELLYS, P.; PETRASSI, H. M.; RICHMOND, W.; PEI, W. Compounds as modulators of steroid hormone nuclear receptors *PCT Int. Appl.* (**2006**), WO 2006015259 A2 20060209.

MS, **2007**. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana* / 2. ed. atual. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, **2007**. 180 p. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_lta_2ed.pdf>, acesso em 10 abril 2013.

MS. Manual de Recomendações para o Diagnóstico, Tratamento e Acompanhamento de Pacientes com a Coinfecção *Leishmania*-HIV, Brasil, **2011**. 112p. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/leishmania_hiv_web_25_01_11.pdf>. Acesso em: 15 maio 2013.

MS. *Boletim epidemiológico: Tuberculose: alinhada com o social afinada com a tecnologia*. Brasil, **2013**. 6p. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2013/Abr/10/boletim2_2013_tb_web.pdf>. Acesso em 15 de maio de 2013.

NAM, N. H., KIM, Y. *et al.* Cytotoxic 2',5'-dihydroxychalcones with unexpected antiangiogenic activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 38(2), 179-87, **2003**.

NARENDER, T. & REDDY K. P., A simple and highly efficient method for the synthesis of chalcones by using borontrifluoride-etherate, *Tetrahedron Letters*, 48, 18, 3177-3180, **2007**.

NEONAKIS, I. K.; GITTI, Z.; KRAMBOVITIS, E.; SPANDIDOS, D. A. Molecular diagnostic tools in mycobacteriology. *Journal of Microbiological Methods* 75, 1-11, **2008**.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M. *Parasitologia Humana*, Atheneu, 494p, **2005**.

NIELSEN, S. F.; CHRISTENSEN, S. B.; CRUCIANI, G.; KHARAZMI, A.; LILJEFORS, T. Antileishmanial chalcones: statistical design, synthesis and three-dimensional Quantitative Structure-Activity relationship analysis. *Journal of Medicinal Chemistry*, 41, p. 4819-4832, **1998**.

NINOMIYA, Y.; SHIMMA, N.; ISHITSUKA, H. Comparative studies on the antirhinovirus activity and the mode of action of the rhinovirus capsid binding agents, chalcone amides. *Antiviral Research*, 13(2), 61-74, **1990**.

NÖREN-MÜLLER, A.; REIS-CORRÊA Jr., I.; PRINZ, H.; ROSENBAUM, C.; SAXENA, K.; SCHWALBE, H. J.; VESTWEBER,

D.; CAGNA, G.; SCHUNK, S.; SCHWARZ, O.; SCHIEWE, H.; WALDMANN, H. Discovery of protein phosphatase inhibitor classes by biology-oriented synthesis. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 103(28), 10606-10611, **2006**.

NOWAKOWSKA, Z. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 42, 125-137, **2007**.

NUNES, R. K. *Clonagem e expressão da enzima tripanotona redutase de leishmania braziliensis e atividade leishmanicida de chalconas*. Dissertação de mestrado Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Florianópolis, **2011**.

OLIVEIRA, K. N.; CHIARADIA, L. D.; MARTINS, P. G. A.; MASCARELLO, A.; CORDEIRO, M. N. S.; CARVALHO G.; VICTORIO, R.; ANDRICOPULO, A. D.; YUNES, R. A.; NUNES, R. J.; VERNAL, J.; TERENCEZI, H. Sulfonyl-hydrazones of cyclic imides derivatives as potent inhibitors of the Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase B (PtpB). *Medicinal Chemical Communication*, 2, 500-504, **2011**.

OPLETALOVA, V. & SEDIVY, D. Chalcones and their heterocyclic analogs as potential antifungal chemotherapeutic agents. *Ceska Slov Farm*, 48(6), 252-5, **1999**.

PETROV, O.; IVANOVA, Y.; GEROVA, M. SOCl₂/EtOH: Catalytic system for synthesis of chalcones. *Catalysis Communications*., 9(2), 315-316, **2008**.

POLINSKY, A. Lead-likeness and drug-likeness. In: WERMUTH, C. G. (org.). *The Practice of Medicinal Chemistry*. 3 ed. Illkirch, France: Elsevier, **2008**. Cap. 12, p. 244-254.

RAM, V. J., SAXENA, A. S. *et al.* Oxygenated chalcones and bischalcones as potential antimalarial agents. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, 10(19): 2159-61, **2000**.

REDDY, G. JAGATH; REDDY, R. SHAILAJA; PALLAVI, K.; RAO, K. SRINIVASA Synthesis of 6-[1-(4'-hydroxycoumarin-3'-yl)-1-phenyl]propionyl-2H-[1,4]-benzoxazin-3(4H)-ones. *Heterocyclic Communications* , 10(1), 93-96, **2004**.

REDDY, G. JAGATH; THIRUPATHAIAH, C.; RAO, K. SRINIVASA; KHALILULLAH, MD. Synthesis of 6-(1,5-benzothiazepinyl/pyridyl)-2H-[1,4]-benzoxazin-3[4H]-ones. *Heterocyclic Communications*, 10(1), 43-46, **2004**.

ROMANELLI, G.; PASQUALE, G.; SATHICQ, Á.; THOMAS, H.; AUTINO, J.; VÁZQUEZ, P. Synthesis of chalcones catalyzed by aminopropylated silica sol-gel under solvent-free conditions. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 340(1-2), 24-32, **2011**.

RUIZ-MANZANO, J.; BLANQUER, R.; CALPE, J. L.; CAMINERO, J. A.; CAYLÁ, J.; DOMÍNGUEZ, J. A.; GARCÍA, J. M.; VIDAL, R. Diagnosis and treatment of tuberculosis. *Archivos de Bronconeumología*, 44(10), 551-566, **2008**.

SALUM, L. B. ; ALTEI, W. F. ; CHIARADIA, L. D. ; CORDEIRO, M. N. S. ; CANEVAROLO, R. R. ; MELO, C. P. S. ; WINTER, E. ; MATTEI, B. ; DAGHESTANI, H. N. ; SANTOS-SILVA, MARIA CLÁUDIA ; CRECZYNSKI-PASA, Tânia Beatriz ; YUNES, R. A. ; YUNES, J. A. ; ANDRICOPULO, A. D. ; DAY, B. W. ; NUNES, R. J. ; VOGT, A. Cytotoxic 3,4,5-trimethoxychalcones as mitotic arresters and cell migration inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 501-510, **2013**.

MEHRA, H. S.; LAL MATHUR, K. B. *Journal of the Indian Chemical Society* 33, 618-20, **1956**.

SCHWENDE, H. et al. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Journal Leukocyte Biology*. 59, 4, p. 555-561, **1996**.

SEBTI, S.; SOLHY, A.; TAHIR, R.; BOULAAJAJ, S.; MAYORAL, J. A.; FRAILE, J. M.; KOSSIR, A.; OUMIMOUN, H. *Tetrahedron Letters*, 42, 7953-7955, **2001**.

SIVAKUMAR, P. M.; PRIYA, S.; DOBLE, M. Synthesis, biological evaluation, mechanism of action and quantitative structure-activity relationship studies of chalcones as antibacterial agents. *Chemical Biology & Drug Design*, 73(4), 403-415, **2009**.

SOELLNER, M. B.; RAWLS, K. A.; GRUNDNER, C.; ALBER, T.; ELLMAN, J. A. Fragmentbased substrate activity screening method for the identification of potent inhibitors of the *Mycobacterium tuberculosis* phosphatase PtpB. *Journal of American Chemical Society*, 129, 9613-9615, **2007**.

SRIVASTAVA, Y.K. Ecofriendly Microwave Assisted Synthesis of Some Chalcones. *Journal of Chemical Research.*, 1(4), 884-886, **2008**.

SVS, **2010**. *Situação epidemiológica das zoonoses de interesse para a saúde pública, 2010.* Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ano10_n02_sit_epidemio1_zoonoses_br.pdf>. Acesso em 15 maio 2013.

TOPLISS, J. G. Utilization of operational schemes for analog synthesis in drug design. *Journal of Medicinal Chemistry*, 15, 1006, **1972**.

TORRES-SANTOS E. C.; SAMPAIO-SANTOS, M. I.; BUCKNER F. S.; YOKOYAMA K.; GELB M.; URBINA J. A.; ROSSI-BERGMANN B. Altered sterol profile induced in *Leishmania amazonensis* by a natural dihydroxymethoxylated chalcone *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 63, 469-472, **2009**.

TORRES-SANTOS, E. C.; MOREIRA, D. L.; KAPLAN, M. A. C.; MEIRELLES, M. N.; ROSSIBERGMANN, B. Selective effect of 2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(5), 1234-1241, **1999**.

VINTONYAK, V. V.; WARBURG, K.; KRUSE, H.; GRIMME, S.; HÜBEL, K.; RAUH, D. WALDMANN, H. Identification of Thiazolidinones Spiro-Fused to Indolin-2-ones as Potent and Selective Inhibitors of the *Mycobacterium tuberculosis* Protein Tyrosine

Phosphatase B *Angewandte Chemie International Edition*, 49, 5902 – 5905, **2010**.

VOGEL, A. I. *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*, 5 ed. New York: John Wiley & Sons, **1989**. p.1017.

WERMUTH, D. G.; GANELLIN, C. R.; LINDBERG, P.; MITSCHER, L. A. Glossary of terms used in medicinal chemistry. *Pure and Applied Chemistry*., 70 (5), 1129-1143, **1998**.

WHO *Sixtieth world health assembly*. Geneva, **2008**. 339p. Disponível em: < http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA60-REC3/A60_REC3-en.pdf>. Acesso em: 10 abril 2013.

WHO. *Distribution of visceral leishmaniasis, worldwide*, **2009a**. Disponível em: < http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_leishmaniasis_viscerai_2009.png>. Acesso em: 10 abril 2013.

WHO. *Distribution of visceral cutaneous, worldwide*, **2009b**. Disponível em: <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_leishmaniasis_cutaneous_2009.png>. Acesso em: 10 abril 2013.

WHO. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, **2010**. 202p. Disponível em: < http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf>. Acesso em: 10 abril 2013.

WHO. *Global Tuberculosis Report*. França, **2012**. 100p. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75938/1/9789241564502_eng.pdf>. Acesso em: 15 maio 2013.

WHO. *The world health report 2013: research for universal health coverage*. Luxemburgo, **2013**. 169p. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85761/2/9789240690837_eng.pdf>. Acesso em: 23 agosto 2013.

ZHAI, L.; BLOM, J.; CHEN, M.; CHRISTENSEN, S. B.; KHARAZMI, A. The antileishmanial agent licochalcone A interferes with the function of parasite mitochondria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(12), 2742-2748, **1995**.

ZHANG, Z. Y. Protein tyrosine phosphatases: prospects for therapeutics. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5(4), 416-423, **2001**.

ZHANG, Z.Y. Protein tyrosine phosphatases: Structure and Function, Substrate Specificity, and Inhibitor Development Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 42, 209-234, **2002**.

ZHOU, B.; HE, Y.; ZHANG, X.; XU, J.; LUO, Y.; WANG, W.; FRANZBLAU, S. G.; YANG, Z.; CHAN, R. J.; LIU Y.; ZHENG, J.; ZHANG, Z.Y. Targeting mycobacterium protein tyrosine phosphatase B for antituberculosis agents. *PNAS*, 107(10), 4573-4578, **2010**.

ZUANAZZI, J. A. S. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O.; *et al.* (orgs.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3 ed. Florianópolis: Editora da UFSC, Porto Alegre: Editora da UFRGS, **2001**. Cap. 23, p. 499-526.

**Anexo 1 -
Estruturas Obtidas e
Respectivos Nomes
Químicos**

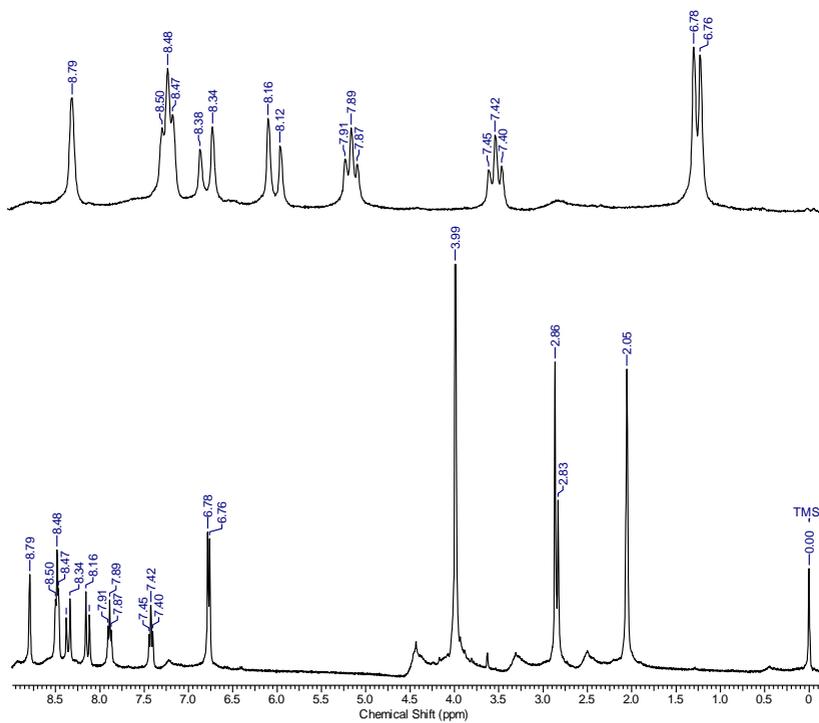
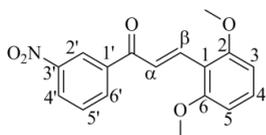
Nitrochalconas derivadas da CH8		
Código	Estrutura	Nome Químico
ML1		(2E)-1-(2,5-dimetoxifenil)-3-(3-nitrofenil)prop-2-en-1-ona.
ML2		(2E)-1-(2,4-dimetoxifenil)-3-(3-nitrofenil)prop-2-en-1-ona.
ML3		(2E)-1-(4-metoxifenil)-3-(3-nitrofenil)prop-2-en-1-ona.
ML4		(2E)-1-(3,4-dimetoxifenil)-3-(3-nitrofenil)prop-2-en-1-ona.
ML5		(2E)-1-(3,5-dimetoxifenil)-3-(3-nitrofenil)prop-2-en-1-ona.
ML6		(2E)-1-(2-metoxifenil)-3-(3-nitrofenil)prop-2-en-1-ona.
ML9		(2E)-1-(3-metoxifenil)-3-(3-nitrofenil)prop-2-en-1-ona.
ML11		(2E)-1-(2,3,4-trimetoxifenil)-3-(3-nitrofenil)prop-2-en-1-ona.
ML14		(2E)-3-(4-metoxifenil)-1-(3-nitrofenil)prop-2-en-1-ona
ML18		(2E)-3-(2,5-dimetoxifenil)-1-(3-nitrofenil)prop-2-en-1-ona

ML20		(<i>2E</i>)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-1-(3-nitrofenil)prop-2-en-1-ona
ML24		(<i>2E</i>)-3-(2,6-dimetoxifenil)-1-(3-nitrofenil)prop-2-en-1-ona
Chalconas derivadas da 6-acetil-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona		
Código	Estrutura	Nome Químico
MN1		(<i>2E</i>)-6-(3-(3,4-diclorofenil)acrilóil)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona
MN2		(<i>2E</i>)-6-(3-(4-clorofenil)acrilóil)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona
MN3		(<i>2E</i>)-6-(3-(<i>p</i> -toluol)acrilóil)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona
MN4		(<i>2E</i>)-6-(3-(2,6-diclorofenil)acrilóil)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona
MN5		(<i>2E</i>)-6-(3-(4-bromofenil)acrilóil)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona
MN8		(<i>2E</i>)-6-(3-(4-fluorfenil)acrilóil)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona
MN10		(<i>2E</i>)-6-(3-(3-nitrofenil)acrilóil)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona

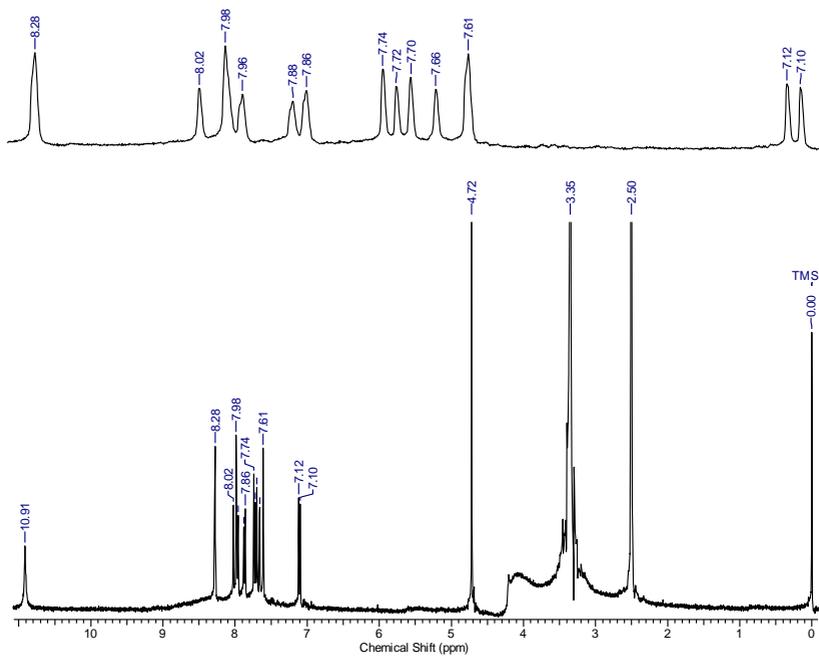
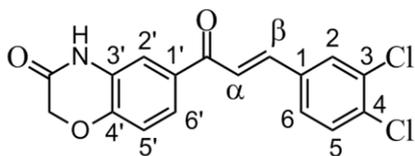
MN11		(2 <i>E</i>)-6-(3-(4-metoxifenil)acriloil)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona
MN14		(2 <i>E</i>)-6-(3-(3,4,5-trimetoxifenil)acriloil)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona
MN17		(2 <i>E</i>)-6-(3-(2,4-diclorofenil)acriloil)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona
MN20		(2 <i>E</i>)-6-(3-(4-cianofenil)acriloil)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona
MN22		(2 <i>E</i>)-6-(3-(2,5-dimetoxifenil)acriloil)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona

**Anexo 2 -
RMN de ^1H dos
Compostos Inéditos**

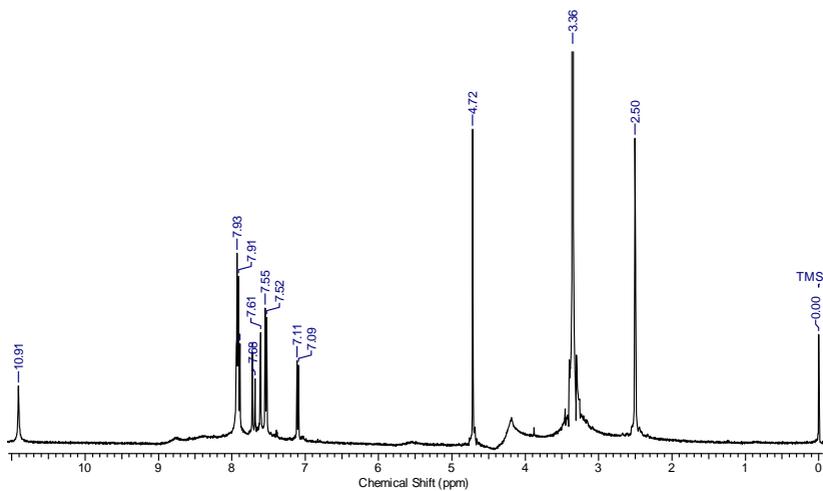
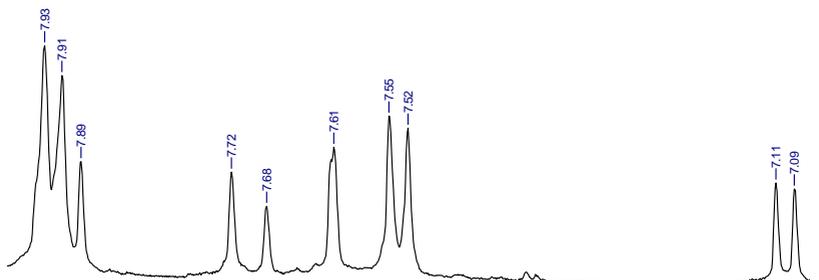
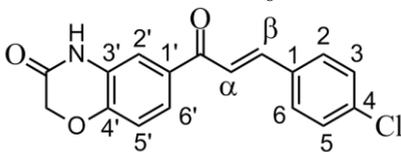
RMN 1H composto ML24 em acetona d-6.



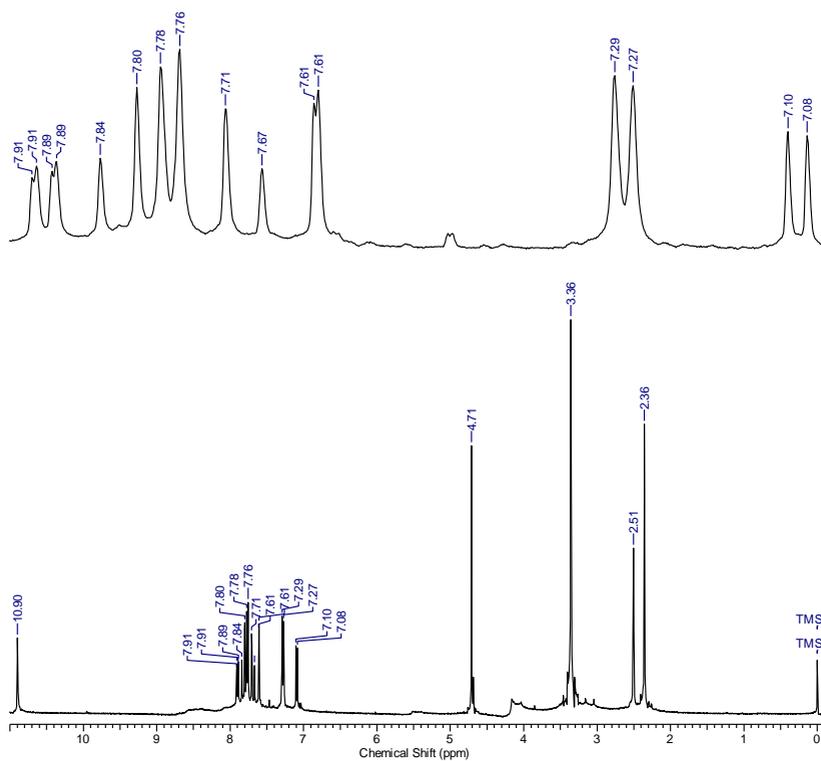
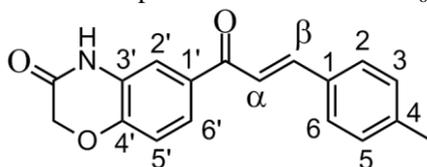
RMN ^1H do composto MN1 em DMSO-d_6



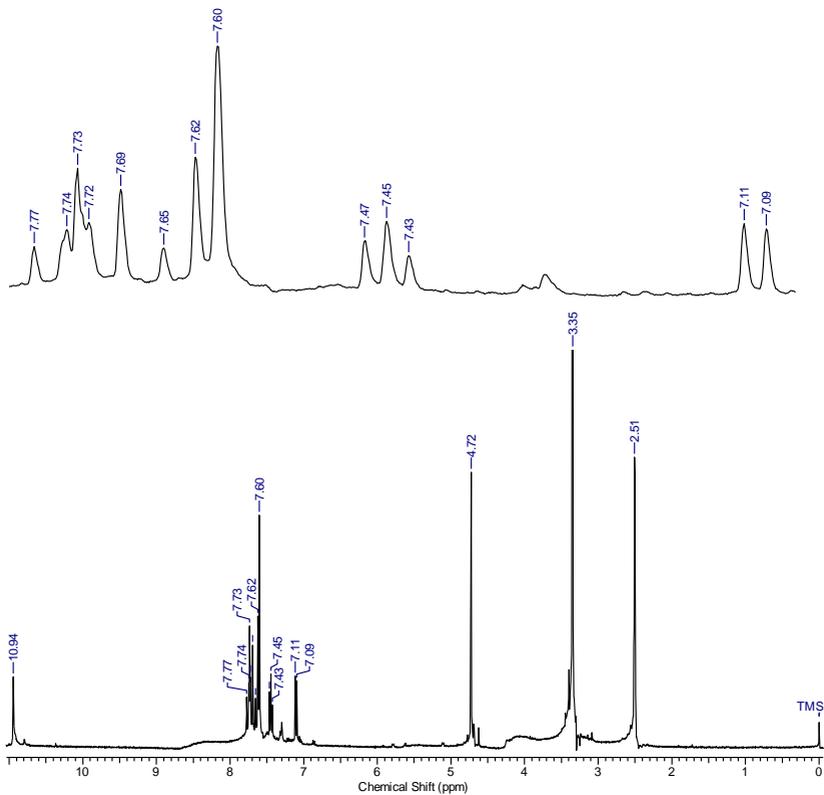
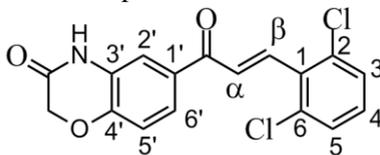
RMN ^1H do composto MN2 em DMSO-d_6



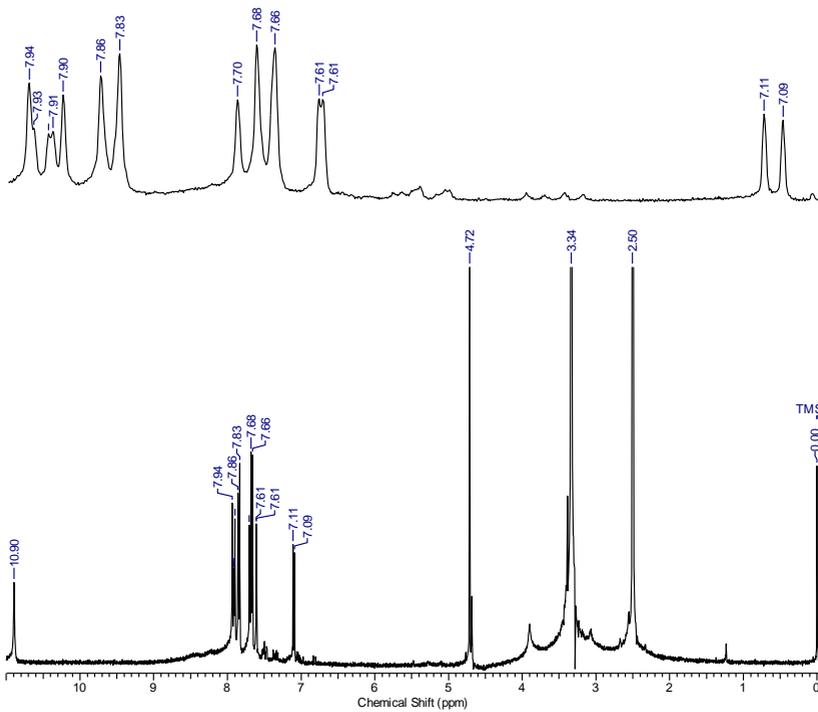
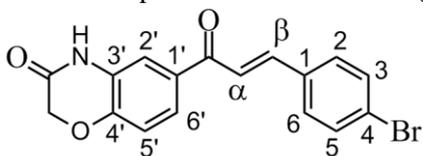
Espectro de RMN ^1H do composto MN3 em DMSO- d_6



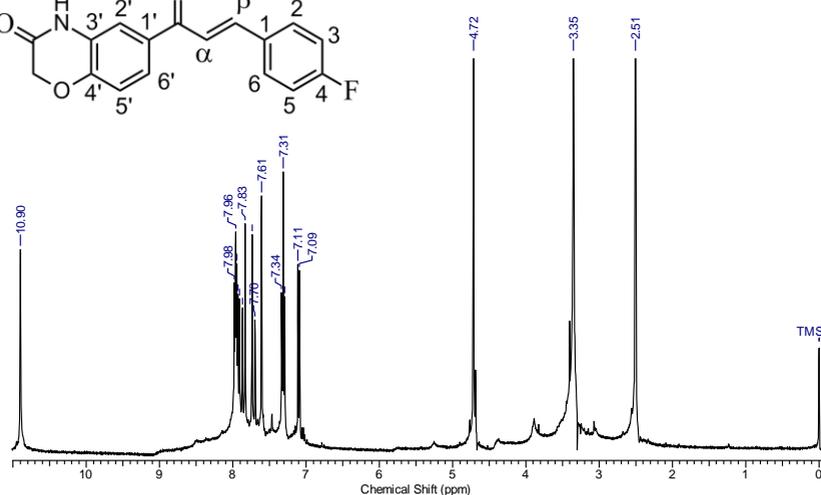
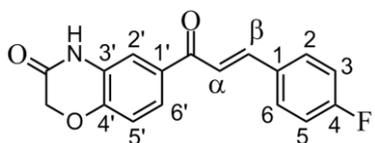
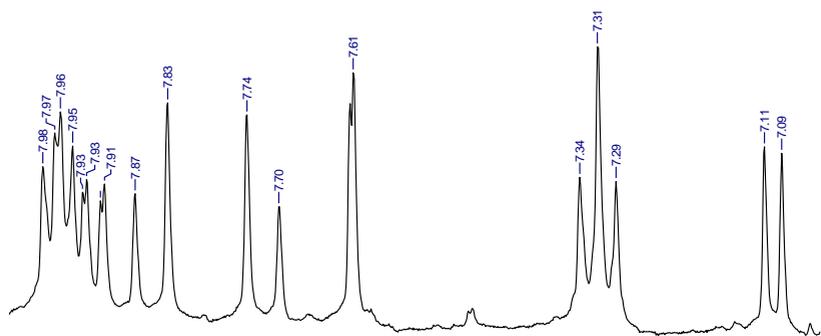
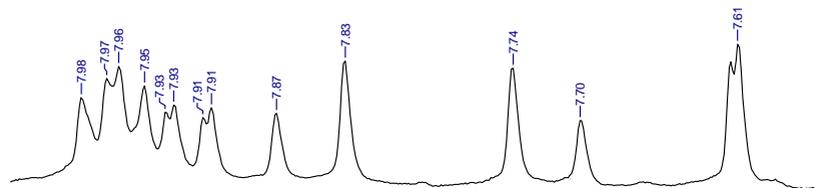
Espectro de RMN ^1H do composto MN4 em DMSO-d_6



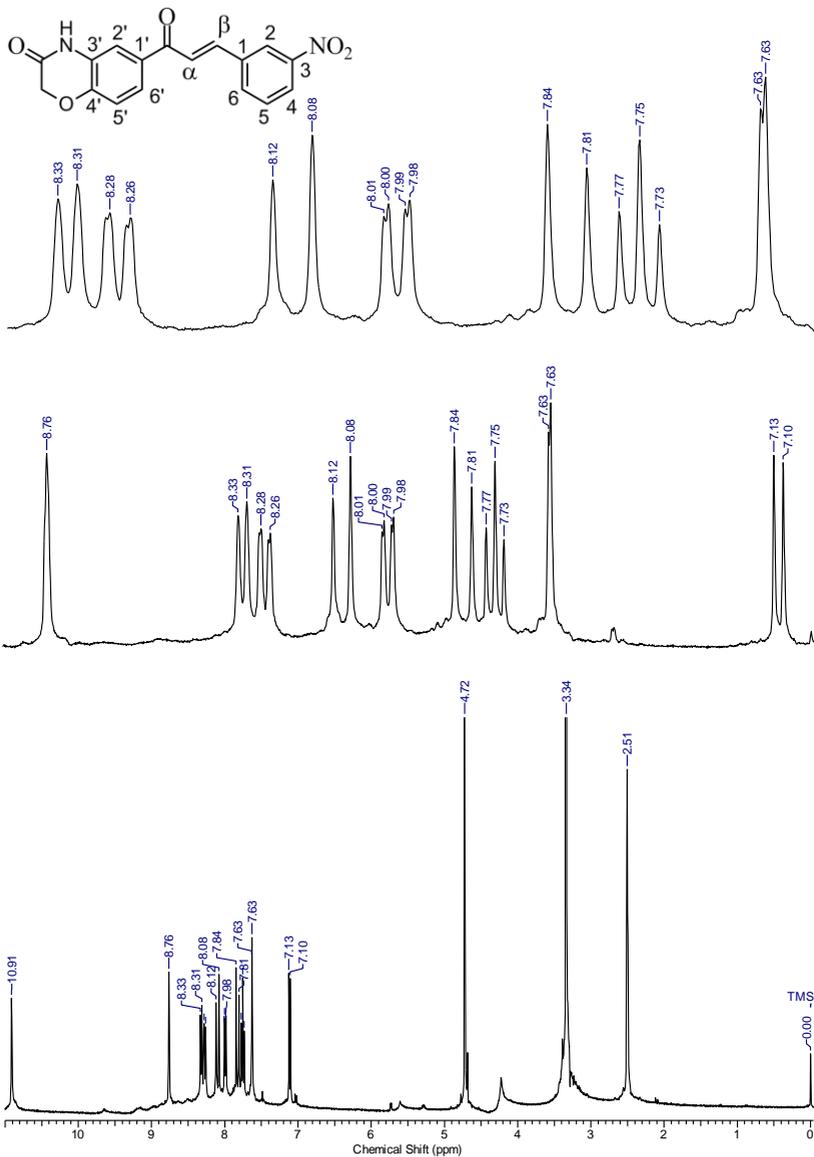
Espectro de RMN ^1H do composto MN5 em DMSO-d_6



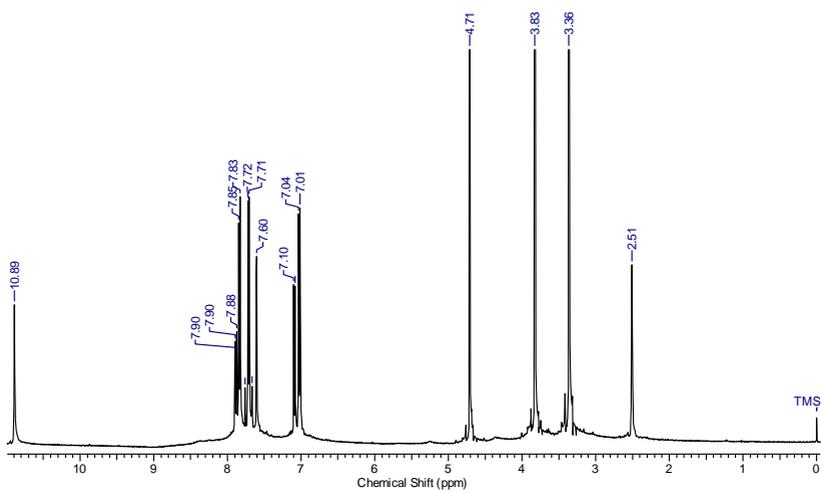
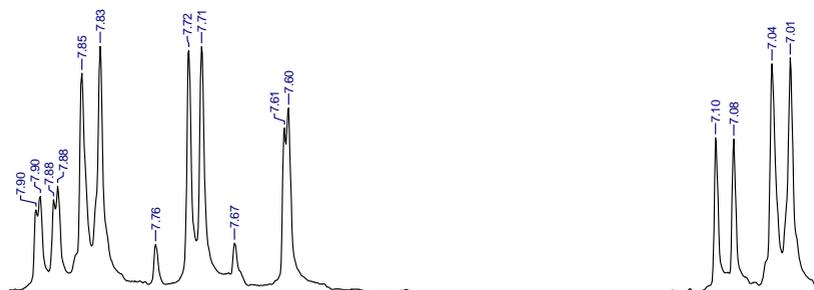
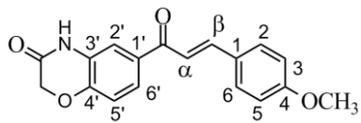
Espectro de RMN ^1H do composto MN8 em DMSO- d_6



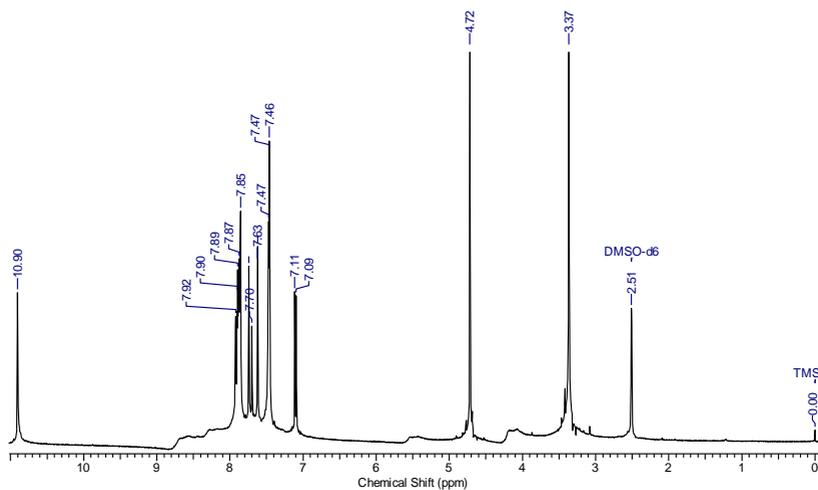
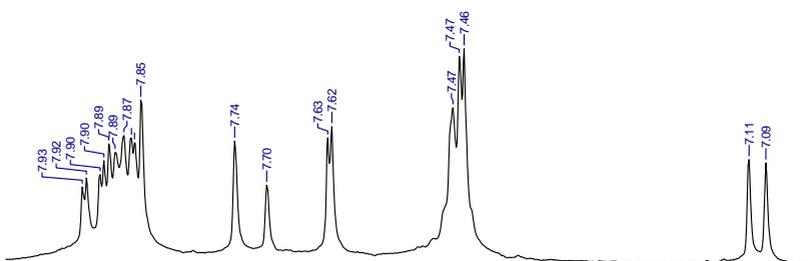
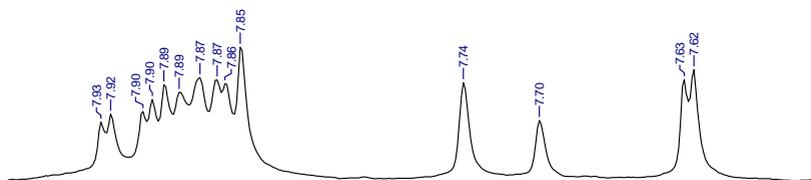
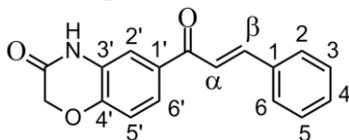
Espectro de RMN ^1H do composto MN10 em DMSO- d_6



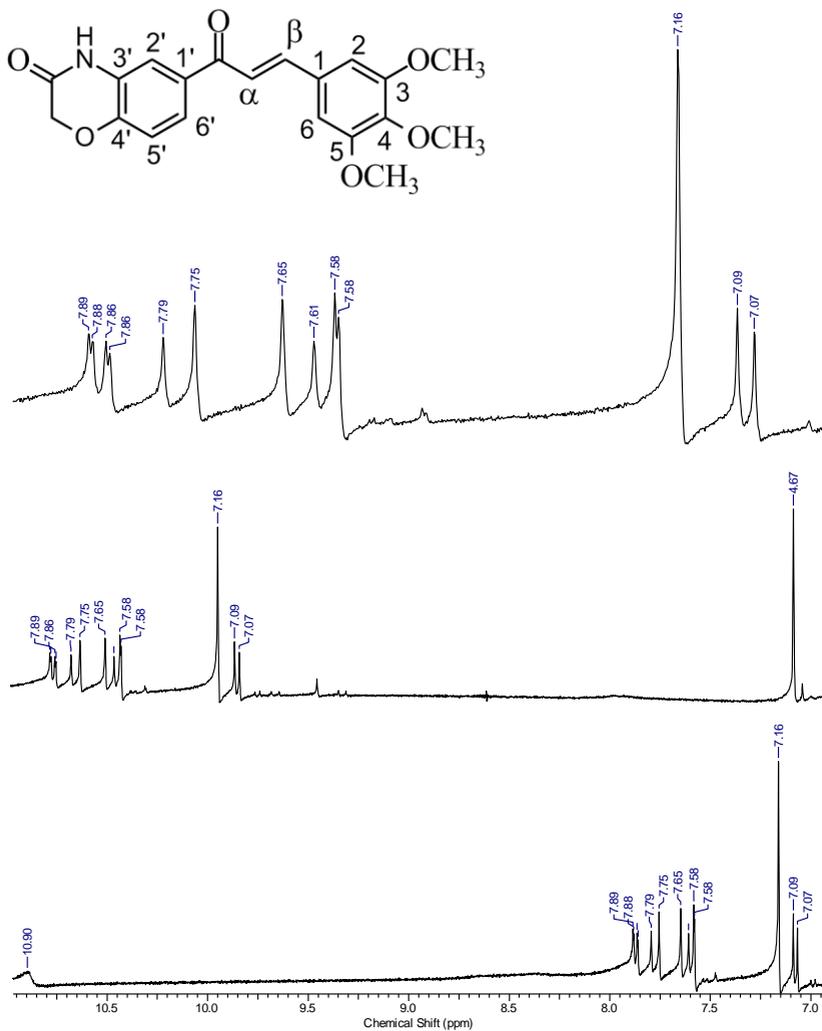
Espectro de RMN ^1H do composto MN11 em DMSO-d_6



Espectro de RMN ^1H do composto MN12 em DMSO-d_6

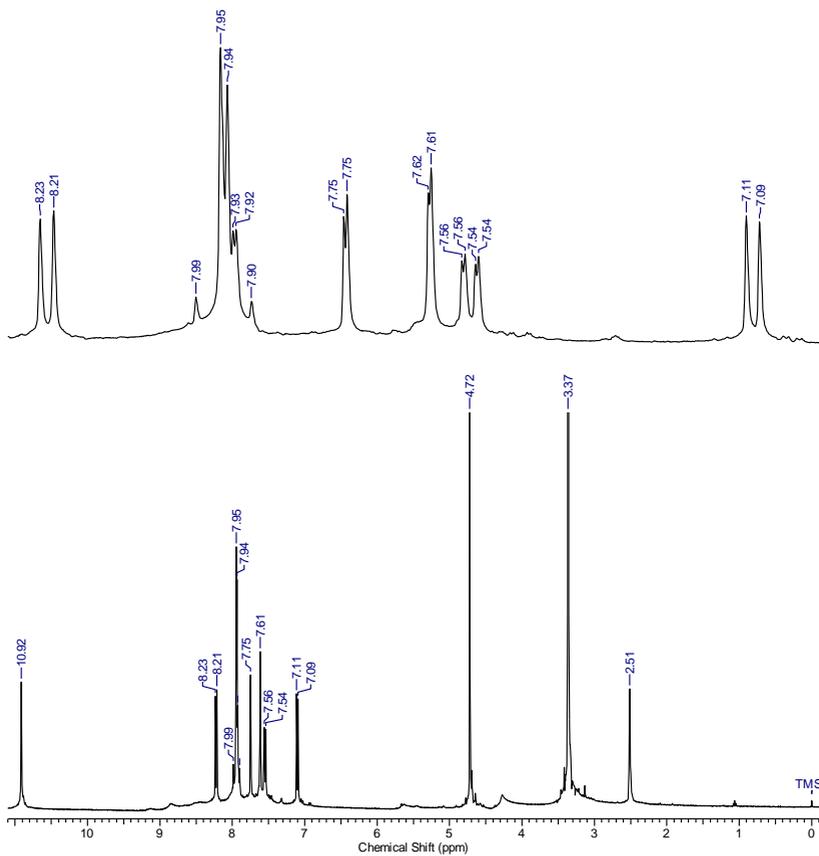
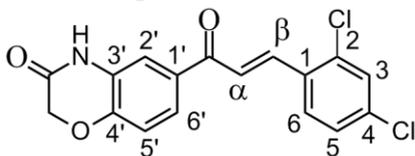


Espectro de RMN ^1H do composto MN14 em DMSO-d_6

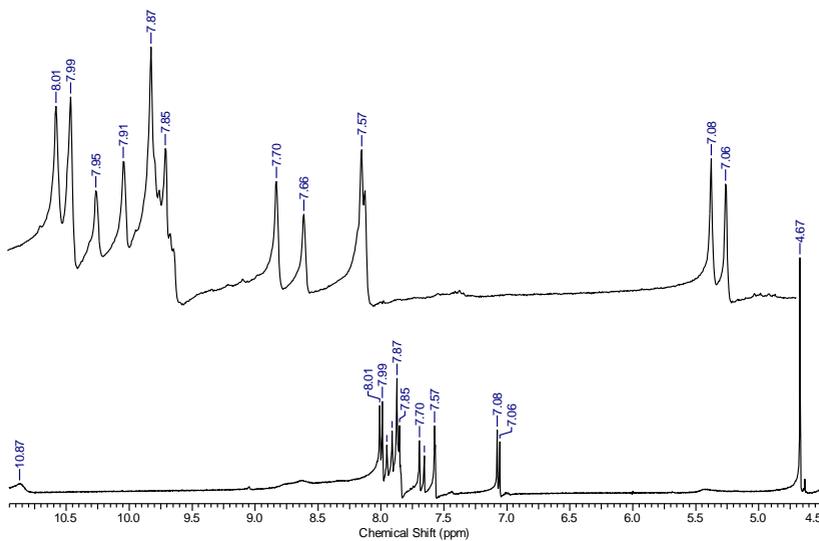
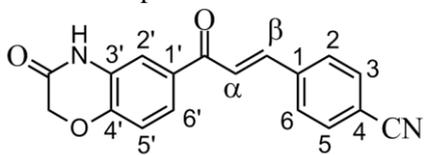


* Espectro obtido em campo de 200MHz

Espectro de RMN ^1H do composto MN17 em DMSO-d_6



Espectro de RMN ^1H do composto MN20 em DMSO-d_6



Espectro de RMN ^1H do composto MN22 em DMSO-d_6

