

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Vinicius Rodrigues Durães Pereira**

**PLANEJAMENTO MOLECULAR, SÍNTESE E ATIVIDADE**  
**ESQUISTOSSOMICIDA DE CHALCONAS E AURONAS INIBIDORAS DA ENZIMA**  
**SmATPDASE1 DE *Schistosoma mansoni***

**Juiz de Fora**

**2016**

**Vinicius Rodrigues Durães Pereira**

**PLANEJAMENTO MOLECULAR, SÍNTESE E ATIVIDADE  
ESQUISTOSSOMICIDA DE CHALCONAS E AURONAS INIBIDORAS DA ENZIMA  
SmATPDASE1 DE *Schistosoma mansoni***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais

Orientador: Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho

**Juiz de Fora**

**2016**

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Pereira, Vinicius Rodrigues Durães.

Planejamento molecular, síntese e atividade esquistossomicida de chalconas e auronas inibidoras da enzima SmATPDase1 de *Schistosoma mansoni* / Vinicius Rodrigues Durães Pereira. -- 2016. 122 f. : il.

Orientador: Ademar Alves da Silva Filho

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2016.

1. Esquistossomíase. 2. Síntese. 3. Chalconas. 4. Auronas. 5. Planejamento molecular. I. da Silva Filho, Ademar Alves, orient. II. Título.

**PLANEJAMENTO MOLECULAR, SÍNTESE E ATIVIDADE  
ESQUISTOSSOMICIDA DE CHALCONAS E AURONAS INIBIDORAS DA ENZIMA  
SmATPDASE1 DE *Schistosoma mansoni***

**Vinicius Rodrigues Durães Pereira**

**ORIENTADOR (A): Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

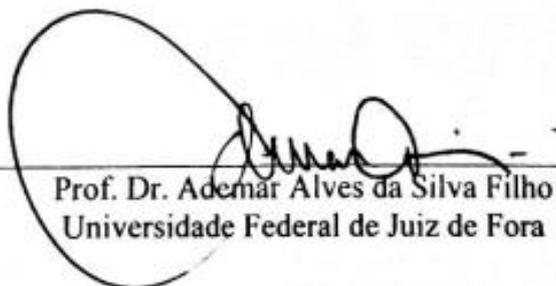
Aprovada em 28 / 07 / 2016



Prof. Dr. William de Castro Borges  
Universidade Federal de Ouro Preto



Prof. Dra. Mara Rubia Costa Couri  
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho  
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dedico este trabalho aos meus pais, José Alberto e  
Maria Ivete (*in memoriam*).

## AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de luz infinita.

Aos meus pais, José Alberto e Maria Ivete (*in memoriam*), por todo o amor e dedicação dados a este filho que tanto os admira.

Aos amigos do Núcleo de Identificação e Pesquisa de Princípios Ativos Naturais (NIPPAN), por todos os momentos de alegria e aprendizado compartilhados.

Ao pós-doutorando Reinaldo, pela assistência com as metodologias computacionais.

Ao aluno de iniciação científica Ismael, por toda a ajuda na síntese dos compostos.

Aos amigos do Departamento de Química, sempre muito solícitos comigo.

Ao Prof. Dr. Josué de Moraes, Prof. Dr. Pedro Luiz Silva Pinto e todos os alunos e funcionários do Núcleo de Pesquisa em Doenças Negligenciadas e do Instituto Adolfo Lutz, por toda a hospitalidade e auxílio com os ensaios esquistossomicidas.

À Profa. Dra. Priscila de Faria Pinto e alunos do Laboratório de Estudo da Estrutura e Função de Proteínas do Instituto de Ciências Biológicas da UFJF, pela ajuda com os ensaios de inibição enzimática.

Ao Prof. Dr. Gilson Costa Macedo e alunos do Laboratório de Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFJF, pela ajuda com os ensaios de citotoxicidade.

À Profa. Dra. Mara Rubia Costa Couri, por toda a atenção e carinho com que sempre me tratou.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho, por toda a confiança depositada em mim, pelos ensinamentos e por ter me fornecido todas as condições e incentivo necessários ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade de realização do mestrado.

À UFJF e todos os seus funcionários, pelo comprometimento com o meio acadêmico.

Às instituições de fomento à pesquisa pela bolsa de mestrado concedida, bem como pelo financiamento deste projeto.

A todos os meus amigos, pelos momentos de felicidade e companheirismo compartilhados durante esta jornada.

A todos aqueles que de alguma maneira contribuíram não só para a realização deste projeto, mas também para o meu crescimento pessoal e profissional.

A todos estes, um MUITO OBRIGADO!

*“Tudo o que vistes, ouvistes ou tocastes não passou de mera ilusão. Real mesmo foi o poder da sua imaginação”*

Vinicius Rodrigues Durães Pereira

## RESUMO

A esquistossomíase é uma das doenças parasitárias mais prevalentes em muitos países tropicais e subtropicais. Atualmente, o tratamento da esquistossomíase depende de um único fármaco disponível, o praziquantel (PZQ). Logo, necessitam-se novos fármacos alternativos. Neste sentido, os produtos naturais, especialmente chalconas e auronas, têm demonstrado significantes atividades esquistossomicidas *in vitro*. Assim, este trabalho descreve o planejamento molecular *in silico*, síntese e atividade esquistossomicida *in vitro* de análogos de chalconas e auronas. Adicionalmente, investigou-se a atividade inibitória dos compostos sobre a enzima *Schistosoma mansoni* ATPDase1 (SmATPDase1). Desenvolveu-se o planejamento molecular por técnicas de docking. Realizaram-se os ensaios esquistossomicidas *in vitro* com vermes adultos de *S. mansoni*, avaliou-se a viabilidade celular pelo método MTT e determinou-se a atividade inibitória da SmATPDase1 por espectrofotometria. Planejou-se e sintetizou-se um total de oito chalconas e três auronas. Os compostos **VR1**, **VR2**, **VR8** e **VR13** foram ativos frente a vermes adultos na concentração de 50  $\mu\text{M}$ . Todos os compostos ativos provaram ser citotóxicos a 100  $\mu\text{M}$  para células de mamíferos. Encontraram-se diferentes perfis de inibição para os compostos em ensaios preliminares de inibição da SmATPDase1. Estes resultados reforçam o potencial de chalconas e auronas como substâncias esquistossomicidas. Maiores estudos são necessários para correlacionar a atividade esquistossomicida apresentada pelos compostos com a inibição enzimática.

**Palavras-chave:** Esquistossomíase. Síntese. Chalconas. Auronas.

## ABSTRACT

Schistosomiasis is one of the most prevalent parasitic diseases that occur in many tropical and subtropical countries. Currently, the treatment of schistosomiasis is dependent on a single available drug, praziquantel (PZQ). Thus, new drug choices are needed. In this regard, natural products, especially chalcone and aurone, have exhibited significant *in vitro* schistosomicidal activities. Therefore, this paper describes the *in silico* molecular design, synthesis and *in vitro* schistosomicidal activities of chalcones and aurones analogues. Also, the *in vitro* *Schistosoma mansoni* ATPDase1 (SmATPDase1) enzyme inhibitory activity of compounds was investigated. Molecular design was done by docking techniques. *In vitro* schistosomicidal assays were performed against *S. mansoni* adult worms, cell viability was measured by MTT assay, and the SmATPDase1 inhibitory activity was determined spectrophotometrically. A total of eight chalcone and three aurone analogues were successfully designed and synthesized. Compounds **VR1**, **VR2**, **VR8** and **VR13** were active at a concentration of 50  $\mu\text{M}$  against adult schistosomes. All active compounds proved to be citotoxic at 100  $\mu\text{M}$  to mammalian cells. Different inhibition profiles were found for the compounds in preliminary assays with SmATPDase1. These results reinforce the potential of chalcones and aurones as schistosomicidal substances. Further studies are needed to correlate the antischistosomal activities presented by the compounds with the enzyme inhibition.

**Keywords:** Schistosomiasis. Synthesis. Chalcones. Aurones.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Distribuição geográfica mundial da esquistossomíase.....	16
<b>Figura 2</b> – Vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> em cópula.....	17
<b>Figura 3</b> – Ciclo biológico do <i>Schistosoma mansoni</i> .....	18
<b>Figura 4</b> – Estruturas químicas dos enantiômeros do praziquantel .....	20
<b>Figura 5</b> – Fármacos antiparasitários oriundos de produtos naturais .....	21
<b>Figura 6</b> – Padrão estrutural comum às chalconas .....	25
<b>Figura 7</b> – Exemplos de chalconas oriundas de fontes naturais .....	26
<b>Figura 8</b> – Padrão estrutural comum às auronas.....	31
<b>Figura 9</b> – Exemplos de auronas provenientes de fontes naturais.....	31
<b>Figura 10</b> – Estruturas químicas da licochalcona A e da cardamonina.....	35
<b>Figura 11</b> – Análise por microscopia confocal de varredura a laser da atividade da licochalcona A e da cardamonina no tegumento de vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	36
<b>Figura 12</b> – Chalconas e auronas sintéticas ativas <i>in vitro</i> frente ao <i>Schistosoma mansoni</i> ...	37
<b>Figura 13</b> – Etapas da seleção virtual baseada em estrutura .....	40
<b>Figura 14</b> – <i>Docking</i> molecular da cardamonina, da chalcona <b>LS1</b> e das auronas <b>LS6</b> e <b>LS23</b> com a SmATPDase1.....	53
<b>Figura 15</b> – Análogos de chalconas e auronas selecionados por <i>docking</i> molecular .....	54
<b>Figura 16</b> – Estereosseletividade das chalconas para a configuração <i>E</i> .....	58
<b>Figura 17</b> – Estereosseletividade das auronas para a configuração <i>Z</i> .....	61
<b>Figura 18</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) da chalcona <b>VR11</b> .....	62
<b>Figura 19</b> – Expansão da região dos hidrogênios aromáticos e olefínicos do espectro de RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) da chalcona <b>VR11</b> .....	63
<b>Figura 20</b> – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 125 MHz) da chalcona <b>VR11</b> .....	63
<b>Figura 21</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) da aurona <b>VR13</b> .....	69
<b>Figura 22</b> – Expansão da região dos hidrogênios aromáticos e do hidrogênio olefínico do espectro de RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) da aurona <b>VR13</b> .....	70
<b>Figura 23</b> – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 125 MHz) da aurona <b>VR13</b> .....	70
<b>Figura 24</b> – Inibição <i>in vitro</i> da atividade hidrolítica de ATP da SmATPDase1 promovida pelos compostos <b>VR1</b> , <b>VR6</b> , <b>VR7</b> , <b>VR8</b> , e <b>VR9</b> .....	81
<b>Figura 25</b> – Viabilidade celular de macrófagos murinos da linhagem celular RAW 264.7 expostos às chalconas e auronas a 100 µM .....	83

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1</b> – Mecanismo da condensação de Claisen-Schmidt em meios básico e ácido .....	27
<b>Esquema 2</b> – Mecanismo da síntese de auronas utilizando-se Hg(OAc) <sub>2</sub> em piridina.....	32
<b>Esquema 3</b> – Reação de síntese das chalconas <b>VR1, VR2, VR4, VR5, VR6, VR7 e VR11</b> .	45
<b>Esquema 4</b> – Reação de síntese da chalcona <b>VR8</b> .....	45
<b>Esquema 5</b> – Reação de síntese das auronas <b>VR9, VR10 e VR13</b> .....	46
<b>Esquema 6</b> – Esquema de síntese para obtenção das chalconas <b>VR1, VR2, VR4, VR5, VR6, VR7 e VR11</b> .....	57
<b>Esquema 7</b> – Esquema de síntese para obtenção da chalcona <b>VR8</b> .....	58
<b>Esquema 8</b> – Esquema de síntese para a obtenção das auronas <b>VR9, VR10 e VR13</b> .....	60

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Casos de esquistossomíase notificados no Brasil em 2015 .....	19
<b>Tabela 2</b> – Exemplos de compostos naturais com atividade frente ao <i>Schistosoma mansoni</i> . 22	22
<b>Tabela 3</b> – Atividades antiparasitárias de chalconas .....	28
<b>Tabela 4</b> – Atividades antiparasitárias de auronas.....	33
<b>Tabela 5</b> – Atividade esquistossomicida <i>in vitro</i> da licochalcona A e da cardamonina em vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> .....	35
<b>Tabela 6</b> – Energias de ligação dos análogos de chalconas e auronas com a enzima SmATPDase1 .....	55
<b>Tabela 7</b> – Propriedades ADME dos análogos de chalconas e auronas .....	56
<b>Tabela 8</b> – Utilização de diferentes proporções de 2,6–diidroxiacetofenona e benzaldeído para o aumento do rendimento da chalcona <b>VR1</b> .....	59
<b>Tabela 9</b> – Metodologias utilizadas para o aumento do rendimento da chalcona <b>VR1</b> .....	60
<b>Tabela 10</b> – Comparação dos dados de RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) e <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 125 MHz) da chalcona <b>VR11</b> com os da literatura .....	64
<b>Tabela 11</b> – Dados de caracterização das chalconas <b>VR1, VR2, VR4, VR5, VR6, VR7, VR8</b> e <b>VR11</b> .....	65
<b>Tabela 12</b> – Comparação dos dados de RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) e <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 125 MHz) da aurona <b>VR13</b> com os da literatura.....	71
<b>Tabela 13</b> – Dados de caracterização das auronas <b>VR9, VR10</b> e <b>VR13</b> .....	72
<b>Tabela 14</b> – Atividade <i>in vitro</i> dos compostos <b>VR1, VR2, VR8, VR9, VR11</b> e <b>VR13</b> frente a vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> .....	75

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Å	angstrom
AcOEt	acetato de etila
ADME	absorção, distribuição, metabolismo e excreção
ADP	difosfato de adenosina
AFA	ácido acético glacial/formaldeído/etanol/água destilada 2:9:30:59
Ala	aminoácido alanina
AMP	monofosfato de adenosina
Asp	aminoácido aspartato
ATP	trifosfato de adenosina
CCD	cromatografia em camada delgada
CE <sub>50</sub>	concentração efetiva para 50%
CI <sub>50</sub>	concentração inibitória para 50%
CIM	concentração inibitória mínima
CL <sub>50</sub>	concentração letal para 50%
cm	centímetro
DMSO	dimetilsulfóxido
E1	eliminação de primeira ordem
E1cb	eliminação de primeira ordem via base conjugada
E-NTPDases	ecto-nucleosídeo trifosfato difosfoidrolases
EtOH	etanol
FRD	fumarato redutase
Glu	aminoácido glutamato
Gly	aminoácido glicina
h	hora
HBA	<i>Hydrogen Bond Acceptor</i> , aceptores de ligação de hidrogênio
HBD	<i>Hydrogen Bond Donor</i> , doadores de ligação de hidrogênio
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
kcal	kilocaloria
Leu	aminoácido leucina
LGA	<i>Lamarckian Genetic Algorithm</i> , Algoritmo Genético Lamarckiano
log P	logaritmo do coeficiente de partição

Lys	aminoácido lisina
MAO-B	enzima monoamino oxidase B
MeOH	metanol
mg	miligrama
MHz	mega-hertz
mL	mililitro
MMFF	<i>Merck Molecular Force Field</i>
MOPS	ácido 3-(N-morfolino)-propanossulfônico
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
NCE	<i>New Chemical Entities</i> , novas entidades químicas
nm	nanômetro
NY	Nova York
°C	grau Celsius
OMS	Organização Mundial da Saúde
P.A.	para análise
pH	potencial hidrogeniônico
Phe	aminoácido fenilalanina
pi	piridina
PZQ	praziquantel
QSAR	<i>Quantitative Structure Activity Relationship</i> , relação estrutura-atividade quantitativa
RAW 264.7	linhagem celular de macrófagos murinos
RM1	Recife <i>Model 1</i>
RMN de <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13
RMN de <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio 1
rpm	rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SAR	<i>Structure Activity Relationship</i> , relação estrutura-atividade
Ser	aminoácido serina
t.a.	temperatura ambiente
Thr	aminoácido treonina
TMS	tetrametilsilano
TPSA	<i>Topological Polar Surface Area</i> , área de superfície polar topológica
Trp	aminoácido triptofano

Tyr	aminoácido tirosina
UI	unidade internacional
UV	ultravioleta
W	watt
WDI	<i>World Drug Index</i>
$\lambda$	comprimento de onda
$\Delta G$	energia livre de Gibbs
$\alpha$	alfa minúsculo, do alfabeto grego
$\beta$	beta minúsculo, do alfabeto grego
$\delta$	deslocamento químico
$\mu\text{g}$	micrograma
$\mu\text{M}$	micromolar

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1	ESQUISTOSSOMÍASE .....	16
1.2	PRODUTOS NATURAIS .....	21
1.3	CHALCONAS E AURONAS .....	25
1.4	SmATPDASE1 .....	38
1.5	PLANEJAMENTO RACIONAL DE FÁRMACOS.....	39
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	42
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	43
3.1	ANÁLISES <i>IN SILICO</i> .....	43
<b>3.1.1</b>	<b>Simulações de <i>docking</i> molecular com a enzima SmATPDase1</b> .....	43
<b>3.1.2</b>	<b>Avaliação de propriedades ADME</b> .....	43
3.2	SÍNTESE, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS CHALCONAS E AURONAS .....	44
<b>3.2.1</b>	<b>Procedimento geral para a síntese das chalconas VR1, VR2, VR4, VR5, VR6, VR7 e VR11</b> .....	45
<b>3.2.2</b>	<b>Procedimento para a síntese da chalcona VR8</b> .....	45
<b>3.2.3</b>	<b>Procedimento geral para a síntese das auronas VR9, VR10 e VR13</b> .....	46
3.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA <i>IN VITRO</i> FRENTE A VERMES ADULTOS DE <i>Schistosoma mansoni</i> .....	47
<b>3.3.1</b>	<b>Linhagem do <i>Schistosoma mansoni</i> e animais hospedeiros utilizados</b> .....	47
<b>3.3.2</b>	<b>Manutenção do ciclo evolutivo de <i>Schistosoma mansoni</i></b> .....	47
<b>3.3.3</b>	<b>Preparo das amostras</b> .....	48
<b>3.3.4</b>	<b>Ensaio <i>in vitro</i> com vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i></b> .....	49
3.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA <i>IN VITRO</i> FRENTE À ENZIMA SmATPDASE1 .....	49
3.5	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i> FRENTE A MACRÓFAGOS MURINOS DA LINHAGEM CELULAR RAW 264.7 .....	50
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	52
4.1	PLANEJAMENTO MOLECULAR .....	52
<b>4.1.1</b>	<b><i>Docking</i> molecular com a enzima SmATPDase1</b> .....	52
<b>4.1.2</b>	<b>Análise <i>in silico</i> de propriedades ADME</b> .....	56
4.2	ASPECTOS GERAIS DAS REAÇÕES DE SÍNTESE .....	57

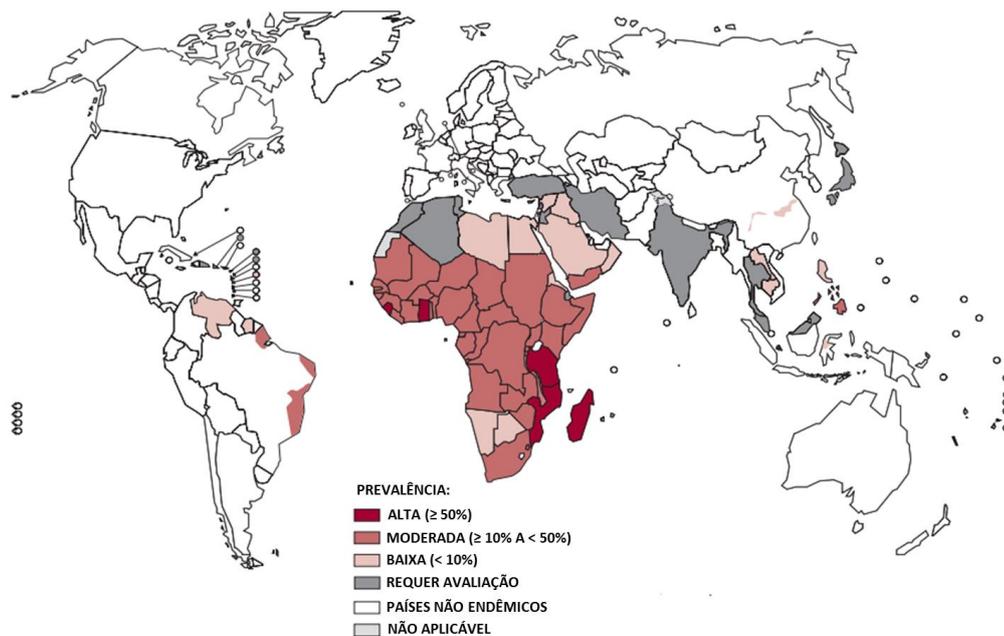
4.3	CARACTERIZAÇÃO DAS CHALCONAS E AURONAS.....	62
4.3.1	<b>Caracterização da chalcona VR11 .....</b>	<b>62</b>
4.3.2	<b>Caracterização da aurona VR13 .....</b>	<b>69</b>
4.4	ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA <i>IN VITRO</i> FRENTE A VERMES ADULTOS DE <i>Schistosoma mansoni</i> .....	74
4.5	ATIVIDADE INIBITÓRIA <i>IN VITRO</i> FRENTE À ENZIMA SmATPDASE1 .....	79
4.6	CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i> FRENTE A MACRÓFAGOS MURINOS DA LINHAGEM CELULAR RAW 264.7 .....	82
5	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>84</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>85</b>
	<b>APÊNDICE .....</b>	<b>99</b>
	<b>APÊNDICE A - ESPECTROS DE RMN DE <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) E <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) DAS CHALCONAS E AURONAS .....</b>	<b>99</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ESQUISTOSSOMÍASE

A esquistossomíase é uma doença parasitária que afeta 250 milhões de pessoas e expõe outras 700 milhões ao risco de contraí-la em mais de 70 países. Insere-se em um contexto socioecológico onde condições climático-ambientais ideais, precária infraestrutura sanitária e escassos investimentos em saúde pública favorecem sua transmissão. Deste modo, prevalece em áreas tropicais e subtropicais do globo, colocando-se como uma das maiores parasitoses da atualidade (**Figura 1**) (DE MORAES, 2015; UTZINGER et al., 2011; WHO, 2013; 2016).

**Figura 1** – Distribuição geográfica mundial da esquistossomíase



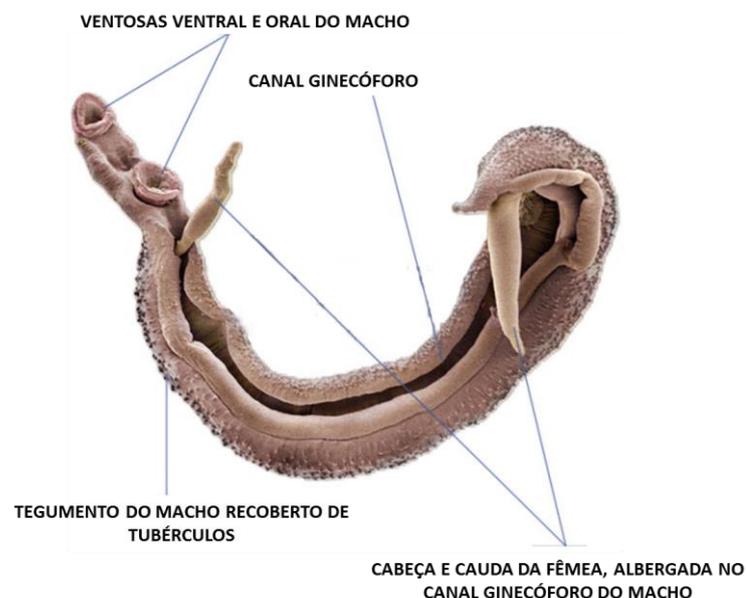
Fonte: Adaptado de WHO, 2013.

Devido ao seu caráter debilitante, esta doença causa prejuízos econômicos e sociais aos países atingidos. Para se ter uma ideia, estima-se que em áreas endêmicas 60% a 80% dos jovens de 5 a 20 anos, a faixa etária mais suscetível, e 20% a 40% dos adultos estejam ativamente infectados. Consequentemente, aproximadamente 120 milhões de pessoas ao redor do mundo manifestam quadros clínicos de esquistossomíase e 20 milhões apresentam morbidade severa. Assim, compromete-se a qualidade de vida destas populações e a produtividade dos trabalhadores, gerando-se perdas anuais de bilhões de dólares (COLLEY et al., 2014; HOTEZ et al., 2007; UTZINGER et al., 2011).

Platelmintos trematódeos pertencentes ao gênero *Schistosoma* são os responsáveis por ocasionar a esquistossomíase. São parasitos dioicos (sexos separados) e digenéticos (reprodução assexuada e sexuada) que habitam os vasos sanguíneos de seus hospedeiros. Cinco espécies possuem relevância epidemiológica: *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mekongi* e *Schistosoma intercalatum* (GRYSEELS, 2012). Contudo, no Brasil há somente a espécie *S. mansoni*, devido à presença de condições climáticas propícias e de hospedeiros intermediários suscetíveis (caramujos planorbídeos das espécies *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila*) (NEVES, 2004; SCHOLTE et al., 2012).

Dentre as formas evolutivas do parasito, destacam-se os vermes adultos. O macho mede cerca de 1 cm, tem corpo achatado, tegumento recoberto de pequenas projeções denominadas de tubérculos e canal ginecóforo formado pela dobra de suas extremidades laterais, o qual utiliza para abrigar a fêmea e fecundá-la. A fêmea tem aproximadamente 1,5 cm de comprimento, possui corpo cilindroide e tegumento liso (**Figura 2**) (GRYSEELS, 2012). Essencial à fisiologia do parasito, o tegumento atua na absorção de nutrientes, excreção, osmorregulação e evasão ao sistema imune do hospedeiro (BRASCHI et al., 2006; HOCKLEY; MCLAREN, 1973). Deste modo, lesões tegumentares ocasionam sérios danos ao parasito, tornando este local potencial alvo para a ação de substâncias esquistossomicidas.

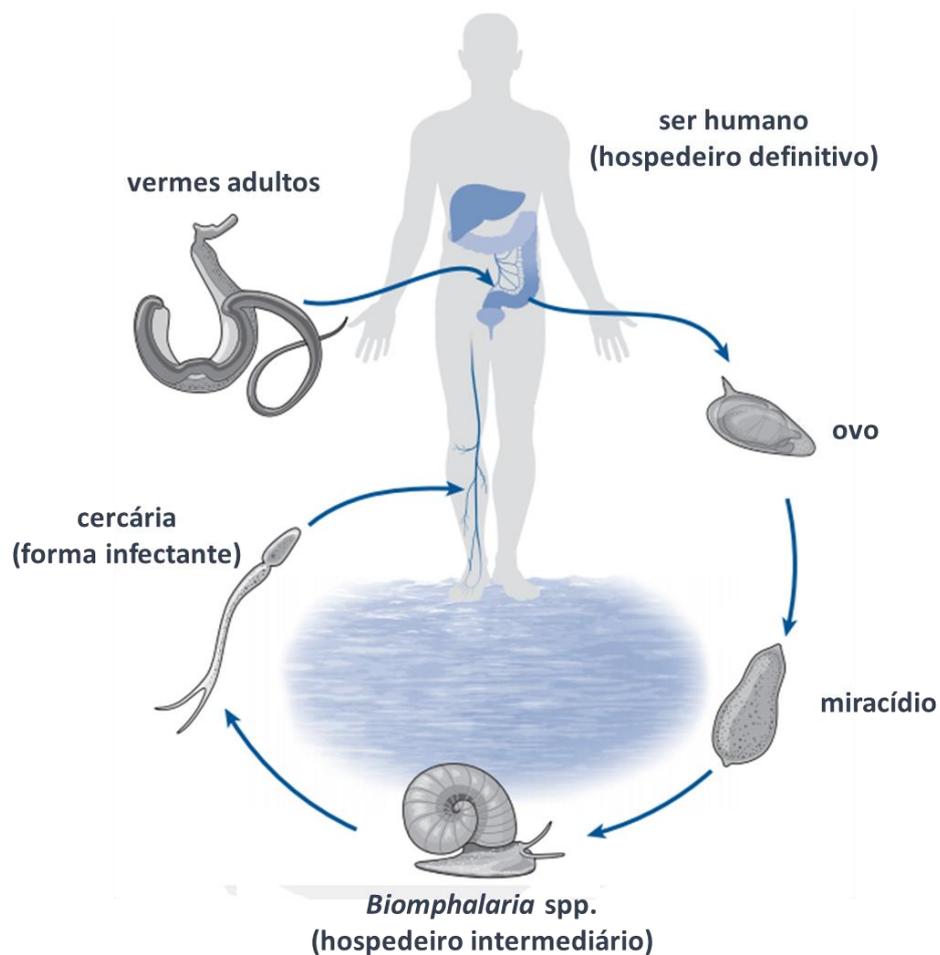
**Figura 2** – Vermes adultos de *Schistosoma mansoni* em cópula



Fonte: Adaptado de GRYSEELS, 2012.

O ciclo biológico do *S. mansoni* (**Figura 3**) inicia-se quando ovos do parasito são expelidos junto com as fezes humanas, entram em contato com água doce e liberam miracídios. Por sua vez, os miracídios infectam caramujos *Biomphalaria* spp. (hospedeiro intermediário) e, após algumas semanas, originam cercárias (forma infectante). As cercárias liberam-se dos caramujos e penetram ativamente na pele do ser humano (hospedeiro definitivo) durante o contato deste com águas contaminadas. No organismo humano, os parasitos maturam-se em vermes adultos (macho e fêmea) e migram para as veias mesentéricas inferiores, onde a fêmea realiza a oviposição. A maioria dos ovos fica retida nos tecidos e ocasiona sérias reações inflamatórias (granulomas), originando quadros clínicos de hipertensão portal, hepatoesplenomegalia e ascite. Entretanto, alguns ovos atingem a luz intestinal e são liberados junto com as fezes, dando reinício ao ciclo (CDC, 2012; GRYSEELS; STRICKLAND, 2012; NEVES, 2004; ROSS et al., 2002).

**Figura 3** – Ciclo biológico do *Schistosoma mansoni*



Fonte: Adaptado de GRYSEELS; STRICKLAND, 2012.

No Brasil, a doença é popularmente conhecida como esquistossomose, xistose ou barriga-d'água, exigindo-se a notificação compulsória de novos casos. Contabilizam-se no país aproximadamente 6 milhões de pessoas infectadas e 25 milhões vivendo sob risco de infecção (BRASIL, 2008; 2014; DRUMMOND et al., 2006; HOTEZ; FUJIWARA, 2014; SCHOLTE et al., 2014). Segundo dados atuais do Ministério da Saúde, dos 2509 casos confirmados no Brasil em 2015, mais da metade (1884) foram notificados somente em Minas Gerais, sendo o estado responsável ainda por 15 dos 26 óbitos ocorridos neste ano (**Tabela 1**) (BRASIL, 2016). Portanto, são necessárias medidas de controle da endemicidade e redução da mortalidade devido à esquistossomíase no Brasil, sobretudo em Minas Gerais.

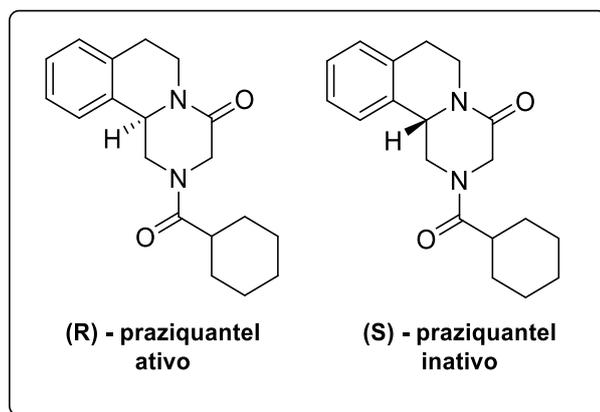
**Tabela 1** – Casos de esquistossomíase notificados no Brasil em 2015

<b>Unidade Federativa</b>	<b>Cura</b>	<b>Não cura</b>	<b>Óbito por esquistossomíase</b>	<b>Óbito por outras causas</b>	<b>Total de casos notificados por estado</b>
Rondônia (RO)	4	-	-	-	4
Amazonas (AM)	1	-	-	-	1
Pará (PA)	2	-	-	-	2
Maranhão (MA)	9	-	1	-	10
Piauí (PI)	1	-	-	-	1
Ceará (CE)	21	1	-	-	22
Rio Grande do Norte (RN)	1	-	-	-	1
Paraíba (PB)	26	-	1	-	27
Pernambuco (PE)	132	8	6	16	162
Alagoas (AL)	4	3	-	-	7
Sergipe (SE)	33	-	-	-	33
Bahia (BA)	107	-	2	-	109
Minas Gerais (MG)	1855	13	15	1	1884
Espírito Santo (ES)	92	1	1	-	94
Rio de Janeiro (RJ)	42	1	-	1	44
São Paulo (SP)	73	6	-	6	85
Paraná (PR)	5	-	-	-	5
Santa Catarina (SC)	1	-	-	1	2
Rio Grande do Sul (RS)	1	-	-	-	1
Mato Grosso do Sul (MS)	5	-	-	2	7
Mato Grosso (MT)	5	-	-	-	5
Goiás (GO)	2	1	-	-	3
<b>Total nacional</b>	<b>2422</b>	<b>34</b>	<b>26</b>	<b>27</b>	<b>2509</b>

Fonte: BRASIL, 2016.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a farmacoterapia como principal forma de tratamento e controle da esquistossomíase (WHO, 2006; 2013). Esta estratégia previne o agravamento da doença, principalmente em jovens de até 20 anos (NEVES, 2004). Desta forma, utiliza-se atualmente como fármaco de escolha o praziquantel (PZQ) (**Figura 4**), derivado pirazinoisoquinolínico comercializado como uma mistura racêmica de enantiômeros R e S, sendo apenas o isômero R ativo (MEISTER et al., 2014).

**Figura 4** – Estruturas químicas dos enantiômeros do praziquantel



Fonte: Adaptado de MEISTER et al., 2014.

O PZQ promove imobilidade muscular e lesões tegumentares nos vermes adultos, expondo-os ao sistema imune do hospedeiro (GRYSEELS, 2012; NEVES, 2004). Entretanto, sua utilização apresenta limitações. Por exemplo, o PZQ é inativo contra as formas jovens do parasito e não previne a reinfeção. Além disso, sua ampla utilização desde a década de 1980 pode induzir resistência nos parasitos e comprometer sua eficácia, assim como o ocorrido no Brasil com o fármaco oxamniquina, o qual teve seu uso descontinuado devido ao surgimento de focos de resistência (CIOLI et al., 2014; VALENTIM et al., 2013).

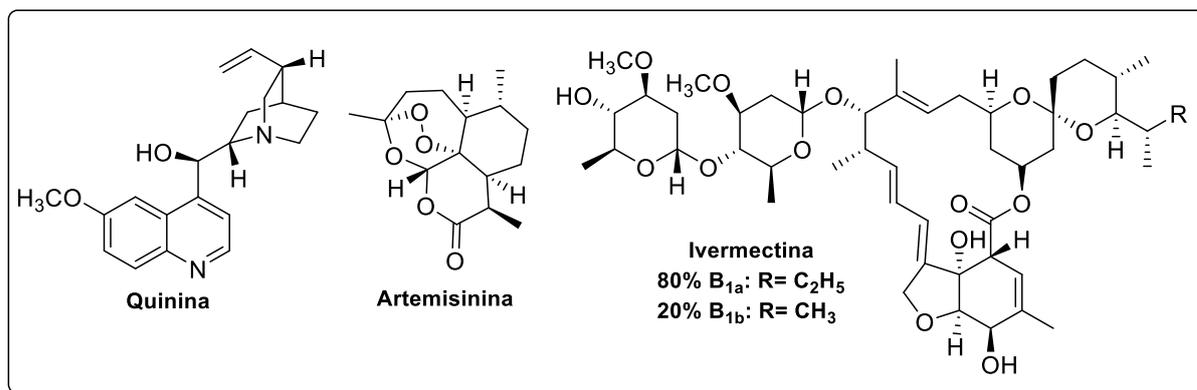
Há também o desinteresse político-econômico das grandes companhias farmacêuticas na pesquisa e desenvolvimento de fármacos voltados para o tratamento de doenças negligenciadas. Por este motivo, a esquistossomíase e outras doenças infecciosas permanecem como um problema global de saúde pública, representando uma necessidade médica ainda não atendida (HOTEZ et al., 2007; MORAN et al., 2009).

Assim, torna-se imperativo o envolvimento do Estado e da comunidade científica na busca por novos fármacos que possam complementar a farmacoterapia existente e auxiliar no combate à esquistossomíase (CIOLI et al., 2014; ROSS et al., 2002). Nesse sentido, os produtos naturais inserem-se como potenciais fontes de moléculas para o desenvolvimento de novos fármacos esquistossomicidas (UTZINGER et al., 2011).

## 1.2 PRODUTOS NATURAIS

Os produtos naturais servem há milênios como fonte de compostos medicinais ao homem (NEWMAN; CRAGG; KINGSTON, 2015). Por consequência, sempre se atrelaram ao desenvolvimento de fármacos. Para exemplificar, nos últimos 30 anos 64% das novas entidades químicas (NCE, do inglês *New Chemical Entities*) lançadas no mercado farmacêutico mundial foram inspiradas em moléculas oriundas de fontes naturais (HARVEY, 2008; NEWMAN; CRAGG, 2012; NEWMAN; CRAGG; KINGSTON, 2015). Ainda mais, 69% dos anti-infecciosos existentes são derivados ou inspirados em produtos naturais, como os antiparasitários quinina, artemisinina e ivermectina, sendo que a descoberta destas últimas duas substâncias rendeu aos pesquisadores envolvidos o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina de 2015 (**Figura 5**) (BUTLER, 2004; GOA; MCTAVISH; CLISSOLD, 1991; LI; VEDERAS, 2009; NEWMAN; CRAGG; KINGSTON, 2015).

**Figura 5** – Fármacos antiparasitários oriundos de produtos naturais

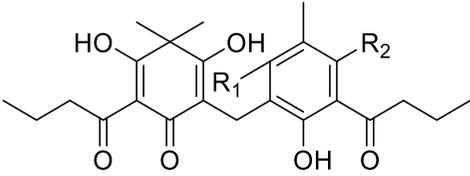
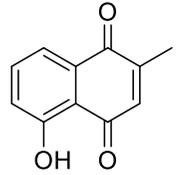
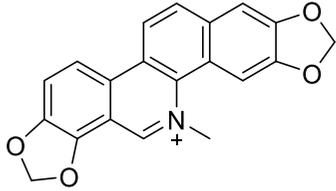


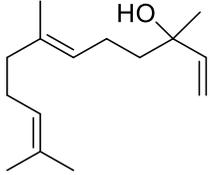
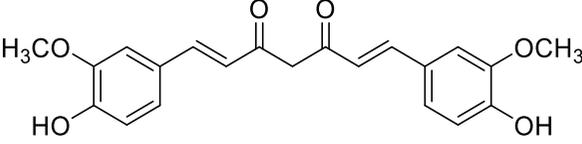
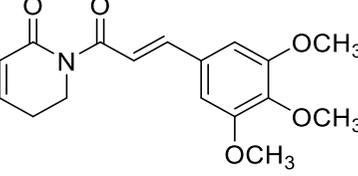
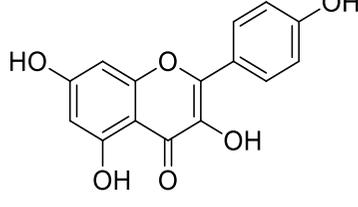
Fonte: Adaptado de GOA; MCTAVISH; CLISSOLD, 1991; BARREIRO; BOLZANI, 2009.

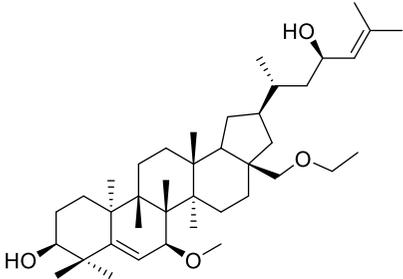
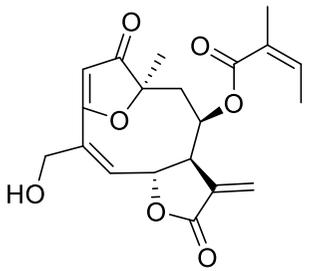
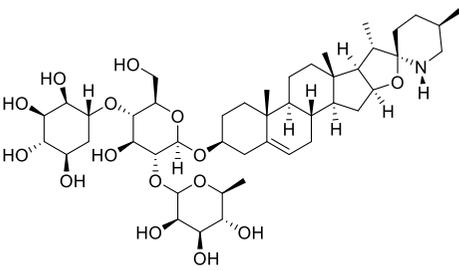
Atualmente, renova-se o interesse pela pesquisa com produtos naturais. Isso deve-se aos avanços obtidos na seleção, isolamento e elucidação estrutural de compostos, em conjunto com a síntese orgânica, que permite a obtenção de grandes quantidades de substâncias para a realização de estudos pré-clínicos e clínicos. Além disso, a enorme biodiversidade mundial, sobretudo do Brasil que hospeda 15% a 20% de todas as espécies animais e vegetais existentes, também motiva pesquisas nesta área. Portanto, buscam-se continuamente nos produtos naturais substâncias bioativas úteis ao desenvolvimento de fármacos (BARREIRO; BOLZANI, 2009; CRAGG; NEWMAN, 2013).

Neste contexto, resultados expressivos têm sido obtidos com alguns compostos naturais frente ao *S. mansoni* (**Tabela 2**).

**Tabela 2** – Exemplos de compostos naturais com atividade frente ao *Schistosoma mansoni*

Composto	Classe	Origem	Atividade esquistossomicida	Concentração ativa	Referência
 <p>Aspidina: R<sub>1</sub>= OH; R<sub>2</sub>= OCH<sub>3</sub>  Desaspidina: R<sub>1</sub>= OCH<sub>3</sub>; R<sub>2</sub>= OH  Ácido flavaspídico: R<sub>1</sub>= OH; R<sub>2</sub>= OH</p>	Floroglucinol	<i>Dryopteris</i> spp. (Dryopteridaceae)	<i>In vitro</i> frente a vermes adultos	10 µM Controle positivo: PZQ – 10 µM	(MAGALHÃES et al., 2010)
 <p>Plumbagina</p>	Naftoquinona	<i>Plumbago</i> spp. (Plumbaginaceae)	<i>In vitro</i> frente a vermes adultos	10 µM Controle positivo: PZQ – 5 µM	(LORSUWANNARAT et al., 2013; ZHANG; COULTAS, 2013)
 <p>Sanguinarina</p>	Alcaloide	<i>Sanguinaria</i> spp. (Papaveraceae)	<i>In vitro</i> frente a vermes adultos	10 µM Controle positivo: PZQ – 5 µM	(ZHANG e COULTAS, 2013)

Composto	Classe	Origem	Atividade esquistossomicida	Concentração ativa	Referência
 <b>Nerolidol</b>	Sesquiterpeno	Encontrado em muitas espécies vegetais	<i>In vitro</i> frente a vermes adultos	31,2 $\mu\text{M}$ Controle positivo: PZQ – 3 $\mu\text{M}$	(SILVA et al., 2014)
 <b>Curcumina</b>	Diarileptanoide	<i>Curcuma longa</i> L. (Zingiberaceae)	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i> frente a vermes adultos	50 $\mu\text{M}$ Controle positivo: PZQ – 10 $\mu\text{M}$	(EL-BANHAWEY et al., 2007; MAGALHÃES et al., 2009)
 <b>Piplartina</b>	Piperamida	<i>Piper tuberculatum</i> Jacq. (Piperaceae)	<i>In vitro</i> frente a formas jovens e vermes adultos	15,8 $\mu\text{M}$ Controle positivo: PZQ – 10 $\mu\text{M}$	(DE MORAES et al., 2012; DE MORAES et al., 2011B)
 <b>Kaempferol</b>	Flavonoide	<i>Styrax pohlii</i> Fritsch (Styracaceae)	<i>In vitro</i> frente a vermes adultos	100 $\mu\text{M}$ Controle positivo: PZQ – 10 $\mu\text{M}$	(BRAGUINE et al., 2012)

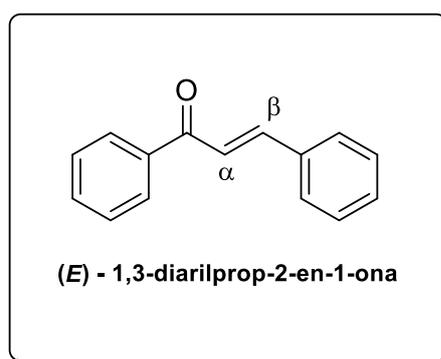
Composto	Classe	Origem	Atividade esquistossomicida	Concentração ativa	Referência
 <p><b>karavilagenina C</b></p>	Triterpeno	<i>Momordica balsamina</i> L. (Cucurbitaceae)	<i>In vitro</i> frente a vermes adultos	CL <sub>50</sub> = 28.9 ± 1.8 μM Controle positivo: PZQ CL <sub>50</sub> = 1.2 ± 0.1 μM	(RAMALHETE et al., 2012)
 <p><b>Budleína-A</b></p>	Lactona sesquiterpênica	<i>Viguiera robusta</i> Gardn. (Asteraceae)	<i>In vitro</i> frente a vermes adultos	12,5 μM Controle positivo: PZQ – 12,5 μM	(SASS et al., 2014)
 <p><b>Solamargina</b></p>	Alcaloide	<i>Solanum lycocarpum</i> A. St. Hil. (Solanaceae)	<i>In vitro</i> frente a vermes adultos	32 μM Controle positivo: PZQ – 10 μM	(MIRANDA et al., 2012)

Em vista disso, necessitam-se maiores estudos com produtos naturais na busca por novas moléculas esquistossomicidas. Assim sendo, chalconas e auronas, classes de compostos naturais que apresentam diversas atividades biológicas, dentre elas antiparasitárias, representam substâncias em potencial.

### 1.3 CHALCONAS E AURONAS

As chalconas são cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas e possuem o padrão estrutural 1,3-diarilprop-2-en-1-ona em comum, existindo preferencialmente na forma do isômero *E*, mais termodinamicamente estável (**Figura 6**) (MATOS et al., 2015).

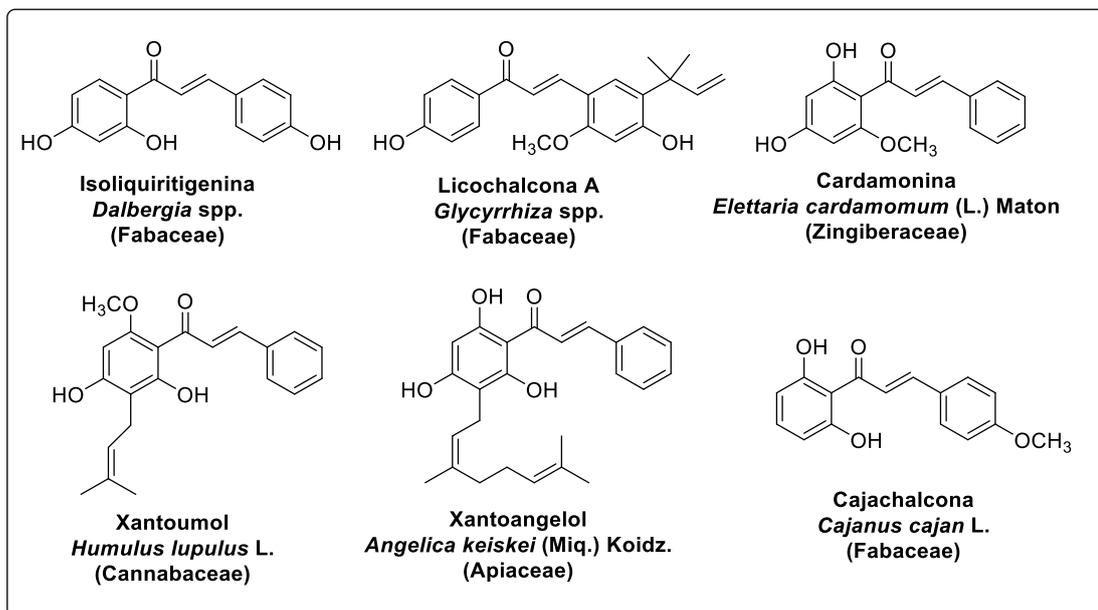
**Figura 6** – Padrão estrutural comum às chalconas



Fonte: Adaptado de HALBWIRTH, 2010; MATOS et al., 2015.

Metabólitos secundários de plantas, as chalconas atuam na pigmentação de flores, atração de polinizadores e defesa contra patógenos e predadores (BATOVSKA; TODOROVA, 2010). Por conseguinte, isolam-se estas substâncias das mais variadas espécies vegetais e estudam-se suas atividades farmacológicas (**Figura 7**) (AJAIYEOBA et al., 2013; GONÇALVES; VALENTE; RODRIGUES, 2014; LEE et al., 2009; MATOS et al., 2015; MESSIER; GRENIER, 2011; MOTANI et al., 2008; VOGEL; HEILMANN, 2008). Entretanto, as chalconas de ocorrência natural possuem poucos padrões de substituição em seus anéis aromáticos (BATOVSKA; TODOROVA, 2010). Deste modo, a síntese orgânica representa ferramenta útil à obtenção de moléculas estruturalmente diversas e em quantidades suficientes para a realização de ensaios biológicos, permitindo assim que se estude a influência de diferentes substituintes nas propriedades físico-químicas da molécula e correlacionando estes dados aos níveis de bioatividade apresentados.

**Figura 7** – Exemplos de chalconas oriundas de fontes naturais

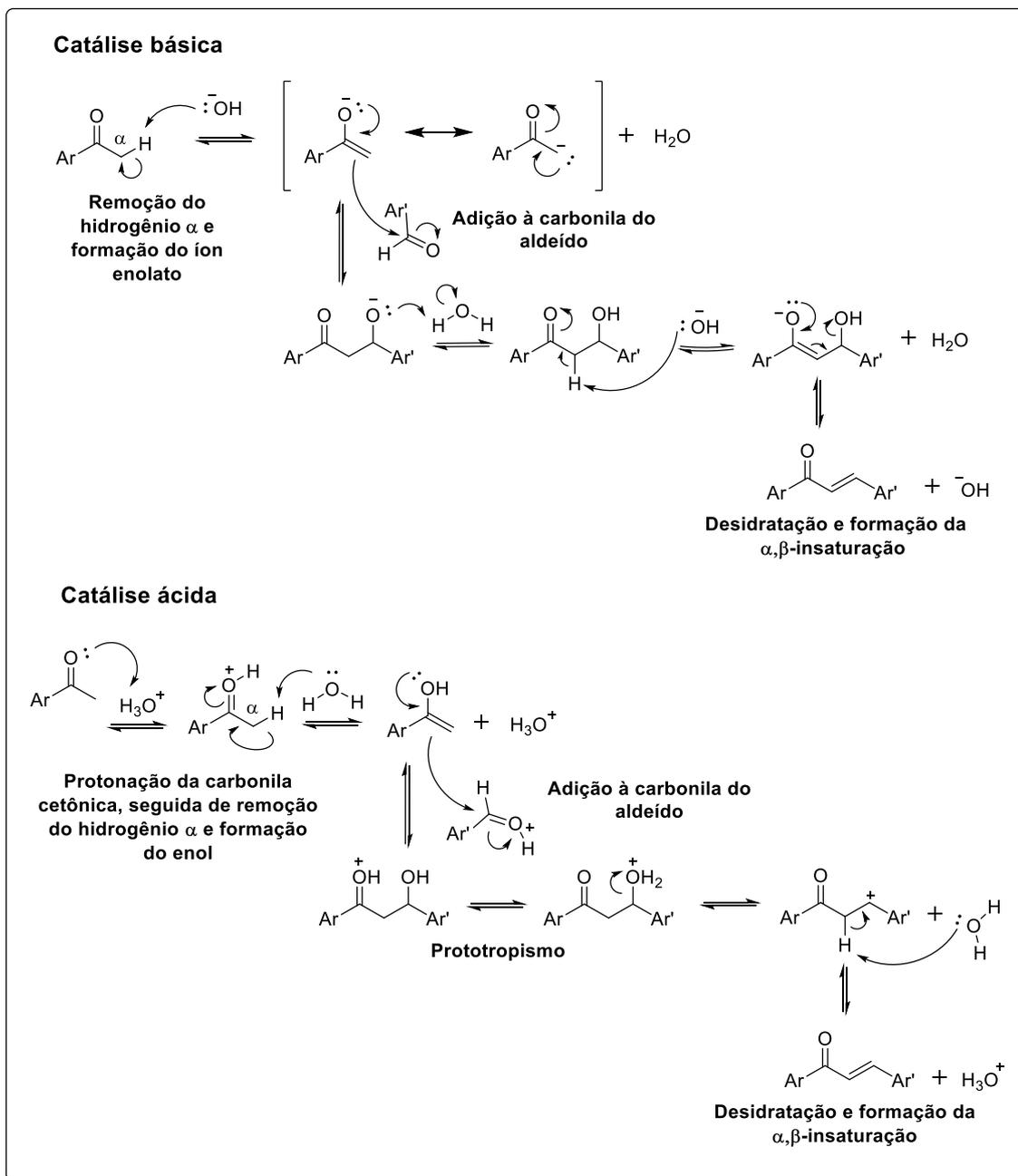


Fonte: Adaptado de MOTANI et al., 2008; VOGEL; HEILMANN, 2008; LEE et al., 2009; MESSIER; GRENIER, 2011; AJAIYEGBA et al., 2013; GONÇALVES et al., 2014; MATOS et al., 2015.

Descrevem-se na literatura científica muitas estratégias para a síntese de chalconas. Contudo, a condensação de Claisen-Schmidt é o método mais utilizado, devido à sua facilidade de execução, tempo relativamente curto de reação, exigência de condições brandas e obtenção de bons rendimentos finais do produto (AL-MASUM; NG; WAI, 2011; BOHM, 1998; EDDARIR et al., 2003; KUMAR et al., 2010; MATOS et al., 2015; ZOU et al., 2007).

A condensação de Claisen-Schmidt ocorre entre acetofenonas e aldeídos aromáticos. É essencialmente uma condensação aldólica, reação de adição entre compostos carbonílicos seguida por desidratação e formação de ligação dupla carbono-carbono. Na reação catalisada por base, primeiramente há remoção de um  $\alpha$ -hidrogênio da acetofenona e formação do íon enolato. Em seguida, ocorre adição à carbonila do aldeído aromático, eliminação de água por mecanismo do tipo E1cb e formação da  $\alpha,\beta$ -insaturação. Já na reação catalisada por ácido, primeiramente acontece a protonação da carbonila da acetofenona, remoção de um  $\alpha$ -hidrogênio e formação do enol. Posteriormente, há adição à carbonila do aldeído aromático, desidratação por mecanismo do tipo E1 e formação da  $\alpha,\beta$ -insaturação. (**Esquema 1**) (CAREY; SUNDBERG, 2007; CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012; KLEIN, 2015).

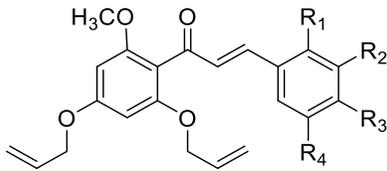
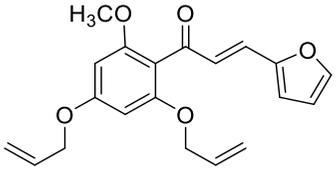
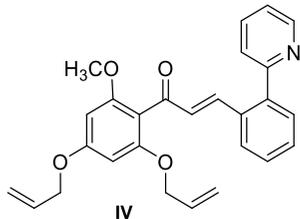
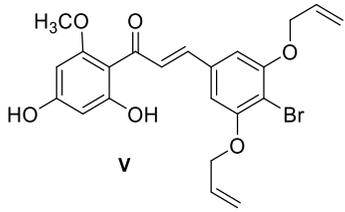
### Esquema 1 – Mecanismo da condensação de Claisen-Schmidt em meios básico e ácido

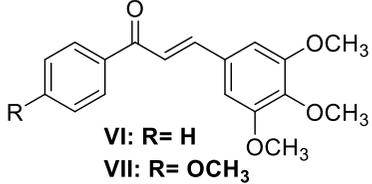
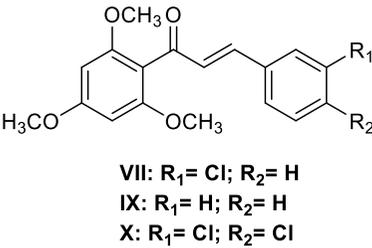
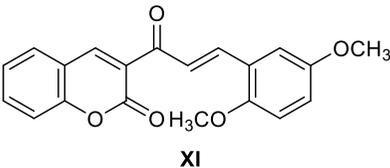


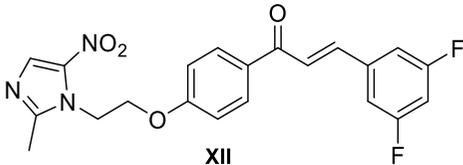
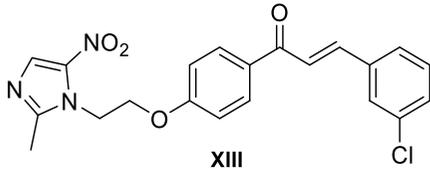
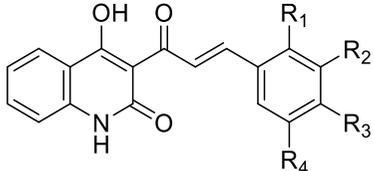
Fonte: Adaptado de CAREY; SUNDBERG, 2007; CLAYDEN et al., 2012; KLEIN, 2015.

Encontram-se na literatura várias atividades biológicas atribuídas às chalconas, dentre elas antioxidante (VOGEL; HEILMANN, 2008), anti-inflamatória (BANDGAR et al., 2010), anticancerígena (MIELCKE et al., 2012), antibacteriana (MOKLE et al., 2010; NIELSEN et al., 2004), antifúngica (CHLUPACOVA et al., 2015) e antiviral (FATIMA et al., 2012). Do mesmo modo, realizam-se estudos antiparasitários com chalconas (**Tabela 3**).

Tabela 3 – Atividades antiparasitárias de chalconas

Chalconas	Alvo	Atividade antiparasitária	Concentração ativa	Referência
 <p>I: R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>4</sub> = H; R<sub>3</sub> = CH<sub>3</sub>            II: R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>3</sub> = OCH<sub>3</sub></p>  <p>III</p>	<i>Trypanosoma cruzi</i>	<i>In vitro</i> frente a formas tripomastigotas	CI <sub>50</sub> (μM) <b>I:</b> 17,2 <b>II:</b> 3,4 <b>III:</b> 12,2 Controle positivo: Nifurtimox – 0,52	(APONTE et al., 2008)
 <p>IV</p>	<i>Leishmania amazonensis</i>	<i>In vitro</i> frente a macrófagos infectados com <i>Leishmania amazonensis</i>	Atividade em μM <b>IV:</b> 0,9 <b>V:</b> 4,1 Controle positivo: Anfotericina B – 0,4	(APONTE et al., 2010)
 <p>V</p>				

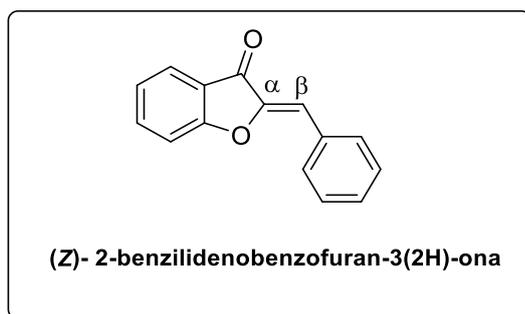
Chalconas	Alvo	Atividade antiparasitária	Concentração ativa	Referência
 <p>VI: R= H VII: R= OCH<sub>3</sub></p>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	<i>In vitro</i> frente a formas promastigotas	CI <sub>50</sub> (μM) <b>VI:</b> 6,36; <b>VII:</b> 5,69 Controle positivo: Anfotericina B – 4,25	(DE MELLO et al., 2014)
 <p>VIII: R<sub>1</sub>= Cl; R<sub>2</sub>= H IX: R<sub>1</sub>= H; R<sub>2</sub>= H X: R<sub>1</sub>= Cl; R<sub>2</sub>= Cl</p>	<i>Leishmania braziliensis</i>	<i>In vitro</i> frente a formas promastigotas	CI <sub>50</sub> (μM) <b>VIII:</b> 2,7; <b>IX:</b> 3,9; <b>X:</b> 4,6 Controle positivo: Pentamidina – 6,0	(BELLO et al., 2011)
 <p>XI</p>	<i>Trypanosoma cruzi</i>	<i>In vitro</i> frente a formas tripomastigotas e amastigotas	CI <sub>50</sub> (μM) <b>XI:</b> tripomastigota – 2,6; amastigota – 2,9 Controle positivo: Nifurtimox tripomastigota – 10,0; amastigota – 18,6	(RODRIGUEZ et al., 2015)

Chalconas	Alvo	Atividade antiparasitária	Concentração ativa	Referência
 <p>XII</p>	<i>Trichomonas vaginalis</i>	<i>In vitro</i> frente a trofozoítos metronidazol-resistentes	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )	(ANTHWAL et al., 2014)
 <p>XIII</p>			<b>XII:</b> 3,125 <b>XIII:</b> 3,125 Controle positivo: Metronidazol – 12,5	
 <p>XIV: <math>R_1 = \text{CH}_3</math>; <math>R_2, R_3, R_4 = \text{H}</math>            XV: <math>R_1 = \text{H}</math>; <math>R_2, R_4 = \text{C}(\text{CH}_3)_3</math>; <math>R_3 = \text{OH}</math></p>	<i>Trypanosoma brucei</i> e <i>Leishmania infantum</i>	<i>In vitro</i> frente a formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma brucei</i> e amastigotas de <i>Leishmania infantum</i>	$\text{CI}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) <i>Trypanosoma brucei</i> – <b>XIV:</b> 2,6; <b>XV:</b> 3,3 <i>Leishmania infantum</i> - <b>XV:</b> 1,3 Controles positivos: <i>Trypanosoma brucei</i> - Nifurtimox – 2,9 <i>Leishmania infantum</i> - Anfotericina B – 1,2	(ROUSSAKI et al., 2013)

Além das chalconas, inserem-se nesta área de estudos as auronas, substâncias naturais com grande potencial farmacológico.

As auronas são compostos  $\alpha,\beta$ -insaturados e possuem em comum o padrão estrutural 2-benzilidenobenzofuran-3(2H)-ona, que preferencialmente adota a configuração termodinamicamente estável Z (**Figura 8**) (BOUMENDJEL, 2003; SIM et al., 2008; ZWERGEL et al., 2012).

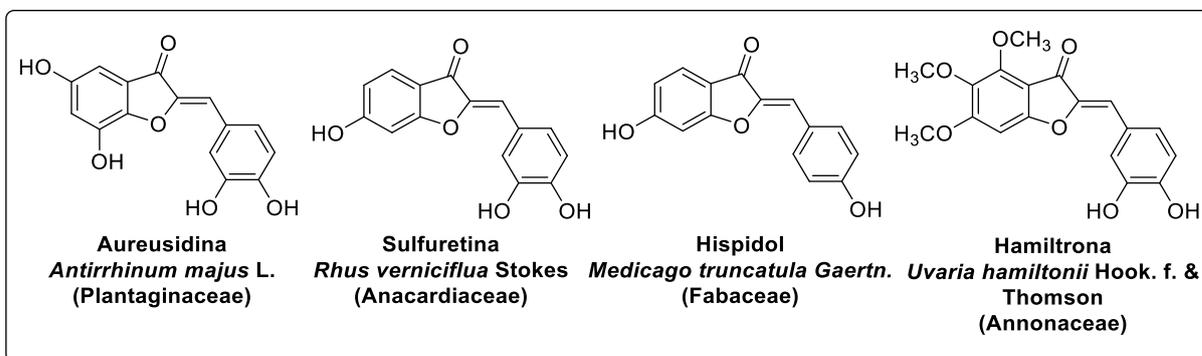
**Figura 8** – Padrão estrutural comum às auronas



Fonte: Adaptado de BOUMENDJEL, 2003; HALBWIRTH, 2010.

Presentes em espécies vegetais terrestres e marinhas, as auronas desempenham funções de pigmentação, defesa contra predadores e como fitoalexinas, utilizadas pela planta no combate a infecções (BOUMENDJEL, 2003). Deste modo, encontram-se na literatura estudos com auronas provenientes de fontes naturais (**Figura 9**) (FARAG et al., 2009; HAUDECOEUR; BOUMENDJEL, 2012; LAWRENCE et al., 2003; NAKAYAMA et al., 2000; SHIN et al., 2011A).

**Figura 9** – Exemplos de auronas provenientes de fontes naturais

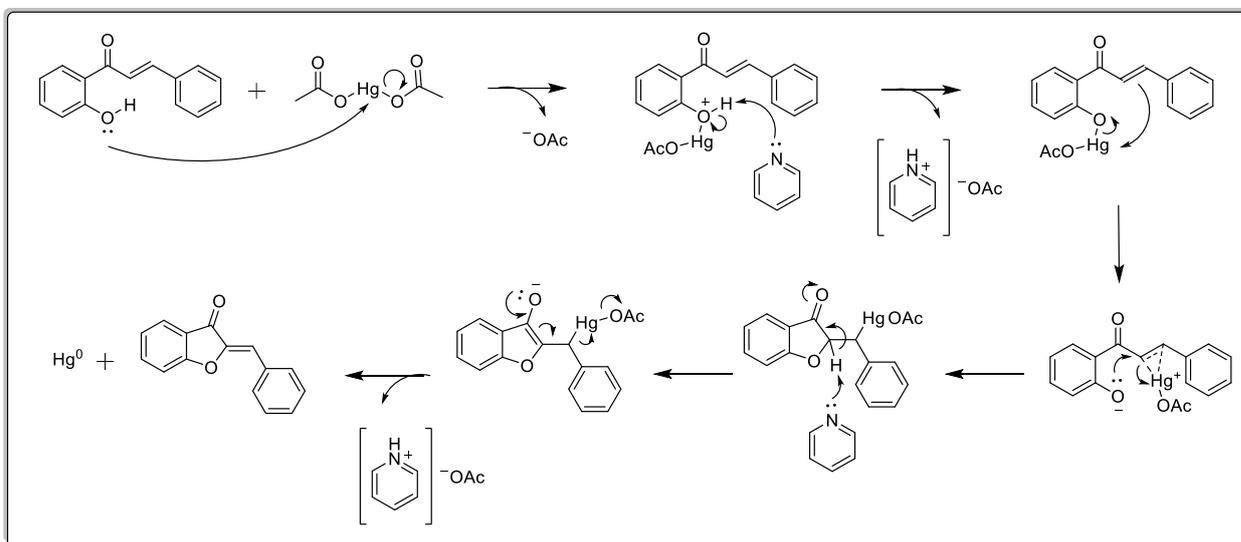


Fonte: Adaptado de NAKAYAMA et al., 2000; LAWRENCE et al., 2003; FARAG et al., 2009; SHIN et al., 2011; HAUDECOEUR; BOUMENDJEL, 2012.

As auronas são biossintetizadas a partir de chalconas através, principalmente, da enzima aureusidina sintase (HAWKINS; HANDY, 2013; NAKAYAMA et al., 2001). Baseando-se nestes processos, desenvolveram-se metodologias de síntese de auronas (HARKAT et al., 2008; HAUDECOEUR; BOUMENDJEL, 2012; KRAUS; GUPTA, 2010; OKOMBI et al., 2006; SEKIZAKI, 1988). A maioria destes procedimentos de síntese não é seletiva e conduz a uma mistura de produtos (auronas, flavonas, isoflavonas e flavanonas). Entretanto, a utilização de  $\text{Hg}(\text{OAc})_2$  em piridina demonstra-se eficaz, obtendo-se unicamente auronas como produto final (TIWARI et al., 2011; VENKATESWARLU et al., 2007).

De acordo com Agrawal e Soni (2006), Tiwari e colaboradores (2011) e Silveira (2013) o mecanismo para a síntese de auronas utilizando-se  $\text{Hg}(\text{OAc})_2$  em piridina inicia-se pela coordenação do íon  $[\text{HgOAc}]^+$  ao átomo de oxigênio do fenol. Posteriormente, ocorre a ligação deste grupo à  $\alpha,\beta$ -insaturação e o ataque do fenolato ao carbono  $\alpha$ . Então, devido a fatores estéreos, há a formação de um anel de cinco membros, seguida de eliminação do tipo  $\text{E1cb}$ , dando origem à aurona preferencialmente na configuração *Z* termodinamicamente estável (**Esquema 2**) (AGRAWAL; SONI, 2006; SILVEIRA, 2013; TIWARI et al., 2011).

**Esquema 2** – Mecanismo da síntese de auronas utilizando-se  $\text{Hg}(\text{OAc})_2$  em piridina

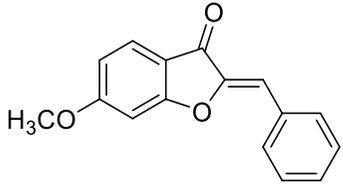
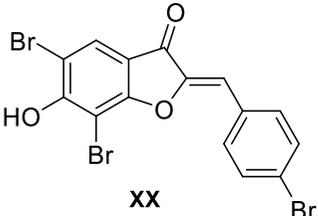
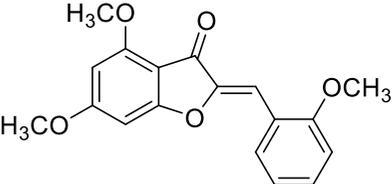


Fonte: Adaptado de AGRAWAL; SONI, 2006; TIWARI et al., 2011; SILVEIRA, 2013.

As auronas exibem várias atividades biológicas, como anticancerígena (ELHADI et al., 2015; LAWRENCE et al., 2003), antioxidante (DETSI et al., 2009), anti-inflamatória (SHIN et al., 2011B), antibacteriana (TIWARI et al., 2012) e antiviral (LIU et al., 2008; MEGUELLATI et al., 2016). Além disso, estudos demonstram atividades antiparasitárias de auronas (**Tabela 4**).

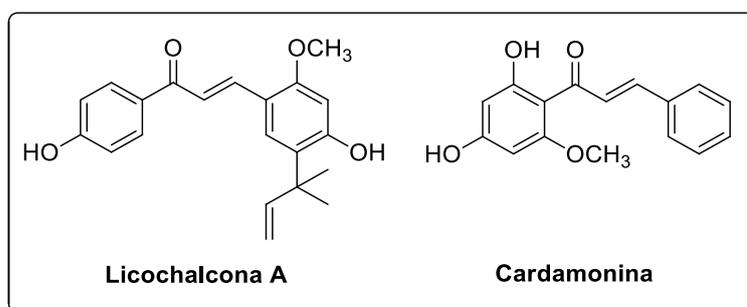
Tabela 4 – Atividades antiparasitárias de auronas

Auronas	Alvo	Atividade antiparasitária	Concentração ativa	Referência
<p><b>XVI</b></p>	<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>In vitro</i> frente às linhagens K1 e NF54	$CI_{50}$ ( $\mu M$ ) K1 - <b>XVI</b> : 0,007; NF54 - <b>XVI</b> : 0,18 Controles positivos: Cloroquina - K1-0,070; NF54 -0,004 Artemisinina - K1-0,001; NF54 -0,002	(KAYSER; KIDERLEN; BRUN, 2001)
<p><b>XVII</b></p>	<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>In vitro</i> frente à linhagem W2 cloroquina-resistente	$CI_{50}$ ( $\mu M$ ) <b>XVII</b> : 1,18 Controle positivo: Cloroquina – 0,14	(CARRASCO et al., 2014)
<p><b>XVIII</b></p>	<i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>In vitro</i> frente a formas intracelulares	% de inibição a 100 $\mu M$ <b>XVIII</b> : 98 ( $\pm$ 0,4) Controle positivo: Paromicina - 40	(KAYSER et al., 2001)

Auronas	Alvo	Atividade antiparasitária	Concentração ativa	Referência
 <p><b>XIX</b></p>	<i>Leishmania major</i>	<p><i>In vitro</i> frente à enzima fumarato redutase (FRD)</p> <p>presente em formas promastigotas de <i>Leishmania major</i></p>	<p>% de inibição da FRD a 12,5 nM</p> <p><b>XIX:</b> 94,3 (± 1,8)</p> <p>Controle positivo: Licochalcona A – 46,6 (± 3,9)</p>	(KAYSER et al., 2002)
 <p><b>XX</b></p>	<i>Trypanosoma cruzi</i>	<p><i>In vitro</i> frente a formas tripomastigotas</p>	<p>CI<sub>50</sub> (µg/mL)</p> <p><b>XX:</b> 5,06</p> <p>Controles positivos: Benzimidazol – 0,81 Nifurtimox – 0,47</p>	(AMETA et al., 2012)
 <p><b>XXI</b></p>	<i>Leishmania infantum</i>	<p><i>In vitro</i> frente a formas amastigotas</p>	<p>CI<sub>50</sub> (µM)</p> <p><b>XXI:</b> 1,3 ± 0,1</p> <p>Controle positivo: Anfotericina B – 1,2 ± 0,1</p>	(ROUSSAKI et al., 2012)

Considerando-se as atividades antiparasitárias, estudos realizados por nosso grupo de pesquisas e de parceiros têm demonstrado o potencial de chalconas e auronas como substâncias ativas também frente ao *S. mansoni*. A licochalcona A, isolada das raízes de *Glycyrrhiza inflata* Bat. (Fabaceae) (dados ainda não publicados) e a cardamonina, isolada das inflorescências de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) (DE CASTRO et al., 2015) (**Figura 10**) ocasionaram, *in vitro* na concentração de 25  $\mu$ M, a morte de 100% dos vermes adultos de *S. mansoni* após 24 horas de incubação. Adicionalmente, promoveram significativa redução na atividade motora e alterações tegumentares nos parasitos, resultados comparáveis ao PZQ a 5  $\mu$ M. (**Tabela 5 e Figura 11**).

**Figura 10** – Estruturas químicas da licochalcona A e da cardamonina



Fonte: Adaptado de DE CASTRO et al., 2015.

**Tabela 5** - Atividade esquistosomicida *in vitro* da licochalcona A e da cardamonina em vermes adultos de *Schistosoma mansoni*

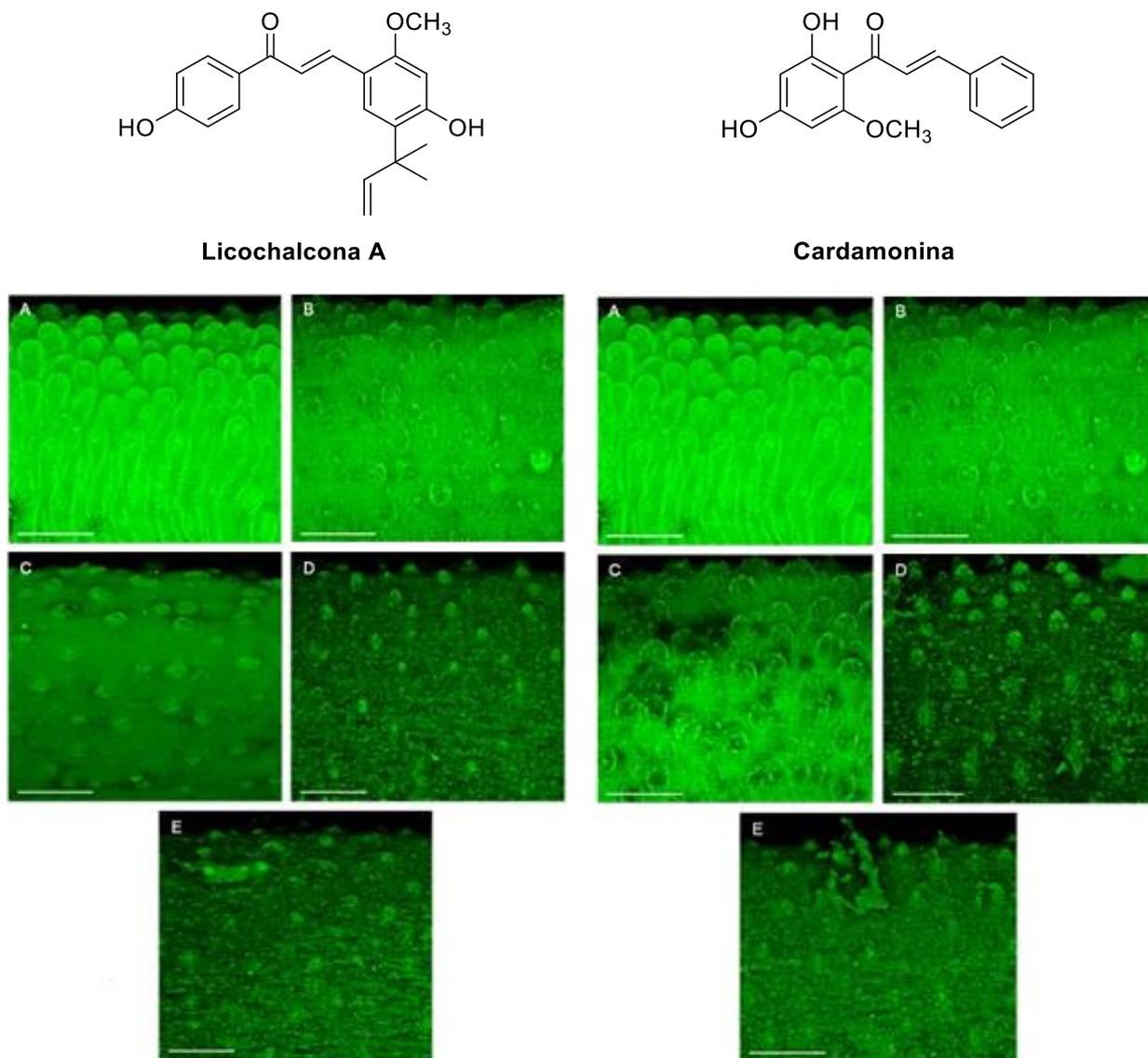
Grupos	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) <sup>a</sup>	Redução na atividade motora (%) <sup>a</sup>		Alterações tegumentares (%) <sup>a</sup>	
			Leve	Significativa	Leve	Significativa
Controle <sup>b</sup>	24	0	0	0	0	0
DMSO 0,5%	24	0	0	0	0	0
PZQ (5 $\mu$ M)	24	100	0	100	0	100
Licochalcona A (25 $\mu$ M)	24	100	0	100	0	100
Cardamonina (25 $\mu$ M)	24	100	0	100	0	100

<sup>a</sup> Porcentagem em relação a 20 vermes.

<sup>b</sup> Meio RPMI 1640.

Fonte: DE CASTRO et al., 2015 e dados ainda não publicados.

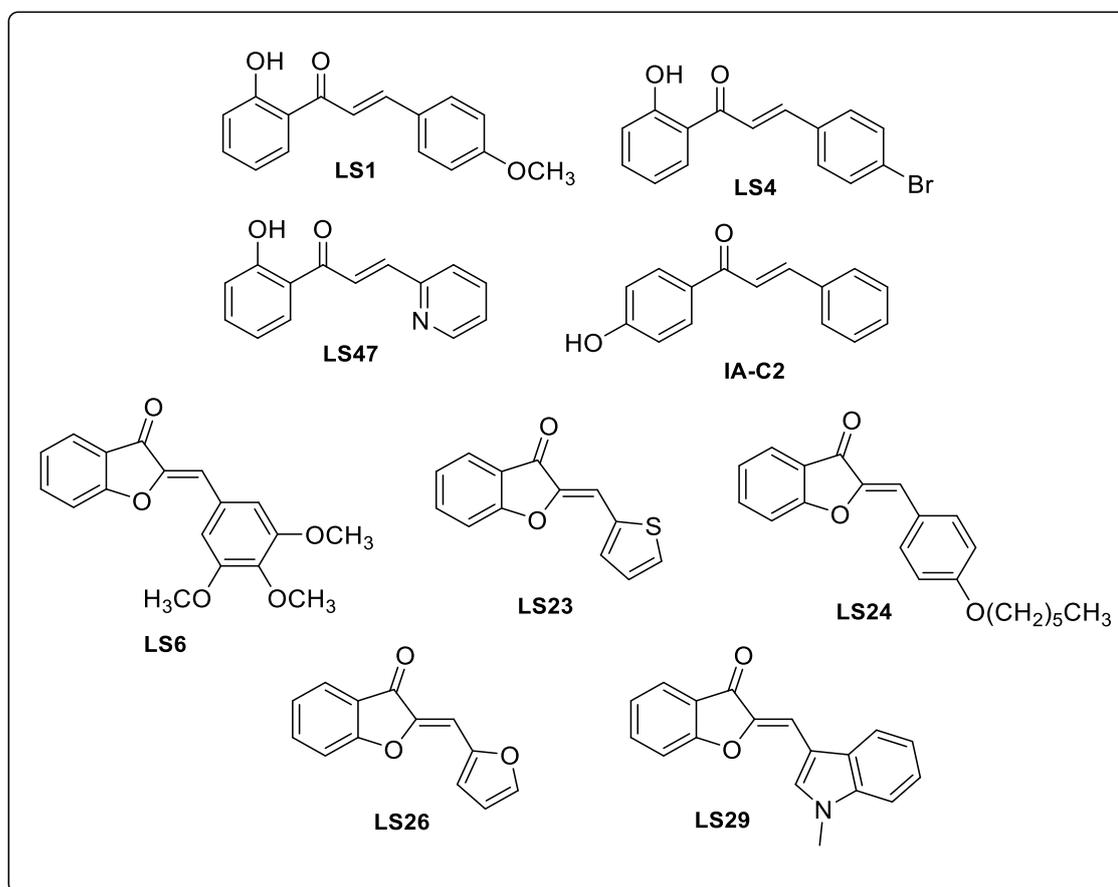
**Figura 11** – Análise por microscopia confocal de varredura a laser da atividade da licochalcona A e da cardamonina no tegumento de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*



Incubaram-se pares de vermes adultos (machos e fêmeas) em placas de 24 poços (1 casal por poço) contendo meio *Roswell Memorial Park Institute* (RPMI 1640) com DMSO 0,5%, PZQ 5  $\mu\text{M}$  ou a substância teste (licochalcona A ou cardamonina) em diferentes concentrações. Em seguida, fixaram-se os parasitos em solução AFA (ácido acético glacial/formaldeído/etanol/água destilada 2:9:30:59) e analisaram-se os mesmos com o auxílio de um microscópio confocal de varredura a laser. A: Controle negativo (meio RPMI 1640 com DMSO 0,5%). B: Controle positivo (PZQ 5  $\mu\text{M}$ ). C: Substância teste a 10  $\mu\text{M}$ . D: Substância teste a 25  $\mu\text{M}$ . E: Substância teste a 50  $\mu\text{M}$ . Imagens: A-E são imagens tridimensionais; barras = 200  $\mu\text{m}$ . Fonte: Adaptado de DE CASTRO et al., 2015 e de dados ainda não publicados.

Outro estudo inédito realizado por colaboradores com uma série de chalconas e auronas sintéticas reforça o caráter esquistossomicida destas classes de compostos. Submetidas aos mesmos ensaios esquistossomicidas *in vitro* que o estudo anterior, as chalconas **LS1**, **LS4** e **LS47** e as auronas **LS6**, **LS23**, **LS24**, **LS26** e **LS29** (**Figura 12**) ocasionaram, a 50  $\mu$ M, 100% de mortalidade, significativa redução da atividade motora e alterações tegumentares nos vermes adultos após 24 h de incubação, em comparação ao PZQ a 5  $\mu$ M. Além disso, a chalcona **IA-C2** (**Figura 12**) demonstrou-se ativa na concentração de 25  $\mu$ M, exibindo resultados similares à cardamonina e à licochalcona A. Vale ressaltar que estes dados ainda não foram publicados.

**Figura 12** – Chalconas e auronas sintéticas ativas *in vitro* frente ao *Schistosoma mansoni*



Fonte: Elaborado pelo autor.

Soma-se a este fato a possibilidade de pesquisa do mecanismo de ação esquistossomicida exercido por chalconas e auronas e, para isso, a enzima SmATPDase1 representa um possível alvo molecular.

#### 1.4 SmATPDase1

A SmATPDase1 (*S. mansoni* ATPDase1) é uma enzima extracelular pertencente ao grupo das ecto-nucleosídeo trifosfato difosfoidrolases (E-NTPDases ou ATP difosfoidrolases) cuja função é hidrolisar nucleosídeos di e trifosfatados (ADP e ATP) aos seus correspondentes monofosfatos (AMP) através de ativação dependente de  $\text{Ca}^{+2}$  ou  $\text{Mg}^{+2}$  (MAIA et al., 2011; ZIMMERMANN; ZEBISCH; STRÄTER, 2012). Localiza-se na superfície externa dos ovos, esquistossômulos e tegumento dos vermes adultos de *S. mansoni*. Consequentemente, estudos sugerem que sua atividade esteja relacionada a mecanismos de evasão do parasito ao sistema imune do hospedeiro, devido à importância do ATP e ADP para processos de ativação da resposta imunológica e hemostática, como a agregação plaquetária (DE MARCO et al., 2003; FARIA-PINTO et al., 2004; FARIA-PINTO et al., 2008; MEBIUS et al., 2013). Além disso, acredita-se que a adenosina, oriunda do metabolismo do AMP, atue imunossuprimindo o hospedeiro e sirva como substrato nutricional essencial ao *S. mansoni*, uma vez que o parasito é incapaz de sintetizar purinas (BOURS et al., 2006; LEVY; READ, 1975). Assim, estes fatores em conjunto promoveriam a adaptação e sobrevivência do parasito no organismo do hospedeiro.

Recentemente, comprovou-se a especificidade da SmATPDase1 do tegumento do parasito na hidrólise de ATP e ADP extracelulares (DA'DARA; BHARDWAJ; SKELLY, 2014). Por conseguinte, propõe-se que a enzima possa servir como um novo alvo terapêutico para substâncias esquistossomicidas (DA'DARA; BHARDWAJ; SKELLY, 2014; PENIDO et al., 2007). Entretanto, não há na literatura a descrição de inibidores potentes, seletivos e estáveis para a mesma (BAQI, 2015). Assim, necessitam-se compostos que promovam a inibição da SmATPDase1, representando substâncias potencialmente ativas frente ao *S. mansoni*.

Neste sentido, avaliou-se a atividade inibitória *in vitro* da cardamonina, da chalcona sintética **LS1** e das auronas sintéticas **LS6** e **LS23** (página 38, **Figura 12**) sobre a SmATPDase1, como forma de elucidação do provável mecanismo de ação esquistossomicida exercido por estes compostos. A 40  $\mu\text{M}$ , a cardamonina, a chalcona **LS1** e as auronas **LS6** e **LS23** ocasionaram, respectivamente, 82% ( $\text{CI}_{50} = 23,54 \mu\text{M}$ ), 53,31% ( $\text{CI}_{50} = 30,62 \mu\text{M}$ ), 48,69% ( $\text{CI}_{50} = 49,72 \mu\text{M}$ ) e 89,94% ( $\text{CI}_{50} = 13,47 \mu\text{M}$ ) de inibição da atividade hidrolítica de ATP da SmATPDase1. Dentre estes, somente a aurona **LS23** foi capaz de inibir a atividade

hidrolítica de ADP, com  $CI_{50} = 28,20 \mu M$  (DE CASTRO et al., 2015 e dados ainda não publicados).

Logo, devem-se realizar maiores estudos acerca da atividade inibitória de chalconas e auronas frente à SmATPDase1, de modo a condicioná-las como protótipos no desenvolvimento de novos fármacos esquistossomicidas. Para isto, o planejamento racional de fármacos insere-se como ferramenta útil na otimização molecular e elaboração de análogos com melhores níveis de bioatividade que os compostos modelo.

## 1.5 PLANEJAMENTO RACIONAL DE FÁRMACOS

Atualmente, a pesquisa e o desenvolvimento de fármacos demandam grandes investimentos em tempo e dinheiro. Estimativas apontam que gastos da ordem de 800 milhões a 2 bilhões de dólares e tempo médio de 12 anos sejam necessários para a introdução de um novo fármaco no mercado farmacêutico mundial (ADAMS; BRANTNER, 2010; DIMASI; HANSEN; GRABOWSKI, 2003). Descobrem-se inicialmente compostos com baixos níveis de atividade, posteriormente otimizando-os até atingirem níveis considerados terapêuticos. Entretanto, apesar das contribuições da química combinatória e da triagem de alta produtividade (HTS, do inglês *High Throughput Screening*) neste processo, não há crescimento significativo no lançamento de novas entidades químicas. Portanto, tornam-se necessárias tecnologias que auxiliem na identificação, planejamento e otimização de novos compostos. Neste sentido, aplicam-se as triagens virtuais, ou análises *in silico* (GELDENHUYS et al., 2006; ROLLINGER; LANGER; STUPPNER, 2006).

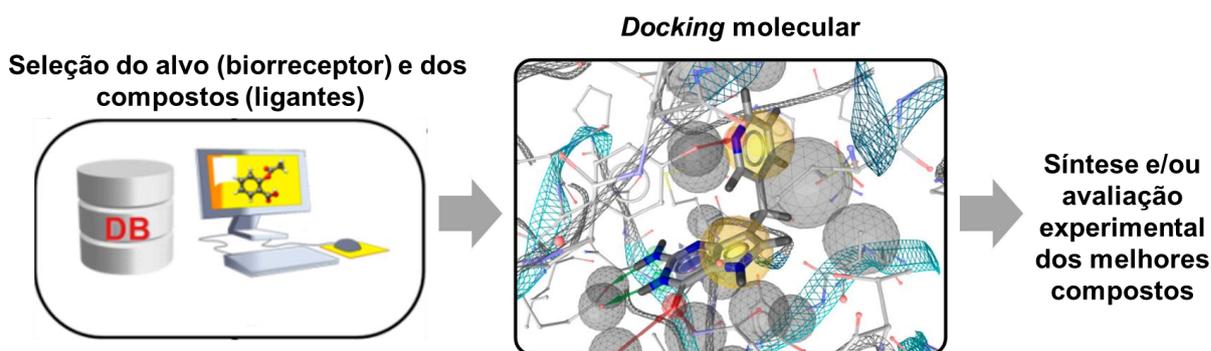
O termo *in silico* é uma expressão moderna que significa realizar experiências por meio de recursos computacionais. Mais especificamente, sua aplicação permite criar modelos, realizar previsões, sugerir hipóteses e promover cálculos que facilitem a elaboração de pesquisas (EKINS; MESTRES; TESTA, 2007). Adicionalmente, estes recursos permitem a obtenção de resultados mais rápidos e econômicos, reduzindo em até 50% os custos inerentes ao desenvolvimento de fármacos (BARREIRO et al., 1997; GELDENHUYS et al., 2006). Por conseguinte, a gestão e aplicação ordenada de informações, tendo por base análises *in silico*, constituem passos importantes no planejamento racional de fármacos (EKINS; MESTRES; TESTA, 2007; MACALINO et al., 2015). Com estes propósitos, utiliza-se o recurso *in silico* conhecido como *docking* molecular

O *docking* molecular permite, com boa acurácia, prever as interações que ocorrem entre a estrutura tridimensional de um alvo, comumente uma proteína, e moléculas

ligantes. Além disso, esta técnica utiliza algoritmos que analisam modos preferenciais de ligação e funções de pontuação que executam previsões quantitativas da energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) inerente ao processo de formação do complexo ligante-biorreceptor. Deste modo, se obtém um ranqueamento energético dos compostos em função das suas afinidades de ligação (COUPEZ; LEWIS, 2006; FERREIRA et al., 2015; MENG et al., 2011).

Neste sentido, utilizam-se técnicas de *docking* molecular frente a um determinado alvo específico para a seleção de novos compostos bioativos, processo denominado de seleção virtual baseada em estrutura (SBVS, do inglês *Structure-Based Virtual Screening*). Esta estratégia consiste, primeiramente, em escolher o alvo molecular (biorreceptor) e os compostos (ligantes) a serem analisados, realizar o *docking* molecular destes e interpretar as informações obtidas, sintetizando e/ou submetendo os melhores compostos a ensaios experimentais (**Figura 13**) (FERREIRA et al., 2015; NEVES; ANDRADE; CRAVO, 2015).

**Figura 13** – Etapas da seleção virtual baseada em estrutura



Fonte: Adaptado de FERREIRA et al., 2015; NEVES; ANDRADE; CRAVO, 2015.

Outra etapa importante no planejamento racional de fármacos é a predição *in silico* de propriedades farmacocinéticas (absorção, distribuição, metabolismo e excreção - ADME). Dentre as principais causas de falhas nas pesquisas com novas moléculas, calcula-se que 39% relacionam-se a características farmacocinéticas (VAN DE WATERBEEMD; GIFFORD, 2003). Devido a isso, Lipinski e colaboradores (1997) criaram a “Regra dos 5”, tendo por base informações provenientes de bancos de dados virtuais, como o *World Drug Index* (WDI). Esta regra prediz que moléculas com mais de 5 átomos doadores de ligações de hidrogênio (HBD, do inglês *Hydrogen Bond Donor*), 10 átomos aceptores de ligações de hidrogênio (HBA, do inglês *Hydrogen Bond Acceptor*), peso molecular maior que 500 e logaritmo do coeficiente de partição (log P) maior do que 5 apresentariam problemas

relacionados à permeabilidade celular e absorção oral (LIPINSKI, 2000; LIPINSKI et al., 1997). Posteriormente, Zhao e colaboradores (2002) também desenvolveram uma fórmula, expressa por  $\%ABS = 109 - (0,345 \times TPSA)$ , na qual obtém-se a porcentagem teórica de absorção oral para uma determinada molécula a partir da sua área de superfície polar topológica (TPSA, do inglês *Topological Polar Surface Area*) (ZHAO et al., 2002).

Diante do exposto e tendo-se em vista as atividades apresentadas por chalconas e auronas frente ao *S. mansoni* e à enzima SmATPDase1, podem-se utilizar estas classes de compostos como modelos no planejamento molecular e síntese de novos análogos. Para isso, a aplicação ordenada e sequencial de técnicas de *docking* molecular, análise de propriedades ADME, síntese e avaliação experimental de compostos com características potenciais de bioatividade representa estratégia racional na busca por protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos esquistossomicidas.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é avaliar a atividade esquistossomicida *in vitro* de chalconas e auronas sintéticas planejadas por métodos *in silico*, visando-se encontrar substâncias potencialmente ativas. Adicionalmente, os compostos serão submetidos a ensaios de inibição *in vitro* da enzima SmATPDase1 de *S. mansoni*, como forma de pesquisa do possível mecanismo de ação envolvido, além de ensaios de avaliação citotóxica *in vitro*.

Para esta finalidade, propõem-se os seguintes objetivos específicos:

- Realizar o planejamento molecular *in silico* de chalconas e auronas por meio de *docking* molecular com a enzima SmATPDase1, bem como através da análise de propriedades ADME;
- Sintetizar, purificar e caracterizar as chalconas e auronas planejadas;
- Avaliar a atividade esquistossomicida *in vitro* frente a vermes adultos de *S. mansoni* das chalconas e auronas sintetizadas, purificadas e caracterizadas;
- Avaliar a atividade inibitória *in vitro* das chalconas e auronas sintetizadas, purificadas e caracterizadas frente à enzima SmATPDase1;
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* das chalconas e auronas frente a macrófagos murinos da linhagem celular RAW 264.7.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ANÁLISES *IN SILICO*

##### 3.1.1 Simulações de *docking* molecular

Primeiramente, realizou-se a seleção virtual de análogos de chalconas e auronas com características estruturais e físico-químicas específicas por meio de acesso aos bancos de dados virtuais PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/search.cgi>), ChemSpider ([www.chemspider.com/](http://www.chemspider.com/)) e SciFinder (<https://scifinder.cas.org/>). Em seguida, representaram-se as estruturas químicas dos compostos selecionados, em duas dimensões, utilizando-se o programa ChemDraw Professional 15.0 (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, EUA) e converteram-se estas estruturas para modelos tridimensionais através do programa Spartan 14' (Wavefunction, Inc., Irvine, CA, EUA).

Então, utilizaram-se estes modelos nos programas AutoDock 4.2 e Autodock Tools-1.5.6 para as simulações de *docking* molecular, aplicando-se o Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA, do inglês *Lamarckian Genetic Algorithm*) (MORRIS et al., 1998). Definiram-se os parâmetros para 100 conformações e 2,5 milhões de avaliações de energia por ciclo. Ajustou-se o tamanho da grade para 40 Å x 40 Å x 40 Å (dimensões x, y e z) e o espaçamento entre seus pontos para 0,508 Å. Em seguida, posicionou-se a grade no domínio de ligação nucleotídica do modelo tridimensional validado da SmATPDase1 (DE CASTRO et al., 2015). Selecionaram-se as conformações de menor energia dos compostos. Por fim, analisaram-se e visualizaram-se os resultados finais de simulação utilizando-se os programas Visual Molecular Dynamics (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>) e Swiss PDB Viewer (<http://spdbv.vital-it.ch/>).

##### 3.1.2 Avaliação de propriedades ADME

Para o cálculo da porcentagem de absorção oral teórica (ZHAO et al., 2002) das chalconas e auronas, assim como para a avaliação da obediência destas à regra dos 5 de Lipinski (LIPINSKI, 2000; LIPINSKI et al., 1997), utilizaram-se os descritores moleculares obtidos por meio do programa Spartan 14' (Wavefunction, Inc., Irvine, CA, EUA). Neste programa, inicialmente calculou-se o confôrmero mais estável de cada molécula pelo método de mecânica molecular MMFF (Merck *Molecular Force Field*) (HALGREN, 1996).

Posteriormente, através do método quântico semi-empírico RM1 (Recife *Model 1*) (ROCHA et al., 2006), otimizou-se a geometria molecular destes confôrmeros. Por último, aplicou-se o método quântico *ab initio* de Hartree-Fock na base 6-31G\*\* para a obtenção dos descritores moleculares.

### 3.2 SÍNTESE, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS CHALCONAS E AURONAS

O Núcleo de Identificação e Pesquisa de Princípios Ativos Naturais (NIPPAN) da Faculdade de Farmácia e o Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas (ICE), ambos pertencentes à Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), disponibilizaram os seguintes equipamentos e material necessários ao desenvolvimento das etapas de síntese, purificação e caracterização das chalconas e auronas deste trabalho.

Para a síntese e purificação das chalconas e auronas:

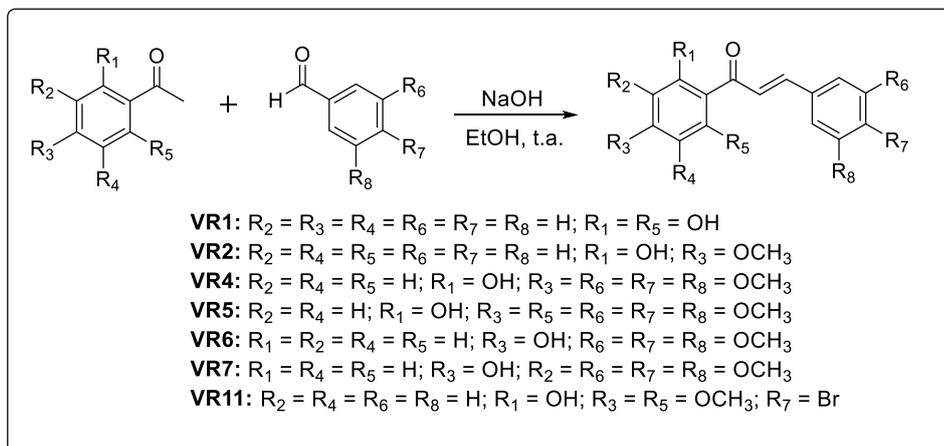
- Agitador magnético com aquecimento Fisatom – 752A;
- Rotaevaporador Buchi RII e bomba de vácuo Buchi V-700;
- Balança analítica Marte AY220;
- Estufa com renovação e circulação de ar Solab - SL102;
- Lavadora ultrassônica digital Sanders Medical – Soniclean 2PS;
- Reagentes para síntese orgânica da marca Sigma-Aldrich;
- Solventes P.A. das marcas Vetec, Alphatec, Isofar e Quemis;
- Placas para cromatografia em camada delgada (CCD) sílica gel 60 GF<sub>254</sub> com base de alumínio Merck. Reveladores: Câmara UV ( $\lambda = 254 \text{ nm}$  e  $365 \text{ nm}$ ) Solab – SL204 e vapores de I<sub>2</sub>.

Para a caracterização estrutural e físico-química das chalconas e auronas:

- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) BRUKER AVANCE III 500 MHz, localizado no Departamento de Química do ICE da UFJF e operado a 500 MHz para <sup>1</sup>H e a 125 MHz para <sup>13</sup>C. Utilizou-se CDCl<sub>3</sub>, das marcas Cambridge Isotope Laboratories, Inc. e Sigma-Aldrich, como solvente para os compostos e tetrametilsilano (TMS) como referência interna;
- Aparelho digital para determinação do ponto de fusão Microquímica MQAPF.

### 3.2.1 Procedimento geral para a síntese das chalconas VR1, VR2, VR4, VR5, VR6, VR7 e VR11

**Esquema 3** – Reação de síntese das chalconas VR1, VR2, VR4, VR5, VR6, VR7 e VR11

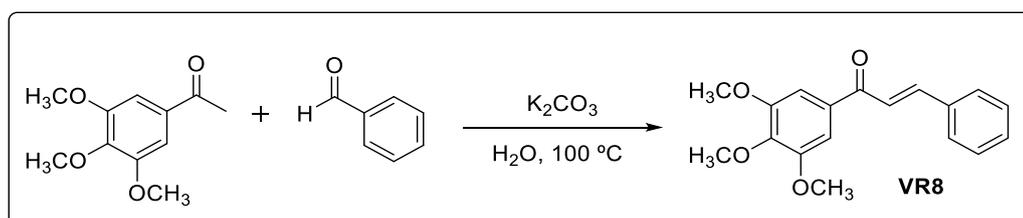


Fonte: Elaborado pelo autor.

Adicionou-se a um balão de fundo redondo 1 mmol (1eq.) de acetofenona e 1 mmol (1eq.) de aldeído aromático, correspondentes ao produto desejado, além de 15 mL de EtOH e 5 mL de solução aquosa de NaOH 4,0 mol/L, deixando-se este sistema sob agitação magnética à temperatura ambiente. Acompanhou-se a formação do produto através de CCD (fase móvel: Hexano/AcOEt 7:3 ou  $CHCl_3$ /Acetona 9,5:0,5; reveladores: UV e vapores de  $I_2$ ). Após o término da reação, retirou-se o sistema da agitação magnética, colocou-se o mesmo sob banho de gelo e adicionou-se aos poucos HCl 1,0 mol/L. Posteriormente, extraiu-se o produto com  $CH_2Cl_2/H_2O$ , secou-se a fase orgânica com  $Na_2SO_4$  anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente sob pressão reduzida em rotaevaporador. Então, recristalizou-se o produto em EtOH e filtrou-se o mesmo à vácuo.

### 3.2.2 Procedimento para a síntese da chalcona VR8

**Esquema 4** – Reação de síntese da chalcona VR8

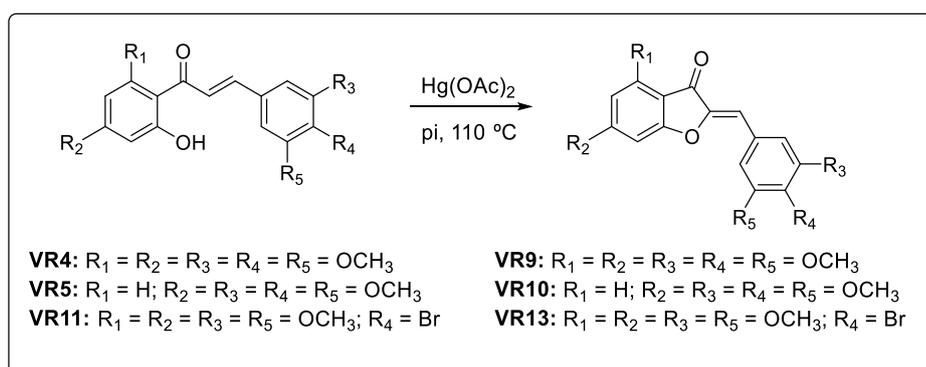


Fonte: Elaborado pelo autor.

Para a síntese da chalcona **VR8**, seguiu-se metodologia descrita na literatura (REZENDE; PIZARRO; MILLÁN, 2007). Adicionou-se a um balão de fundo redondo 1 mmol (1eq.) de 3,4,5-trimetoxiacetofenona, 1 mmol (1eq.) de benzaldeído, 30 mL de água e 0,25 mmol de  $K_2CO_3$ , deixando-se o sistema sob agitação magnética à temperatura de 100 °C. Acompanhou-se a formação do produto através de CCD (fase móvel: Hexano/AcOEt 7:3; reveladores: UV e vapores de  $I_2$ ). Após o término da reação, retirou-se o sistema da agitação magnética, extraiu-se o produto com  $CH_2Cl_2/H_2O$ , secou-se a fase orgânica com  $Na_2SO_4$  anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente sob pressão reduzida em rotaevaporador. Então, recristalizou-se o produto em EtOH e filtrou-se o mesmo à vácuo.

### 3.2.3 Procedimento geral para a síntese das auronas **VR9**, **VR10** e **VR13**

**Esquema 5** – Reação de síntese das auronas **VR9**, **VR10** e **VR13**



Fonte: Elaborado pelo autor.

Adicionou-se a um balão de fundo redondo 1 mmol (1eq.) de acetato de mercúrio e volume de piridina suficiente para solubilizá-lo. Em seguida, adicionou-se 1 mmol (1eq.) da chalcona correspondente à aurona desejada e deixou-se o sistema sob agitação magnética à temperatura de 110 °C. Acompanhou-se a formação do produto através de CCD (fase móvel: Hexano/AcOEt 7:3; reveladores: UV e vapores de  $I_2$ ). Após o término da reação, retirou-se o sistema da agitação magnética, colocou-se o mesmo sob banho de gelo e adicionou-se aos poucos HCl 1,0 mol/L. Posteriormente, extraiu-se o produto com AcOEt/ $H_2O$ , secou-se a fase orgânica com  $Na_2SO_4$  anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente sob pressão reduzida em rotaevaporador. Então, recristalizou-se o produto em MeOH/AcOEt e filtrou-se o mesmo à vácuo.

Caracterizaram-se todos os compostos sintetizados e purificados por meio de análises de RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$ , bem como pela determinação de seus pontos de fusão.

### 3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA *IN VITRO* FRENTE A VERMES ADULTOS DE *Schistosoma mansoni*

Efetuiu-se esta etapa no Núcleo de Enteroparasitas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, São Paulo, SP), sob a colaboração e supervisão do Prof. Dr. Josué de Moraes e do Prof. Dr. Pedro Luiz Silva Pinto.

#### 3.3.1 Linhagem do *Schistosoma mansoni* e animais hospedeiros utilizados

Neste trabalho, utilizou-se a linhagem BH (Belo Horizonte, MG) de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, mantida no Núcleo de Enteroparasitas do IAL por meio de ciclo evolutivo bem estabelecido (DE MORAES et al., 2012).

Como hospedeiro intermediário, utilizaram-se caramujos *Biomphalaria glabrata* Say, 1818, acondicionados em aquários de polietileno (55 x 22 x 17 cm) contendo cerca de 20 litros de água dechlorada, à temperatura de 24 °C e alimentados com alface fresca; arejaram-se os aquários com bombas de 1,5 W (MORAES et al., 2009).

Mantiveram-se também os parasitos em hamsters *Mesocricetus auratus* Waterhouse, 1839, fornecidos pelo biotério do IAL e utilizados como hospedeiro definitivo. Esses roedores eram recém-desmamados, de sexo único, com massa aproximada de 20 g aos 21 dias de idade, acondicionados em caixas de polipropileno (40 x 34 x 16 cm) com tampa metálica, acomodados em maravalha com duas trocas semanais e alimentados com ração e água *ad libitum*.

#### 3.3.2 Manutenção do ciclo evolutivo do *Schistosoma mansoni*

Para a manutenção do ciclo evolutivo de *S. mansoni* e recuperação dos vermes adultos, seguiram-se metodologias descritas e bem estabelecidas na literatura (PELLEGRINO; KATZ, 1968; SMITHERS; TERRY, 1965). Inicialmente, infectaram-se os hamsters por meio de injeção subcutânea contendo um concentrado de cercárias. Após 49 dias, sacrificaram-se estes animais em câmara de CO<sub>2</sub> e, através de perfusão no sistema porta hepático dos roedores, recuperaram-se os vermes adultos de *S. mansoni*.

Para esta perfusão, utilizaram-se meio Roswell Memorial Park Institute (RPMI 1640; pó para preparo de 1 litro; Vitrocell, Campinas, SP, Brasil), contendo L-glutamina e vermelho de fenol, além de heparina sódica 5 UI/ml (Liquemine<sup>®</sup>, Roche, São Paulo, SP, Brasil).

Inicialmente, realizou-se uma secção longitudinal na região ventral, expondo-se os órgãos internos. Então, seccionou-se a veia porta e, com o auxílio de uma agulha acoplada a uma bomba peristáltica, injetou-se meio de cultura diretamente no coração do animal, posteriormente coletando-se os vermes adultos (SMITHERS; TERRY, 1965).

Em seguida, retiraram-se e trituraram-se os fígados dos roedores em liquidificador conjuntamente com solução salina 0,85% (m/v), deixando que a suspensão resultante sedimentasse no escuro. Após lavagens por decantações sucessivas, ressuspendeu-se o sedimento com água de clorada e incidiu-se luz artificial (lâmpada incandescente de 60 W) sobre o mesmo para obtenção dos miracídios. Determinou-se o número e a viabilidade dos miracídios com o auxílio de um estereomicroscópio (Wild Heerbrugg, modelo M3C, Heerbrugg, Alemanha) (PELLEGRINO; KATZ, 1968).

Posteriormente, infectaram-se os caramujos, sexualmente maduros, colocando-os em placas de cultura de células com 24 poços (TTP, Techno Plastic Products, St. Louis, MO, USA) contendo água filtrada e miracídios (na proporção de 8 miracídios por caramujo) sob a incidência de luz artificial à distância de aproximadamente 30 cm, durante 3 a 4 horas. Tal procedimento promove aumento da temperatura para cerca de 30 °C. Após 35 a 40 dias, transferiram-se cerca de 30 caramujos infectados para um recipiente de vidro tipo Becker (Vidrolabor, Laborquimi Ltda., Poá, SP, Brasil) contendo água de clorada e incidiu-se luz artificial sobre os mesmos, durante 2 a 3 horas, para a liberação de cercárias. Concentraram-se as cercárias colocando-as em tubos de ensaio de vidro com capacidade de 40 mL (Pyrex, Corning Incorporated, Corning, NY, USA) parcialmente protegidos da luz com papel alumínio, de modo a permitir a entrada de luz somente pelo ápice do tubo. Utilizou-se o concentrado de cercárias para a infecção dos hamsters (PELLEGRINO; KATZ, 1968).

### 3.3.3 Preparo das amostras

Acondicionaram-se os compostos em microtubos de polipropileno de fundo cônico com capacidade de 1,5 mL (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), conservando-os à temperatura ambiente e ao abrigo da luz e umidade. No momento do uso, dissolveram-se os mesmos em dimetilsulfóxido (DMSO, Merck) e adicionou-se meio RPMI 1640 para a obtenção de várias concentrações (100 µM, 50 µM, 25 µM, 10 µM e 5 µM), sendo que a concentração final de DMSO não foi superior a 0,5%. Solubilizaram-se as amostras com o auxílio de um agitador de tubo, tipo Vortex (Biomixer, modelo QL-901). Preparou-se PZQ a 2 µM (Merck) nas mesmas condições, utilizando-o como controle positivo. Como

controle negativo, utilizou-se somente meio RPMI 1640, ou meio RPMI 1640 com DMSO a 0,5%.

### 3.3.4 Ensaios *in vitro* com vermes adultos de *Schistosoma mansoni*

Inicialmente, lavaram-se os vermes obtidos por perfusão 2 vezes com o meio RPMI 1640, contendo penicilina 200 UI/mL (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil) e estreptomicina 200 µg/mL (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil), realizando-se este procedimento em placa de Petri de polietileno estéril (90 mm x 15 mm). Posteriormente, transferiram-se os parasitos para placas de cultura de células com 24 poços contendo, por poço, 1 casal de vermes em 2 mL do meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil) e tamponado com HEPES 25 mM (Sigma-Aldrich). Então, adicionaram-se os compostos a serem testados, em diversas concentrações, a cada grupo de parasitos. Então, incubaram-se os parasitos em contato com os compostos em estufa (Thermo Scientific 8000 WJ, CA, EUA) a 37 °C e atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%. Para cada grupo experimental, utilizou-se um grupo controle negativo (casais de parasitos cultivados somente em meio RPMI 1640 ou meio RPMI 1640 com DMSO a 0,5%) e um grupo controle positivo (PZQ a 2 µM) (DE MORAES et al., 2013A; DE MORAES et al., 2013B; DE MORAES et al., 2013C; DE MORAES et al., 2011A; DE MORAES et al., 2012; DE MORAES et al., 2011B).

Monitoraram-se diariamente, por 3 dias, as culturas de vermes adultos com o auxílio de um estereomicroscópio, avaliando-se a mortalidade, julgada pela ausência de movimentos do parasito durante 2 minutos ou pelo toque de uma pinça, bem como a redução da atividade motora (moderada e significativa) do *S. mansoni*. Ao término do período de incubação (3 dias) ou ocorrência de morte, fixaram-se os parasitos em solução AFA (ácido acético glacial/formaldeído/etanol/água destilada 2:9:30:59), para a necessidade de eventuais análises (DE MORAES et al., 2011A; DE MORAES et al., 2012; DE MORAES et al., 2011B).

## 3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA *IN VITRO* FRENTE À ENZIMA SmATPDASE1

Realizou-se esta avaliação no Laboratório de Estudo de Estrutura e Função de Proteínas, localizado no Departamento de Bioquímica do ICB da UFJF, sob a colaboração e supervisão da Profa. Dra. Priscila de Faria Pinto. Nestes ensaios, utilizaram-se vermes adultos de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, pertencentes à linhagem BH (Belo Horizonte, MG),

gentilmente cedidos pelo Núcleo de Enteroparasitas do IAL, com a colaboração do Prof. Dr. Josué de Moraes e do Prof. Dr. Pedro Luiz Silva Pinto.

Primeiramente, preparou-se o homogeneizado total dos vermes adultos de *S. mansoni*, o qual contém a enzima SmATPDase1, seguindo-se metodologia previamente descrita por Colley e colaboradores (1977). Inicialmente, suspenderam-se os parasitos em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), contendo 8% de sacarose e inibidores de proteases (Sigma; leupeptina 0,5 µg/mL, pepstatina 0,07 µg/mL, inibidor de tripsina 50 µg/mL e fluoreto de fenilmetilsufonil 2 µg/mL). Logo após, submeteram-se os mesmos à trituração mecânica com o auxílio de um *Potter-Elvehjem* e, em seguida, a quatro ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido, colocando-os a cada ciclo em banho de ultrassom (Ultrasonic Cleaner USC 700, Unique, Indaiatuba, SP) por 10 minutos (4 x 10 = 40 minutos no ultrassom) (COLLEY et al., 1977).

Posteriormente, centrifugou-se o homogeneizado total a 1500 rpm por 10 minutos (Microcentrífuga Revan 14000 D, Cientec, Piracicaba, SP), recolheu-se o sobrenadante e determinou-se seu conteúdo proteico (LOWRY et al., 1951).

Então, incubou-se uma alíquota deste sobrenadante (0,05 mg de proteína/mL) juntamente com os compostos sob avaliação (solubilizados em DMSO e diluídos a diversas concentrações em H<sub>2</sub>O) em um meio de reação padrão contendo tampão MOPS 50 mM (ácido 3-(N-morfolino)-propanossulfônico), ouabaína 1 mM, azida 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, NaCl 150 mM, KCl 5mM, a 37 °C por 1 hora. Como controle, incubou-se o sobrenadante com o meio de reação na presença e ausência de DMSO. Para o ensaio de atividade hidrolítica, adicionou-se 3 mM do substrato ATP ou ADP ao meio, incubou-se a 37 °C por mais 1 hora e interrompeu-se a reação pela adição de HCl 0,1 N. Por último, determinou-se a hidrólise de ATP ou ADP (utilizada como parâmetro de inibição da enzima) por meio da quantificação espectrofotométrica de fosfato inorgânico liberado no meio (TAUSSKY; SHORR; KURZMANN, 1953).

### 3.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* FRENTE A MACRÓFAGOS MURINOS DA LINHAGEM CELULAR RAW 264.7

Executou-se esta etapa no Laboratório de Imunologia do ICB da UFJF, sob a colaboração e supervisão do Prof. Dr. Gilson Costa Macedo.

Avaliou-se a citotoxicidade dos compostos através do método colorimétrico de redução do brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), no qual

quantifica-se a formação de formazan, composto de coloração roxa, por meio da ação de enzimas desidrogenases mitocondriais. Devido à importância da atividade mitocondrial para a viabilidade celular, associa-se indiretamente a ausência destas enzimas à citotoxicidade induzida por diversos fatores, como pela ação de compostos exógenos (MOSMANN, 1983; RISS et al., 2013).

Deste modo, cultivaram-se macrófagos murinos (palavra que se refere a ratos) da linhagem celular RAW 264.7 em garrafas até atingirem a confluência necessária, removendo-as posteriormente. Em seguida, contaram-se estas células em câmara de Neubauer, utilizando-se o corante Azul de Tripán (Sigma), transferindo-as depois para placas de 96 poços de fundo chato, na concentração de  $2 \times 10^5$  células por poço, sendo esta concentração adaptada da literatura (HUO et al., 2012). Então, incubaram-se estas células por 24 horas antes da realização dos passos seguintes.

Como próximo passo, removeu-se o meio de cultura presente com células mortas e adicionou-se 200  $\mu$ L de meio de cultura suplementando (2% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico) contendo os compostos a serem testados na concentração de 100  $\mu$ M. Utilizaram-se como controles o meio de cultura e o solvente utilizado no preparo dos compostos, no caso o DMSO a 0,5%.

Após 48 horas de incubação, removeu-se o sobrenadante e adicionou-se uma solução de meio de cultura contendo 10% (v/v) do reagente MTT (5 mg/mL, Invitrogen), com o volume final de 100  $\mu$ L/poço. Incubou-se a placa por um período de 2 horas e 30 minutos em estufa incubadora a 37 °C, com atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%. Ao final deste intervalo, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o cristal de formazan em DMSO, realizando-se a leitura em espectrofotômetro (SpectraMax M2, Molecular Devices, CA, EUA) a 595 nm. Realizaram-se estes ensaios em duplicata.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 PLANEJAMENTO MOLECULAR

#### 4.1.1 *Docking* molecular com a enzima SmATPDase1

Tendo por base a inibição da atividade ATPásica promovida pela cardamonina, pela chalcona **LS1** e pelas auronas **LS6** e **LS23** sobre o tegumento do *S. mansoni* (página 39), nosso grupo de pesquisas realizou estudo de *docking* molecular com estes compostos utilizando-se a enzima SmATPDase1 como modelo de alvo, de modo a se conhecerem os requisitos estruturais essenciais para a inibição da mesma.

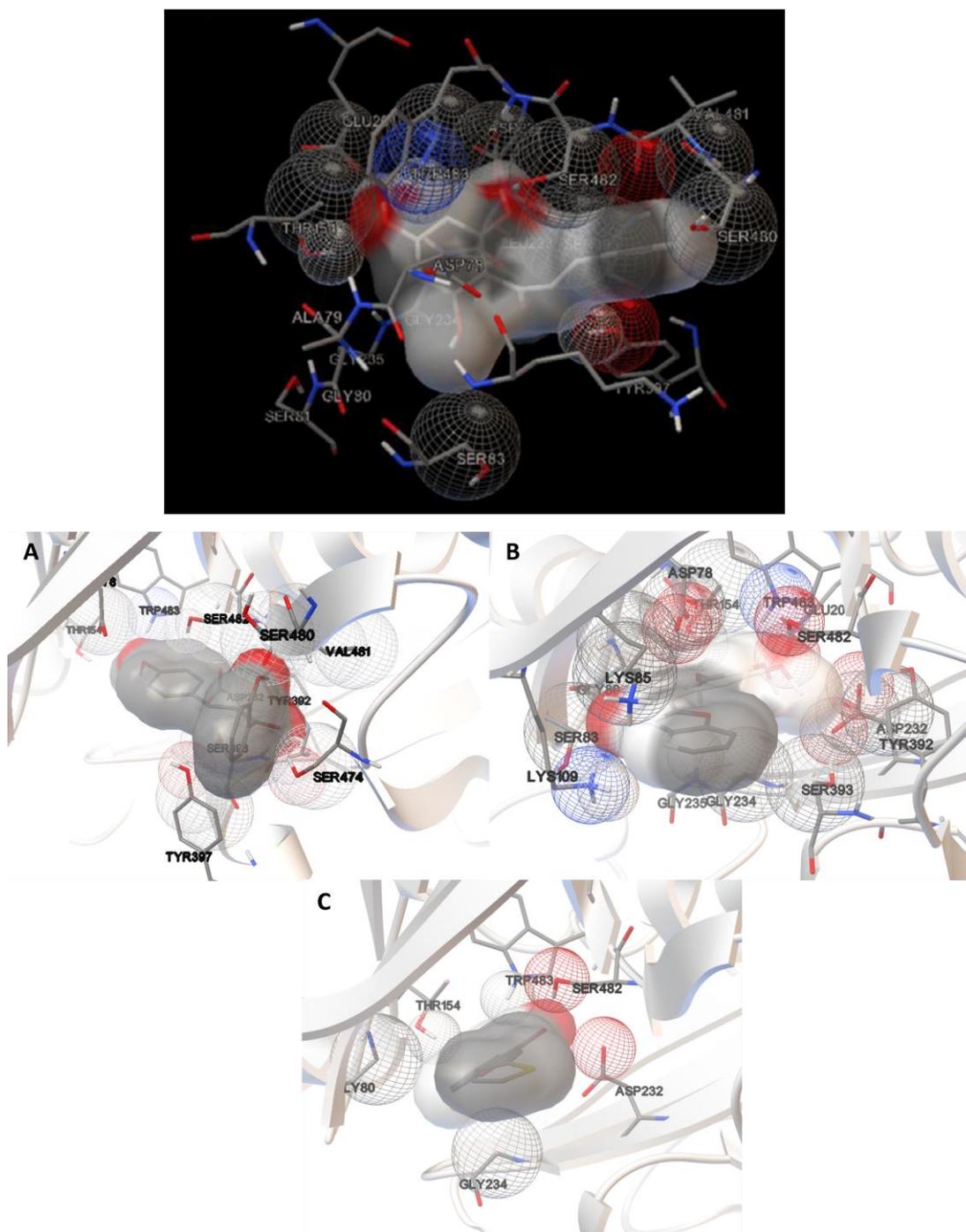
Com relação à cardamonina, observou-se a importância da presença de grupos polares contendo átomos de oxigênio (C=O, OH, OCH<sub>3</sub>) para a realização de ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos Glu201, Asp232 e Tyr397, bem como para a interação iônica com o resíduo Trp483 no domínio de ligação nucleotídica (sítio de ligação do ATP e ADP) da SmATPDase1. Também ocorrem interações de Van der Waals com os resíduos Asp78, Ala79, Gly80, Ser81, Ser83, Lys85, Glu201, Asp232, Leu233, Phe234 e Gly235 (**Figura 14**) (DE CASTRO et al., 2015).

Para os outros compostos, observaram-se padrões semelhantes. No domínio de ligação nucleotídica da SmATPDase1, ocorrem interações por meio de ligações de hidrogênio entre a chalcona **LS1** e os resíduos de aminoácidos Ser239, Ser474 e Trp483, entre a aurona **LS6** e os resíduos Asp78, Glu201, Thr154 e Ser482, e entre a aurona **LS23** e os resíduos Asp232 e Glu482. Além disso, há interações de van der Waals destes compostos com vários outros resíduos de aminoácidos (**Figura 14**) (Dados ainda não publicados).

Além disso, através destes estudos, concluiu-se que o domínio de ligação nucleotídica da enzima (sítio de ligação do ATP e ADP) é realmente o local onde ocorrem interações com as chalconas e auronas, uma vez que obtiveram-se valores negativos de energia livre ( $\Delta G$ ) nestas análises, evidenciando que este é um processo espontâneo e estável (DE CASTRO et al., 2015).

Assim, estas informações são de grande relevância para o planejamento molecular de novas moléculas inibidoras da SmATPDase1 e, por conseguinte, com potencial atividade esquistossomicida.

**Figura 14** – *Docking* molecular da cardamonina, da chalcona **LS1** e das auronas **LS6** e **LS23** com a SmATPDase1



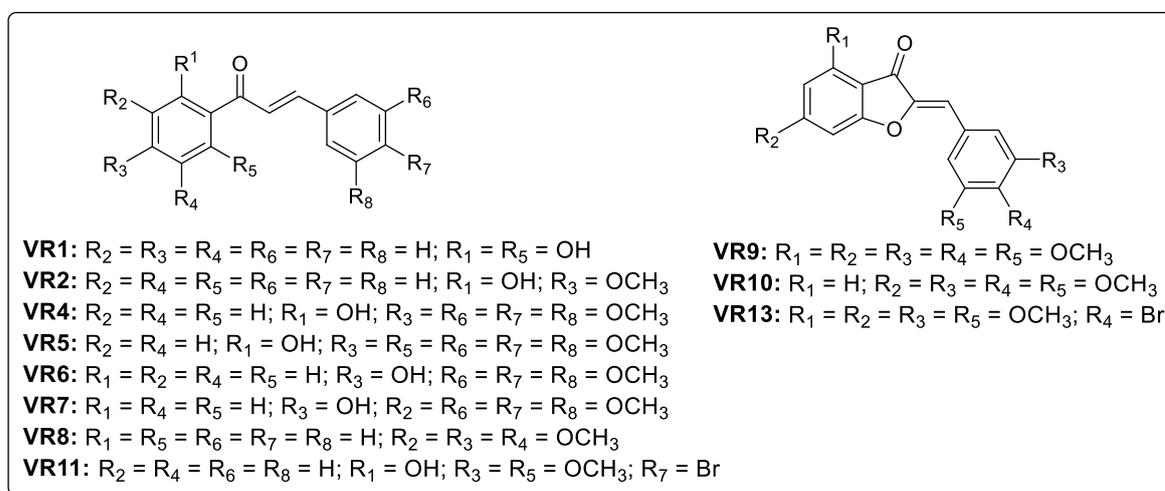
Conformações de menor energia da cardamonina (fundo preto), da chalcona **LS1** (A) e das auronas **LS6** (B) e **LS23** (C) interagindo com resíduos de aminoácidos no domínio de ligação nucleotídica (sítio de ligação do ATP e ADP) da SmATPDase1. Representou-se a superfície dos compostos em cinza para superfície apolar e em vermelho para superfície polar negativa. As esferas representam as interações com a SmATPDase1: esferas azuis para interações polares positivas, esferas vermelhas para interações polares negativas e esferas cinzas para interações hidrofóbicas. Os resíduos de aminoácidos estão coloridos no padrão CPK. Fonte: DE CASTRO et al., 2015 e dados ainda não publicados.

Logo, a partir das informações anteriores, buscaram-se nas bases de dados virtuais PubChem, ChemSpider e SciFinder as estruturas de aproximadamente 50 análogos de chalconas e auronas com características estruturais que proporcionassem modos de interação com a enzima SmATPDase1 similares aos observados para a cardamonina, para a chalcona **LS1** e para as auronas **LS6** e **LS23**. Em seguida, realizaram-se simulações de *docking* molecular com estes compostos.

A princípio, avaliaram-se as interações de várias conformações dos ligantes com a SmATPDase1, aplicando-se o Algoritmo Genético Lamarckiano. Baseando-se nos princípios da teoria da evolução e seleção natural, este algoritmo realiza uma seleção estocástica das conformações dos ligantes que melhor interagem com o alvo. O próximo passo consistiu na predição das energias associadas às interações entre as conformações e a enzima. A variação na energia durante a formação de complexos ligante-receptor é comumente fornecida em termos da energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) e a predição desta ocorre ao se avaliar os diversos fenômenos físico-químicos que ocorrem nestas interações (MORRIS et al., 1998). Então, obteve-se um ranqueamento das respectivas energias livres de ligação dos compostos com a enzima.

Dentre todos os compostos analisados, 11 análogos (**VR1**, **VR2**, **VR4**, **VR5**, **VR6**, **VR7**, **VR8**, **VR9**, **VR10**, **VR11** e **VR13**) (**Figura 15**) apresentaram os melhores perfis de energia livre durante a interação com a SmATPDase1, demonstrando grande estabilidade na formação do complexo ligante-enzima. Estes valores foram similares aos exibidos pelos compostos analisados acima (cardamonina, **LS1**, **LS6** e **LS23**) como observa-se na **Tabela 6**.

**Figura 15** – Análogos de chalconas e auronas selecionados por *docking* molecular



Fonte: Elaborado pelo autor

**Tabela 6** – Energias de ligação dos análogos de chalconas e auronas com a enzima

SmATPDase1

<b>Compostos</b>	<b>Energia (kcal/mol)</b>
<b>VR1</b>	-7,00
<b>VR2</b>	-7,40
<b>VR4</b>	-7,40
<b>VR5</b>	-7,30
<b>VR6</b>	-7,20
<b>VR7</b>	-7,70
<b>VR8</b>	-7,20
<b>VR9</b>	-7,70
<b>VR10</b>	-7,90
<b>VR11</b>	-7,80
<b>VR13</b>	-7,00
<b>Cardamonina</b>	-7,20
<b>LS1</b>	- 6,37
<b>LS6</b>	- 6,08
<b>LS23</b>	- 7,10

Fonte: DE CASTRO et al., 2015 e dados ainda não publicados.

Morales-Camilo e colaboradores (2015) também utilizaram técnicas de *docking* molecular para simulação de chalconas e auronas como inibidoras seletivas da enzima monoamino oxidase B (MAO-B). Estas análises permitiram identificar características estruturais importantes para a racionalização dos resultados e também para a síntese de novas moléculas com maiores níveis de atividade e maior seletividade frente a esta enzima (MORALES-CAMILO et al., 2015).

Em outro estudo, Narsinghani, Sharma e Bhargav (2013) analisaram as interações de uma série de chalconas e auronas antioxidantes frente ao modelo virtual da enzima tirosinase de *Bacillus megaterium* por meio de *docking* molecular. Os resultados obtidos permitiram obter informações essenciais para a compreensão dos modos de ligação destes compostos à enzima, algo que pode ser utilizado para o planejamento molecular de novos inibidores da mesma (NARSINGHANI; SHARMA; BHARGAV, 2013).

Após a seleção dos compostos por meio de *docking* molecular, submeteram-se os mesmos à análise de suas propriedades ADME.

#### 4.1.2 Análise *in silico* de propriedades ADME

Como último passo do planejamento molecular, analisaram-se *in silico* as propriedades ADME dos compostos selecionados através do *docking*. Nenhum dos análogos violou qualquer parâmetro da regra dos 5 de Lipinski, ou seja, todos apresentaram peso molecular menor do que 500, log P menor do que 5, número de átomos aceptores de ligação de hidrogênio (HBA) menor do que 10 e de doadores de ligação de hidrogênio (HBD) menor do que 5 (LIPINSKI, 2000; LIPINSKI et al., 1997). Além disso, observaram-se valores de absorção oral teórica, acima de 88% para todos os compostos (ZHAO et al., 2002). Em comparação, o PZQ também não violou nenhum dos 5 parâmetros de Lipinski e apresentou 99% de absorção oral teórica (Tabela 7).

**Tabela 7** – Propriedades ADME dos análogos de chalconas e auronas

Compostos	Regra dos 5 de Lipinski					Absorção oral teórica	
	PM	log P	HBA	HBD	Violação	%ABS = 109 – (0,345 x TPSA)	
						TPSA (Å <sup>2</sup> )	(%)
<b>VR1</b>	240,26	2,98	3	2	Não	45,002	93
<b>VR2</b>	254,29	3,24	3	1	Não	34,719	97
<b>VR4</b>	344,36	2,86	6	1	Não	53,783	90
<b>VR5</b>	374,39	2,74	7	1	Não	57,959	88
<b>VR6</b>	314,34	2,99	5	1	Não	52,934	90
<b>VR7</b>	344,36	2,86	6	1	Não	59,113	88
<b>VR8</b>	298,34	3,38	4	0	Não	33,634	97
<b>VR9</b>	363,21	1,94	7	0	Não	53,628	90
<b>VR10</b>	372,37	2,06	6	0	Não	47,210	93
<b>VR11</b>	342,35	3,95	4	1	Não	39,136	95
<b>VR13</b>	361,19	3,14	4	0	Não	34,407	97
<b>PZQ</b>	312,41	0,91	4	0	Não	29,206	99

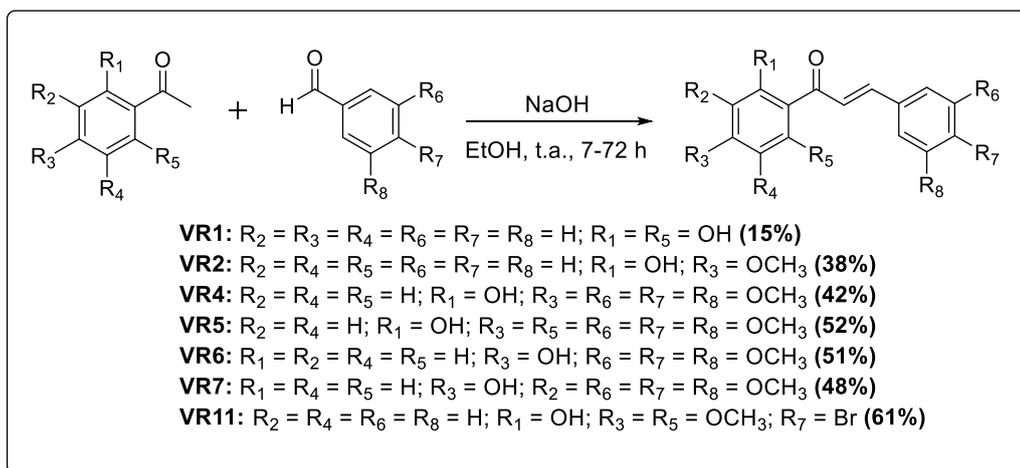
Estes resultados indicam que as moléculas possuem propriedades físico-químicas que as condicionam a serem aprovadas durante as etapas clínicas de pesquisa com novas drogas e, assim, tornarem-se futuros fármacos (LIPINSKI, 2000).

Por fim, uma vez selecionados os análogos de chalconas e auronas por meio do planejamento molecular realizado, a próxima etapa consistiu na síntese destes compostos.

## 4.2 ASPECTOS GERAIS DAS REAÇÕES DE SÍNTESE

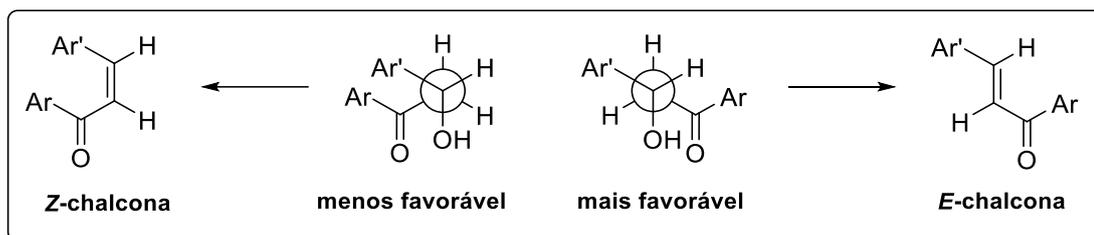
Iniciou-se esta etapa pela síntese das chalconas **VR1**, **VR2**, **VR4**, **VR5**, **VR6**, **VR7** e **VR11**, utilizando-se para isso a condensação de Claisen-Schmidt catalisada por base (**Esquema 6**). Esta reação representa um tipo especial de condensação aldólica mista, onde um composto carbonílico age exclusivamente como nucleófilo (acetofenona) e outro exclusivamente como eletrófilo (aldeído aromático), possibilitando a formação de ligação carbono-carbono com maior controle dos fatores regioquímicos e estereoquímicos (CAREY; SUNDBERG, 2007; CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012).

**Esquema 6** – Esquema de síntese para obtenção das chalconas **VR1**, **VR2**, **VR4**, **VR5**, **VR6**, **VR7** e **VR11**



Fonte: Elaborado pelo autor.

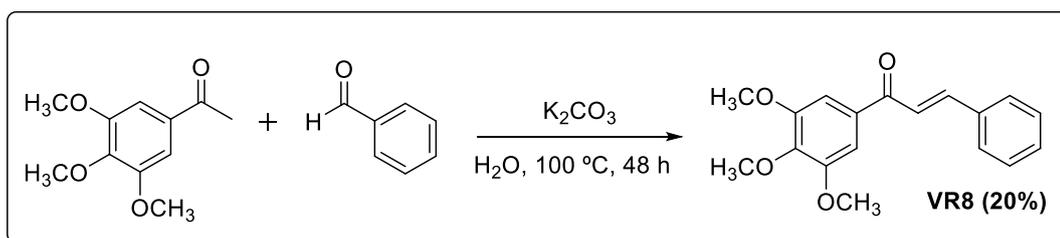
A primeira parte desta condensação envolve a desprotonação de um  $\alpha$ -hidrogênio da acetofenona e formação do íon enolato. Para isso, utilizou-se como catalisador um meio básico composto por excesso de base (solução aquosa de NaOH 4,0 mol/L), sendo este necessário para a ionização inicial de substituintes hidroxila no anel aromático das acetofenonas, sabidamente mais ácidos que  $\alpha$ -hidrogênios, bem como para a enolização propriamente dita. Então, a reação prossegue com o ataque nucleofílico do enolato à carbonila aldeídica, seguido da etapa de desidratação, sendo esta favorecida pela formação de um sistema altamente conjugado. Nesta última etapa, ocorre uma estereosseletividade para a configuração *E* das chalconas, devido a interações espaciais entre seus anéis aromáticos (CAREY; SUNDBERG, 2007; KLEIN, 2015) (**Figura 16**).

**Figura 16** – Estereosseletividade das chalconas para a configuração *E*

Fonte: Adaptado de CAREY; SUNDBERG, 2007.

Assim sendo, as reações ocorreram em tempos variáveis de 7 a 72 horas. Após o término da reação, promoveu-se a acidificação do meio com HCl 1,0 mol/L até pH = 7, observando-se a precipitação da chalcona e consequente mudança da coloração do sistema de laranja para amarelo. Os próximos passos consistiram na purificação das chalconas. Assim, realizou-se a extração das mesmas com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O, secou-se a fase orgânica com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrou-se e, em seguida, evaporou-se o solvente em rotaevaporador. Por fim, recristalizaram-se os sólidos resultantes com EtOH, obtendo-se as chalconas como sólidos cristalinos amarelos com rendimentos de 15% a 61%.

Para a síntese da chalcona **VR8**, utilizou-se primeiramente a metodologia com NaOH como base, entretanto não houve formação do produto. O mesmo ocorreu com bases mais fortes, como metóxido e etóxido de sódio, ou com a realização destas reações sob atmosfera de N<sub>2</sub>.

**Esquema 7** – Esquema de síntese para obtenção da chalcona **VR8**

Fonte: Elaborado pelo autor.

Contrariamente, para Bonesi e colaboradores (2010) a condensação de Claisen-Schmidt catalisada por base (solução de NaOH 50% m/v) sob atmosfera de argônio foi efetiva, permitindo obter uma série de chalconas derivadas da 3,4,5-trimetoxiacetofenona com altos rendimentos. Porém, como relatado acima, não foi possível aplicar a catálise básica,

mesmo utilizando-se atmosfera similar à empregada no caso anterior. Desta forma, buscaram-se novas metodologias.

Assim, conseguiu-se sintetizar a chalcona **VR8** seguindo-se metodologia que utiliza  $K_2CO_3$  como base e água como solvente à temperatura de 100 °C (REZENDE; PIZARRO; MILLÁN, 2007). Neste tipo de reação, há condições que promovem um maior controle termodinâmico do sistema, como a utilização de altas temperaturas, de solventes polares próticos e de quantidades estequiométricas de uma base mais fraca (CAREY; SUNDBERG, 2007). Deste modo, obteve-se esta chalcona como um sólido cristalino amarelo, após 48 h de reação e com 20% de rendimento.

Realizaram-se também tentativas de aumentar o rendimento da chalcona **VR1**. Para isso, primeiramente adicionaram-se diferentes proporções da 2,6-diidroxiacetofenona e do benzaldeído ao meio reacional. Contudo, observou-se apenas um ligeiro aumento de 5% no rendimento final da reação, passando de 10% para 15% (**Tabela 8**).

**Tabela 8** – Utilização de diferentes proporções de 2,6-diidroxiacetofenona e benzaldeído para o aumento do rendimento da chalcona **VR1**

Condição	Proporção	Rendimento (%)
	2,6-diidroxiacetofenona : benzaldeído	
1	1 : 2	11
2	1 : 3	11
3	1 : 4	15
4	2 : 1	7

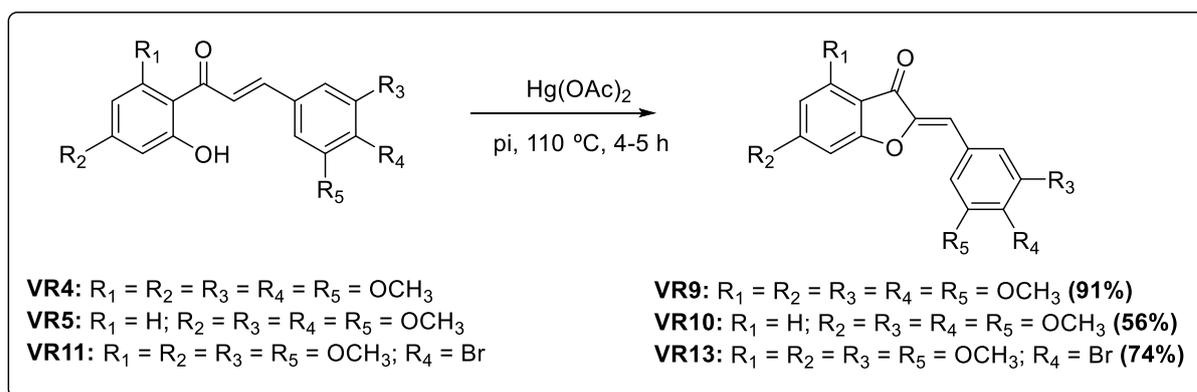
Posteriormente, tentaram-se outras metodologias, como as que utilizam catálise básica promovida por  $LiOH \cdot H_2O$  (BHAGAT et al., 2006) ou  $K_2CO_3/H_2O$  a 100 °C (REZENDE; PIZARRO; MILLÁN, 2007), a que usa catálise ácida promovida por  $SOCl_2/EtOH$  (HU et al., 2004), além das que substituem a agitação magnética na catálise básica pelo uso de ultrassom (PRASATH et al., 2015) ou pela ação mecânica com almofariz e pistilo sem o uso de solventes (PALLEROS, 2004). Em nenhuma destas tentativas houve aumento do rendimento inicial de 10% da chalcona **VR1** (**Tabela 9**).

**Tabela 9** –Metodologias utilizadas para o aumento do rendimento da chalcona **VR1**

Condição	Metodologia	Rendimento (%)
LiOH·H <sub>2</sub> O	(BHAGAT et al., 2006)	8
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O a 100 °C	(REZENDE; PIZARRO; MILLÁN, 2007)	10
SOCl <sub>2</sub> /EtOH	(HU et al., 2004)	6
Agitação por ultrassom	(PRASATH et al., 2015)	9
Ação mecânica com almofariz e pistilo sem o uso de solventes	(PALLEROS, 2004)	8

Para a síntese das auronas **VR9**, **VR10** e **VR13**, submetem-se respectivamente as chalconas **VR4**, **VR5** e **VR11** à ciclização utilizando-se Hg(OAc)<sub>2</sub> em piridina sob aquecimento a 110 °C (**Esquema 8**).

Atualmente, vários estudos aplicam esta metodologia para a síntese de auronas, obtendo-as como produto único em tempos relativamente curtos de reação e com bons rendimentos (DETSI et al., 2009; ELHADJI et al., 2015; MORALES-CAMILO et al., 2015; TIWARI et al., 2011).

**Esquema 8** – Esquema de síntese para a obtenção das auronas **VR9**, **VR10** e **VR13**

Fonte: Elaborado pelo autor.

Como primeiro passo, solubilizou-se o Hg(OAc)<sub>2</sub> em piridina. Alternativamente, Khan e Asad Mueed (2004) usaram DMSO como solvente, sem que houvesse prejuízo da reação (KHAN; ASAD MUEED, 2004).

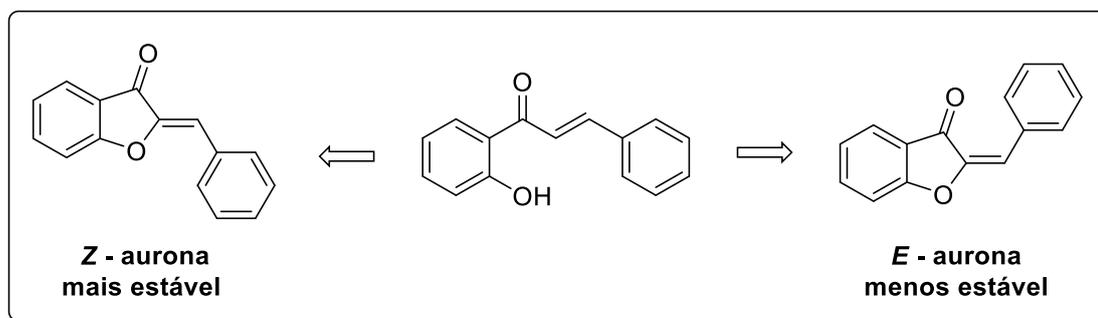
Posteriormente, adicionou-se a chalcona correspondente à aurona desejada e submeteu-se o sistema à agitação magnética sob aquecimento a 110 °C. Segundo Agrawal e

Soni (2006), o aquecimento do sistema e a utilização de quantidades equimolares de  $\text{Hg}(\text{OAc})_2$  são essenciais para o sucesso da reação, não ocorrendo nenhuma alteração nas chalconas quando estas condições não são seguidas. Ainda, os autores realizaram a síntese de auronas com quantidades catalíticas de  $\text{CuBr}_2$  em DMSO sob aquecimento e obtiveram rendimentos similares, porém em tempos maiores de reação (AGRAWAL; SONI, 2006). Ameta e colaboradores (2012) também utilizaram  $\text{CuBr}_2$ , contudo substituíram o DMSO por uma mistura de DMF/ $\text{H}_2\text{O}$  4:1, submetendo o sistema ao aquecimento. Neste caso, as reações ocorreram em tempos maiores e com rendimentos inferiores aos conseguidos quando utiliza-se  $\text{Hg}(\text{OAc})_2$  em piridina ou  $\text{CuBr}_2$  em DMSO (AMETA et al., 2012).

Além disso, Tiwari e colaboradores (2011) relataram a importância da base para a ciclização das 2-hidroxicalconas com  $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ . Ainda, houve aumento considerável na velocidade da reação com a utilização de uma base forte (TIWARI et al., 2011).

Geralmente, a síntese de auronas leva à formação estereosseletiva do isômero *Z*, mais termodinamicamente estável (**Figura 17**). Estudos comprovam tal afirmação não só por meio de evidências espectroscópicas, mas também através de estudos cristalográficos (SIM et al., 2008; ZHANG et al., 2012).

**Figura 17** – Estereosseletividade das auronas para a configuração *Z*



Fonte: Elaborado pelo autor.

Por fim, as reações ocorreram em tempos variáveis de 4 a 5 horas. Logo após o término destas, promoveu-se a acidificação do meio com  $\text{HCl}$  1,0 mol/L. Em seguida, realizou-se uma extração com  $\text{AcOEt}/\text{H}_2\text{O}$ , secou-se a fase orgânica com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrou-se e evaporou-se o solvente em rotaevaporador. Então, recrystalizaram-se os sólidos com  $\text{MeOH}/\text{AcOEt}$ , obtendo-se as auronas **VR9**, **VR10** e **VR13** como sólidos cristalinos amarelos, com rendimentos de 74% a 91%.

### 4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS CHALCONAS E AURONAS

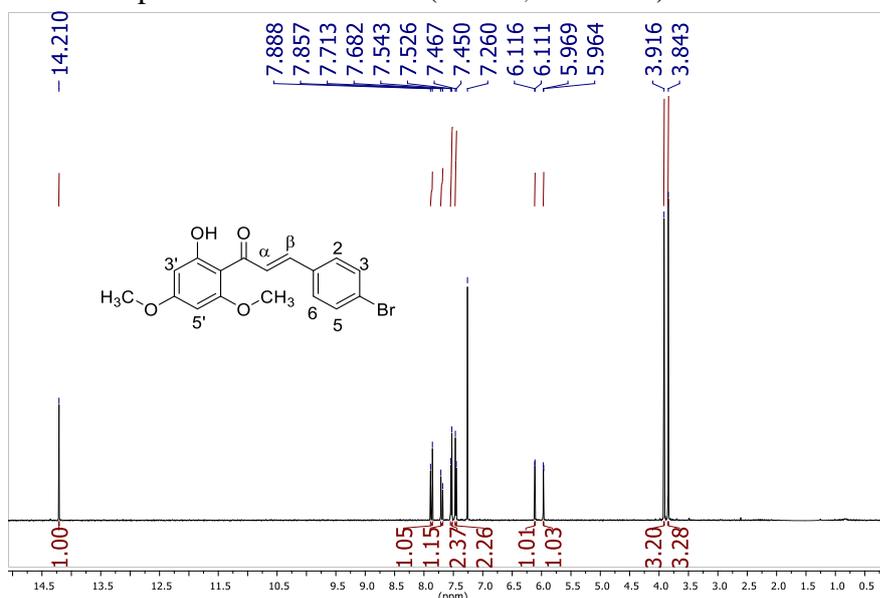
#### 4.3.1 Caracterização da chalcona VR11

Inicialmente, salienta-se que as atribuições nas estruturas químicas dos compostos deste trabalho aplicam-se apenas de forma didática e não correspondem às regras da IUPAC.

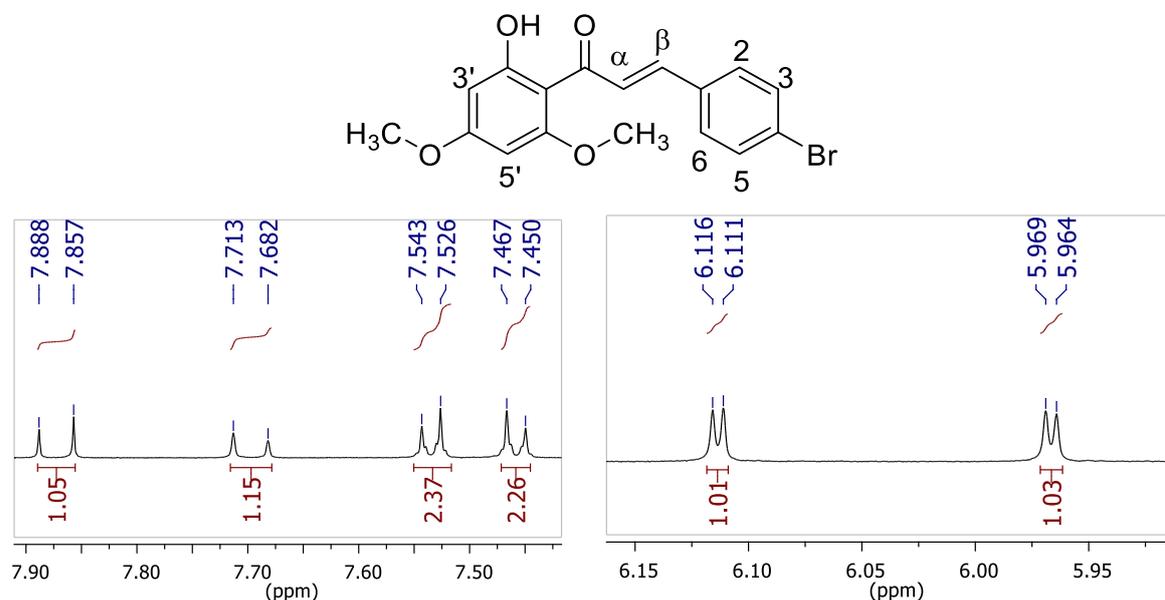
Como modelo para a caracterização das chalconas, escolheu-se aleatoriamente a chalcona **VR11**. Obteve-se esta chalcona como um sólido cristalino amarelo, após 24 horas de reação, com 61% de rendimento e faixa de fusão experimental de 150 °C a 152 °C, sendo esta similar à descrita na literatura, 150 °C a 151 °C (BOECK et al., 2005).

Através da análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 18**) e de sua expansão (**Figura 19**), inferiu-se a formação desta chalcona pelo aparecimento de um duplete (1H,  $J_{\alpha,\beta} = 15,6$  Hz) centrado em  $\delta$  7,70, referente ao hidrogênio  $\alpha$ , e outro duplete (1H,  $J_{\beta,\alpha} = 15,6$  Hz) centrado em  $\delta$  7,88, referente ao hidrogênio  $\beta$ . Através do valor desta constante de acoplamento, confirmou-se a configuração *E* para as chalconas (PAVIA et al., 2015). Além disso, observaram-se dois simpletos, em  $\delta$  3,84 (3H) e  $\delta$  3,92 (3H), referentes aos hidrogênios dos grupos metoxila, dois dupletos centrados em  $\delta$  5,96 (1H,  $J = 2,4$  Hz) e  $\delta$  6,11 (1H,  $J = 2,4$  Hz), atribuídos aos hidrogênios 3' e 5', outros dois dupletos centrados em  $\delta$  7,46 (2H,  $J = 8,5$  Hz) e  $\delta$  7,53 (2H,  $J = 8,5$  Hz), correspondentes respectivamente aos pares de hidrogênios 3/5 e 2/6, bem como um simpleto em  $\delta$  7,46 (1H), referente ao hidrogênio da hidroxila fenólica.

**Figura 18** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) da chalcona **VR11**



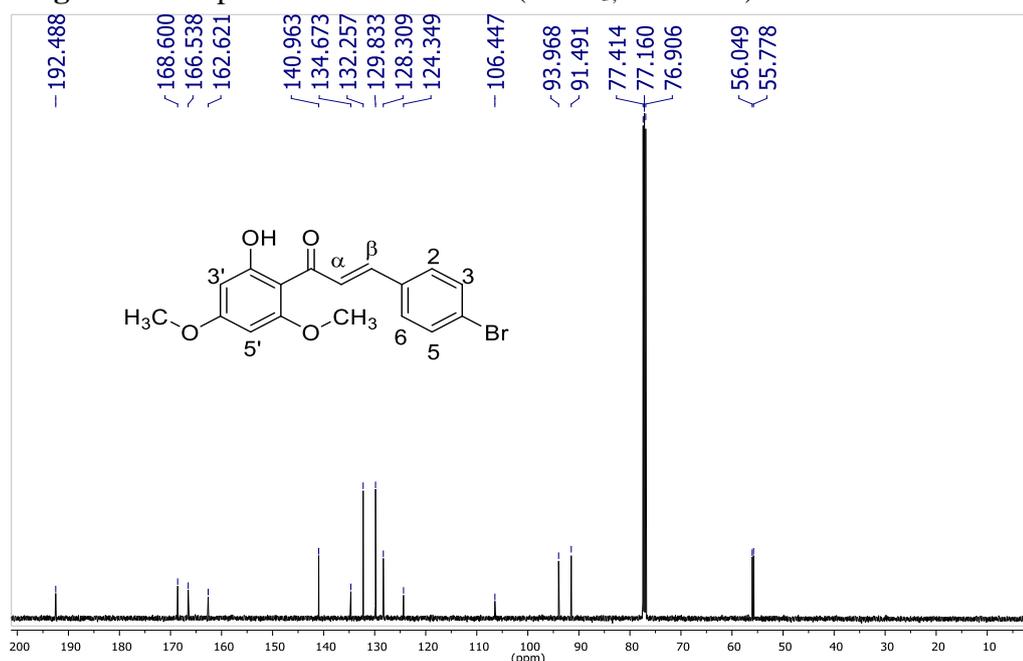
**Figura 19** – Expansão da região dos hidrogênios aromáticos e olefínicos do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) da chalcona **VR11**



Fonte: Elaborado pelo autor.

Com relação ao espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Figura 20**), observaram-se sinais em  $\delta$  55,78 e  $\delta$  56,05, referentes aos carbonos dos grupos metoxila, sinais entre  $\delta$  91,49 e  $\delta$  168,60, correspondentes aos carbonos aromáticos e olefínicos, e um sinal em  $\delta$  192,49, referente ao carbono do grupo carbonila.

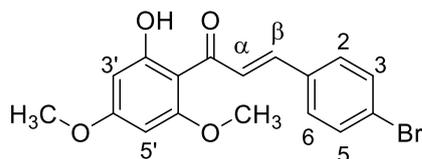
**Figura 20** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) da chalcona **VR11**



Fonte: Elaborado pelo autor.

A comparação destes dados com os da literatura (**Tabela 10**) também permitiu concluir que o produto obtido se trata da chalcona **VR11**.

**Tabela 10** – Comparação dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) da chalcona **VR11** com os da literatura



RMN de $^1\text{H}$ - $\delta_{\text{H}}$ em ppm, multiplicidade, $J$ em Hz		
Atribuições	VR11 ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)	Literatura (BOECK et al., 2005) ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)
$\text{OCH}_3$	3,84, s e 3,92, s	3,84, s e 3,91, s
H-3'	5,96, d, $J = 2,4$	5,96, d, $J = 2,2$
H-5'	6,11, d, $J = 2,4$	6,11, d, $J = 2,2$
H-3 e H-5	7,46, d, $J = 8,5$	7,47 – 7,51, m
H-2 e H-6	7,53, d, $J = 8,5$	7,47 – 7,51, m
H- $\alpha$	7,70, d, $J = 15,6$	7,68, d, $J = 15,51$
H- $\beta$	7,88, d, $J = 15,6$	7,87, d, $J = 15,51$
OH	14,21, s	*

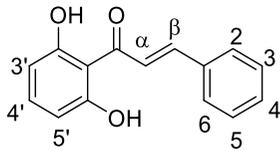
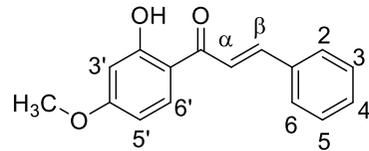
  

RMN de $^{13}\text{C}$ - $\delta_{\text{C}}$ em ppm		
Atribuições	VR11 ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)	Literatura (BOECK et al., 2005) ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)
$\text{OCH}_3$	55,78 e 56,05	56,30 e 56,57
C- $\alpha$ , C- $\beta$ e C-Ar	91,49 – 168,60	92,03 – 169,13
C=O	192,49	193,0

\*Não atribuído pela fonte citada.

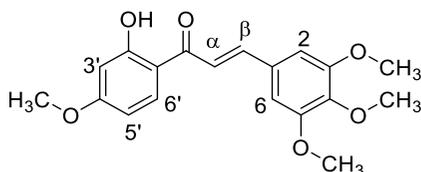
Por tratarem-se de análogos estruturais da chalcona **VR11**, apresentam-se na **Tabela 11** os dados referentes à caracterização desta e das chalconas **VR1**, **VR2**, **VR4**, **VR5**, **VR6**, **VR7** e **VR8**. Seus respectivos espectros encontram-se no apêndice A deste documento.

Tabela 11 – Dados de caracterização das chalconas VR1, VR2, VR4, VR5, VR6, VR7, VR8 e VR11

Chalconas		
<b>Dados de caracterização</b>	<p><b>VR1</b></p>  <p><b>(E)-1-(2',6'-diidroxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona</b>  <math>C_{15}H_{12}O_3</math>            Massa molar: 240,26 g/mol</p>	<p><b>VR2</b></p>  <p><b>(E)-1-(2'-hidroxi-4'-metoxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona</b>  <math>C_{16}H_{14}O_3</math>            Massa molar: 254,29 g/mol</p>
	<b>Tempo de reação e rendimento</b>	72 horas; 15%
<b>Aspecto físico</b>	Sólido cristalino amarelo	Sólido cristalino amarelo
<b>Faixa de fusão experimental e da literatura</b>	Experimental: 170 °C – 172 °C Literatura: 169 °C – 172 °C (MILES; MAIN; NICHOLSON, 1989)	Experimental: 106 °C – 107 °C Literatura: 107 °C – 108 °C (OHKATSU; SATOH, 2008)
<b>RMN de <math>^1H</math> (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)</b>	7,04 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz, H-3' e H-5'); 7,43 – 7,46 (m, 3H, H-3, H-5 e H-4'); 7,51 (t, 1H, $J = 8,6$ Hz, H-4); 7,66 – 7,69 (m, 3H, H-2, H-6 e H- $\alpha$ ); 7,93 (d, 1H, $J_{\beta,\alpha} = 15,5$ Hz, H- $\beta$ ); 12,81 (s, 2H, OH)	3,87 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ); 6,48 – 6,51 (m, 2H, H-3' e H-5'); 7,43 -7,44 (m, 3H, H-3, H-5 e H-4); 7,49 (d, 1H, $J_{\alpha,\beta} = 15,5$ Hz, H- $\alpha$ ); 7,65 – 7,67 (m, 2H, H-2 e H-6); 7,84 (d, 1H, $J_{6',5'} = 8,6$ Hz, H-6'); 7,89 (d, 1H, $J_{\beta,\alpha} = 15,5$ Hz, H- $\beta$ ); 13,44 (s, 1H, OH)
<b>RMN de <math>^{13}C</math> (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)</b>	118,81 – 163,76 (C- $\alpha$ , C- $\beta$ e Ar); 193,91 (C=O)	55,63 (OCH <sub>3</sub> ); 101,10 – 166,75 (C- $\alpha$ , C- $\beta$ e Ar); 191,88 (C=O)
<b><math>\delta</math> (ppm)</b>		

## Chalconas

VR4

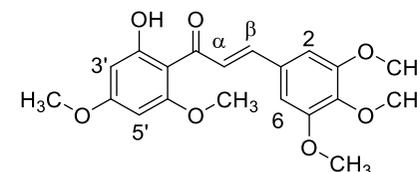


(*E*)-1-(2'-hidroxi-4'-metoxifenil)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona

$C_{19}H_{20}O_6$

Massa molar: 344,36 g/mol

VR5



(*E*)-1-(2'-hidroxi-4',6'-dimetoxifenil)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona

$C_{20}H_{22}O_7$

Massa molar: 374,39 g/mol

Tempo de reação e rendimento

24 horas; 42%

7 horas; 52%

Aspecto físico

Sólido cristalino amarelo

Sólido cristalino amarelo

Faixa de fusão

Experimental: 129 °C – 131 °C

Experimental: 181 °C – 182 °C

experimental e da literatura

Literatura: 131 °C – 133 °C (DUCKI et al., 2009)

Literatura: 181 °C – 182 °C (MATEEVA; KODE; REDDA, 2002)

RMN de  $^1H$   
( $CDCl_3$ , 500 MHz)  
 $\delta$  (ppm)

3,86 (s, 3H,  $OCH_3$ ); 3,91 (s, 3H,  $OCH_3$ ); 3,93 (s, 6H,  $OCH_3$ ); 3,84 (s, 3H,  $OCH_3$ ); 3,90 (s, 3H,  $OCH_3$ ); 3,91 (s, 9H,  $OCH_3$ ); 5,97 (d, 1H,  $J = 2,4$  Hz, H-3'); 6,48 – 6,51 (m, 2H, H-3' e H-5'); 6,87 (s, 2H, H-2 e H-6); 7,45 (d, 1H,  $J = 2,4$  Hz, H-5'); 6,84 (s, 1H,  $J_{\alpha,\beta} = 15,4$  Hz, H- $\alpha$ ); 7,81 (d, 1H,  $J_{\beta,\alpha} = 15,4$  Hz, H- $\beta$ ); 7,84 (d, 1H,  $J = 8,8$  Hz, H-6'); 13,47 (s, 1H, OH)

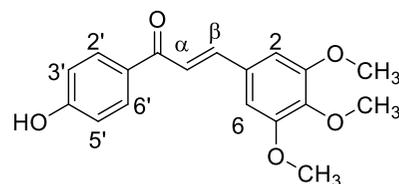
RMN de  $^{13}C$   
( $CDCl_3$ , 125 MHz)  
 $\delta$  (ppm)

55,76; 56,41; 61,18 (4 x  $OCH_3$ ); 101,20 – 166,88 (C- $\alpha$ , C- $\beta$  e Ar); 191,80 (C=O)

55,76; 55,96; 56,30; 61,16 (5 x  $OCH_3$ ); 91,49 – 168,58 (C- $\alpha$ , C- $\beta$  e Ar); 192,51 (C=O)

## Chalconas

VR6

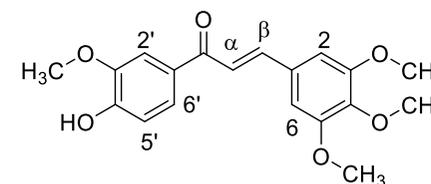


(*E*)-1-(4'-hidroxifenil)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona

$C_{18}H_{18}O_5$

Massa molar: 314,34 g/mol

VR7



(*E*)-1-(4'-hidroxi-3'-metoxifenil)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona

$C_{19}H_{20}O_6$

Massa molar: 344,36 g/mol

Tempo de reação e  
rendimento

48 horas; 51%

48 horas; 48%

Aspecto físico

Sólido cristalino amarelo

Sólido cristalino amarelo

Faixa de fusão

Experimental: 160 °C – 162 °C

Experimental: 187 °C – 189 °C

experimental e da  
literatura

Literatura: 163 - 164 °C (SARDA et al., 2009)

Literatura: 188 °C – 190 °C (DUCKI et al., 2009)

RMN de  $^1H$   
( $CDCl_3$ , 500 MHz)  
 $\delta$  (ppm)

3,90 (s, 3H,  $OCH_3$ ); 3,93 (s, 6H,  $OCH_3$ ); 6,12 (s, 1H, OH); 6,87 (s, 2H, H-2 e H-6); 7,0 (d, 2H,  $J = 7,7$  Hz, Ar); 7,42 (d, 1H,  $J_{\alpha,\beta} = 15,5$  Hz, H- $\alpha$ ); 7,63-7,66 (m, 2H, Ar); 7,72 (d, 1H,  $J_{\beta,\alpha} = 15,5$  Hz, H- $\beta$ )

3,90 (s, 3H,  $OCH_3$ ); 3,93 (s, 6H,  $OCH_3$ ); 3,99 (s, 3H,  $OCH_3$ ); 6,10 (s, 1H, OH); 6,87 (s, 2H, H-2 e H-6); 7,0 (d, 2H,  $J = 8,0$  Hz, Ar); 7,42 (d, 1H,  $J_{\alpha,\beta} = 15,5$  Hz, H- $\alpha$ ); 7,63-7,66 (m, 2H, Ar); 7,72 (d, 1H,  $J_{\beta,\alpha} = 15,5$  Hz, H- $\beta$ )

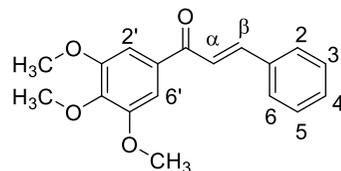
RMN de  $^{13}C$   
( $CDCl_3$ , 125 MHz)  
 $\delta$  (ppm)

56,39; 61,16 (3 x  $OCH_3$ ); 105,75 – 153,63 (C- $\alpha$ , C- $\beta$  e Ar); 188,65 (C=O)

56,32; 56,40; 61,17 (4 x  $OCH_3$ ); 105,75 – 153,64 (C- $\alpha$ , C- $\beta$  e Ar); 188,64 (C=O)

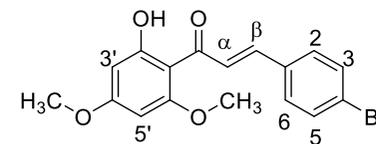
## Chalconas

## VR8

*(E)*-3-fenil-1-(3',4',5'-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona $C_{18}H_{18}O_4$ 

Massa molar: 298,34 g/mol

## VR11

*(E)*-3-(4-bromofenil)-1-(2'-hidroxi-4',6'-dimetoxifenil)prop-2-en-1-ona $C_{17}H_{15}BrO_4$ 

Massa molar: 363,21 g/mol

## Tempo de reação e rendimento

48 horas, 20%

24 horas, 61%

## Aspecto físico

Sólido cristalino amarelo

Sólido cristalino amarelo

## Faixa de fusão

Experimental: 85 °C – 86 °C

Experimental: 150 °C – 152 °C

## experimental e da literatura

Literatura: 87 °C – 88 °C (EDWARDS; STEMERICK;

Literatura: 150 °C – 151 °C (BOECK et al., 2005)

SUNKARA, 1990)

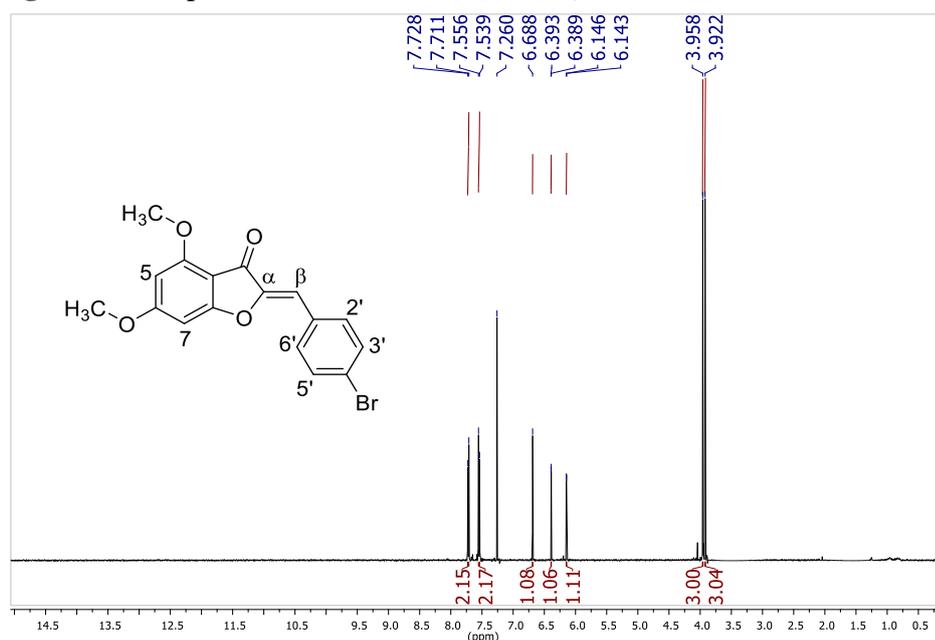
RMN de  $^1H$   
( $CDCl_3$ , 500 MHz)  
 $\delta$  (ppm)3,94 (s, 3H,  $OCH_3$ ); 3,96 (s, 6H,  $OCH_3$ ); 7,28 (s, 2H, H-2' e H-6'); 7,43-7,44 (m, 3H, H-3, H-4 e H-5); 7,49 (d, 1H,  $J_{\alpha,\beta} = 15,7$  Hz, H- $\alpha$ ); 7,65-7,67 (m, 2H, H-2 e H-6); 7,83 (d, 1H,  $J_{\beta,\alpha} = 15,7$  Hz, H- $\beta$ )3,84 (s, 3H,  $OCH_3$ ); 3,92 (s, 3H,  $OCH_3$ ); 5,96 (d, 1H,  $J = 2,4$  Hz, H-3'); 6,11 (d, 1H,  $J = 2,4$  Hz, H-5'); 7,46 (d, 2H,  $J = 8,5$  Hz, H-3 e H-5); 7,53 (d, 2H,  $J = 8,5$  Hz, H-2 e H-6); 7,70 (d, 1H,  $J_{\alpha,\beta} = 15,6$  Hz, H- $\alpha$ ); 7,88 (d, 1H,  $J_{\beta,\alpha} = 15,6$  Hz, H- $\beta$ ); 14,21 (s, 1H, OH)RMN de  $^{13}C$   
( $CDCl_3$ , 125 MHz)  
 $\delta$  (ppm)56,56; 61,15 (3 x  $OCH_3$ ); 106,26 – 153,32 (C- $\alpha$ , C- $\beta$  e Ar); 189,44 (C=O)55,78; 56,05; (2 x  $OCH_3$ ); 91,49 – 168,60 (C- $\alpha$ , C- $\beta$  e Ar); 192,49 (C=O)

### 4.3.2 Caracterização da aurona VR13

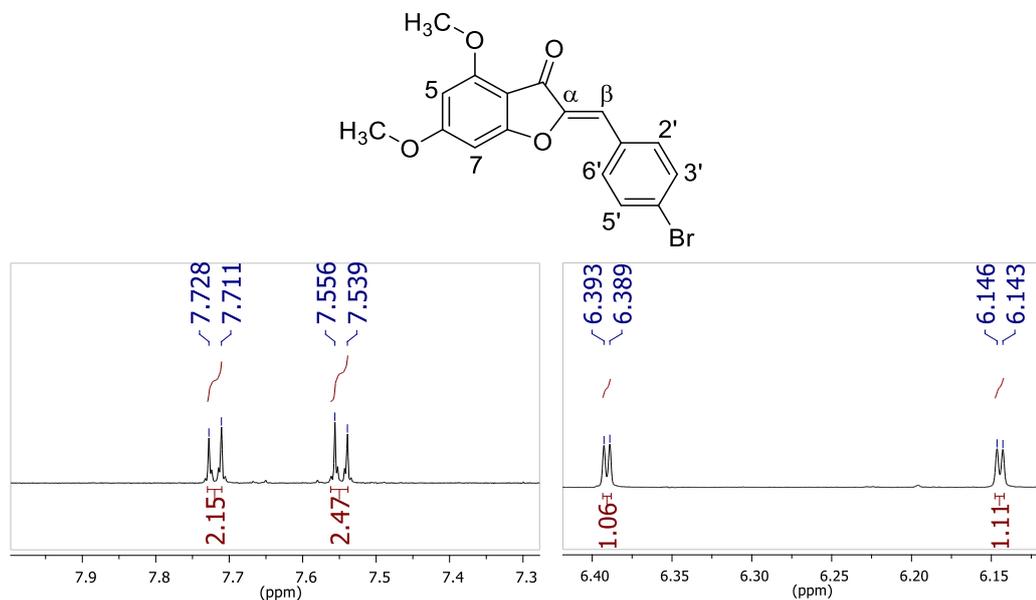
Como modelo de caracterização das auronas, selecionou-se de forma aleatória a aurona **VR13**. Obteve-se este composto como um sólido cristalino amarelo, após 5 horas de reação, com 74% de rendimento e faixa de fusão experimental de 170 °C a 171 °C, valor este próximo ao descrito na literatura, 171 °C – 172 °C (BOUMENDJEL; MARIOTTE; BENEY, 2001).

Analisando-se o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  deste composto (**Figura 21**), bem como de sua expansão (**Figura 22**), presumiu-se a formação da aurona **VR13** pela ausência do sinal referente à hidroxila fenólica e aparecimento de um simpleto em  $\delta$  6,69 (1H), referente ao hidrogênio olefínico H- $\beta$ . Este hidrogênio olefínico apresenta deslocamento químico próximo a  $\delta$  6,70 em auronas com configuração *Z* e superior a  $\delta$  7,00 em auronas com configuração *E* (HASTINGS; HELLER, 1972; SIM et al., 2008; VENKATESWARLU et al., 2007). Assim, com base no deslocamento químico deste hidrogênio ( $\delta$  6,69), confirmou-se a configuração *Z* para as auronas. Ainda, observaram-se dois simpletos em  $\delta$  3,92 (3H) e  $\delta$  3,96 (3H), referentes aos hidrogênios dos grupos metoxila, um duplete centrado em  $\delta$  6,39 (1H,  $J = 1,8$  Hz), correspondente ao hidrogênio H-7, além de outros dois dupletos centrados em  $\delta$  7,55 (2H,  $J = 8,6$  Hz) e  $\delta$  7,72 (2H,  $J = 8,6$  Hz), correspondentes respectivamente aos pares de hidrogênios quimicamente equivalentes 3'/5' e 2'/6'.

**Figura 21** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) da aurona **VR13**



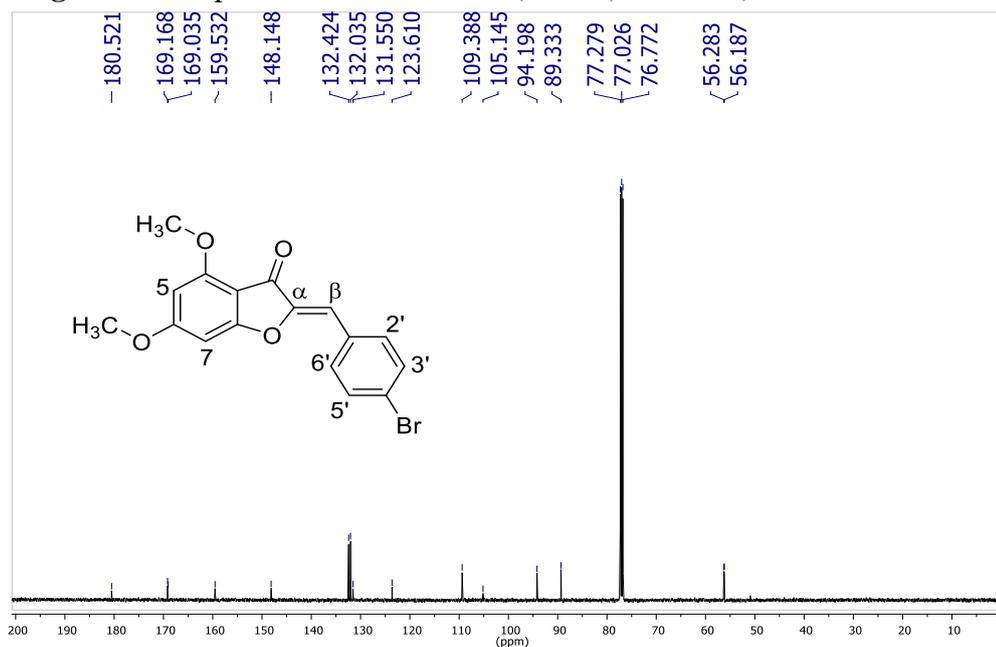
**Figura 22** – Expansão da região dos hidrogênios aromáticos e do hidrogênio olefínico do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) da aurona **VR13**



Fonte: Elaborado pelo autor.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  deste composto (**Figura 23**), observaram-se sinais em  $\delta$  56,19 e  $\delta$  56,28, referentes aos carbonos dos grupos metoxila, sinais entre  $\delta$  89,33 e  $\delta$  169,17, correspondentes aos carbonos aromáticos e olefínicos, além de um sinal em  $\delta$  180,52, referente ao carbono do grupo carbonila.

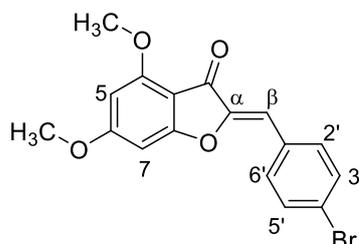
**Figura 23** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) da aurona **VR13**



Fonte: Elaborado pelo autor.

Além disso, por comparação destes dados com os da literatura (**Tabela 12**), inferiu-se que o produto obtido se trata da aurona **VR13**.

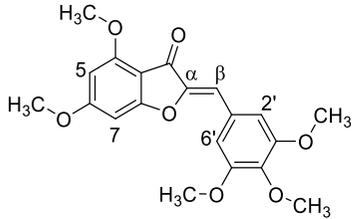
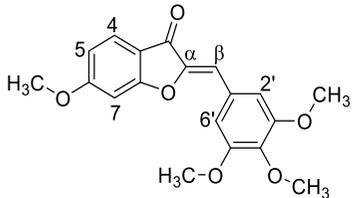
**Tabela 12**– Comparação dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) da aurona **VR13** com os da literatura



RMN de $^1\text{H}$ - $\delta_{\text{H}}$ em ppm, multiplicidade, $J$ em Hz			
Atribuições	VR13 ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)	Literatura (BOUMENDJEL; MARIOTTE; BENEY, 2001) ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)	Literatura (SOUARD et al., 2010) ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)
$\text{OCH}_3$	3,92, s e 3,96, s	3,92, s e 3,96, s	3,92, s e 3,96, s
H-5	6,15, d, $J = 1,8$	6,14, d, $J = 1,7$	6,14, d, $J = 1,7$
H-7	6,39, d, $J = 1,8$	6,38, d, $J = 1,7$	6,38, d, $J = 1,7$
H-3' e H-5'	7,55, d, $J = 8,6$	7,54, d, $J = 8,6$	7,54, d, $J = 8,6$
H-2' e H-6'	7,72, d, $J = 8,6$	7,72, d, $J = 8,6$	7,72, d, $J = 8,6$
H- $\beta$	6,69, d, $J = 15,6$	6,68, d, $J = 15,6$	6,68, d, $J = 15,6$
RMN de $^{13}\text{C}$ - $\delta_{\text{C}}$ em ppm			
Atribuições	VR13 ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)	Literatura (BOUMENDJEL; MARIOTTE; BENEY, 2001) ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)	Literatura (SOUARD et al., 2010) ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)
$\text{OCH}_3$	56,19 e 56,28	56,1 e 56,2	56,13 e 56,26
C- $\beta$ e C-Ar	89,33-169,17	89,3 – 169,1	89,34 – 169,14
C=O	180,52	180,4	180,49

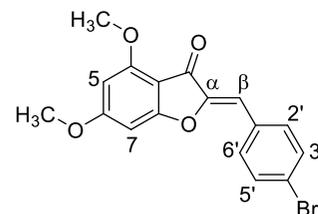
Por tratarem-se de análogos estruturais da aurona **VR13**, apresentam-se a seguir (**Tabela 13**) os dados de caracterização desta e das auronas **VR9** e **VR10**. Seus respectivos espectros encontram-se no Apêndice A deste documento.

Tabela 13 – Dados de caracterização das auronas VR9, VR10 e VR13

Dados de caracterização	Auronas	
	VR9	VR10
	 <p>(Z)-4,6-dimetoxi-2-(3',4',5'-trimetoxibenzilideno)benzofuran-3(2H)-ona  <math>C_{20}H_{20}O_7</math>            Massa molar: 372,37 g/mol</p>	 <p>(Z)-6-metoxi-2-(3',4',5'-trimetoxibenzilideno)benzofuran-3(2H)-ona  <math>C_{19}H_{18}O_6</math>            Massa molar: 342,35 g/mol</p>
Tempo de reação e rendimento	4 horas; 91%	4 horas; 56%
Aspecto físico	Sólido cristalino amarelo	Sólido cristalino amarelo
Faixa de fusão experimental e da literatura	Experimental: 182 °C – 183 °C	Experimental: 178 °C – 179 °C
RMN de $^1H$ ( $CDCl_3$ , 500 MHz) $\delta$ (ppm)	3,91 (s, 3H, $OCH_3$ ); 3,93 (s, 3H, $OCH_3$ ); 3,94 (s, 6H, $OCH_3$ ); 3,96 (s, 3H, $OCH_3$ ); 6,15 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz, H-5); 6,34 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz, H-7); 6,70 (s, 1H, H- $\beta$ ); 7,13 (s, 2H, H-2' e H-6')	3,92 (s, 3H, $OCH_3$ ); 3,94 (s, 3H, $OCH_3$ ); 3,95 (s, 6H, $OCH_3$ ); 6,73 (d, 1H, $J = 2,1$ Hz, H-7); 6,75 (s, 1H, H- $\beta$ ); 6,77 (dd, 1H, $J = 8,6$ Hz e $J = 2,1$ Hz, H-5); 7,16 (s, 2H, H-2' e H-6'); 7,72 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz, H-4)
RMN de $^{13}C$ ( $CDCl_3$ , 125 MHz) $\delta$ (ppm)	56,31; 56,36; 56,39; 61,15 (5 x $OCH_3$ ); 89,38 – 169,08 (C- $\alpha$ , C- $\beta$ e Ar); 180,70 (C=O)	56,23; 56,39; 61,17 (4 x $OCH_3$ ); 96,81 – 168,49 (C- $\alpha$ , C- $\beta$ e Ar); 183,00 (C=O)

## Auronas

## VR13



(Z)-2-(4'-bromobenzilideno)-4,6-dimetoxibenzofuran-3(2H)-ona

$C_{17}H_{13}BrO_4$

Massa molar: 361,19 g/mol

<b>Tempo de reação e rendimento</b>	5 horas; 74%
<b>Aspecto físico</b>	Sólido cristalino amarelo
<b>Faixa de fusão experimental e da literatura</b>	Experimental: 170 °C – 171 °C Literatura: 171 °C – 172 °C (BOUMENDJEL; MARIOTTE; BENEY, 2001)
<b>RMN de <math>^1H</math> (<math>CDCl_3</math>, 500 MHz) <math>\delta</math> (ppm)</b>	3,92 (s, 3H, $OCH_3$ ); 3,96 (s, 3H, $OCH_3$ ); 6,15 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz, H-5); 6,39 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz, H-7); 6,69 (s, 1H, H- $\beta$ ); 7,55 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz, H-3' e H-5'); 7,72 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz, H-2' e H-6')
<b>RMN de <math>^{13}C</math> (<math>CDCl_3</math>, 125 MHz) <math>\delta</math> (ppm)</b>	56,19 e 56,28 (2 x $OCH_3$ ); 89,33-169,17 (C- $\alpha$ , C- $\beta$ e Ar); 180,52 (C=O)

#### 4.4 ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA *IN VITRO* FRENTE A VERMES ADULTOS DE *Schistosoma mansoni*

Vários estudos da literatura relatam o potencial de produtos naturais frente ao parasito *S. mansoni* (DE MORAES, 2015; DE MORAES et al., 2012; DE MORAES et al., 2011B; MAGALHÃES et al., 2010; MAGALHÃES et al., 2009).

Neste contexto, estudos têm demonstrado significativas atividades esquistossomicidas *in vitro* de chalconas e auronas oriundas de fontes naturais (DE CASTRO et al., 2015), bem como provenientes de síntese orgânica (Dados ainda não publicados). Amparando-se nestes resultados, tentou-se neste trabalho explorar o potencial destas classes de compostos como substâncias esquistossomicidas.

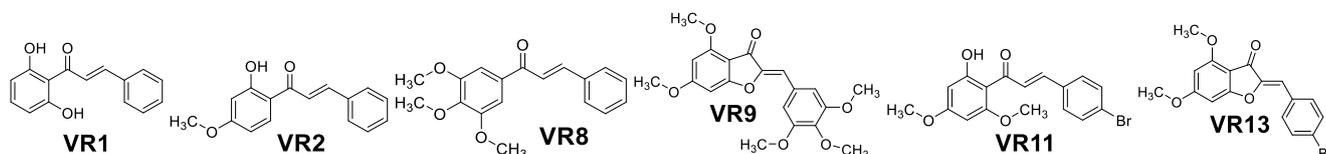
Portanto, inicialmente realizou-se uma triagem com os análogos de chalconas e auronas sintetizados, avaliando-os em tempos de incubação de 24, 48 e 72 horas na concentração preliminar de 100 µM, concentração esta descrita na literatura em vários ensaios antiparasitários (MAGALHÃES et al., 2010; MAGALHÃES et al., 2009; PARREIRA et al., 2010). Utilizou-se PZQ a 2 µM como controle positivo e meio RPMI 1640, contendo ou não DMSO 0,5%, como controle negativo.

Nesta triagem, apenas as chalconas **VR1**, **VR2** e **VR8**, além da aurona **VR13** ocasionaram 100% de mortalidade dos vermes adultos após 24 horas de incubação. A chalcona **VR11** e a aurona **VR9** apresentaram 100% de redução moderada da atividade motora dos parasitos. Os compostos **VR4**, **VR5**, **VR6**, **VR7** e **VR10**, não demonstraram atividade esquistossomicida frente a vermes adultos nas concentrações avaliadas. Torna-se importante salientar que o controle negativo, meio RPMI 1640 contendo ou não DMSO 0,5%, não ocasionou nenhum dano ou alteração nos parasitos e que o controle positivo, PZQ a 2 µM, exerceu a atividade esquistossomicida esperada para o mesmo.

De posse destes resultados, avaliaram-se os compostos ativos (chalconas **VR1**, **VR2**, **VR8** e **VR11**; auronas **VR9** e **VR13**) nas concentrações de 100 µM, 50 µM, 25 µM, 10 µM e 5 µM, sob as mesmas condições de incubação e controles previamente utilizados (**Tabela 14**).

Além de apresentarem atividade na concentração de 100 µM, como observado anteriormente, os compostos também demonstraram-se ativos na concentração de 50 µM. Nesta concentração, observou-se 100% de mortalidade dos parasitos em 24 horas de incubação para a chalcona **VR1**, em 48 horas para a chalcona **VR8** e em 72 horas para a chalcona **VR2**. Já a aurona **VR13** ocasionou 60% de mortalidade em 48 horas de incubação.

**Tabela 14** – Atividade *in vitro* dos compostos **VR1**, **VR2**, **VR8**, **VR9**, **VR11** e **VR13** frente a vermes adultos de *Schistosoma mansoni*.



Grupo	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) <sup>a</sup>		Redução da atividade motora (%) <sup>a</sup>			
		Machos	Fêmeas	Moderada		Significativa	
				Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
Controle <sup>b</sup>	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
DMSO 0,5%	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
PZQ 2 µM	24	100	100	0	0	100	100
	48	100	100	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100
<b>VR1</b> 100 µM	24	100	100	0	0	100	100
	48	100	100	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100
50 µM	24	100	100	0	0	100	100
	48	100	100	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100
25 µM	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	50	100	0	0	50	100
10 µM	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
5 µM	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0

<sup>a</sup> Porcentagem em relação a 20 vermes. <sup>b</sup> Meio RPMI 1640.

Grupo	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) <sup>a</sup>		Redução da atividade motora (%) <sup>a</sup>			
		Machos	Fêmeas	Moderada		Significativa	
				Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
<b>VR2</b> 100 µM	24	100	0	0	0	100	100
	48	100	0	0	0	100	100
	72	100	0	0	0	100	100
50 µM	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	100	100	0	0	100	100
25 µM	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	50	100	0	0	50	100
10 µM	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
5 µM	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
<b>VR8</b> 100 µM	24	100	100	0	0	100	100
	48	100	100	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100
50 µM	24	0	0	100	100	0	0
	48	100	100	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100
25 µM	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
10 µM	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
5 µM	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0

<sup>a</sup> Porcentagem em relação a 20 vermes. <sup>b</sup> Meio RPMI 1640.

Grupo	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) <sup>a</sup>		Redução da atividade motora (%) <sup>a</sup>			
		Machos	Fêmeas	Moderada		Significativa	
				Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
<b>VR9</b> 100 µM	24	0	0	60	60	0	0
	48	0	0	100	100	0	0
	72	0	0	100	100	0	0
50 µM	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	100	100	0	0
	72	0	0	100	100	0	0
25 µM	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
10 µM	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
5 µM	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
<b>VR11</b> 100 µM	24	0	0	100	100	0	0
	48	0	0	100	100	0	0
	72	60	0	0	100	100	0
50 µM	24	0	0	60	60	0	0
	48	0	0	100	100	0	0
	72	0	0	100	100	0	0
25 µM	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
10 µM	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
5 µM	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0

<sup>a</sup> Porcentagem em relação a 20 vermes. <sup>b</sup> Meio RPMI 1640.

Grupo	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) <sup>a</sup>		Redução da atividade motora (%) <sup>a</sup>			
		Machos	Fêmeas	Moderada		Significativa	
				Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
<b>VR13</b> 100 µM	24	0	0	30	0	30	0
	48	100	0	0	100	100	0
	72	100	0	0	100	100	0
50 µM	24	0	0	0	0	0	0
	48	60	0	30	0	60	0
	72	60	0	30	0	60	0
25 µM	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
10 µM	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
5 µM	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0

<sup>a</sup> Porcentagem em relação a 20 vermes. <sup>b</sup> Meio RPMI 1640.

Curiosamente, os compostos **VR2** (100 µM) e **VR13** (100 µM e 50 µM) ocasionaram a mortalidade somente de vermes adultos machos. Na literatura, também encontram-se relatos similares sobre diferenças na susceptibilidade de vermes adultos machos e fêmeas (MENDONÇA et al., 2016; SANDERSON; BARTLETT; WHITFIELD, 2002). Neste sentido, estudos indicam que alterações tegumentares ocasionam maiores danos aos machos em comparação às fêmeas (DA SILVA et al., 2014; MATOS-ROCHA et al., 2016; MOSTAFA; SOLIMAN, 2002; RIAD; TAHA; MAHMOUD, 2009). Há vários estudos que corroboram esta evidência experimental, nos quais demonstra-se a ação lesiva de diversos compostos sintéticos (ALBUQUERQUE et al., 2007; EISSA et al., 2011) e naturais (DE MORAES et al., 2011B; GODINHO et al., 2014), inclusive da chalcona cardamonina (DE CASTRO et al., 2015), sobre o tegumento dos vermes adultos machos ocasionando, na maioria das vezes, a mortalidade destes.

A chalcona **VR11** ocasionou, a 50 µM, 60% de redução moderada da atividade motora dos vermes adultos após 24 horas de incubação. Nesta mesma concentração, a aurona

**VR9** promoveu 100% de redução moderada da atividade dos vermes adultos após 48 horas de incubação. A redução na atividade motora é um importante parâmetro a ser avaliado, já que os vermes adultos necessitam de uma contratilidade muscular normal para locomoverem-se e fixarem-se no sistema vascular do hospedeiro. Assim, promovendo-se a imobilidade dos parasitos, similarmente à ação do PZQ, os mesmos tornam-se mais susceptíveis à resposta imunológica (ANDREWS, 1985).

Salienta-se também que não se podem atribuir as atividades apresentadas pelas auronas **VR9** e **VR13** à ação de resíduos de mercúrio oriundos da etapa de síntese, fato comprovado por estudo anterior (SILVEIRA, 2013).

Assim sendo, estes resultados indicam que alguns dos análogos de chalconas e auronas sintetizados apresentam atividades esquistossomicidas e que estas correlacionam-se diretamente com a concentração avaliada e o tempo em que as substâncias estiveram em contato com os parasitos. Os mecanismos exatos pelo qual estes compostos exercem tais efeitos ainda permanecem desconhecidos. Contudo, supõe-se que a inibição da enzima SmATPDase1 presente no tegumento dos vermes adultos possa estar envolvida neste processo, o que representa um fator a ser investigado.

#### 4.5 ATIVIDADE INIBITÓRIA *IN VITRO* FRENTE À ENZIMA SmATPDASE1

A importância da enzima SmATPDase1 neste trabalho provém de sua localização no tegumento dos vermes adultos de *S. mansoni* e provável participação em mecanismos de evasão do parasito à defesa do hospedeiro, uma vez que ATP e ADP são importantes moléculas sinalizadoras utilizadas pelo organismo na ativação da resposta imunológica e hemostática (DE MARCO et al., 2003; FARIA-PINTO et al., 2004; FARIA-PINTO et al., 2008; MEBIUS et al., 2013). Também, supõe-se que purinas oriundas do metabolismo do AMP, como a adenosina, sirvam como componente nutricional essencial ao *S. mansoni*, já que o parasito não é capaz de sintetizar este tipo de nutriente (BOURS et al., 2006; LEVY; READ, 1975).

Comprovou-se recentemente a especificidade da SmATPDase1 na hidrólise de ATP e ADP extracelulares realizada pelo parasito (DA'DARA; BHARDWAJ; SKELLY, 2014). Por conseguinte, estudos apontam que esta enzima possa servir como um novo alvo terapêutico para a ação de compostos esquistossomicidas (PENIDO et al., 2007).

Assim, nosso grupo de pesquisas realizou ensaios de inibição enzimática sobre a atividade ATPásica do tegumento de *S. mansoni* com os compostos esquistossomicidas *in*

*in vitro* cardamonina, chalcona **LS1** e auronas **LS6** e **LS23**, que ocasionaram respectivamente, a 40  $\mu\text{M}$ , 82%, 53,31%, 48,69% e 89,94% de inibição (DE CASTRO et al., 2015) (Dados ainda não publicados).

Amparando-se nestes resultados, avaliou-se a inibição *in vitro* promovida pelos análogos de chalconas e auronas sintetizados sobre a atividade hidrolítica de ATP do tegumento de *S. mansoni*, onde localiza-se a SmATPDase1, buscando-se assim pesquisar experimentalmente se a ação desta enzima está envolvida com as atividades esquistossomicidas apresentadas pelos compostos.

Para isso, inicialmente realizaram-se ensaios preliminares com os compostos nas concentrações de 50  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$  e 12,5  $\mu\text{M}$ . Nestes ensaios iniciais, as chalconas **VR2**, **VR4**, **VR5** e **VR11**, além das auronas **VR10** e **VR13** não puderam ser avaliadas, sendo então avaliados neste momento somente os compostos **VR1**, **VR6**, **VR7** e **VR8** e **VR9**.

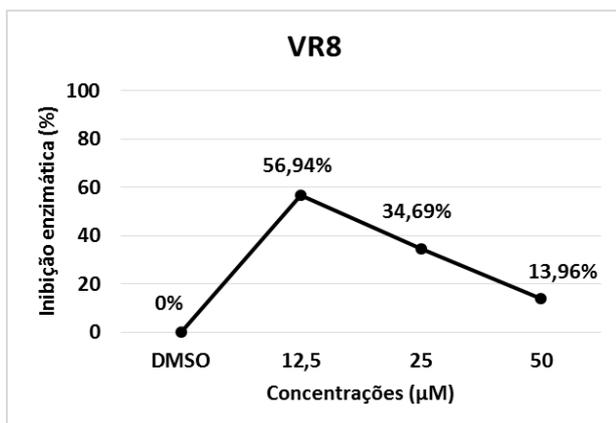
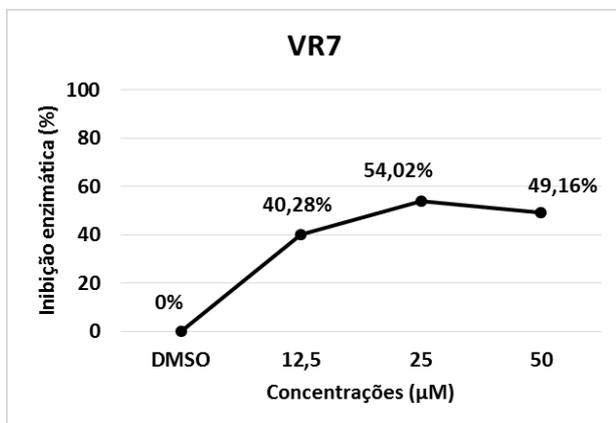
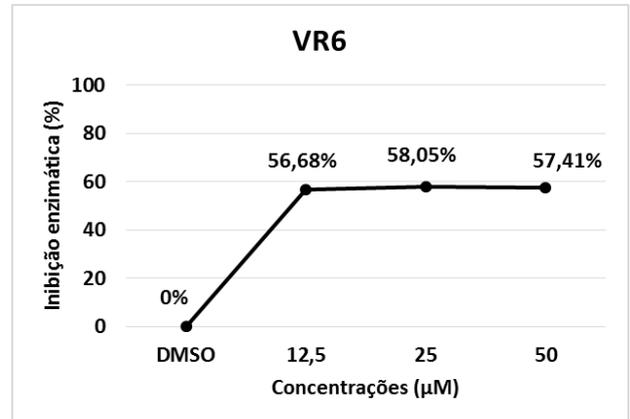
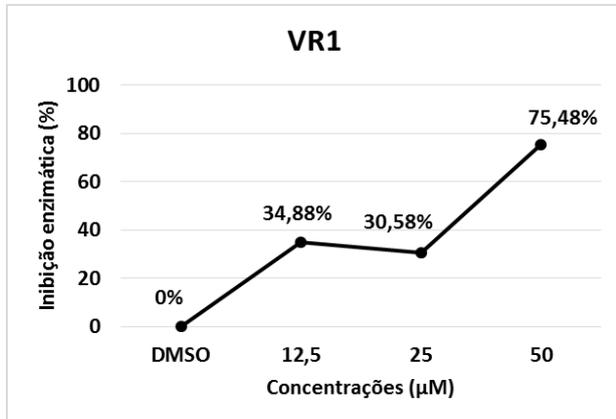
Como pode-se observar na **Figura 24**, a chalcona **VR1** apresentou 75,48% de inibição da enzima quando avaliada a 50  $\mu\text{M}$ , concentração esta na qual demonstrou-se ativa *in vitro* frente a vermes adultos de *S. mansoni*. Nas outras concentrações, 25  $\mu\text{M}$  e 12,5  $\mu\text{M}$ , perceberam-se porcentagens de inibição enzimática gradativamente menores para esta mesma chalcona, apresentando, com ligeira variação nos valores, um perfil de inibição concentração-dependente.

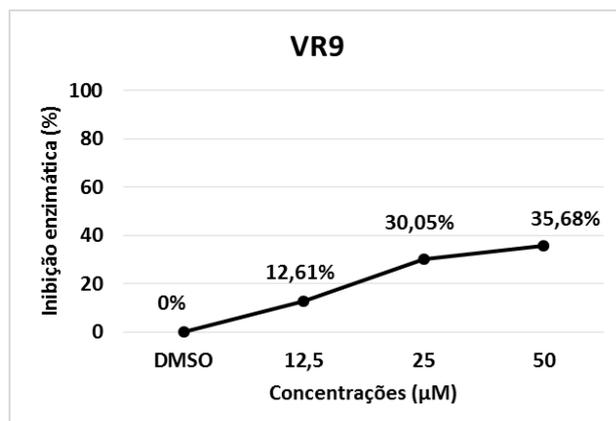
Para as chalconas **VR6** e **VR7**, bem como para a aurona **VR9**, também observaram-se perfis de inibição enzimática concentração-dependentes. A chalcona **VR6** apresentou porcentagens de inibição maiores do que 50% em todas as concentrações testadas, com um máximo de 58% na concentração de 25  $\mu\text{M}$ . Para esta chalcona, não houve significativa variação de inibição enzimática entre as concentrações de 50  $\mu\text{M}$  e 25  $\mu\text{M}$  (57,1% para 58,05%), diferentemente do observado para a chalcona **VR1** na mesma faixa de concentração (75,48% para 30,58%). Observou-se, para a chalcona **VR7**, inibições maiores do que 40% em todas as concentrações, com um máximo de 54% na concentração de 25  $\mu\text{M}$ .

Já a chalcona **VR8**, outro composto que também demonstrou atividade esquistossomicida *in vitro*, promoveu 56,94% de inibição na concentração de 12,5  $\mu\text{M}$ . Curiosamente, esta chalcona não exibiu um perfil concentração-dependente, exibindo aumentos sucessivos nas suas porcentagens de inibição conforme as concentrações diminuía.

Por sua vez, a aurona **VR9** apresentou percentuais de inibição em torno de 30%, com um máximo de 35,68% a 50  $\mu\text{M}$ .

**Figura 24** – Inibição *in vitro* da atividade hidrolítica de ATP da SmATPDase1 promovida pelos compostos **VR1**, **VR6**, **VR7**, **VR8** e **VR9**





Resultados expressos como a média de um ensaio realizado em triplicata para cada concentração, em relação ao grupo controle DMSO 20% (v/v). Atividade ATPásica do controle DMSO 20% (v/v) para cada composto: VR1-17,80 nmol Pi mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>; VR6-24,46 nmol Pi mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>; VR7-19,57 nmol Pi mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>; VR8-21,50 nmol Pi mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>; VR9-13,62 nmol Pi mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>; VR10- 21,00 nmol Pi mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>.

Os resultados preliminares obtidos até o momento não permitem que se façam generalizações acerca da correlação entre a inibição *in vitro* da SmATPDase1 e a atividade *in vitro* frente a vermes adultos de *S. mansoni*, uma vez que obtiveram-se diferentes perfis de inibição para os compostos nas condições e concentrações avaliadas.

Entretanto, observa-se que os compostos apresentaram apreciáveis níveis de inibição da SmATPDase1. Assim, estes resultados experimentais corroboram com os obtidos *in silico* por *docking* molecular, no qual todos os compostos demonstraram bons perfis de interação com a enzima no seu domínio de ligação nucleotídica (local de ligação ao ATP e ADP), indicando que poderiam potencialmente inibir a atividade hidrolítica da mesma.

A presença e importância de E-NTPDases para a infectividade, virulência ou recuperação de purinas de parasitos como *Leishmania sp.* (FIETTO et al., 2016), *Trypanosoma cruzi* (SANTOS et al., 2009), *Toxoplasma Gondii* (TONIN et al., 2014) e *Trichomonas vaginalis* (FRASSON; VIEIRA; TASCA, 2013; MENEZES et al., 2016), bem como a comprovada ação de chalconas e auronas frente a estes mesmos parasitos, representam fatores que reforçam a possibilidade de que a inibição de enzimas desta classe possa estar relacionada à efetividade antiparasitária destes compostos (AMETA et al., 2012; ANTHWAL et al., 2014; APONTE et al., 2010; APONTE et al., 2008; ROUSSAKI et al., 2012; ROUSSAKI et al., 2013).

Neste sentido, novos ensaios de inibição enzimática serão realizados com estes compostos, obtendo-se assim evidências experimentais suficientes que permitam elucidar com

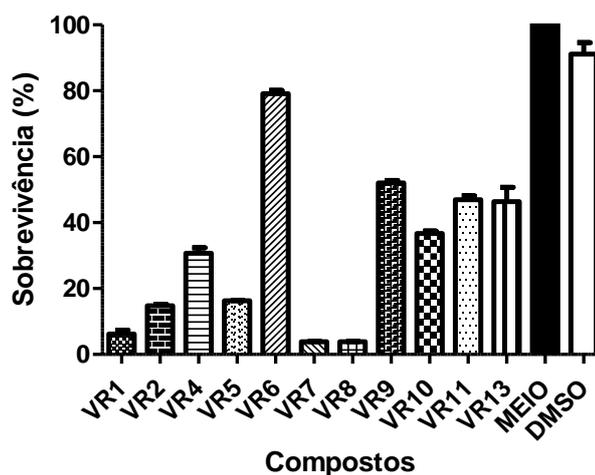
maior clareza a hipótese de correlação entre a atividade esquistosomicida *in vitro* e a inibição *in vitro* da SmATPDase1.

#### 4.6 CITOTOXICIDADE *IN VITRO* FRENTE A MACRÓFAGOS MURINOS DA LINHAGEM CELULAR RAW 264.7

Utilizando-se a técnica de redução do MTT, expuseram-se macrófagos murinos da linhagem celular RAW 264.7 aos compostos sintetizados por um período de 48 horas de incubação na concentração preliminar de 100  $\mu$ M. Deste modo, determinou-se a viabilidade celular destes macrófagos como forma de se avaliarem prováveis características citotóxicas relacionadas aos compostos

A maioria dos compostos ocasionou um perfil de viabilidade celular para esta linhagem abaixo dos 50%, quando comparados com o grupo controle. Contudo, a chalcona **VR6** demonstrou o melhor perfil dentre os compostos, proporcionando 79% de viabilidade celular (**Figura 25**).

**Figura 25** – Viabilidade celular de macrófagos murinos da linhagem celular RAW 264.7 expostos às chalconas e auronas a 100  $\mu$ M



Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão (barras) dos ensaios em triplicata. Todos os compostos demonstraram-se estatisticamente significantes em relação aos grupos controle (meio de cultura e DMSO a 0,5%), com  $P < 0,001$ . Fonte: Elaborado pelo autor

Com base nestes resultados preliminares, não é possível concluir com clareza se as atividades apresentadas pelos compostos esquistossomicidas *in vitro* (**VR1**, **VR2**, **VR8** e **VR13**) relacionam-se às características citotóxicas demonstradas pelos mesmos, uma vez que outros compostos inativos frente ao *S. mansoni*, como as chalconas **VR5** e **VR7**, também apresentaram perfis similares de citotoxicidade.

Desta forma, novos ensaios estão sendo realizados para a avaliação citotóxica dos compostos sintetizados em concentrações menores, como a 50  $\mu\text{M}$ , na qual os mesmos apresentaram atividade esquistossomicida *in vitro*.

Assim sendo, espera-se esclarecer com estes novos resultados, bem como através de novos ensaios de inibição da enzima SmATPDase1, se as atividades esquistossomicidas *in vitro* apresentadas pelos compostos deste trabalho atribuem-se a perfis de citotoxicidade dos mesmos ou se relacionam a mecanismos de inibição enzimática.

## 5 CONCLUSÃO

No presente trabalho, realizou-se o planejamento molecular de análogos de chalconas e auronas por meio de técnicas de *docking* molecular e análise de propriedades ADME. Assim, esta etapa culminou com a seleção de 8 chalconas (**VR1**, **VR2**, **VR4**, **VR5**, **VR6**, **VR7**, **VR8** e **VR11**) e 3 auronas (auronas: **VR9**, **VR10** e **VR13**), com características adequadas de inibição da enzima SmATPDase1.

Sintetizaram-se todos estes análogos de chalconas, purificando-os e caracterizando-os com sucesso. Obtiveram-se as chalconas como sólidos cristalinos amarelos com rendimentos entre 15% e 61% e as auronas também como sólidos cristalinos amarelos com rendimentos entre 74% e 91%.

Submeteram-se estes compostos à avaliação de seus potenciais esquistossomicidas *in vitro* frente a vermes adultos de *S. mansoni*. As chalconas **VR1**, **VR2** e **VR8**, bem como a aurona **VR13**, apresentaram-se ativas na concentração de 50  $\mu\text{M}$ .

Avaliou-se o perfil de citotoxicidade destes compostos frente a macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7. Na concentração preliminar de 100  $\mu\text{M}$ , os compostos apresentaram um perfil citotóxico.

Realizaram-se ensaios preliminares de inibição *in vitro* da enzima SmATPDase1. Nestes ensaios, obtiveram-se diferentes padrões de inibição para os compostos, não sendo

possível estabelecer uma correlação clara com os resultados de atividade esquistossomicida *in vitro* apresentados pelos mesmos.

Estes resultados reforçam o potencial de chalconas e auronas como substâncias esquistossomicidas. Novos ensaios de citotoxicidade e de inibição da SmATPDase1 serão realizados, de modo a se obterem maiores evidências experimentais que permitam esclarecer se as atividades esquistossomicidas *in vitro* dos compostos atribuem-se a perfis de citotoxicidade ou a mecanismos de inibição enzimática.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, C. P.; BRANTNER, V. V. Spending on new drug development1. **Health economics**, v. 19, n. 2, p. 130-141, 2010.
- AGRAWAL, N. N.; SONI, P. A new process for the synthesis of auronas by using mercury (II) acetate in pyridine and cupric bromide in dimethyl sulfoxide. **Indian Journal of Chemistry B**, v. 45, p. 1301-1303, 2006.
- AJAIYEOBA, E. et al. Cajachalcone: An antimalarial compound from *Cajanus cajan* leaf extract. **Journal of parasitology research**, v. 2013, 2013.
- 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**, v. 52, n. 9, p. 1008-1010, 2011.
- ALBUQUERQUE, M. et al. Tegumental alterations in adult *Schistosoma mansoni* treated with imidazolidine derivatives. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 1, p. 65, 2007.
- AMETA, K. L. et al. Synthesis and Trypanocidal Evaluation of Some Novel 2-(Substituted Benzylidene)-5, 7-Dibromo-6-Hydroxy-1-Benzofuran-3(2H)-Ones. **International Journal of Organic Chemistry**, v. 02, n. 03, p. 295-301, 2012.
- ANDREWS, P. Praziquantel: mechanisms of anti-schistosomal activity. **Pharmacology & therapeutics**, v. 29, n. 1, p. 129-156, 1985.

- ANTHWAL, A. et al. Novel metronidazole–chalcone conjugates with potential to counter drug resistance in *Trichomonas vaginalis*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 79, p. 89-94, 2014.
- APONTE, J. C. et al. *In vitro* and *in vivo* anti-Leishmania activity of polysubstituted synthetic chalcones. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 1, p. 100-103, 2010.
- APONTE, J. C. et al. Synthesis, Cytotoxicity, and Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity of New Chalcones. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 19, p. 6230-6234, 2008.
- BANDGAR, B. P. et al. Synthesis and biological evaluation of simple methoxylated chalcones as anticancer, anti-inflammatory and antioxidant agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 3, p. 1364-1370, 2010.
- BAQI, Y. Ecto-Nucleotidase Inhibitors: Recent Developments in Drug Discovery. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 15, n. 1, p. 21-33, 2015.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. D. S. Biodiversity: Potential source for drug discovery. **Química Nova**. v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.
- BARREIRO, E. J. et al. Modelagem Molecular: Uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal. **Química nova**. v. 20, n. 1, p. 1, 1997.
- BATOVSKA, D. I.; TODOROVA, I. T. Trends in utilization of the pharmacological potential of chalcones. **Current Clinical Pharmacology**, v. 5, n. 1, p. 1-29, 2010.
- BELLO, M. L. et al. Trimethoxy-chalcone derivatives inhibit growth of *Leishmania braziliensis*: synthesis, biological evaluation, molecular modeling and structure–activity relationship (SAR). **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 16, p. 5046-5052, 2011.
- BHAGAT, S. et al. LiOH·H<sub>2</sub>O as a novel dual activation catalyst for highly efficient and easy synthesis of 1,3-diaryl-2-propenones by Claisen-Schmidt condensation under mild conditions. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 244, n. 1-2, p. 20-24, 2006.
- BOECK, P. et al. Antifungal activity and studies on mode of action of novel xanthoxylone-derived chalcones. **Archiv der Pharmazie**, v. 338, n. 2-3, p. 87-95, 2005.
- BOHM, A. Introduction to flavonoids. **Harwood Academic Pub**, London, 1998.
- BOUMENDJEL, A. Aurones: A Subclass of Flavones with Promising Biological Potential. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 2621-2630, 2003.
- BOUMENDJEL, A.; MARIOTTE, A.-M.; BENEY, C. An efficient synthesis of 4,6-dimethoxyaurones. **Heterocycles**, v. 55, p. 967-972, 2001.
- BOURS, M. et al. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology & therapeutics**, v. 112, n. 2, p. 358-404, 2006.

BRAGUINE, C. G. et al. Schistosomicidal evaluation of flavonoids from two species of *Styrax* against *Schistosoma mansoni* adult worms. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 7, p. 925–929, 2012.

BRASCHI, S. et al. The tegument surface membranes of the human blood parasite *Schistosoma mansoni*: A proteomic analysis after differential extraction. **Proteomics**. v. 6, n. 5, p. 1471-1482, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Vigilância em Saúde: Dengue, Esquistossomose, Hanseníase, Malária, Tracoma e Tuberculose. **Brasília: Ministério da Saúde. Série A. Normas e Manuais Técnicos Cadernos de atenção básica**, Brasília, DF, v. 2, n. 21, p. 48-60, 2008.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Esquistossomose. **Brasília: Ministério da Saúde**, Brasília, DF, 2014.

\_\_\_\_\_. Esquistossomose **Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN**. **Brasília: Ministério da Saúde**, Brasília, DF, 2016. Disponível em: < <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php> >. Acesso em: 01/03/16.

BUTLER, M. S. The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 12, p. 2141-2153, 2004.

CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J. Addition, Condensation and Substitution Reactions of Carbonyl Compounds. In: (Ed.). **Advanced Organic Chemistry Part A: Structure and Mechanisms**. 5 ed. New York: Springer, 2007. cap. 7, p.682-697.

CARRASCO, M. P. et al. Probing the aurone scaffold against *Plasmodium falciparum*: Design, synthesis and antimalarial activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 80, p. 523-534, 2014.

CDC. Schistosomiasis-Biology. **Centers for Disease Control and Prevention**, Atlanta, GA, 2012. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/biology.html> >. Acesso em: 16/03/16.

CHLUPACOVA, M. K. et al. Novel pyrazine analogs of chalcones: Synthesis and evaluation of their antifungal and antimycobacterial activity. **Molecules**. v. 20, n. 1, p. 1104-1117, 2015.

CIOLI, D. et al. Schistosomiasis control: Praziquantel forever? **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 195, n. 1, p. 23-29, 2014.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. Reactions of enolates with carbonyl compounds: the aldol and Claisen reactions. In: (Ed.). **Organic Chemistry**. 2 ed. New York: Oxford University Press Inc., 2012. cap. 26, p.614-619.

COLLEY, D. et al. Immune responses during human schistosomiasis mansoni. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 53, n. 5, p. 420-433, 1977.

COLLEY, D. G. et al. Human schistosomiasis. **The Lancet**, v. 383, n. 9936, p. 2253-2264, 2014.

COUPEZ, B.; LEWIS, R. A. Docking and scoring - Theoretically easy, practically impossible? **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 25, p. 2995-3003, 2006.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

DA SILVA, A. L. et al. Tegumental changes in adult *Schistosoma mansoni* induced by a new imidazolidinic derivative. **British Journal of Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 16, p. 1988, 2014.

DA'DARA, A. A.; BHARDWAJ, R.; SKELLY, P. J. Schistosome apyrase SmATPDase1, but not SmATPDase2, hydrolyses exogenous ATP and ADP. **Purinergic signalling**, v. 10, n. 4, p. 573-580, 2014.

DE CASTRO, C. C. B. et al. Cardamonin, a schistosomicidal chalcone from *Piper aduncum* L. (Piperaceae) that inhibits *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase. **Phytomedicine**, v. 22, n. 10, p. 921-928, 2015.

DE MARCO, R. et al. Molecular characterization and immunolocalization of *Schistosoma mansoni* ATP-diphosphohydrolase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 307, n. 4, p. 831-838, 2003.

DE MELLO, T. F. P. et al. Leishmanicidal activity of synthetic chalcones in *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Experimental Parasitology**, v. 136, n. 1, p. 27-34, 2014.

DE MORAES, J. Natural products with antischistosomal activity. **Future Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 6, p. 801-820, 2015.

DE MORAES, J. et al. Anthelmintic activity of the natural compound (+)-limonene epoxide against *Schistosoma mansoni*. **Planta Medica**, v. 79, n. 03/04, p. 253-258, 2013a.

DE MORAES, J. et al. Anthelmintic activity of carvacryl acetate against *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, v. 112, n. 2, p. 603-610, 2013b.

DE MORAES, J. et al. *In vitro* synergistic interaction between amide piplartine and antimicrobial peptide dermaseptin against *Schistosoma mansoni* schistosomula and adult worms. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 301-309, 2013c.

DE MORAES, J. et al. Evaluation of the *in vitro* activity of dermaseptin 01, a cationic antimicrobial peptide, against *Schistosoma mansoni*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, p. 548-558, 2011a.

DE MORAES, J. et al. *Schistosoma mansoni*: *In vitro* schistosomicidal activity and tegumental alterations induced by piplartine on schistosomula. **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 2, p. 222-227, 2012.

DE MORAES, J. D. et al. *Schistosoma mansoni*: *In vitro* schistosomicidal activity of piplartine. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 2, p. 357-364, 2011b.

DETSI, A. et al. Natural and synthetic 20-hydroxy-chalcones and aurones: Synthesis, characterization and evaluation of the antioxidant and soybean lipoxygenase inhibitory activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 8073–8085, 2009.

DIMASI, J. A.; HANSEN, R. W.; GRABOWSKI, H. G. The price of innovation: New estimates of drug development costs. **Journal of Health Economics**, v. 22, n. 2, p. 151-185, 2003.

DRUMMOND, S. C. et al. Morbidity of schistosomiasis mansoni in the state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 37-44, 2006.

DUCKI, S. et al. Combretastatin-like chalcones as inhibitors of microtubule polymerization. Part 1: Synthesis and biological evaluation of antivasular activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 22, p. 7698-7710, 2009.

EDDARIR, S. et al. An efficient synthesis of chalcones based on the Suzuki reaction. **Tetrahedron Letters**, v. 44, n. 28, p. 5359-5363, 2003.

EDWARDS, M. L.; STEMERICK, D. M.; SUNKARA, P. S. Chalcones: a new class of antimetabolic agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 33, n. 7, p. 1948-1954, 1990.

EISSA, M. M. et al. Miltefosine, a promising novel agent for schistosomiasis mansoni. **International Journal for Parasitology**, v. 41, n. 2, p. 235-242, 2011.

EKINS, S.; MESTRES, J.; TESTA, B. *In silico* pharmacology for drug discovery: Methods for virtual ligand screening and profiling. **British Journal of Pharmacology**, v. 152, n. 1, p. 9-20, 2007.

EL-BANHAWAY, M. A. et al. Effect of *Curcuma longa* or praziquantel on *Schistosoma mansoni* infected mice liver-histological and histochemical study. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 45, p. 877–889, 2007.

ELHADI, A. A. et al. Synthesis and structural elucidation of two new series of aurone derivatives as potent inhibitors against the proliferation of human cancer cells. **Medicinal Chemistry Research**, v. 24, n. 9, p. 3504-3515, 2015.

FARAG, M. A. et al. Integrated metabolite and transcript profiling identify a biosynthetic mechanism for hispidol in *Medicago truncatula* cell cultures. **Plant Physiology**, v. 151, n. 3, p. 1096-1113, 2009.

FARIA-PINTO, P. et al. ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni* egg: Characterization and immunocytochemical localization of a new antigen. **Parasitology**, v. 129, n. 1, p. 51-57, 2004.

FARIA-PINTO, P. et al. Mapping of the conserved antigenic domains shared between potato apyrase and parasite ATP diphosphohydrolases: Potential application in human parasitic diseases. **Parasitology**, v. 135, n. 8, p. 943-953, 2008.

- FATIMA, S. et al. One pot efficient diversity oriented synthesis of polyfunctional styryl thiazolopyrimidines and their bio-evaluation as antimalarial and anti-HIV agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 195-204, 2012.
- FERREIRA, L. G. et al. Molecular docking and structure-based drug design strategies. **molecules**, v. 20, n. 7, p. 13384-13421, 2015.
- FIETTO, J. L. R. et al. The Leishmania-Macrophage Interactions: Role of E-NTPDases and Purinergic Signaling. **Macrophage**, v. 3, 2016.
- FRASSON, A. P.; VIEIRA, P. B.; TASCA, T. Involvement of extracellular ATP and derivates in *Trichomonas vaginalis* infection. In: (Ed.). **Adenosine Triphosphate: Chemical Properties, Biosynthesis and Functions in Cells**, 2013. p.187-195.
- GELDENHUYS, W. J. et al. Optimizing the use of open-source software applications in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 11, n. 3-4, p. 127-132, 2006.
- GOA, K. L.; MCTAVISH, D.; CLISSOLD, S. P. Ivermectin. **Drugs**, v. 42, n. 4, p. 640-658, 1991.
- GODINHO, L. S. et al. Anthelmintic activity of crude extract and essential oil of *Tanacetum vulgare* (Asteraceae) against adult worms of *Schistosoma mansoni*. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.
- GONÇALVES, L. M.; VALENTE, I. M.; RODRIGUES, J. A. An overview on cardamonin. **Journal of Medicinal Food**, v. 17, n. 6, p. 633-640, 2014.
- GRYSEELS, B. Schistosomiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 383-397, 2012.
- GRYSEELS, B.; STRICKLAND, G. T. Schistosomiasis. In: (Ed.). **Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease: Ninth Edition**, 2012. p.867-883.
- HALBWIRTH, H. The Creation and Physiological Relevance of Divergent Hydroxylation Patterns in the Flavonoid Pathway. **International journal of molecular sciences**, v. 11, n. 2, p. 595-621, 2010.
- HALGREN, T. A. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. **Journal of computational chemistry**, v. 17, n. 5-6, p. 490-519, 1996.
- HARKAT, H. et al. Versatile and expeditious synthesis of aurones via AuI-catalyzed cyclization. **Journal of Organic Chemistry**, v. 73, n. 4, p. 1620-1623, 2008.
- HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19-20, p. 894-901, 2008.
- HASTINGS, J.; HELLER, H. The stereochemistry of aurones [2-substituted benzylidenebenzofuran-3 (2 H)-ones]. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, p. 2128-2132, 1972.

HAUDECOEUR, R.; BOUMENDJEL, A. Recent advances in the medicinal chemistry of aurones. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 18, p. 2861-2875, 2012.

HAWKINS, I.; HANDY, S. T. Synthesis of aurones under neutral conditions using a deep eutectic solvent. **Tetrahedron**, v. 69, n. 44, p. 9200-9204, 2013.

HOCKLEY, D. J.; MCLAREN, D. J. *Schistosoma mansoni*: Changes in the outer membrane of the tegument during development from cercaria to adult worm. **International Journal for Parasitology**, v. 3, n. 1, p. 13-20, 1973.

HOTEZ, P. J.; FUJIWARA, R. T. Brazil's neglected tropical diseases: an overview and a report card. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 16, n. 8, p. 601-606, 2014.

HOTEZ, P. J. et al. Control of Neglected Tropical Diseases. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 10, p. 1018-1027, 2007.

HU, Z. et al. Synthesis of chalcones catalysed by SOCl<sub>2</sub>/EtOH. **Journal of Chemical Research**, n. 2, p. 158-159, 2004.

HUO, M. et al. Traditional medicine alpinetin inhibits the inflammatory response in Raw 264.7 cells and mouse models. **International Immunopharmacology**. v. 12, n. 1, p. 241-248, 2012.

KAYSER, O. et al. Aurones interfere with *Leishmania major* mitochondrial fumarate reductase. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 57, n. 7-8, p. 717-720, 2002.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A. F.; BRUN, R. *In vitro* activity of aurones against *Plasmodium falciparum* strains K1 and NF54. **Planta Medica**, v. 67, n. 8, p. 718-721, 2001.

KAYSER, O. et al. Evaluation of *in vitro* activity of aurones and related compounds against *Cryptosporidium parvum*. **Planta Medica**, v. 67, n. 8, p. 722-725, 2001.

KHAN, M.; ASAD MUEED, M. Scope of mercuric acetate oxidation of chalcones and the antibacterial activity of resulting aurones. **Indian journal of chemistry. Sect. B: Organic chemistry, including medical chemistry**, v. 43, n. 8, p. 1794-1797, 2004.

KLEIN, D. R. Alpha Carbon Chemistry: Enols and Enolates. In: (Ed.). **Organic Chemistry**. 2. ed.: John Wiley & Sons, Inc., 2015. cap. 22, p.1057-1068.

KRAUS, G. A.; GUPTA, V. Divergent approach to flavones and aurones via dihaloacrylic acids. unexpected dependence on the halogen atom. **Organic Letters**, v. 12, n. 22, p. 5278-5280, 2010.

KUMAR, A. et al. Synthesis of chalcones and flavanones using Julia-Kocienski olefination. **Tetrahedron**, v. 66, n. 48, p. 9445-9449, 2010.

- LAWRENCE, N. J. et al. The total synthesis of an aurone isolated from *Uvaria hamiltonii*: Aurones and flavones as anticancer agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, n. 21, p. 3759-3763, 2003.
- LEE, S. H. et al. Isoliquiritigenin, from *Dalbergia odorifera*, up-regulates anti-inflammatory heme oxygenase-1 expression in RAW264.7 macrophages. **Inflammation Research**, v. 58, n. 5, p. 257-262, 2009.
- LEVY, M. G.; READ, C. P. Relation of tegumentary phosphohydrolase to purine and pyrimidine transport in *Schistosoma mansoni*. **The Journal of parasitology**, p. 648-656, 1975.
- LI, J. W. H.; VEDERAS, J. C. Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? **Science**, v. 325, n. 5937, p. 161-165, 2009.
- LIPINSKI, C. A. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 44, n. 1, p. 235-249, 2000.
- LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, n. 1-3, p. 3-25, 1997.
- LIU, A. L. et al. Structure-activity relationship of flavonoids as influenza virus neuraminidase inhibitors and their *in vitro* anti-viral activities. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 15, p. 7141-7147, 2008.
- LORSUWANNARAT, N. et al. The anthelmintic effect of plumbagin on *Schistosoma mansoni*. **Experimental Parasitology**, v. 133, n. 1, p. 18-27, 2013.
- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.
- MACALINO, S. J. Y. et al. Role of computer-aided drug design in modern drug discovery. **Archives of Pharmacal Research**, v. 38, n. 9, p. 1686-1701, 2015.
- MAGALHÃES, L. G. et al. *In vitro* schistosomicidal effects of some phloroglucinol derivatives from *Dryopteris* species against *Schistosoma mansoni* adult worms. **Parasitology Research**, v. 106, n. 2, p. 395-401, 2010.
- MAGALHÃES, L. G. et al. *In vitro* schistosomicidal activity of curcumin against *Schistosoma mansoni* adult worms. **Parasitology Research**, v. 104, n. 5, p. 1197-1201, 2009.
- MAIA, A. C. R. G. et al. Occurrence of a conserved domain in ATP diphosphohydrolases from pathogenic organisms associated to antigenicity in human parasitic diseases. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 35, n. 10, p. 1059-1067, 2011.
- MATEEVA, N. N.; KODE, R. N.; REDDA, K. K. Synthesis of novel flavonoid derivatives as potential HIV-Integrase inhibitors. **Journal of heterocyclic chemistry**, v. 39, n. 6, p. 1251-1258, 2002.

- MATOS-ROCHA, T. J. et al. Ultrastructural changes in *Schistosoma mansoni* male worms after *in vitro* incubation with the essential oil of *mentha x villosa* Huds. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 58, 2016.
- MATOS, M. J. et al. Potential pharmacological uses of chalcones: A patent review (from June 2011-2014). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 25, n. 3, p. 351-366, 2015.
- MEBIUS, M. M. et al. Interference with the Host Haemostatic System by Schistosomes. **PLOS Pathogens**, San Francisco, USA, v. 9, n. 12, p. e1003781, 2013.
- MEGUELLATI, A. et al. New pseudodimeric aurones as palm pocket inhibitors of Hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 115, p. 217-229, 2016.
- MEISTER, I. et al. Activity of praziquantel enantiomers and main metabolites against *Schistosoma mansoni*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 9, p. 5466-72, 2014.
- MENDONÇA, A. M. B. et al. The susceptibility of recent isolates of *Schistosoma mansoni* to praziquantel. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 58, 2016.
- MENEZES, C. B. et al. *Trichomonas vaginalis* NTPDase and ecto-5'-nucleotidase hydrolyze guanine nucleotides and increase extracellular guanosine levels under serum restriction. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 207, n. 1, p. 10-18, 2016.
- MENG, X. Y. et al. Molecular docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. **Current Computer-Aided Drug Design**, v. 7, n. 2, p. 146-157, 2011.
- MESSIER, C.; GRENIER, D. Effect of licorice compounds licochalcone A, glabridin and glycyrrhizic acid on growth and virulence properties of *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 54, n. 6, p. e801-e806, 2011.
- MIELCKE, T. R. et al. Activity of novel quinoxaline-derived chalcones on *in vitro* glioma cell proliferation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, p. 255-264, 2012.
- MILES, C.; MAIN, L.; NICHOLSON, B. Synthesis of 2', 6'-Dihydroxychalcones by Using Tetrahydropyran-2-yl and Trialkylsilyl Protective Groups; the Crystal Structure Determination of 2',6'-Dihydroxy-2,4,6-trimethoxychalcone. **Australian Journal of Chemistry**, v. 42, n. 7, p. 1103-1113, 1989.
- MIRANDA, M. A. et al. Evaluation of the schistosomicidal activity of the steroidal alkaloids from *Solanum lycocarpum* fruits. **Parasitology Research**, v. 111, n. 1, p. 257-262, 2012.
- MOKLE, S. S. et al. Synthesis and antibacterial activity of some new chalcones and flavones having 2-chloro-8-methoxyquinolinyl moiety. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 1, n. 1, 2010.
- MORAES, J. D. et al. *Schistosoma mansoni* and other larval trematodes in *Biomphalaria tenagophila* (Planorbidae) from Guarulhos, São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, n. 2, p. 77-82, 2009.

MORALES-CAMILO, N. et al. Synthesis, biological evaluation, and molecular simulation of chalcones and aurones as selective MAO-B inhibitors. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 85, n. 6, p. 685-695, 2015.

MORAN, M. et al. Neglected disease research and development: How much are we really spending? **PLoS Medicine**, v. 6, n. 2, p. 0137-0146, 2009.

MORRIS, G. M. et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal of computational chemistry**, v. 19, n. 14, p. 1639-1662, 1998.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOSTAFA, O.; SOLIMAN, M. Experimental use of black-seed oil against *Schistosoma mansoni* in albino mice: II. Surface topography of adult worms. **Egypt J Med Lab Sci**, v. 11, n. 1, p. 79-85, 2002.

MOTANI, K. et al. Proteomic analysis of apoptosis induced by xanthoangelol, a major constituent of *Angelica keiskei*, in neuroblastoma. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 4, p. 618-626, 2008.

NAKAYAMA, T. et al. Specificity analysis and mechanism of aurone synthesis catalyzed by aureusidin synthase, a polyphenol oxidase homolog responsible for flower coloration. **FEBS Letters**, v. 499, n. 1-2, p. 107-111, 2001.

NAKAYAMA, T. et al. Aureusidin synthase: A polyphenol oxidase homolog responsible for flower coloration. **Science**, v. 290, n. 5494, p. 1163-1166, 2000.

NARSINGHANI, T.; SHARMA, M. C.; BHARGAV, S. Synthesis, docking studies and antioxidant activity of some chalcone and aurone derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, n. 9, p. 4059-4068, 2013.

NEVES, B. J.; ANDRADE, C. H.; CRAVO, P. V. Natural products as leads in schistosome drug discovery. **molecules**, v. 20, n. 2, p. 1872-1903, 2015.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11<sup>a</sup> edição. Atheneu, 2004.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; KINGSTON, D. G. I. Natural Products as Pharmaceuticals and Sources for Lead Structures. In: (Ed.). **The Practice of Medicinal Chemistry: Fourth Edition**, 2015. p.101-139.

NIELSEN, S. F. et al. Antibacterial chalcones - Bioisosteric replacement of the 4'-hydroxy group. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 11, p. 3047-3054, 2004.

OHKATSU, Y.; SATOH, T. Antioxidant and Photo-antioxidant Activities of Chalcone Derivatives. **Journal of the Japan Petroleum Institute**, v. 51, n. 5, p. 298-308, 2008.

OKOMBI, S. et al. Discovery of benzylidenebenzofuran-3(2H)-one (aurones) as inhibitors of tyrosinase derived from human melanocytes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 1, p. 329-333, 2006.

PALLEROS, D. R. Solvent-free synthesis of chalcones. **J. Chem. Educ**, v. 81, n. 9, p. 1345, 2004.

PARREIRA, N. A. et al. Antiprotozoal, Schistosomicidal, and Antimicrobial Activities of the Essential Oil from the Leaves of *Baccharis dracunculifolia*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, n. 4, p. 993-1001, 2010.

PAVIA, D. L. et al. Nuclear magnetic resonance spectroscopy part three: Spin-spin coupling In: (Ed.). **Introduction to Spectroscopy**. 5 ed.: Cengage Learning, 2015. cap. 7, p.359.

PELLEGRINO, J.; KATZ, N. Experimental chemotherapy of *Schistosomiasis mansoni*. **Advances in Parasitology**, v. 6, p. 233-290, 1968.

PENIDO, L. O. M. et al. A new series of schistosomicide drugs, the alkylaminoalkanethiosulfuric acids, partially inhibit the activity of *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase. **European Journal of Pharmacology**, v. 570, n. 1, p. 10-17, 2007.

PRASATH, R. et al. Efficient ultrasound-assisted synthesis, spectroscopic, crystallographic and biological investigations of pyrazole-appended quinolinyl chalcones. **Journal of Molecular Structure**, v. 1081, p. 201-210, 2015.

RAMALHETE, C. et al. *In vitro* schistosomicidal activity of balsaminol F and karavilagenin C. **Planta Medica**, v. 78, n. 18, p. 1912-1917, 2012.

REZENDE, M. C.; PIZARRO, C.; MILLÁN, D. Preparation, spectroscopic and acidity properties of two hydrazones: an organic lab experiment. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 229-231, 2007.

RIAD, N. H.; TAHA, H. A.; MAHMOUD, Y. I. Effects of garlic on albino mice experimentally infected with *Schistosoma mansoni*: A parasitological and ultrastructural study. **Trop Biomed**, v. 26, n. 1, p. 40-50, 2009.

RISS, T. L. et al. Cell Viability Assays. In: SITTAMPALAM, G. S.; COUSSENS, N. P., et al (Ed.). **Assay Guidance Manual**. Internet ed. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2013.

ROCHA, G. B. et al. RM1: A reparameterization of AM1 for H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br, and I. **Journal of computational chemistry**, v. 27, n. 10, p. 1101-1111, 2006.

RODRIGUEZ, S. et al. Synthesis and Trypanocidal Properties of New Coumarin-Chalcone Derivatives. **Medicinal chemistry**, v. 5, p. 173-177, 2015.

- ROLLINGER, J. M.; LANGER, T.; STUPPNER, H. Integrated *in silico* tools for exploiting the natural products' bioactivity. **Planta Medica**, v. 72, n. 8, p. 671-678, 2006.
- ROSS, A. G. P. et al. Schistosomiasis. **New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 16, p. 1212-1220, 2002.
- ROUSSAKI, M. et al. Aurones: A Promising Heterocyclic Scaffold for the Development of Potent Antileishmanial Agents. **International Journal of Medicinal Chemistry**, v. 2012, 2012.
- ROUSSAKI, M. et al. Synthesis and anti-parasitic activity of a novel quinolinone–chalcone series. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 23, p. 6436-6441, 2013.
- SANDERSON, L.; BARTLETT, A.; WHITFIELD, P. *In vitro* and *in vivo* studies on the bioactivity of a ginger (*Zingiber officinale*) extract towards adult schistosomes and their egg production. **Journal of Helminthology**, v. 76, n. 3, p. 241-248, 2002.
- SANTOS, R. F. et al. Influence of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity on *Trypanosoma cruzi* infectivity and virulence. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 3, n. 3, p. e387, 2009.
- SARDA, S. R. et al. Solvent-free NaOH-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> supported synthesis of 1,3-diaryl-2-propene-1-ones. **International Journal of ChemTech Research**, v. 1, n. 2, p. 265-269, 2009.
- SASS, D. C. et al. Structurally modified natural sesquiterpene lactones constitute effective and less toxic schistosomicidal compounds. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 12, n. 40, p. 7957-7964, 2014.
- SCHOLTE, R. G. C. et al. Spatial distribution of *Biomphalaria* spp., the intermediate host snails of *Schistosoma mansoni*, in Brazil. **Geospatial Health**, v. 6, n. 3 SUPPL., p. S95-S101, 2012.
- SCHOLTE, R. G. C. et al. Predictive risk mapping of schistosomiasis in Brazil using bayesian geostatistical models. **Acta Tropica**, v. 132, n. 1, p. 57-63, 2014.
- SEKIZAKI, H. Synthesis of 2-Benzylidene-3(2H)-benzofuran-3-ones (Aurones) by Oxidation of 2'-Hydroxychalcones with Mercury(II) Acetate. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 61, n. 4, p. 1407-1409, 1988.
- SHIN, S. Y. et al. Synthesis of aurones and their inhibitory effects on nitric oxide and PGE<sub>2</sub> productions in LPS-induced RAW 264.7 cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, p. 4520–4523, 2011a.
- SHIN, S. Y. et al. Synthesis of aurones and their inhibitory effects on nitric oxide and PGE<sub>2</sub> productions in LPS-induced RAW 264.7 cells. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 15, p. 4520-4523, 2011b.
- SILVA, M. P. N. et al. Antischistosomal activity of the terpene nerolidol. **molecules**, v. 19, n. 3, p. 3793-3803, 2014.

SILVEIRA, L. S. **Síntese e avaliação da atividade esquistossomícida de chalconas e auronas frente a vermes adultos de *Schistosoma mansoni***. 2013. 183 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.

SIM, H.-M. et al. Dimethoxyaurones: Potent inhibitors of ABCG2 (breast cancer resistance protein). **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 35, n. 4, p. 293-306, 2008.

SMITHERS, S.; TERRY, R. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. **Parasitology**, v. 55, n. 04, p. 695-700, 1965.

SOUARD, F. et al. 1-Azaaurones derived from the naturally occurring aurones as potential antimalarial drugs. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 15, p. 5724-5731, 2010.

TAUSSKY, H. H.; SHORR, E.; KURZMANN, G. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 202, p. 675-685, 1953.

TIWARI, K. N. et al. Synthesis and structural characterization of ferrocenyl-substituted aurones, flavones, and flavonols. **Organometallics**, v. 30, n. 20, p. 5424-5432, 2011.

TIWARI, K. N. et al. *In vitro* inhibitory properties of ferrocene-substituted chalcones and aurones on bacterial and human cell cultures. **Dalton Transactions**, v. 41, n. 21, p. 6451-6457, 2012.

TONIN, A. A. et al. Biochemical detection of enzymes NTPDase in tachyzoites of *Toxoplasma gondii* and possible functional correlations. **Comparative Clinical Pathology**, 2014.

UTZINGER, J. et al. From innovation to application: Social–ecological context, diagnostics, drugs and integrated control of schistosomiasis. **Acta Tropica**, v. 120, Supplement 1, n. 0, p. S121-S137, 2011.

VALENTIM, C. L. L. et al. Genetic and molecular basis of drug resistance and species-specific drug action in Schistosome parasites. **Science**, v. 342, n. 6164, p. 1385-1389, 2013.

VAN DE WATERBEEMD, H.; GIFFORD, E. ADMET *in silico* modelling: towards prediction paradise? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 3, p. 192-204, 2003.

VENKATESWARLU, S. et al. Synthesis, structural revision, and biological activities of 4'-chloroaurone, a metabolite of marine brown alga *Spatoglossum variabile*. **Tetrahedron**, v. 63, n. 29, p. 6909-6914, 2007.

VOGEL, S.; HEILMANN, J. Synthesis, cytotoxicity, and antioxidative activity of minor prenylated chalcones from *Humulus lupulus*. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 7, p. 1237-1241, 2008.

WHO. Preventive chemotherapy in human helminthiasis: coordinated use of anthelmintic drugs in control interventions: a manual for health professionals and programme managers. **Geneva (Switzerland): World Health Organization**, 2006.

\_\_\_\_\_. Schistosomiasis: progress report 2001 - 2011, strategic plan 2012 - 2020. **Geneva (Switzerland): World Health Organization**, 2013.

\_\_\_\_\_. Schistosomiasis. **Geneva (Switzerland): World Health Organization**, 2016.  
Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/> >. Acesso em: 11/03/16.

ZHANG, M. et al. Synthesis and herbicidal potential of substituted aurones. **Pest Management Science**, v. 68, n. 11, p. 1512-22, Nov 2012.

ZHANG, S. M.; COULTAS, K. A. Identification of plumbagin and sanguinarine as effective chemotherapeutic agents for treatment of schistosomiasis. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 3, p. 28-34, 2013.

ZHAO, Y. H. et al. Rate-limited steps of human oral absorption and QSAR studies. **Pharmaceutical research**, v. 19, n. 10, p. 1446-1457, 2002.

ZIMMERMANN, H.; ZEBISCH, M.; STRÄTER, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. **Purinergic signalling**, v. 8, n. 3, p. 437-502, 2012.

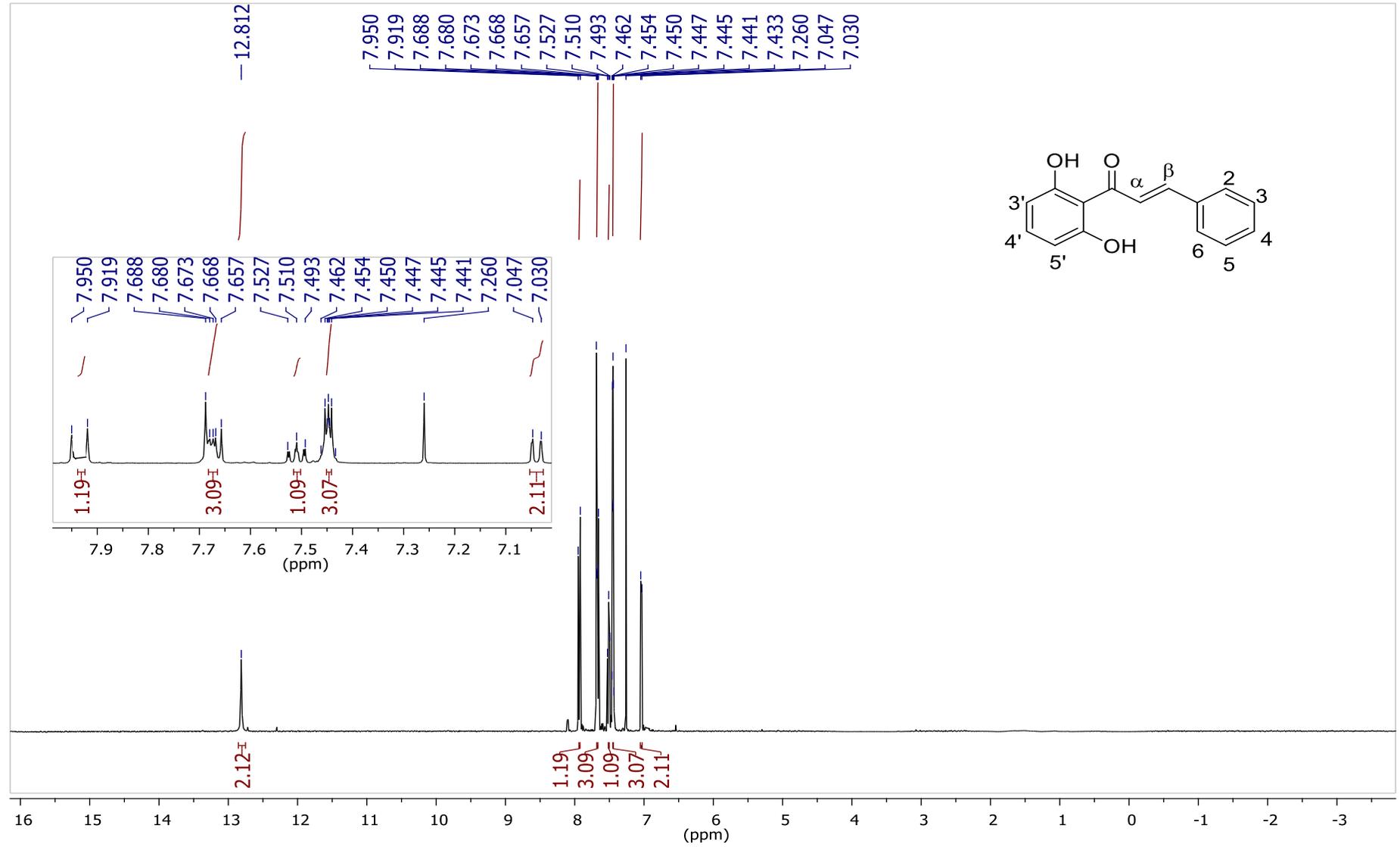
ZOU, G. et al. Heck-type coupling vs. conjugate addition in phosphine-rhodium catalyzed reactions of aryl boronic acids with  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl compounds: A systematic investigation. **Dalton Transactions**, n. 28, p. 3055-3064, 2007.

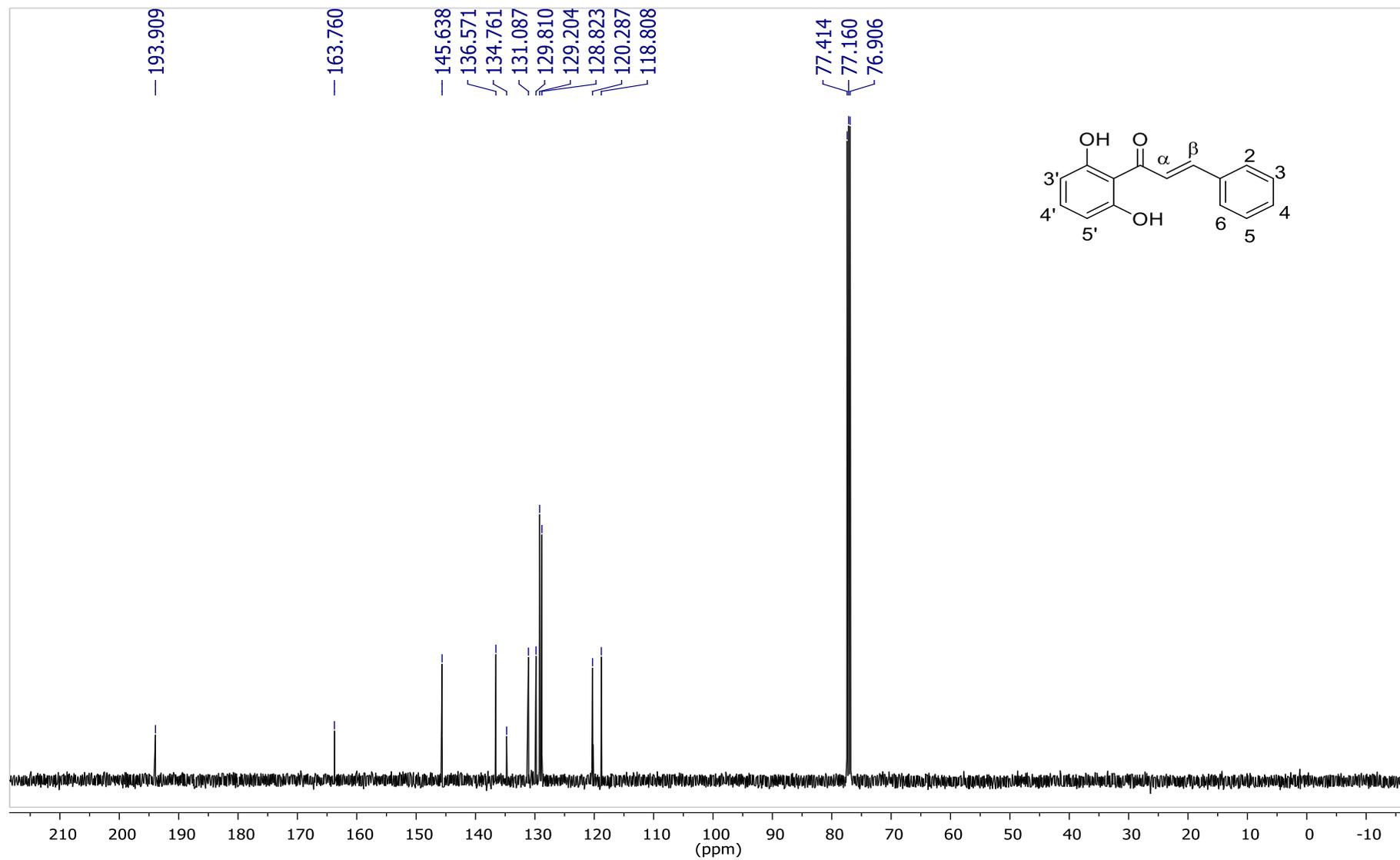
ZWERGEL, C. et al. Aurones: interesting natural and synthetic compounds with emerging biological potential. **Natural product communications**, v. 7, n. 3, p. 389-394, 2012.

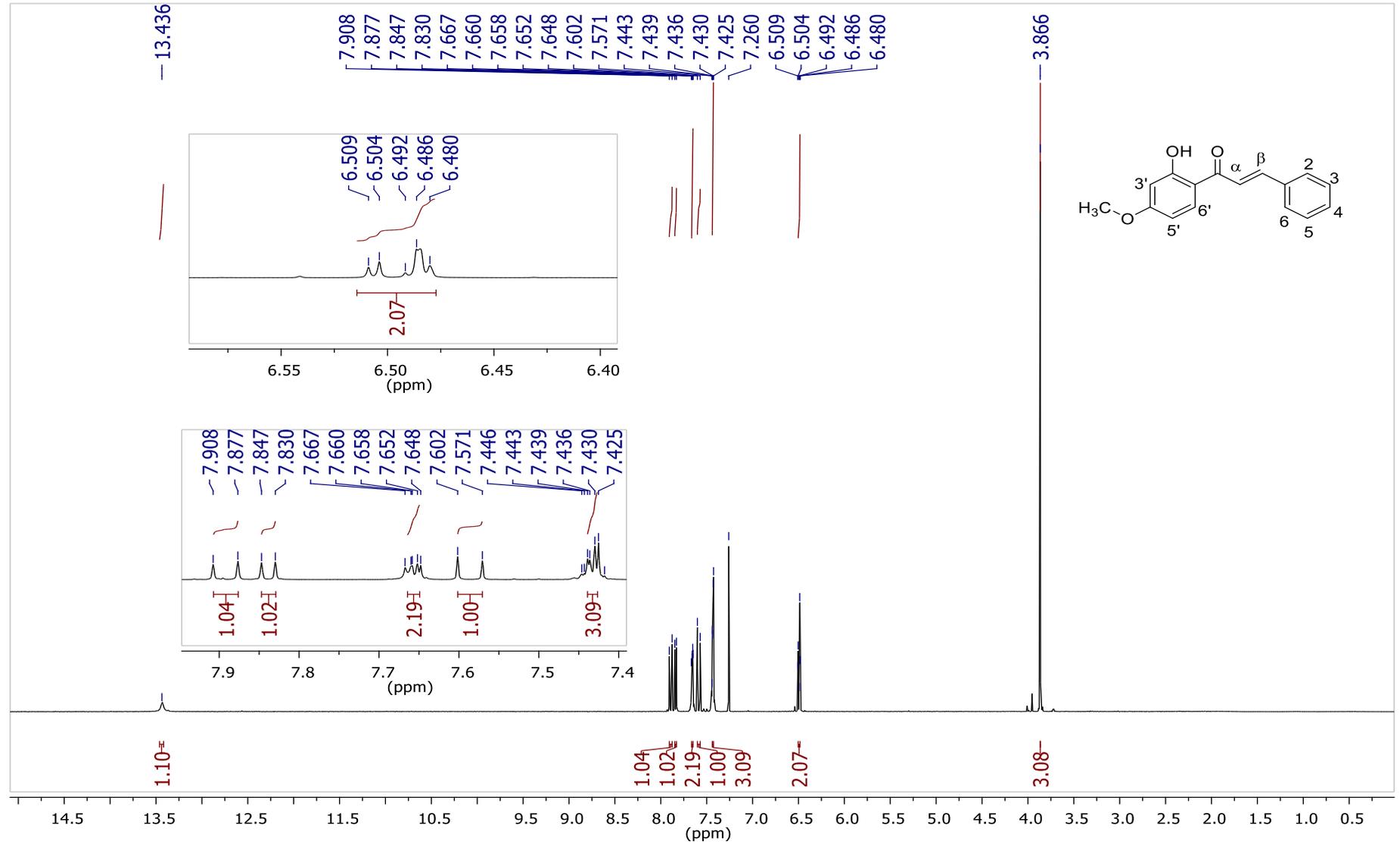
## APÊNDICE

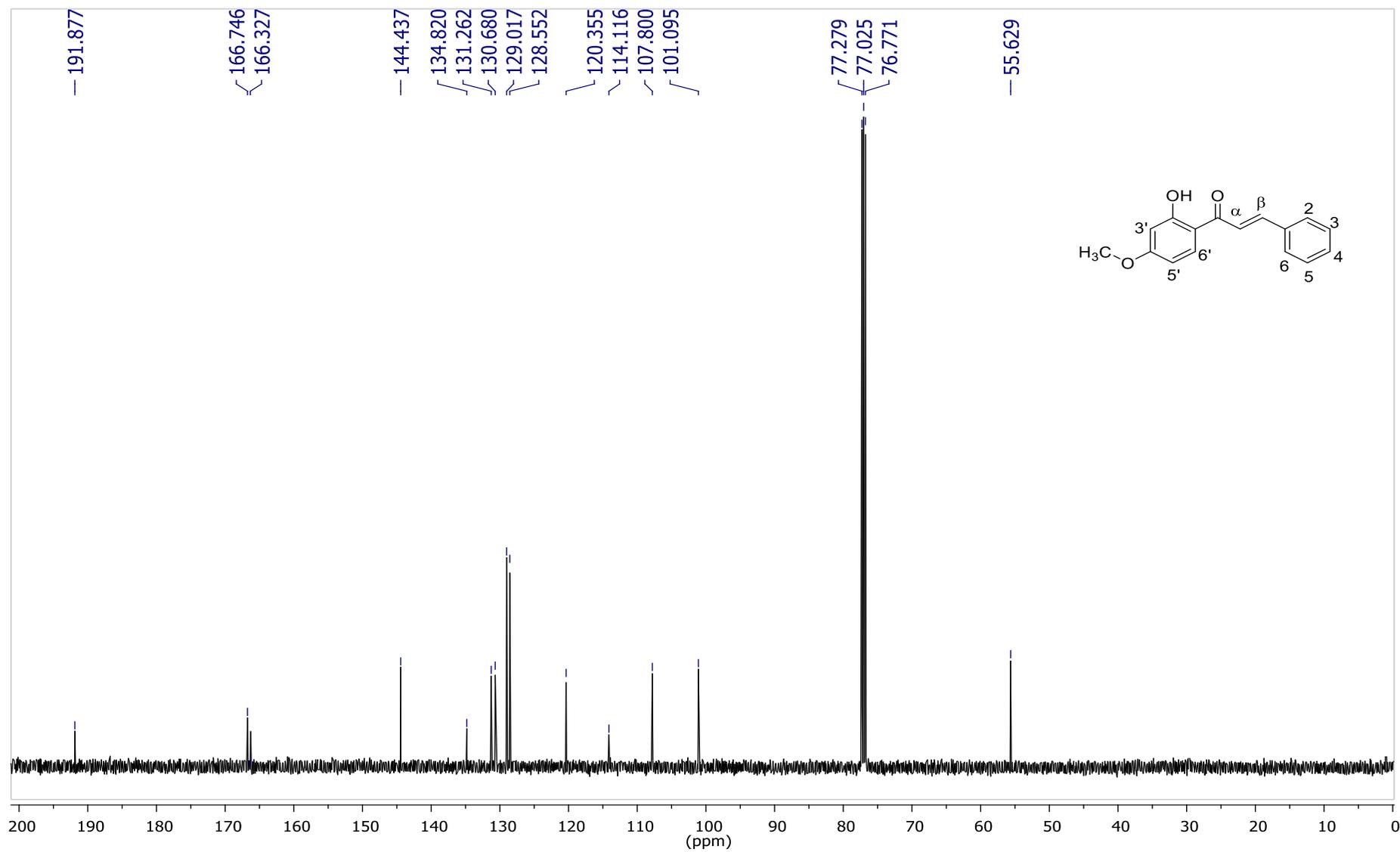
### APÊNDICE A

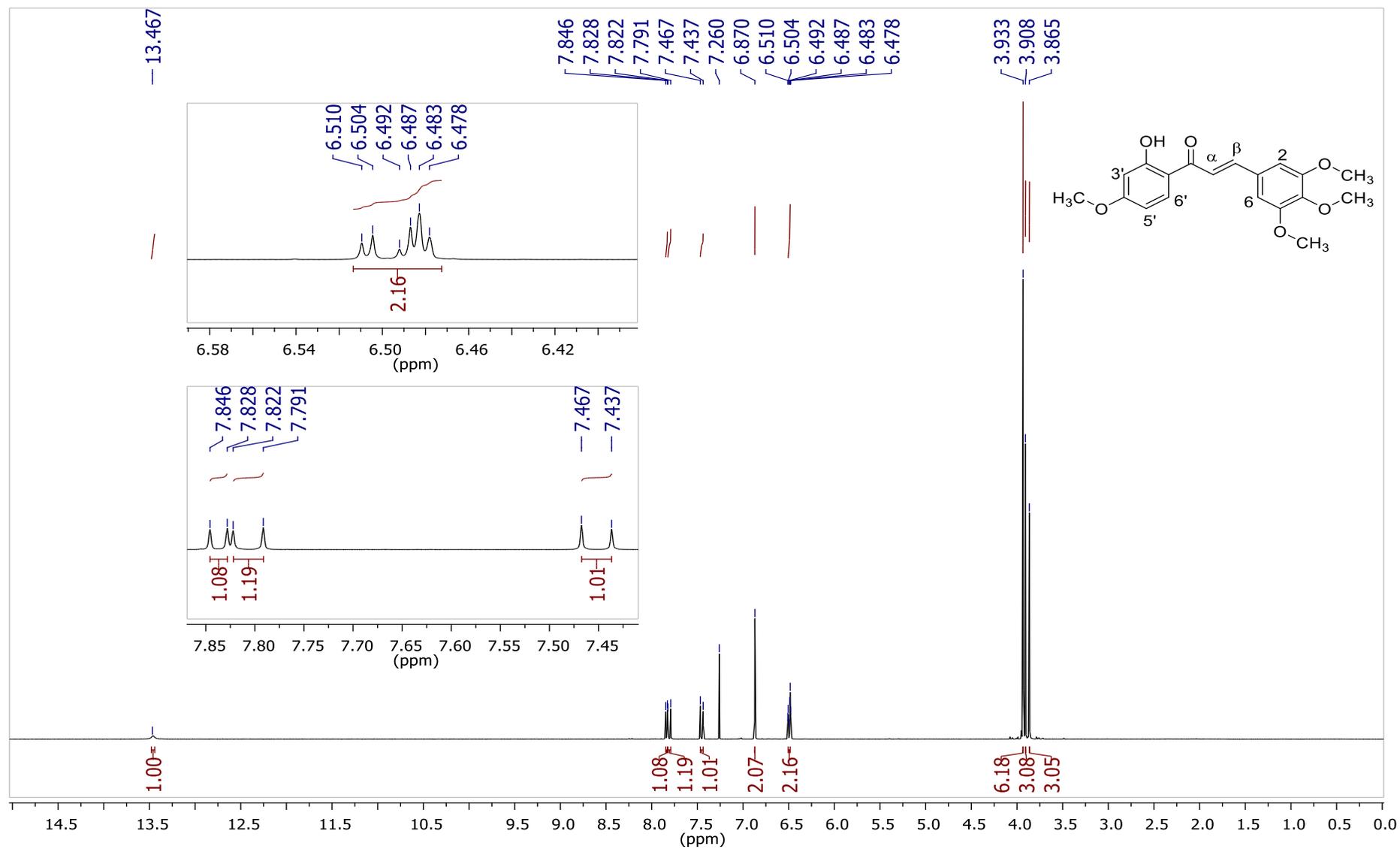
ESPECTROS DE RMN DE  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) E  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) DAS  
CHALCONAS E AURONAS

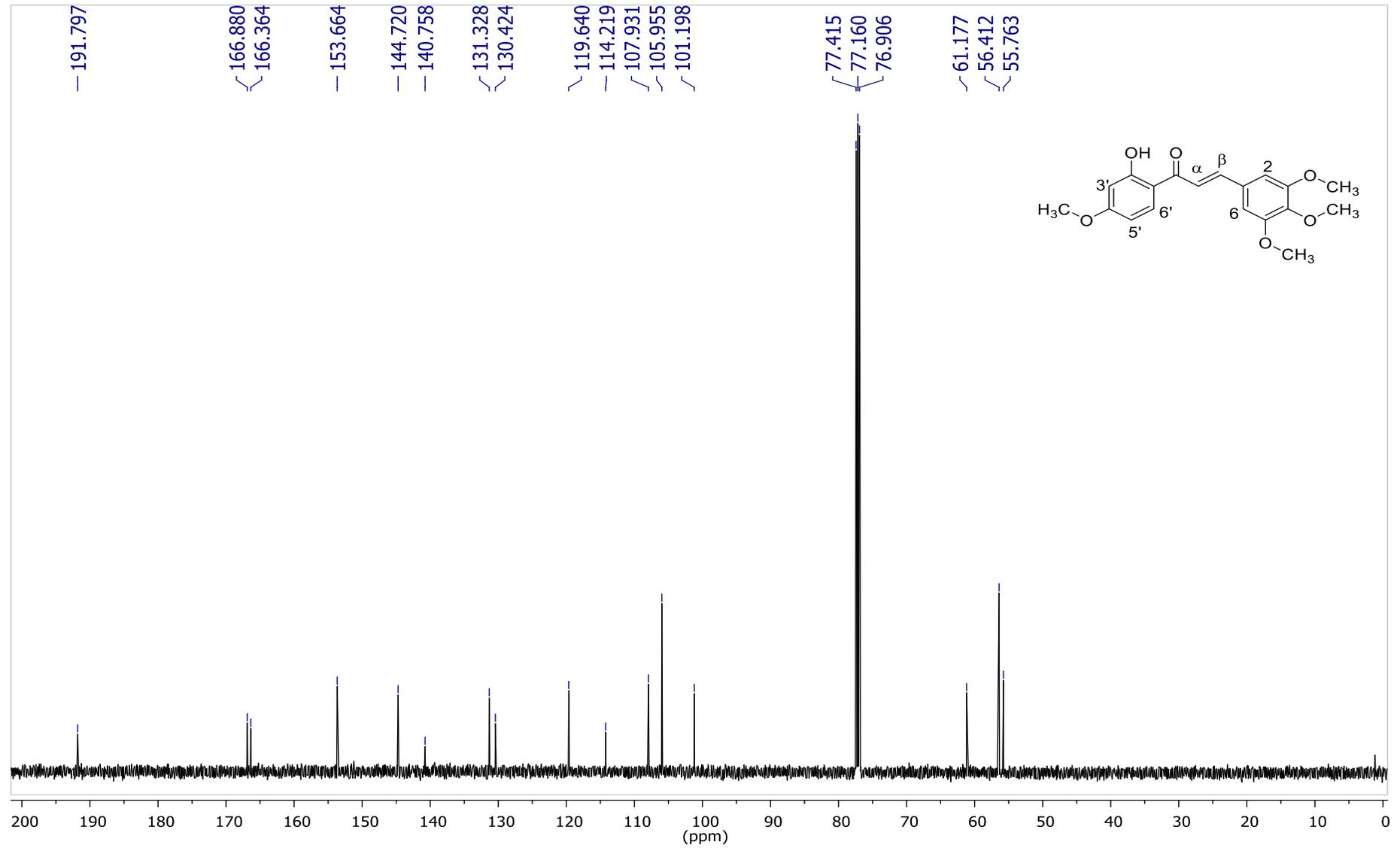
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) da chalcona **VR1**

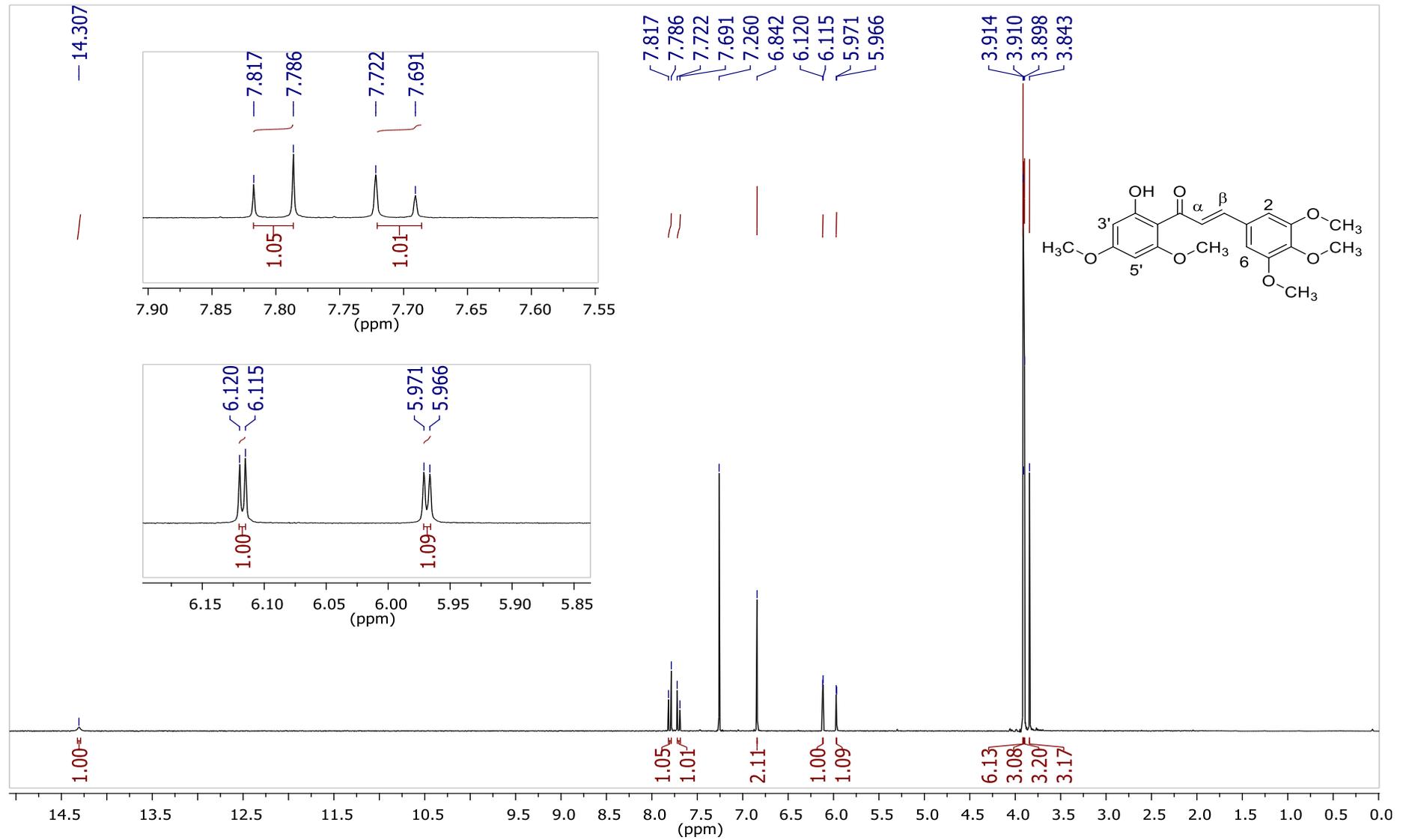
Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) da chalcona **VR1**

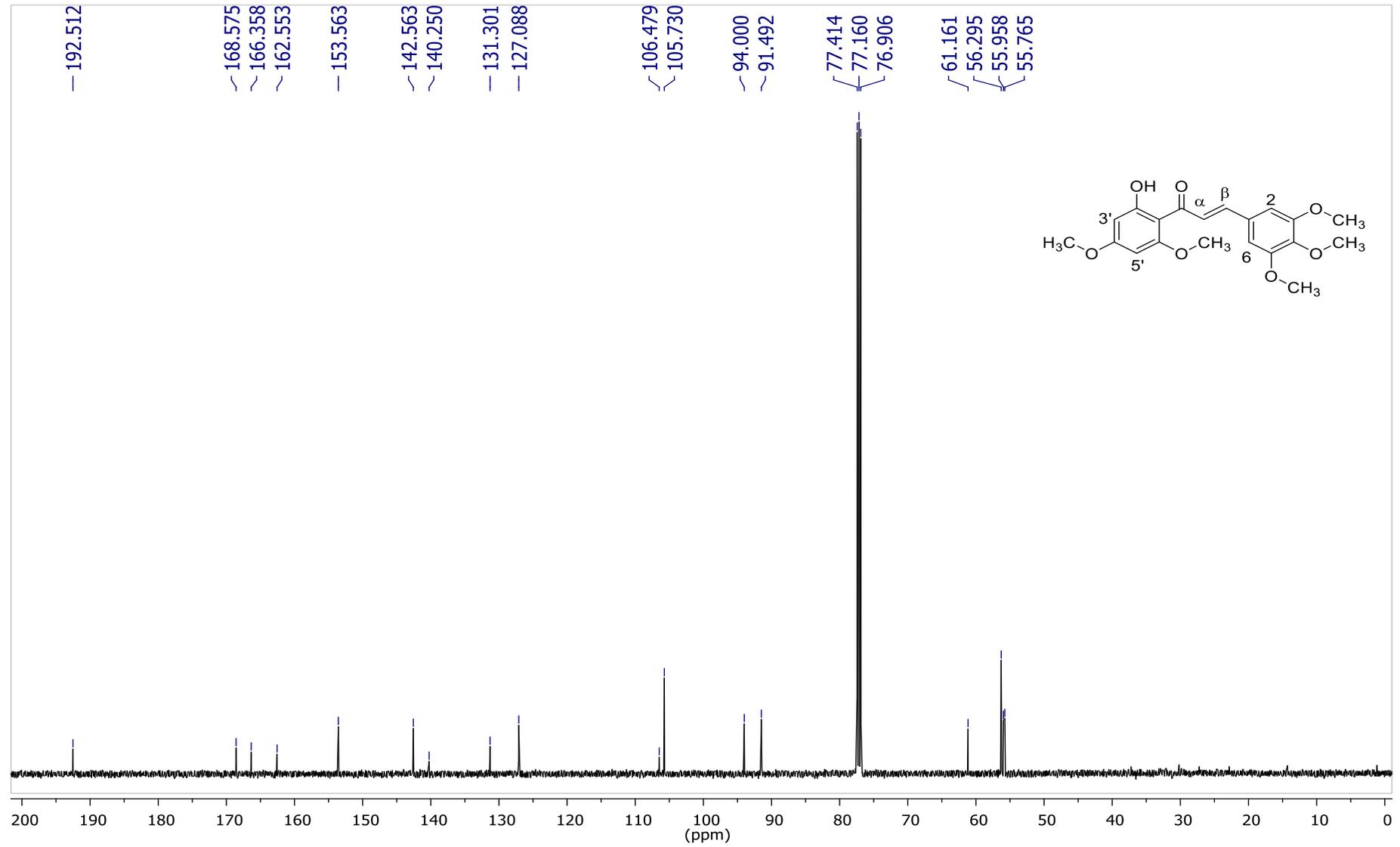
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) da chalcona **VR2**

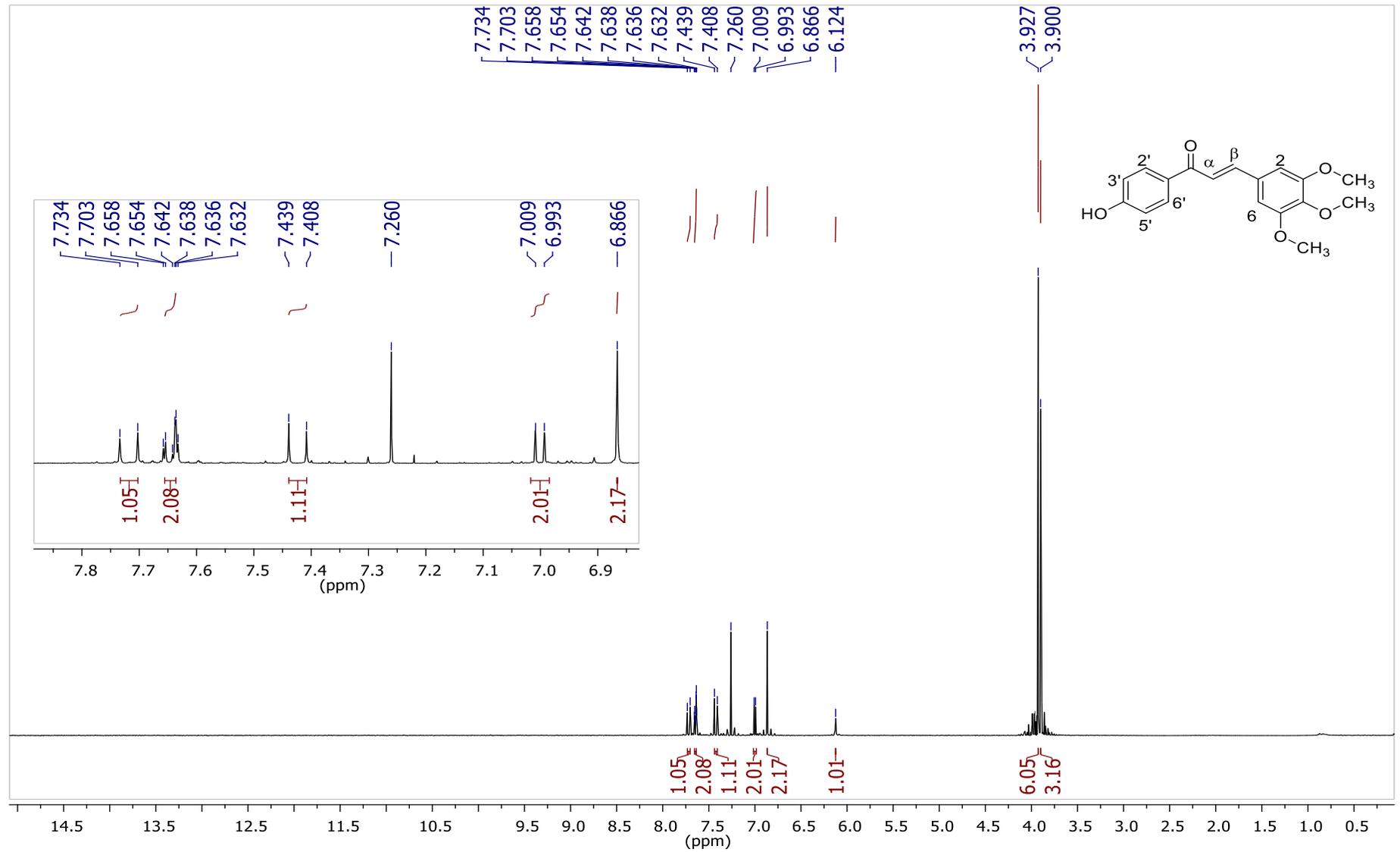
Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) da chalcona **VR2**

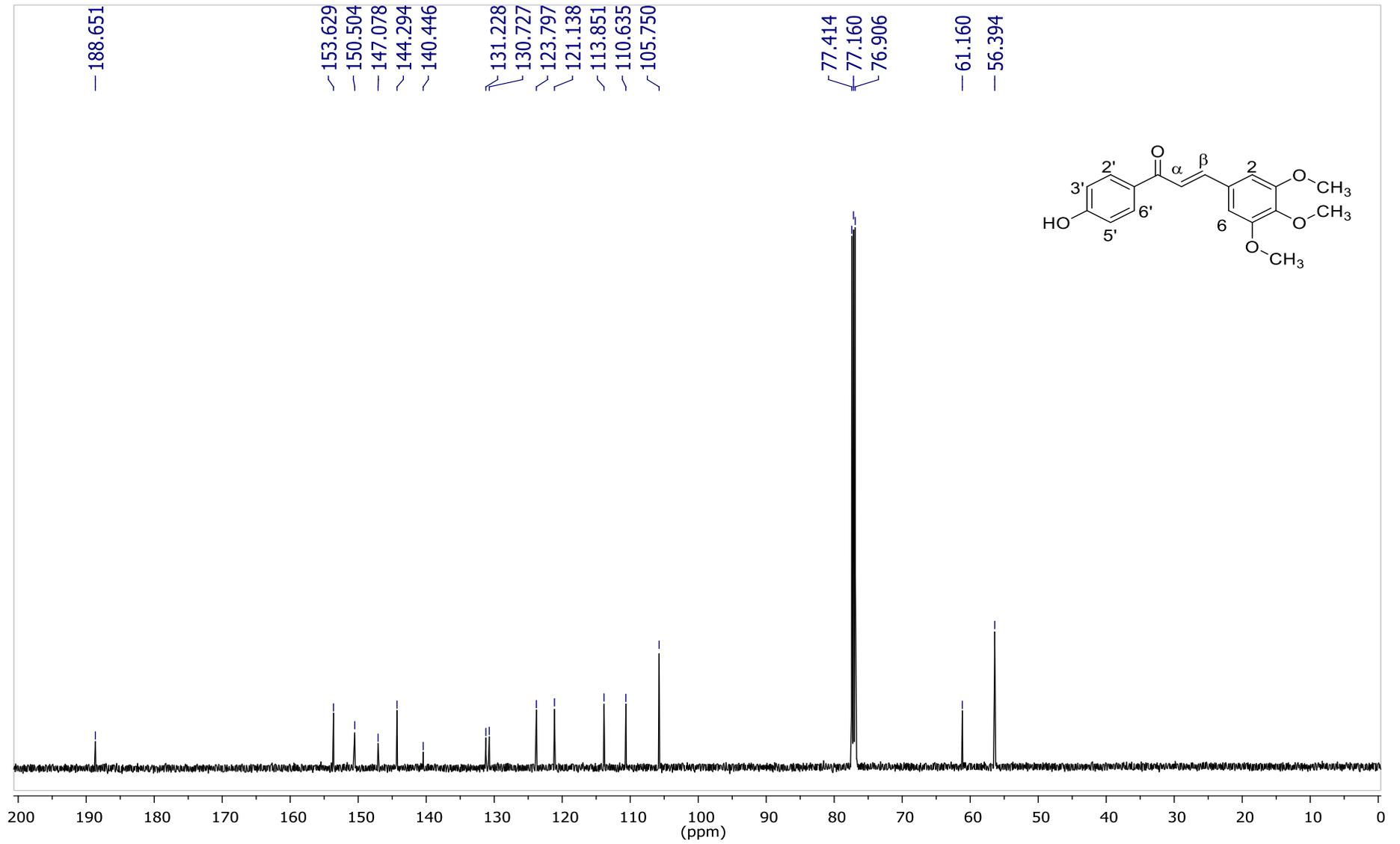
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) da chalcona **VR4**

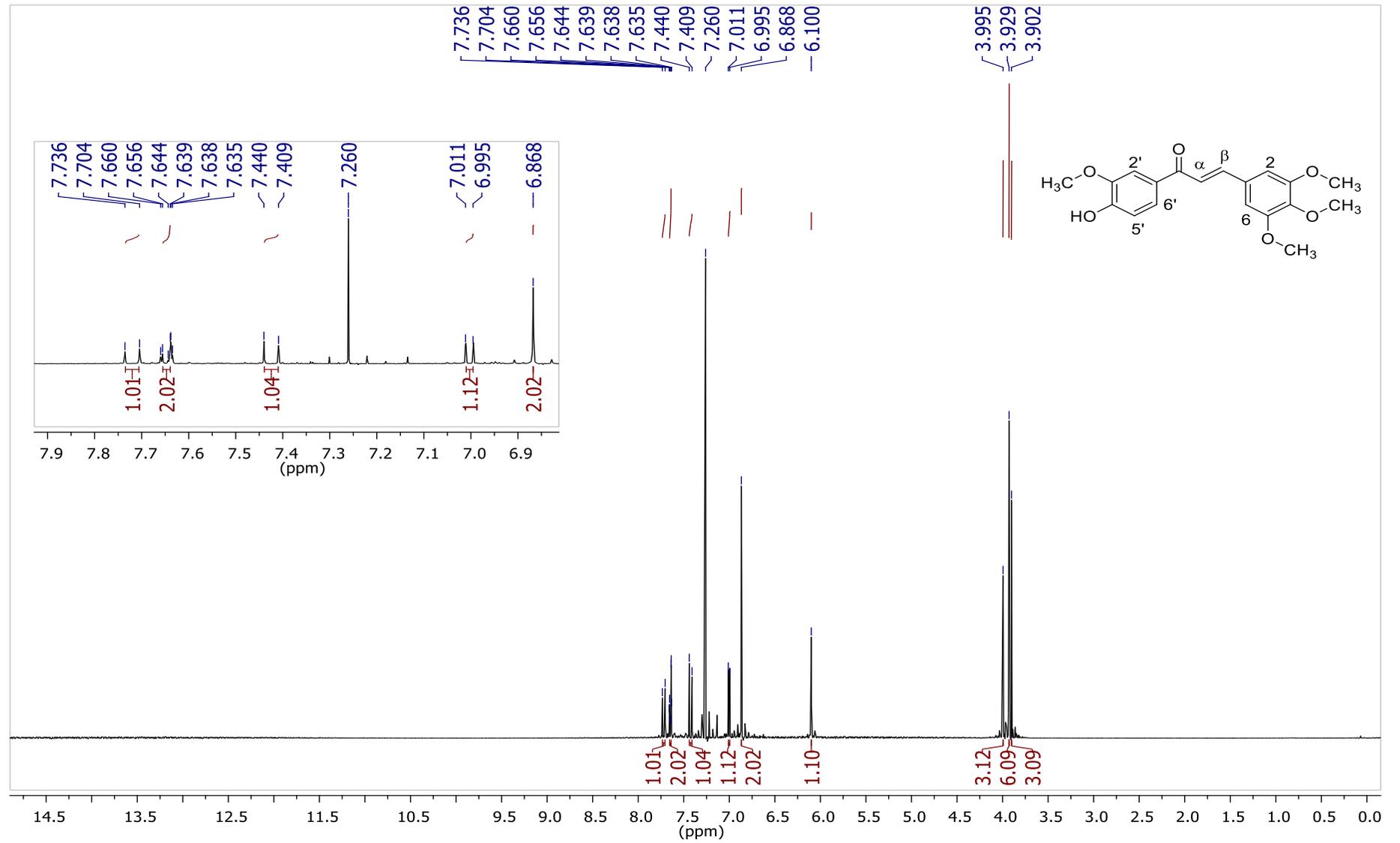
Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) da chalcona **VR4**

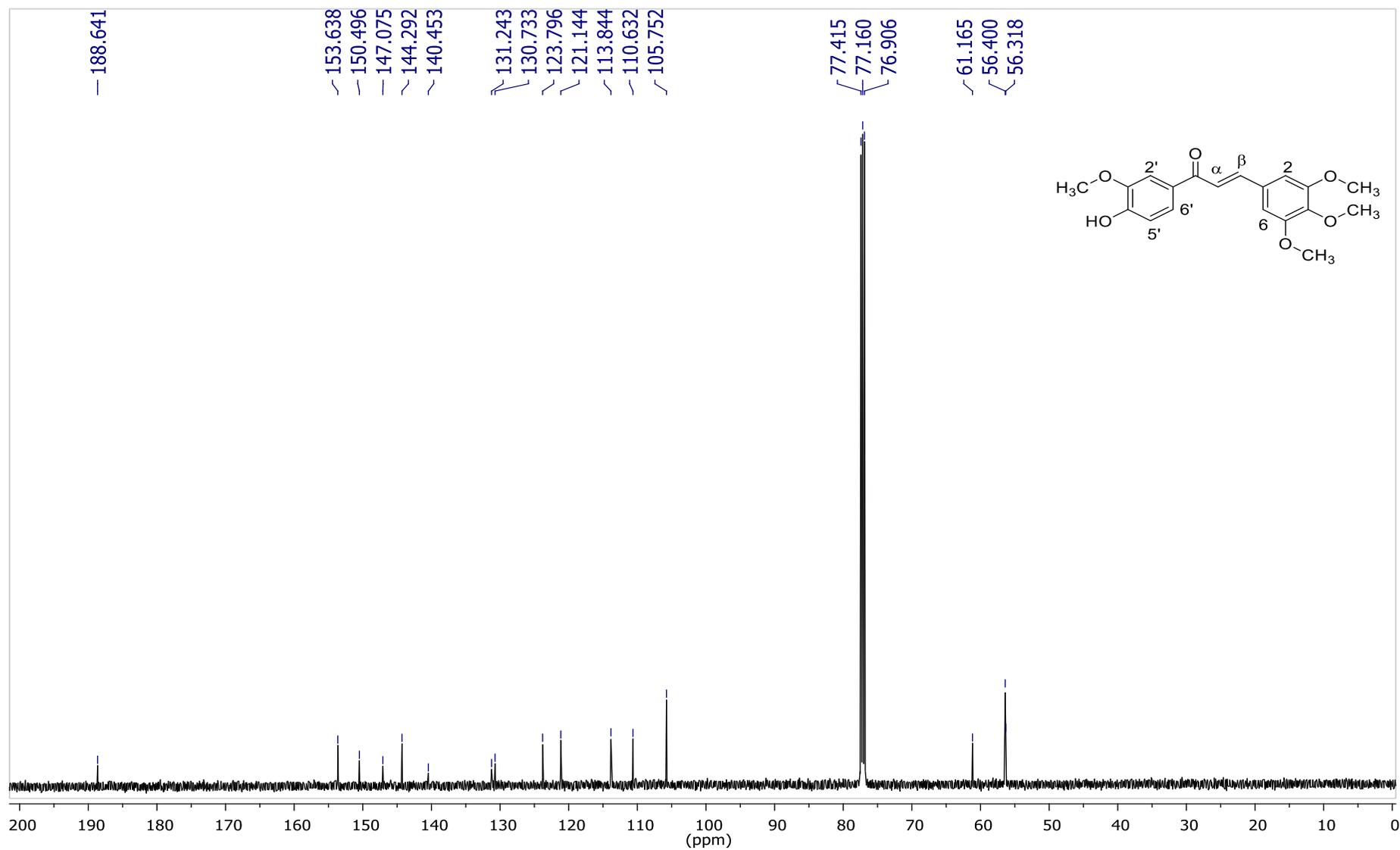
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) da chalcona **VR5**

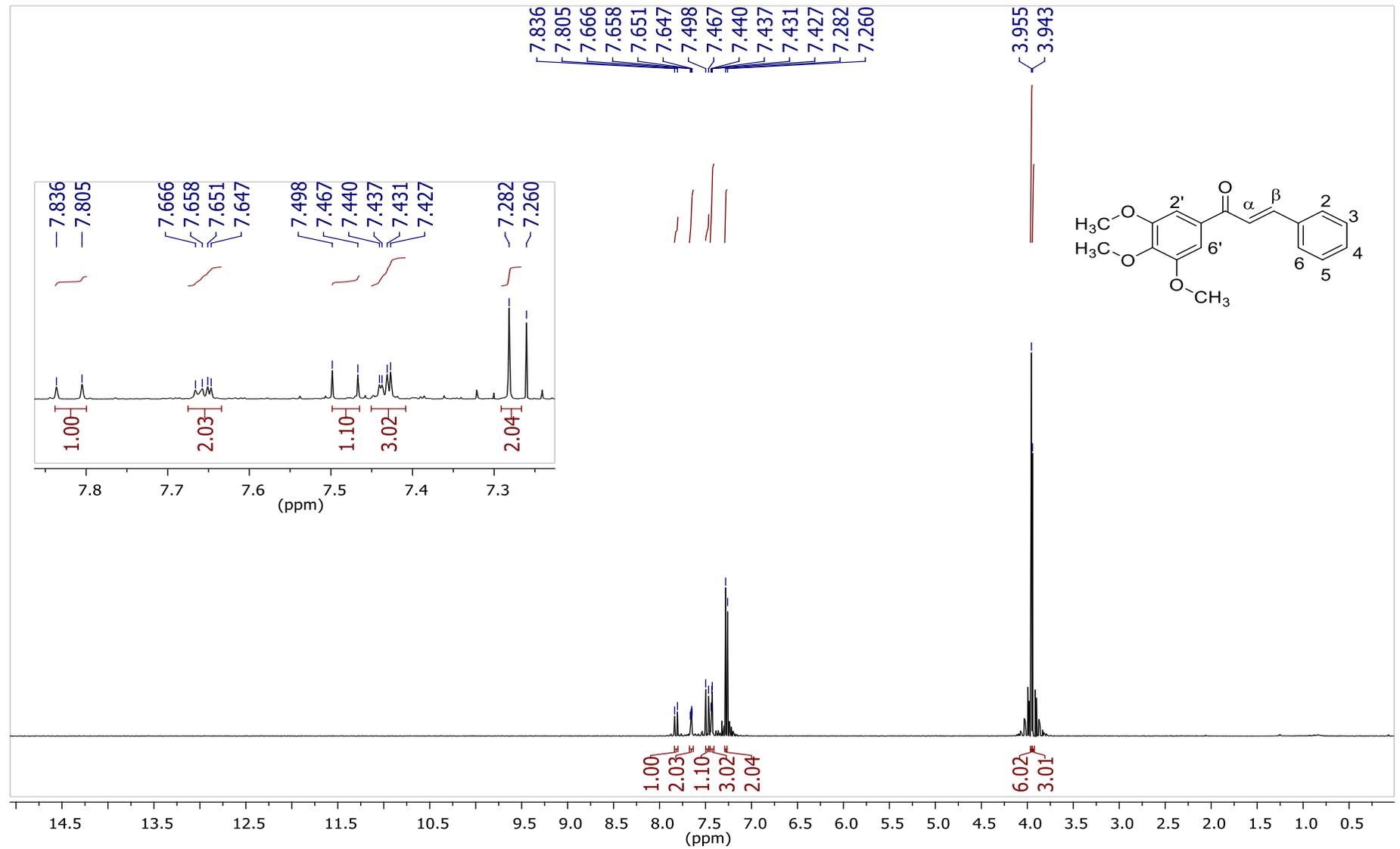
Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) da chalcona **VR5**

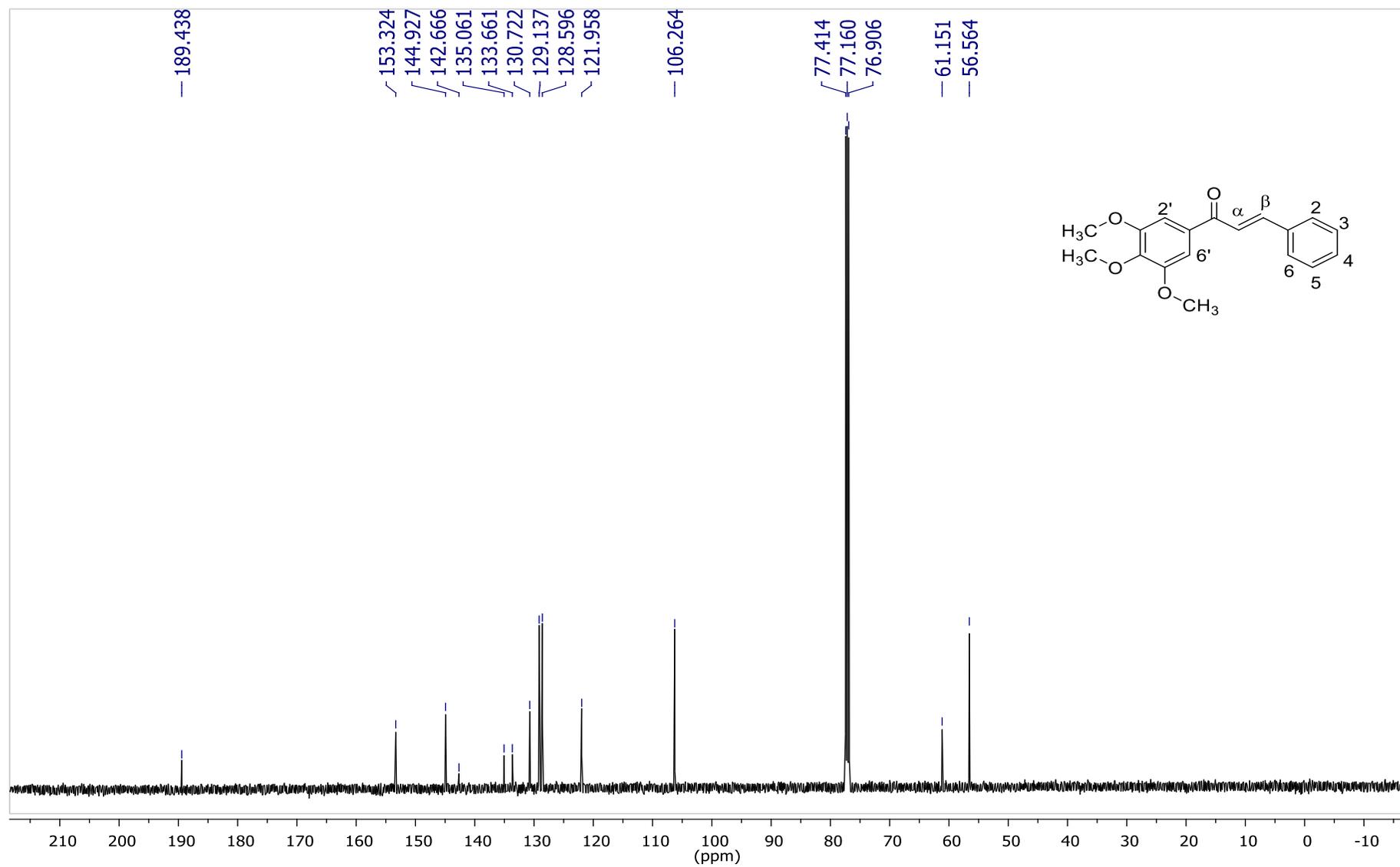
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) da chalcona **VR6**

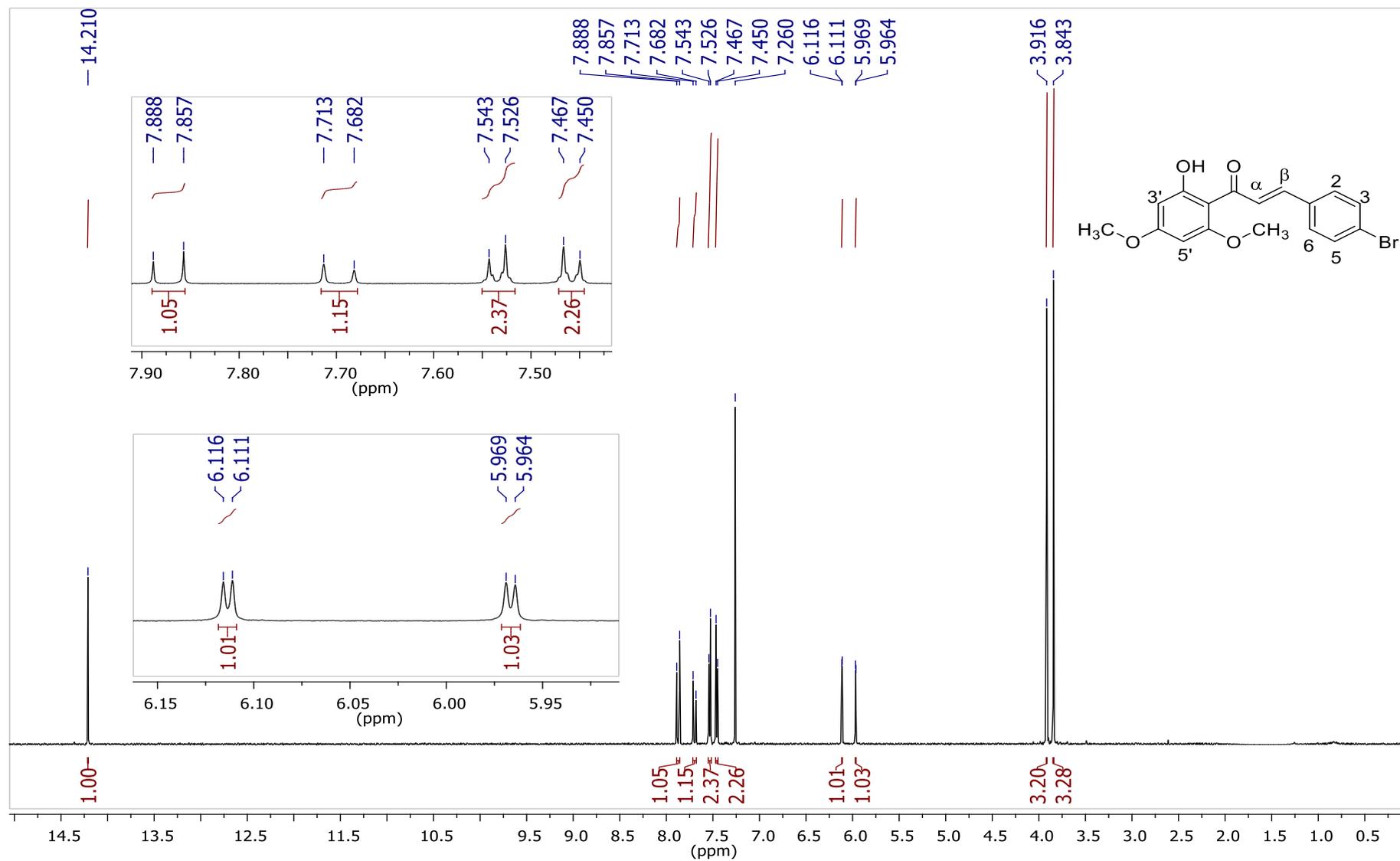
Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) da chalcona **VR6**

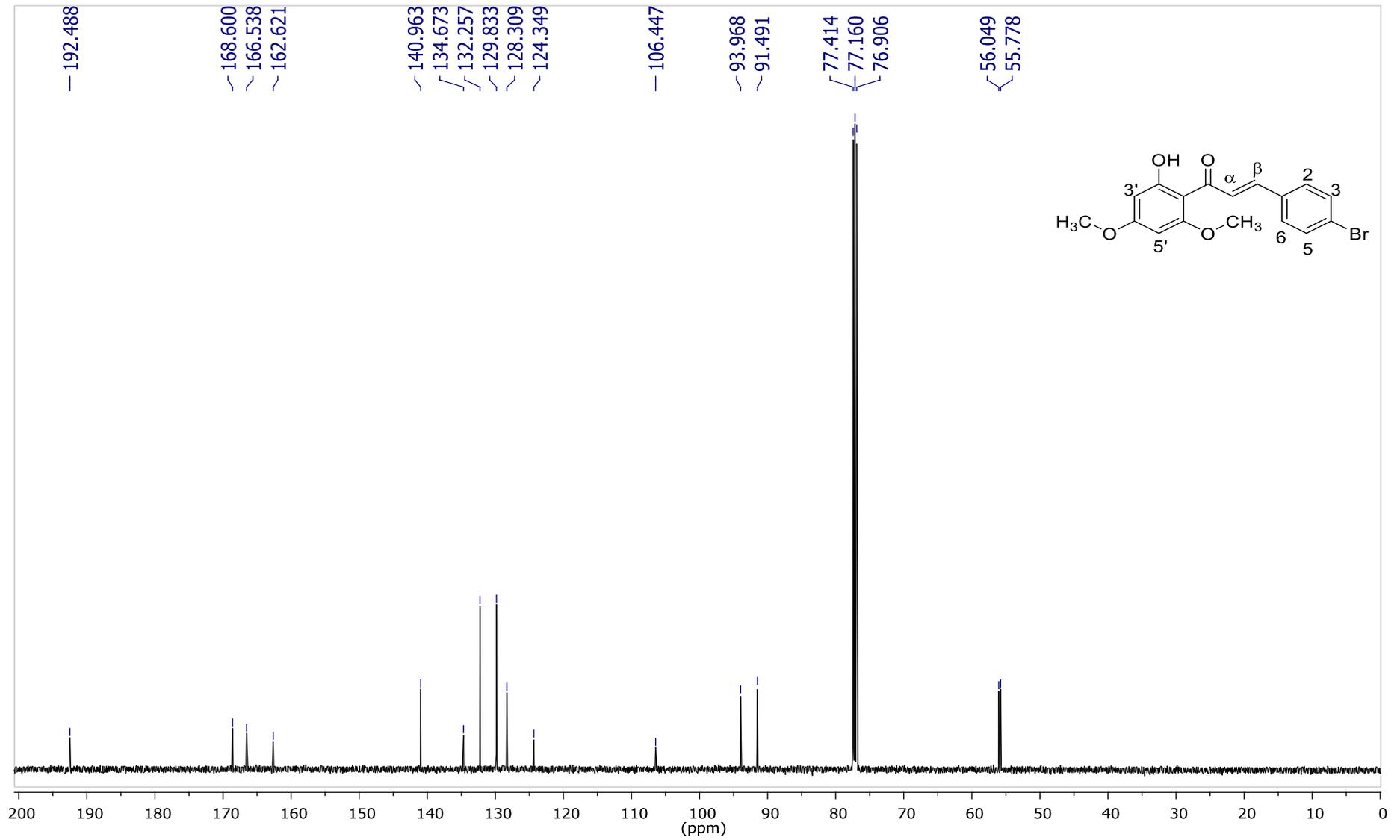
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) da chalcona **VR7**

Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) da chalcona **VR7**

Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) da chalcona **VR8**

Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) da chalcona **VR8**

Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) da chalcona **VR11**

Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) da chalcona **VR11**

— 192.488

~ 168.600

~ 166.538

~ 162.621

~ 140.963

/ 134.673

/ 132.257

/ 129.833

~ 128.309

~ 124.349

— 106.447

~ 93.968

~ 91.491

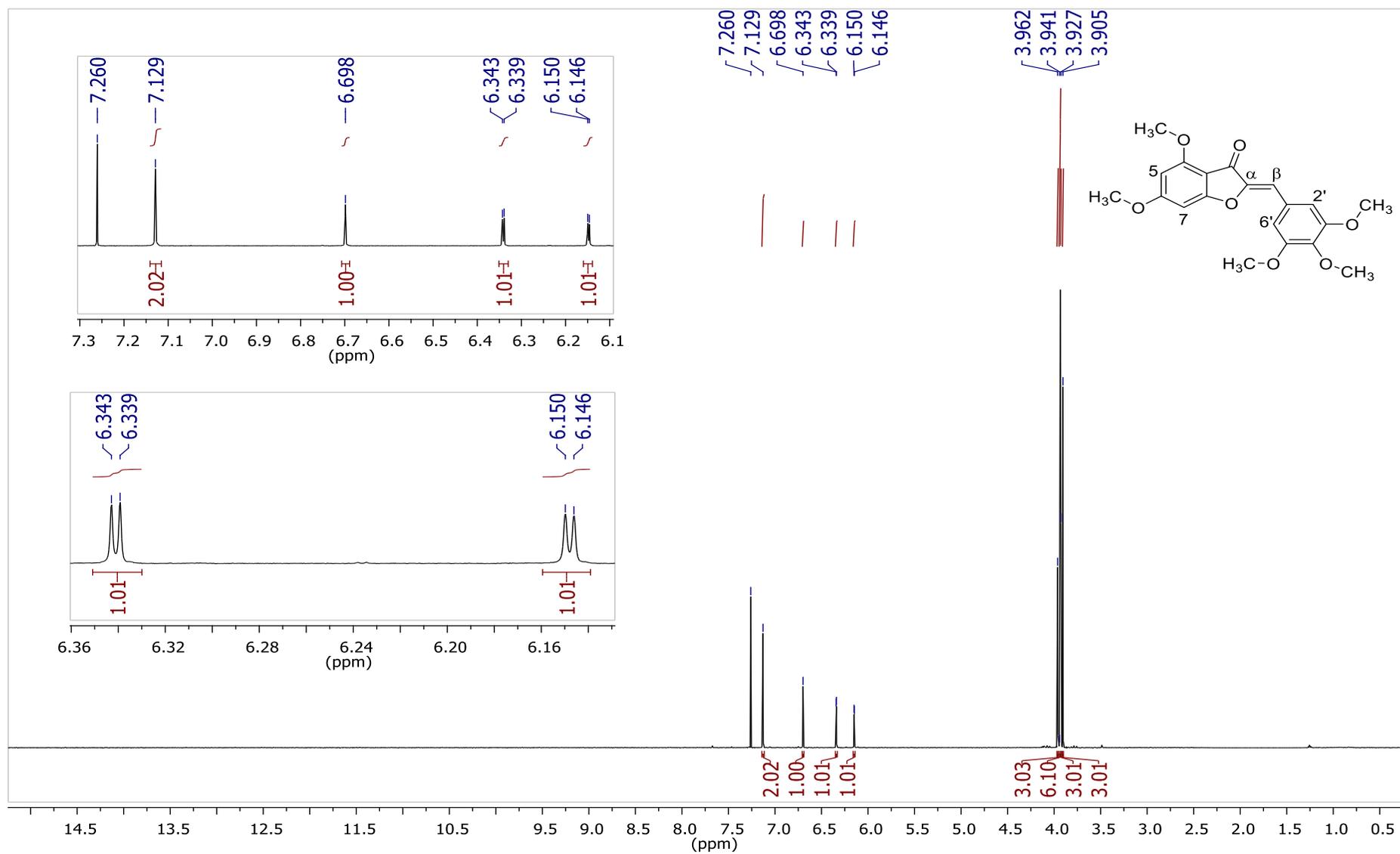
77.414

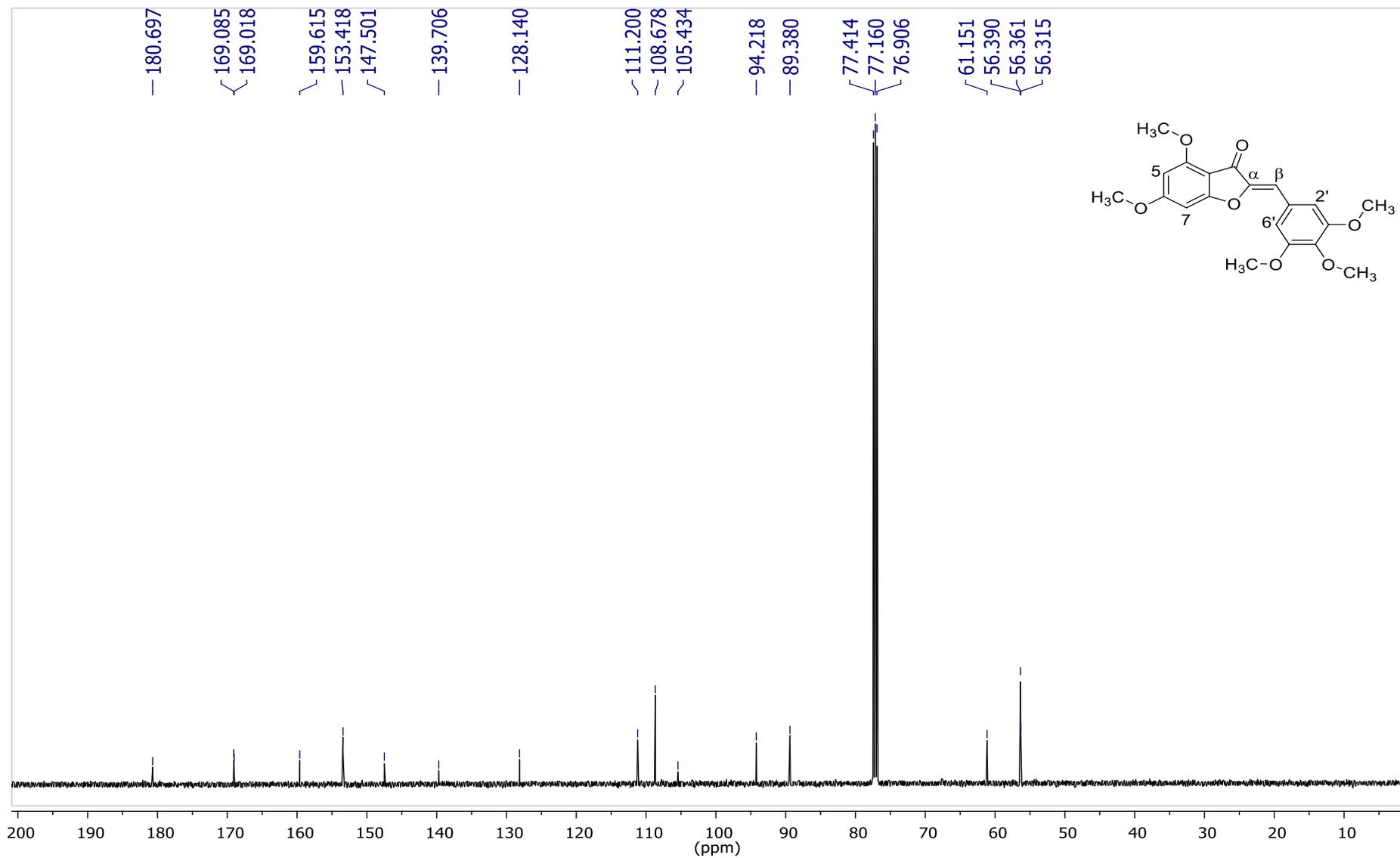
77.160

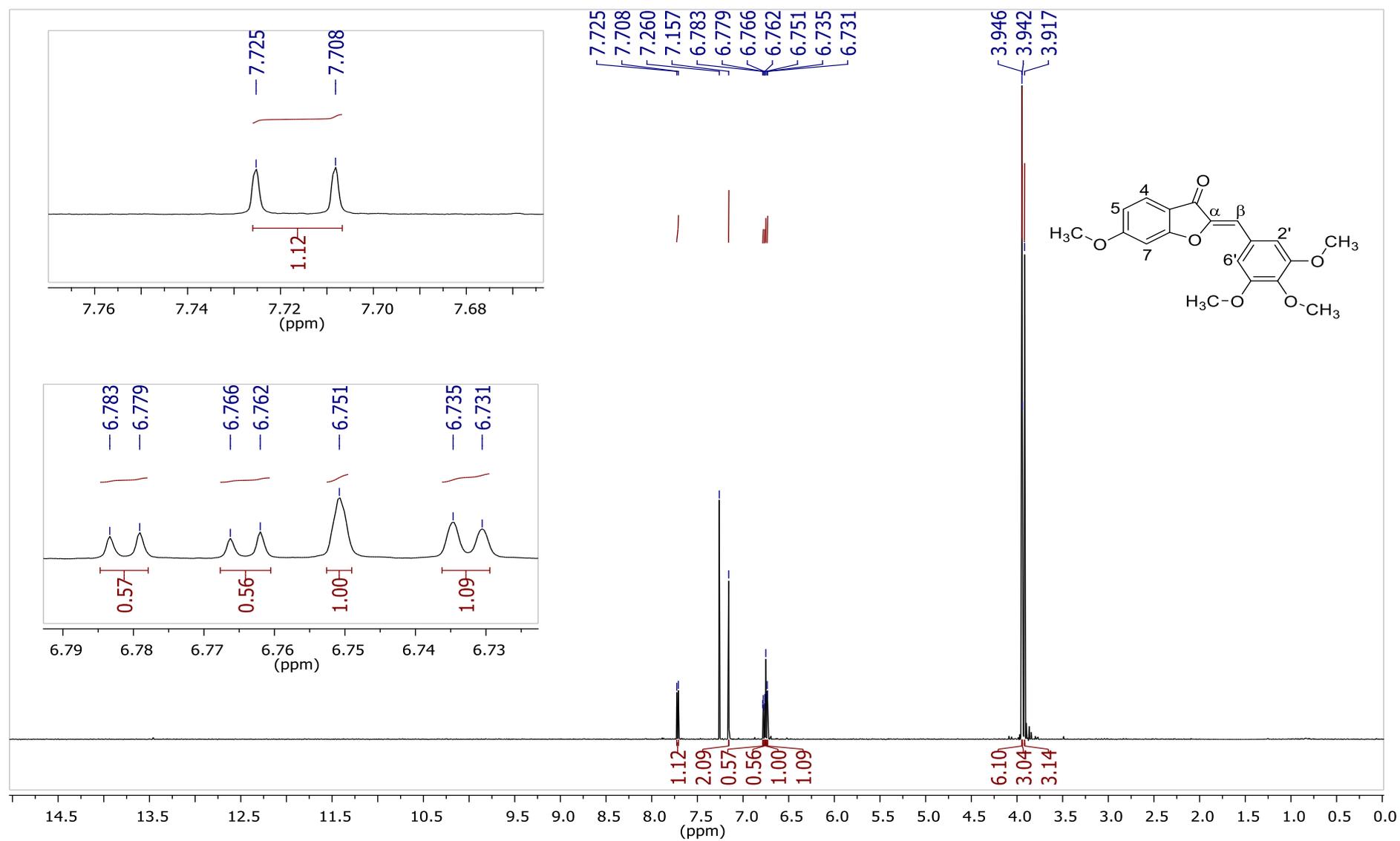
76.906

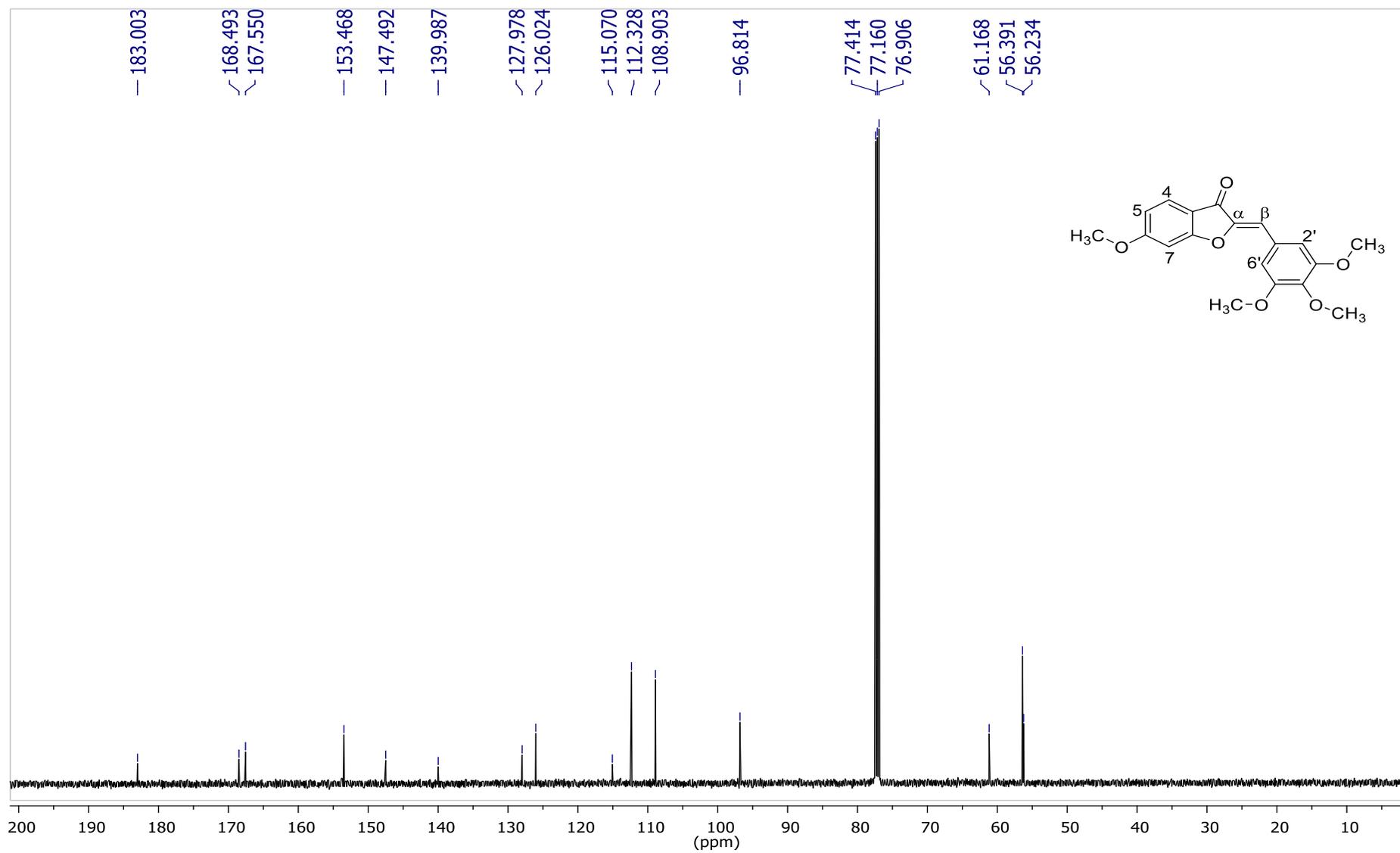
56.049

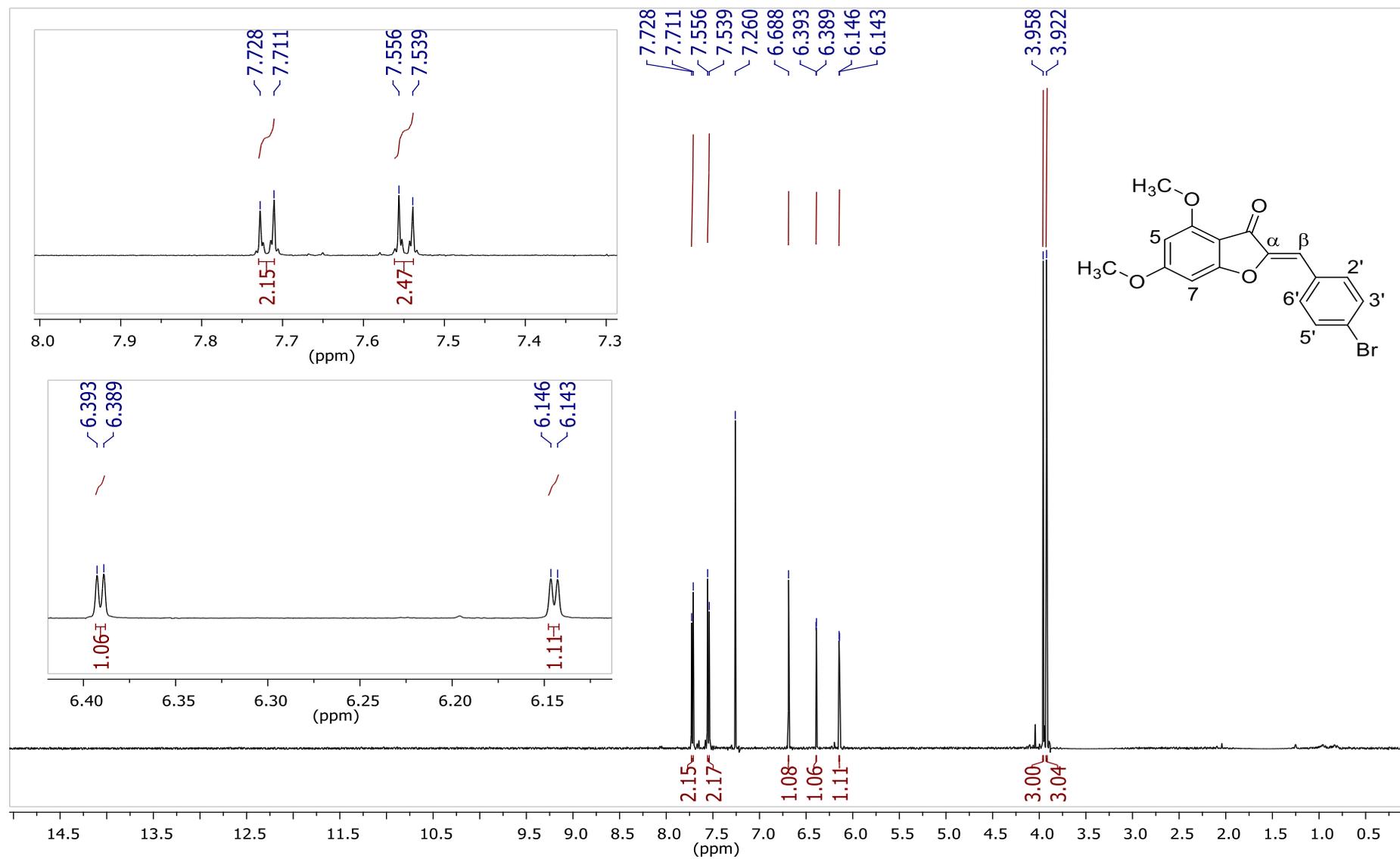
55.778

Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) da aurona **VR9**

Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) da aurona **VR9**

Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) da aurona **VR10**

Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) da aurona **VR10**

Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) da aurona **VR13**

Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) da aurona **VR13**