



UFG

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO FARMACÊUTICA**

MARCELO DO NASCIMENTO GOMES

**Planejamento, síntese guiada por QSAR, avaliação biológica e
modelagem molecular de chalconas com atividade
antituberculose**

**Goiânia
2017**

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☐ Dissertação ☒ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Nome completo do autor: Marcelo do Nascimento Gomes

Título do trabalho: Planejamento, síntese guiada por QSAR, avaliação biológica e modelagem molecular de chalconas com atividade antituberculose

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Marcelo do Nascimento Gomes
Assinatura do (a) autor (a)

Data: 22 / 05 / 2017

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

MARCELO DO NASCIMENTO GOMES

**Planejamento, síntese guiada por QSAR, avaliação biológica
e modelagem molecular de chalconas com atividade
antituberculose**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica da
Universidade Federal de Goiás para obtenção do
Título de Doutor em Inovação Farmacêutica.

Orientadora: Profa. Dra. Carolina Horta Andrade
Co-orientador: Prof. Dr. Guilherme Roberto Oliveira

**Goiânia
2017**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Gomes, Marcelo do Nascimento

Planejamento, síntese guiada por QSAR, avaliação biológica e
modelagem molecular de chalconas com atividade antituberculose
[manuscrito] / Marcelo do Nascimento Gomes. - 2017.
xxxii, 230 f.

Orientador: Profa. Dra. Carolina Horta Andrade; co-orientador Dr.
Guilherme Roberto de Oliveira.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade
Farmácia (FF), Programa de Pós-Graduação em Inovação
Farmacêutica, Goiânia, 2017.

Bibliografia. Anexos.

Inclui abreviaturas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Planejamento racional. 2. Tuberculose. 3. QSAR. 4.
Nitroeteroaril chalconas. 5. Seletividade. I. Andrade, Carolina Horta,
orient. II. Título.

CDU 615.1



Ministério da Educação
Universidade Federal de Goiás
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica
UFG/UFAM/UNIFAP/UFPA

ATA DA SEÇÃO PÚBLICA DE DEFESA DE TESE

Aluno (a): Marcelo do Nascimento Gomes

Orientador (a): Profª. Drª. Carolina Horta Andrade

Título da Dissertação: "Planejamento, síntese guiada por QSAR, avaliação biológica e modelagem molecular de chalconas com atividade antituberculose".

Data: 06/04/2017

Horário: 13:30 horas

Local: Mini auditório da Faculdade de Farmácia/UFG

Sugestões*:

*Obs: sugestão de alteração de título da dissertação deve ser acompanhada de justificativa.

Parecer da Banca Examinadora

Membro	Aprovado/ Reprovado	Assinatura
Profª. Drª. Carolina Horta Andrade (FF/UFG) <i>Presidente</i>	Aprovado	
Profª. Drª. Valéria de Oliveira (FF/UFG)	Aprovado	
Prof. Dr. Luiz Antônio Soares Romeiro (UNB)	Aprovado	
Prof. Dr. Luciano Moraes Lião (IQ/UFG)	Aprovado	
Prof. Dr. Flavio da Silva Emery (FCF/USP-RP)	APROVADO	
Prof. Dr. José Realino de Paula - Suplente (FF/UFG)		
Profª. Drª. Ana Paula Junqueira Kipnis (IPTSP/UFG) Suplente (FF/UFG)		
Parecer Final	Aprovado/Reprovado	



UFG

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO FARMACÊUTICA**

Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Realino Realino de Paula

Subcoordenador do Programa de Pós-Graduação

Profa. Dra. Carolina Horta Andrade

**Goiânia-GO
2017**

Dedico este trabalho ao meu afilhado Gabriel Almeida Gomes, que ele possa se inspirar no esforço e dedicação, valorizando as oportunidades que nos são dada na vida.

Agradeço primeiramente ao Pai Eterno, que me concedeste a vida e me proporciona escolhas que me fizeram alcançar tudo que tenho conquistado até hoje. Agradeço pelo dom da ciência e da sabedoria, porque sei que sempre estive ao meu lado me guiando em meus experimentos e pela sabedoria e humildade para lidar com todas as situações adversas em minha vida e mais ainda nesse período do doutorado.

Aos meus pais Joaquim Paulo Gomes e Elisa do Nascimento Gomes que são meu alicerce, que foram meus primeiros professores que me deram a educação e a formação necessária para que eu pudesse ter chegado até aqui, entendendo a minha ausência e me apoiando nos momentos mais difíceis de toda a minha caminhada.

Aos meus irmãos Márcio e Rodrigo que são meus amigos e parceiros de vida e que me acompanharam e me apoiaram incondicionalmente, com compreensão, carinho e amor de irmãos sempre com a palavra certa no momento certo.

A professora doutora Carolina Horta Andrade, pela orientação, dedicação, profissionalismo e confiança, que me permitiu a oportunidade de desenvolver este trabalho.

Ao professor doutor Guilherme Roberto de Oliveira, pela coorientação na síntese cedendo o laboratório para o desenvolvimento da síntese orgânica de parte dos compostos.

Aos professores doutores membros da banca, pelo aceite do convite, pela disponibilidade deixando seus afazeres para contribuir com o meu crescimento como profissional e com o enriquecimento deste trabalho.

Ao Doutor Rodolpho Campos Braga, pela contribuição na elaboração dos modelos de QSAR.

Ao Doutor Bruno Junior Neves, pela grande amizade que começou como uma relação professor-aluno e depois se solidificou durante esses anos. Obrigado também pelas significativas e importantíssimas colaborações nos artigos produtos deste trabalho, pelos momentos do “café” que junto com nossos colegas de laboratório foram muito construtivos

tanto pessoalmente quanto profissionalmente. E se um dia eu te inspirei como seu professor, hoje você me inspira como amigo, profissionalismo e competência.

Aos meus colegas do LabMol; Ao doutorando José Teófilo Moreira Filho, pela amizade também estabelecida durante o tempo em que fui seu professor na Faculdade Montes Belos e que também foi se consolidando com o tempo, o qual a admiração e o respeito são mútuos e teremos a oportunidade de firmar uma nova parceria. Ao doutorando Cleber Camilo de Melo Filho pela paciência e disposição em nos ajudar, amizade, colaboração, pelo companheirismo nos congressos, e pelas frases memoráveis que tanto nos arrancaram risadas em momentos de descontração. Ao Doutorando Arthur de Carvalho pela amizade, pela sua humildade, pelas conversas e conselhos durante os almoços no “R.U.”, pela paciência e disponibilidade em ajudar a todos que buscam por sua ajuda. A Doutoranda Flávia da Silva, pela amizade também estabelecida durante o tempo que fui seu professor na Faculdade Montes Belos, pelos momentos de descontração e pelos comentários inusitados que fizeram os dias dessa jornada mais leves e divertidos. À Doutoranda Marília Nunes do Nascimento, pela colaboração, amizade e pelas trocas de “dietas”, apesar de não terem funcionado muito bem. Ao Doutorando Vinícius de Medeiros Alves pelo coleguismo durante o período de doutorado.

Ao Doutor Scott Gary Franzblau pela oportunidade de realização do meu estágio sanduíche no Institute for Tuberculosis Research na University of Illinois at Chicago, aos doutores Sanghyum Cho e Larry Klein que me supervisionaram juntamente com o Dr. Scott, e a equipe do ITR Ethan, Rui Ma, Daniel, Yang Liu, Baoji, Valsa Abraham, Lorna Haubrich Akie Matsumura e Yuehong Wang que me recebeu durante meu estágio sanduíche.

À pós-doutora Edyta M. Grzelak que é uma grande profissional, que foi essencial para o êxito dos meus resultados durante meu estágio sanduíche e mesmo depois do meu retorno ao Brasil. E também por ter sido uma grande amiga nos bons momentos e nos momentos mais difíceis da minha adaptação a cultura, idioma e de convívio.

À Fernanda Maura Ferreira Bellato, secretária do programa de pós-graduação em Inovação Farmacêutica, pela paciência, amizade, conselhos e principalmente pelo profissionalismo durante todo meu mestrado e doutorado e por sempre nos acalmar com sua voz tranquila dizendo “calma, vai dar certo”.

Ao Doutor Eugene Muratov, pela sua experiência, contribuição com relevantes discussões e na confecção de alguns dos manuscritos produzidos por este trabalho.

Aos pesquisadores do LaSOPB, Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas (ICB-UFG), LNBio, Fiocruz do Rio de Janeiro e da Universidade Federal de Santa Catarina pela colaboração em realização de ensaios que desmembraram do projeto original.

Aos meus tios, primos e minha cunhada Maria Janaura Almeida Gomes que torceram pelo meu sucesso e rezaram por mim.

Ao meu afilhado Gabriel Almeida Gomes, que em vários momentos, me trouxe a força que faltava para continuar, principalmente durante meu estágio sanduíche, que nos momentos mais difíceis ele me ligava pelo Skype e com seus brinquedos espalhados no chão junto ao computador a gente brincava e o peso da dificuldade se aliviava.

À Nayara Alves Fernandes, uma pessoa muito especial e muito importante na minha vida, que esteve ao meu lado no início desta jornada.

A Karla Soares, uma grande amiga e conselheira que esteve sempre disposta a ouvir e ter uma palavra de conforto.

À doutora Valéria de Oliveira, a todos professores idealizadores do Programa de Pós-graduação em Inovação Farmacêutica (PPGIF) e A todos funcionários e técnicos da Faculdade de Farmácia da UFG.

A Openeye e a ChemAxon que fornecem as licenças gratuitamente para funcionamento dos softwares usados para o desenvolvimento deste e de outros projetos desenvolvidos no LabMol.

À fundação de amparo a pesquisa do estado de Goiás (FAPEG), mantenedora da minha bolsa de doutorado. À coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES), mantenedora da minha bolsa de doutorado sanduíche no ITR-UIC e ao CNPq provedor de fomentos para a manutenção dos projetos de pesquisa no LabMol.

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS	X
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....	XXVII
RESUMO	XXXI
ABSTRACT	XXXII
1 INTRODUÇÃO	1
1.1. Tuberculose (TB).....	1
1.1.1. Etiologia e Patologia.....	1
1.1.2. Bases Epidemiológicas	3
1.1.3. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5
1.1.3.1 Envelope celular	6
1.1.4. Quimioterapia.....	7
1.1.5. Novas terapias para tratamento e prevenção da TB	10
1.2. Indústria farmacêutica e desenvolvimento de fármacos anti-TB	13
1.2.1. Aril e heteroaril chalconas	15
1.2.2. Planejamento de fármacos.....	19
1.2.3. Estratégias de planejamento <i>in silico</i> de fármacos.....	21
1.2.3.1. Relações quantitativas entre estrutura química e atividade (QSAR).....	21
1.2.4. Estratégias de modificação molecular	25
1.2.4.1. Bioisosterismo	25
2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1. Planejamento racional.....	28
3.2. Geração e preparo do conjunto de dados	28
3.3. Estudos de relação entre estrutura e atividade (SAR)	29
3.4. Geração de bioisósteros	29
3.5. QSAR	30
3.5.1. Divisão do conjunto de dados	30
3.5.2. Cálculo de descritores	31
3.5.2.1. MACCS	31
3.5.2.2. Morgan	31
3.5.2.3. FeatMorgan.....	32
3.5.2.4. Avalon	32
3.5.2.5. AtomPairs.....	32
3.5.3. Métodos de Aprendizado de Máquina.	32

3.5.3.1.	<i>Support Vector Machine (SVM)</i>	33
3.5.3.2.	<i>Gradient Boosting Machine (GBM)</i>	33
3.5.3.3.	<i>Random Forest (RF)</i>	33
3.5.4.	Validação dos modelos de QSAR	33
3.5.5.	Permutação da variável Y	35
3.5.6.	Modelo de consenso	36
3.6.	Síntese orgânica	36
3.6.1.	Solventes e Reagentes	36
3.6.2.	Equipamentos e acessórios	38
3.6.3.	Mecanismo reacional geral de síntese de chalconas	38
3.6.3.1.	Síntese de 1,3-diarilprop-2-en-1-onas e heteroaril chalconas	39
3.6.4.	Ensaio de atividade anti-TB	40
3.6.4.1.	MABA	40
3.6.4.2.	LORA	41
3.6.4.3.	Avaliação biológica em cepas isogênicas resistentes a RMP e INH	42
3.6.5.	Avaliação de citotoxicidade em células Vero	42
3.6.6.	Avaliação do espectro de atividade	43
4	RESULTADOS	44
4.1.	Planejamento de novas chalconas antituberculose	44
4.1.1.	Análise de SAR	44
4.1.2.	Desenvolvimento e validação de modelos de QSAR	45
4.1.3.	Geração de bioisómeros	47
4.1.4.	Predição da atividade de novas chalconas planejadas	49
4.2.	Síntese Orgânica	50
4.2.1.	Síntese de aril e heteroaril chalconas	50
4.3.	Avaliação da atividade biológica	62
4.3.1.	Atividade anti-TB em ensaios aeróbicos (MABA) e anaeróbicos (LORA)	62
4.3.2.	Citotoxicidade em células Vero	66
4.3.3.	Avaliação do espectro de atividade	66
5	DISCUSSÃO	69
6	CONCLUSÕES	80
7	REFERÊNCIAS	81
ANEXOS		96
8.1.	Espectros de RMN, IV, Massas e CLAE	96
8.2.	Figuras de similaridade e tabelas de predição predHERG, PAINS e metabolismo	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Mecanismo de resistência dos fármacos anti-TB de 1 ^a e 2 ^a escolha. (Adaptado de SUNDARAMURTHI et al., 2016; ZUMLA; NAHID; COLE, 2013).	9
Tabela 2 - Parâmetros estatísticos dos modelos de QSAR desenvolvidos para o conjunto de dados.....	45
Tabela 3 - Resultados estatísticos da randomização da variável Y.	46
Tabela 4 – Propriedades moleculares de bioisósteros aril e heteroaril chalconas selecionados para síntese.	48
Tabela 5 - Predição da probabilidade de atividade anti-TB dos compostos planejados para atividade anti-TB.....	50
Tabela 6 – Síntese das aril e heteroaril chalconas anti-TB planejadas, rendimento reacional, fator de retenção (Rf), faixa de fusão e pureza dos 33 compostos.	51
Tabela 7 - Variação das condições reacionais na síntese do composto (83).....	52
Tabela 8 - Absorção em IV de carbonila, olefina, grupo nitro e cloro das aril e heteroaril chalconas e atribuição de massas dos compostos sintetizados.....	52
Tabela 9 - Deslocamentos químicos de RMN de ¹ H em ppm dos compostos (46 a 48) e (67 a 71).	54
Tabela 10 - Deslocamentos químicos de RMN de ¹³ C em dos compostos (46 a 48) e (67 a 71).	55
Tabela 11 - Deslocamentos químicos de RMN de ¹ H em ppm dos compostos (72 a 79).	56

Tabela 12 - Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C em ppm dos compostos (72 a 79).	57
Tabela 13 - Deslocamentos químicos de RMN de ^1H em ppm dos compostos (80 a 87).	58
Tabela 14 - Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C em ppm dos compostos (80 a 87).	59
Tabela 15 - Deslocamentos químicos de RMN de ^1H em ppm dos compostos (88 a 96).	60
Tabela 16 - Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C em ppm dos compostos (88 a 96).	61
Tabela 17 - Avaliação da atividade anti-TB <i>in vitro</i> em MABA, LORA, monoresistência a RMP ou INH, de espectro de atividade em microrganismos comensais e de seletividade em células Vero (SI) dos compostos (46 a 48) e (67 a 96).	63
Tabela 18 - Avaliação da atividade anti-TB <i>in vitro</i> em MABA, LORA, monoresistência a RMP ou INH, de espectro de atividade em microrganismos comensais e de seletividade em células Vero (SI) dos compostos padrão.	64
Tabela 19 - Avaliação do espectro de atividade em cepas de micobactérias não tuberculose (NTMs), demonstrada em MIC (μM).	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de patogenicidade de <i>M. tuberculosis</i> , (adaptado de Nunes-Alves et. al, 2014).	1
Figura 2 - Representação das estruturas químicas dos fármacos estreptomicina (SM, 1) e isoniazida (INH, 2).	3
Figura 3 - Incidência de novos casos de TB no mundo no ano de 2015, (adaptado de WHO, 2016).	4
Figura 4 - Representação das estruturas químicas dos fármacos rifampicina (RMP, 3), fluorquinolonas (4), canamicina, etionamida, ciclosserina e ác. <i>p</i> -aminossalicílico.....	5
Figura 5 - Esfregaço contendo <i>M. tb.</i> corado por metodologia de Ziehl-Neelsen (álcool-ácido resistente) em pré-diagnóstico de TB (A). Cultura de <i>M. tb.</i> após quatro semanas de incubação (B) Fonte: (Kayser et al., 2005).	5
Figura 6 – Representação esquemática da estrutura da parede celular micobacteriana (adaptado de Riley, 2006).	7
Figura 7 - Estruturas químicas e mecanismo de ação de fármacos anti-TB de primeira escolha.	8
Figura 8 - Estruturas químicas e mecanismos de ação dos fármacos anti-TB de 2ª escolha.	9
Figura 9 – Representação das estruturas químicas dos fármacos bedaquilina (21) e delamanida (22).....	11
Figura 10 - <i>Pipeline</i> de descoberta de novos fármacos anti-TB e seus estágios de desenvolvimento (adaptado de http://www.newtbdrugs.org.br).	12
Figura 11 - Representação da estrutura química de novas classes químicas de candidatos a fármacos anti-TB.	12
Figura 12 - Projeção da TB Alliance para o tratamento da TB (adaptado de <i>TBAlliance</i> , 2015).	14

Figura 13 - Representação da estrutura geral do núcleo fundamental de aril (26) e heteroaril chalconas (27).....	16
Figura 14 - Representação das estruturas químicas da auxibilina e da sofalcona.	16
Figura 15 - Via bioquímica de biossíntese de chalconas.	17
Figura 16 - Esquema geral da síntese de chalconas pela condensação clássica de Claisen-Schmidt.....	17
Figura 17 - Diferentes atividades biológicas apresentadas por chalconas.....	18
Figura 18 - Estruturas químicas de algumas chalconas naturais e sintéticas reportadas na literatura com atividade anti-TB.	19
Figura 19 - Gênese de novos fármacos (ELEBRING; GILL; PLOWRIGHT, 2012).	19
Figura 20 - Representação esquemática da geração de modelos de QSAR (adaptado de TROP SHA, 2010). PLS: <i>partial least squares</i> ; RLM: regressão linear múltipla; NN: <i>neural networks</i> ; SVM: <i>Support vector machine</i> ; RF: <i>random forest</i> ; DL: <i>deep learning</i>	23
Figura 21 - Modificação bioisostérica da procainamida em procaína.	26
Figura 22 – Fluxograma do planejamento racional realizado para a descoberta de chalconas anti-TB.	28
Figura 23 - Estruturas mais promissoras do conjunto de dados escolhidas para proposição de modificações bioisostéricas nos fragmentos em destaque para o planejamento de novas aril e heteroaril chalconas.	30
Figura 24 - Fluxograma do método de geração modelos de QSAR utilizando o método de validação cruzada <i>5-fold</i> (adaptado de Tropsha, 2010).....	34
Figura 25 – Esquema do mecanismo clássico da reação de condensação de Claisen-Schmidt (adaptado de CLAYDEN et al., 2001).....	38

Figura 26 – Esquema do mecanismo da reação de condensação em meio ácido adaptado de Claisen-Schmidt (adaptado de CLAYDEN et al., 2001).....	40
Figura 27 - Fluxograma do procedimento experimental dos ensaios de inibição do crescimento do <i>M. tb.</i> H37Rv em MABA (sistema aeróbico).....	41
Figura 28 - Fluxograma do procedimento experimental dos ensaios de inibição do crescimento do <i>M. tb.</i> H37Rv em LORA (sistema anaeróbico).	41
Figura 29 - Fluxograma do procedimento experimental de avaliação de citotoxicidade em células Vero.....	43
Figura 30 - MMPA de pares moleculares selecionados das chalconas e heteroaril chalconas com atividade anti-TB relatadas na literatura. O número acima das setas indica o Coeficiente Tanimoto entre o par molecular (alta similaridade estrutural, coeficiente de Tanimoto > 0,90). Os grupos em azul e vermelho representam as diferenças estruturais entre as moléculas.	44
Figura 31 - Regras de SAR derivadas para o planejamento de novas aril e heteroaril chalconas anti-TB. Grupos em azul são favoráveis para a atividade anti-TB e em vermelho são desfavoráveis.	45
Figura 32 - Formação do intermediário metanediol em meio alcalino, justificando a síntese na presença de catalisador ácido.	51
Figura 33 – Representação da estrutura química do metronidazol.....	62
Figura 34 – Representação das estruturas químicas dos fármacos-padrão usados na validação do ensaio de espectro de atividade.	67
Figura 35 – Representação da estrutura química do composto PA-824.....	71
Figura 36 – Demonstração dos seis pares de elétrons π e aromaticidade do anel tiofeno.	72
Figura 37 – Mapa radial de similaridade do <i>hit</i> (74) comparado com compostos ativos e inativos do conjunto de dados, e ainda com fármacos de primeira escolha e fármacos utilizados em cepas resistentes.	74

Figura 38 - Mapa radial de similaridade do <i>hit</i> (87) comparado com compostos ativos e inativos do conjunto de dados, e ainda com fármacos de primeira escolha e fármacos utilizados em cepas resistentes.	75
Figura 39 – Representação da estrutura geral de nitroeteroaril chalconas, destacando os grupos adutor de Michael e nitro, considerados como alertas de toxicidade.....	77
Figura 40 - Representação de estruturas químicas de nitrocompostos antimicrobianos usados na terapêutica.	78

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 – Espectro de RMN ^1H da (2 <i>E</i>)-1-(4-bromofenil)-3-(5-nitrofurano-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol63) (46), 400 MHz, CDCl_3	97
Anexo 2 - Espectro de RMN ^{13}C do (2 <i>E</i>)-1-(4-bromofenil)-3-(5-nitrofurano-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol63) (46), 400 MHz, CDCl_3	98
Anexo 3 - Espectro de IV do (2 <i>E</i>)-1-(4-bromofenil)-3-(5-nitrofurano-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol63) (46), KBr	99
Anexo 4 – Cromatograma do (2 <i>E</i>)-1-(4-bromofenil)-3-(5-nitrofurano-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol63) (46).	100
Anexo 5 - Espectro de RMN ^1H do (2 <i>E</i>)-1-[4-(morfolino-4-il)fenil]-3-(5-nitrofurano-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol64) (47), 400 MHz, $\text{DMSO } d_6$	101
Anexo 6 - Espectro de RMN ^{13}C do (2 <i>E</i>)-1-[4-(morfolino-4-il)fenil]-3-(5-nitrofurano-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol64) (47), 400 MHz, $\text{DMSO } d_6$	102
Anexo 7 - Espectro de IV do (2 <i>E</i>)-1-[4-(morfolino-4-il)fenil]-3-(5-nitrofurano-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol64) (47), KBr.	103
Anexo 8 - Espectro de massas e cromatograma do (2 <i>E</i>)-1-[4-(morfolino-4-il)fenil]-3-(5-nitrofurano-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol64) (47).	104
Anexo 9 - Espectro de RMN ^1H do (2 <i>E</i>)-3-(5-nitrofurano-2-il)-1-[4-(piperidino-1-il)fenil]prop-2-en-1-ona (LabMol65) (48), 400 MHz, $\text{DMSO } d_6$	105
Anexo 10 - Espectro de RMN ^{13}C do (2 <i>E</i>)-3-(5-nitrofurano-2-il)-1-[4-(piperidino-1-il)fenil]prop-2-en-1-ona (LabMol65) (48), 400 MHz, $\text{DMSO } d_6$	106
Anexo 11 - Espectro de IV do (2 <i>E</i>)-3-(5-nitrofurano-2-il)-1-[4-(piperidino-1-il)fenil]prop-2-en-1-ona (LabMol65) (48), KBr.	107
Anexo 12 - Espectro de massas e cromatograma do (2 <i>E</i>)-3-(5-nitrofurano-2-il)-1-[4-(piperidino-1-il)fenil]prop-2-en-1-ona (LabMol65) (48),	108

Anexo 13 - Espectro de RMN ^1H do (2 <i>E</i>)-1-[4-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)fenil]-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol66) (67), 400 MHz, DMSO d_6	109
Anexo 14 - Espectro de RMN ^{13}C (2 <i>E</i>)-1-[4-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)fenil]-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol66) (67), 400 MHz, DMSO d_6	110
Anexo 15 - Espectro de IV (2 <i>E</i>)-1-[4-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)fenil]-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol66) (67), KBr.	111
Anexo 16 - Espectro de massas e cromatograma do (2 <i>E</i>)-1-[4-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)fenil]-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol66) (67).	112
Anexo 17 - Espectro de RMN ^1H do (2 <i>E</i>)-3-(3-nitrofenil)-1-[4-(piperidin-1-il)fenil]prop-2-en-1-ona, (LabMol67) (68), 400 MHz, CDCl_3	113
Anexo 18 - Espectro de RMN ^{13}C do (2 <i>E</i>)-3-(3-nitrofenil)-1-[4-(piperidin-1-il)fenil]prop-2-en-1-ona, (LabMol67) (68), 400 MHz, CDCl_3	114
Anexo 19 - Espectro de IV do (2 <i>E</i>)-3-(3-nitrofenil)-1-[4-(piperidin-1-il)fenil]prop-2-en-1-ona, (LabMol67) (68), KBr.	115
Anexo 20 - Espectro de massas e cromatograma do (2 <i>E</i>)-3-(3-nitrofenil)-1-[4-(piperidin-1-il)fenil]prop-2-en-1-ona, (LabMol67) (68).	116
Anexo 21 - Espectro de RMN ^1H do (2 <i>E</i>)-1-(4- <i>tert</i> -butilfenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-one (LabMol68) (69), 400 MHz, CDCl_3	117
Anexo 22 - Espectro de RMN ^{13}C (2 <i>E</i>)-1-(4- <i>tert</i> -butilfenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-one (LabMol68) (69), 400 MHz, CDCl_3	118
Anexo 23 - Espectro de IV (2 <i>E</i>)-1-(4- <i>tert</i> -butilfenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-one (LabMol68) (69), KBr.	119
Anexo 24 - Espectro de massas e cromatograma (2 <i>E</i>)-1-(4- <i>tert</i> -butilfenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-one (LabMol68) (69).	120
Anexo 25 - Espectro de RMN ^1H do (2 <i>E</i>)-3-[4-dimetilamino)fenil]-1-(4-bifenil)prop-2-en-1-ona (LabMol69) (70), 400 MHz, CDCl_3	121

Anexo 26 - Espectro de RMN ^{13}C do (2 <i>E</i>)-3-[4-dimetilamino]fenil]-1-(4-bifenil)prop-2-em-1-ona (LabMol69) (70), 400 MHz, CDCl_3	122
Anexo 27 - Espectro de IV (2 <i>E</i>)-3-[4-dimetilamino]fenil]-1-(4-bifenil)prop-2-em-1-ona (LabMol69) (70), KBr.	123
Anexo 28 - Espectro de massas e cromatograma (2 <i>E</i>)-3-[4-dimetilamino]fenil]-1-(4-bifenil)prop-2-em-1-ona (LabMol69) (70).	124
Anexo 29 - Espectro de RMN ^1H do (2 <i>E</i>)-3-(4-metoxifenil)-1-(4-bifenil)prop-2-em-1-ona (LabMol70) (71), 400 MHz, CDCl_3	125
Anexo 30 - Espectro de RMN ^{13}C do (2 <i>E</i>)-3-(4-metoxifenil)-1-(4-bifenil)prop-2-em-1-ona (LabMol70) (71), 400 MHz, CDCl_3	126
Anexo 31 - Espectro de IV (2 <i>E</i>)-3-(4-metoxifenil)-1-(4-bifenil)prop-2-em-1-ona (LabMol70), (71) KBr	127
Anexo 32 - Espectro de massas e cromatograma do (2 <i>E</i>)-3-(4-metoxifenil)-1-(4-bifenil)prop-2-em-1-ona (LabMol70) (71).	128
Anexo 33 - Espectro de RMN ^1H (2 <i>E</i>)-3-(furan-2-il)-1-[4-(metilsulfonil)fenil]prop-2-en-1-ona (LabMol71) (72), 400 MHz, CDCl_3	129
Anexo 34 - Espectro de ^{13}C (2 <i>E</i>)-3-(furan-2-il)-1-[4-(metilsulfonil)fenil]prop-2-en-1-ona (LabMol71) (72), 400 MHz, CDCl_3	130
Anexo 35 - Espectro de IV (2 <i>E</i>)-3-(furan-2-il)-1-[4-(metilsulfonil)fenil]prop-2-en-1-ona (LabMol71) (72), KBr.	131
Anexo 36 - Espectro de massas e cromatograma (2 <i>E</i>)-3-(furan-2-il)-1-[4-(metilsulfonil)fenil]prop-2-en-1-ona (LabMol71) (72).	132
Anexo 37 - Espectro de RMN ^1H (2 <i>E</i>)-1-(4-ciclohexilfenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol72) (73), 400 MHz, CDCl_3	133
Anexo 38 - Espectro de RMN ^{13}C (2 <i>E</i>)-1-(4-ciclohexilfenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol72), (73), 400 MHz, CDCl_3	134

Anexo 39 - Espectro de IV (2 <i>E</i>)-1-(4-ciclohexilfenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol72), (73), KBr	135
Anexo 40 - Espectro de Massas e cromatograma (2 <i>E</i>)-1-(4-ciclohexilfenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol72), (73).....	136
Anexo 41 - Espectro de RMN ¹ H (2 <i>E</i>)-3-(5-nitrofuran-2-il)-1-[4-(piperazin-1-il)fenil]prop-2-en-1-ona (LabMol73), (74), 400 MHz, DMSO <i>d</i> ₆	137
Anexo 42 - Espectro ¹³ C (2 <i>E</i>)-3-(5-nitrofuran-2-il)-1-[4-(piperazin-1-il)fenil]prop-2-en-1-ona (LabMol73), (74) 400 MHz, DMSO <i>d</i> ₆	138
Anexo 43 - Espectro de IV (2 <i>E</i>)-3-(5-nitrofuran-2-il)-1-[4-(piperazin-1-il)fenil]prop-2-en-1-ona (LabMol73), (74), KBr.	139
Anexo 44 – Cromatograma (2 <i>E</i>)-3-(5-nitrofuran-2-il)-1-[4-(piperazin-1-il)fenil]prop-2-en-1-ona (LabMol73), (74).	140
Anexo 45 – Espectro de RMN ¹ H (2 <i>E</i>)-3-(5-nitrofuran-2-il)-1-[4-bifenil]prop-2-en-1-ona (LabMol74), (75), 400 MHz, CDCl ₃	141
Anexo 46 - Espectro de ¹³ C (2 <i>E</i>)-3-(5-nitrofuran-2-il)-1-[4-bifenil]prop-2-en-1-ona (LabMol74), (75) 400 MHz, CDCl ₃	142
Anexo 47 - Espectro de IV (2 <i>E</i>)-3-(5-nitrofuran-2-il)-1-[4-bifenil]prop-2-en-1-ona (LabMol74), (75), KBr.	143
Anexo 48 - Espectro de massas e cromatograma (2 <i>E</i>)-3-(5-nitrofuran-2-il)-1-[4-bifenil]prop-2-en-1-ona (LabMol74), (75).....	144
Anexo 49 - Espectro de RMN ¹ H (2 <i>E</i>)-1-(2-metilfenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol75), (76) 400 MHz, CDCl ₃	145
Anexo 50 - Espectro de RMN ¹³ C (2 <i>E</i>)-1-(2-metilfenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol75), (76), 400 MHz, CDCl ₃	146
Anexo 51 - Espectro de IV (2 <i>E</i>)-1-(2-metilfenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol75), (76), KBr.	147

Anexo 52 - Espectro de massas e cromatograma (2 <i>E</i>)-1-(2-metilfenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol75) (76).....	148
Anexo 53 - Espectro de RMN ¹ H (2 <i>E</i>)-1-(3-iodofenil)-3-(4-metoxifenil)prop-2-en-1-ona (LabMol76), (77), 400 MHz, CDCl ₃	149
Anexo 54 - Espectro de RMN ¹³ C (2 <i>E</i>)-1-(3-iodofenil)-3-(4-metoxifenil)prop-2-en-1-ona (LabMol76), (77), 400 MHz, CDCl ₃	150
Anexo 55 - Espectro de IV (2 <i>E</i>)-1-(3-iodofenil)-3-(4-metoxifenil)prop-2-en-1-ona (LabMol76), (77) KBr.	151
Anexo 56 - Espectro de massas e cromatograma (2 <i>E</i>)-1-(3-iodofenil)-3-(4-metoxifenil)prop-2-en-1-ona (LabMol76), (77), 400 MHz, CDCl ₃	152
Anexo 57 - Espectro de RMN ¹ H (2 <i>E</i>)-1-(4-butilfenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol77), (78), 400 MHz, CDCl ₃	153
Anexo 58 – Espectro de RMN ¹³ C (2 <i>E</i>)-1-(4-butilfenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol77), (78), 400 MHz, CDCl ₃	154
Anexo 59 - Espectro de IV (2 <i>E</i>)-1-(4-butilfenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol77), (78), KBr.	155
Anexo 60 - Espectro de massas e cromatograma (2 <i>E</i>)-1-(4-butilfenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol77), (78).....	156
Anexo 61 - Espectro de RMN ¹ H (2 <i>E</i>)-1-(4-iodofenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol78), (79), 400 MHz, CDCl ₃	157
Anexo 62 - Espectro de RMN ¹³ C (2 <i>E</i>)-1-(4-iodofenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol78), (79), 400 MHz, CDCl ₃	158
Anexo 63 - Espectro de IV (2 <i>E</i>)-1-(4-iodofenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol78), (79) KBr.	159
Anexo 64 – Cromatograma (2 <i>E</i>)-1-(4-iodofenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol78), (79) 400 MHz, CDCl ₃	160

Anexo 65 - Espectro de RMN ^1H (2 <i>E</i>)-1-(3-metilfenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol79), (80) 400 MHz, CDCl_3	161
Anexo 66 - Espectro de RMN ^{13}C (2 <i>E</i>)-1-(3-metilfenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol79), (80), 400 MHz, CDCl_3	162
Anexo 67 - Espectro de IV (2 <i>E</i>)-1-(3-metilfenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol79), (80), KBr.	163
Anexo 68 - Espectro de massas e cromatograma (2 <i>E</i>)-1-(3-metilfenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol79), (80).....	164
Anexo 69 - Espectro de RMN ^1H (2 <i>E</i>)-3-(furan-2-il)-1-[4-(piperidin-1-il)fenil]prop-2-en-1-ona (LabMol80), (81) 400 MHz, CDCl_3	165
Anexo 70 - Espectro de RMN ^{13}C (2 <i>E</i>)-3-(furan-2-il)-1-[4-(piperidin-1-il)fenil]prop-2-en-1-ona (LabMol80), (81), 400 MHz, CDCl_3	166
Anexo 71 - Espectro de IV (2 <i>E</i>)-3-(furan-2-il)-1-[4-(piperidin-1-il)fenil]prop-2-en-1-ona (LabMol80), (81) KBr.	167
Anexo 72 - Espectro de massas e cromatograma (2 <i>E</i>)-3-(furan-2-il)-1-[4-(piperidin-1-il)fenil]prop-2-en-1-ona (LabMol80) (81).	168
Anexo 73 - Espectro de RMN ^1H (2 <i>E</i>)-3-(5-nitrofuran-2-il)-1-[4-(pirrolidin-1-il)fenil]prop-2-en-1-ona (LabMol81), (82) 400 MHz, CDCl_3	169
Anexo 74 - Espectro de ^{13}C (2 <i>E</i>)-3-(5-nitrofuran-2-il)-1-[4-(pirrolidin-1-il)fenil]prop-2-en-1-ona (LabMol81), (82) 400 MHz, CDCl_3	170
Anexo 75 - Espectro de IV (2 <i>E</i>)-3-(5-nitrofuran-2-il)-1-[4-(pirrolidin-1-il)fenil]prop-2-en-1-ona (LabMol81), (82), KBr.	171
Anexo 76 - Espectro de massas e cromatograma (2 <i>E</i>)-3-(5-nitrofuran-2-il)-1-[4-(pirrolidin-1-il)fenil]prop-2-en-1-ona (LabMol81), (82) 400 MHz, CDCl_3	172
Anexo 77 – Espectro de RMN ^1H (2 <i>E</i>)-1-(3-bromofenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-em-1-ona (LabMol82), (83) 400 MHz, CDCl_3	173

Anexo 78 - Espectro de RMN ^{13}C (2 <i>E</i>)-1-(3-bromofenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-em-1-ona (LabMol82), (83) 400 MHz, CDCl_3	174
Anexo 79 - Espectro de IV (2 <i>E</i>)-1-(3-bromofenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-em-1-ona (LabMol82), (83) KBr	175
Anexo 80 - Espectro de massas e cromatograma (2 <i>E</i>)-1-(3-bromofenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-em-1-ona (LabMol82), (83).....	176
Anexo 81 - Espectro de RMN ^1H (2 <i>E</i>)-1-(3-bromofenil)-3-(4-metoxifenil)prop-2-em-1-ona (LabMol83), (84) 400 MHz, CDCl_3	177
Anexo 82 - Espectro de RMN ^{13}C (2 <i>E</i>)-1-(3-bromofenil)-3-(4-metoxifenil)prop-2-em-1-ona (LabMol83), (84) 400 MHz, CDCl_3	178
Anexo 83 - Espectro de IV (2 <i>E</i>)-1-(3-bromofenil)-3-(4-metoxifenil)prop-2-em-1-ona (LabMol83), (84) KBr.	179
Anexo 84 – Cromatograma (2 <i>E</i>)-1-(3-bromofenil)-3-(4-metoxifenil)prop-2-em-1-ona (LabMol83), (84).	180
Anexo 85 - Espectro de RMN ^1H (2 <i>E</i>)-1-[4-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)fenil]-3-(5-nitrotiofen-2-il)prop-2-em-1-ona (LabMol84), (85) 400 MHz, $\text{DMSO } d_6$	181
Anexo 86 - Espectro de RMN ^{13}C (2 <i>E</i>)-1-[4-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)fenil]-3-(5-nitrotiofen-2-il)prop-2-em-1-ona (LabMol84), (85) 400 MHz, $\text{DMSO } d_6$	182
Anexo 87 - Espectro de IV (2 <i>E</i>)-1-[4-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)fenil]-3-(5-nitrotiofen-2-il)prop-2-em-1-ona (LabMol84), (85) KBr.	183
Anexo 88 - Espectro de massas e cromatograma (2 <i>E</i>)-1-[4-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)fenil]-3-(5-nitrotiofen-2-il)prop-2-em-1-ona (LabMol84), (85) 400 MHz, $\text{DMSO } d_6$	184
Anexo 89 - Espectro de RMN ^1H (2 <i>E</i>)-1-(4- <i>tert</i> -butilfenil)-3-(1 <i>H</i> -pirrol-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol85), (86) 400 MHz, CDCl_3	185
Anexo 90 - Espectro de RMN ^{13}C (2 <i>E</i>)-1-(4- <i>tert</i> -butilfenil)-3-(1 <i>H</i> -pirrol-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol85), (86) 400 MHz, CDCl_3	186

Anexo 91 - Espectro de massas e cromatograma (2 <i>E</i>)-1-(4- <i>tert</i> -butilfenil)-3-(1 <i>H</i> -pirrol-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol85), (86).....	187
Anexo 92 - Espectro de RMN ¹ H (2 <i>E</i>)-1-(4- <i>tert</i> -butilfenil)-3-(5-nitrotiofen-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol86), (87) 400 MHz, CDCl ₃	188
Anexo 93 - Espectro de RMN ¹³ C (2 <i>E</i>)-1-(4- <i>tert</i> -butilfenil)-3-(5-nitrotiofen-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol86), (87) 400 MHz, CDCl ₃	189
Anexo 94 - Espectro de IV (2 <i>E</i>)-1-(4- <i>tert</i> -butilfenil)-3-(5-nitrotiofen-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol86), (87) KBr.	190
Anexo 95 - Espectro de massas e cromatograma (2 <i>E</i>)-1-(4- <i>tert</i> -butilfenil)-3-(5-nitrotiofen-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol86), (87).....	191
Anexo 96 - Espectro de RMN ¹ H (2 <i>E</i>)-1-(4-butilfenil)-3-(5-nitrotiofen-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol87), (88), 400 MHz, CDCl ₃	192
Anexo 97 - Espectro de RMN ¹³ C (2 <i>E</i>)-1-(4-butilfenil)-3-(5-nitrotiofen-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol87), (88) 400 MHz, CDCl ₃	193
Anexo 98 - Espectro de IV (2 <i>E</i>)-1-(4-butilfenil)-3-(5-nitrotiofen-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol87), (88) KBr.	194
Anexo 99 - Espectro de massas e cromatograma (2 <i>E</i>)-1-(4-butilfenil)-3-(5-nitrotiofen-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol87), (88) 400 MHz, CDCl ₃	195
Anexo 100 - Espectro de RMN ¹ H (2 <i>E</i>)-1-(4-ciclohexilfenil)-3-(5-nitrotiofen-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol88), (89), 400 MHz, CDCl ₃	196
Anexo 101 - Espectro de RMN ¹³ C (2 <i>E</i>)-1-(4-ciclohexilfenil)-3-(5-nitrotiofen-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol88), (89) 400 MHz, CDCl ₃	197
Anexo 102 - Espectro de IV (2 <i>E</i>)-1-(4-ciclohexilfenil)-3-(5-nitrotiofen-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol88), (89), KBr..	198
Anexo 103 - Espectro de Massas e cromatograma (2 <i>E</i>)-1-(4-ciclohexilfenil)-3-(5-nitrotiofen-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol88), (89).....	199

Anexo 104 - Espectro de RMN ^1H (2 <i>E</i>)-1-[4-mofolin-4-il]fenil]-3-(nitrotiofen-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol89), (90) 400 MHz, CDCl_3	200
Anexo 105 - Espectro de RMN ^{13}C (2 <i>E</i>)-1-[4-mofolin-4-il]fenil]-3-(nitrotiofen-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol89), (90), 400 MHz, CDCl_3	201
Anexo 106 - Espectro de IV (2 <i>E</i>)-1-[4-mofolin-4-il]fenil]-3-(nitrotiofen-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol89), (90), KBr	202
Anexo 107 - Espectro de massas e cromatograma (2 <i>E</i>)-1-[4-mofolin-4-il]fenil]-3-(nitrotiofen-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol89), (90).....	203
Anexo 108 - Espectro de RMN ^1H (2 <i>E</i>)-3-(4-nitrofenil)-1-[4-piperidin-1-il]fenil]prop-2-en-1-ona (LabMol90), (91) 400 MHz, CDCl_3	204
Anexo 109 - Espectro de RMN ^{13}C (2 <i>E</i>)-3-(4-nitrofenil)-1-[4-piperidin-1-il]fenil]prop-2-en-1-ona (LabMol90), (91) 400 MHz, CDCl_3	205
Anexo 110 - Espectro de IV (2 <i>E</i>)-3-(4-nitrofenil)-1-[4-piperidin-1-il]fenil]prop-2-en-1-ona (LabMol90), (91) KBr	206
Anexo 111 - Espectro de massas e cromatograma (2 <i>E</i>)-3-(4-nitrofenil)-1-[4-piperidin-1-il]fenil]prop-2-en-1-ona (LabMol90), (91).	207
Anexo 112 - Espectro de RMN ^1H (2 <i>E</i>)-1-(4-tert-butilfenil)-3-(furan-2-il)prop-2-em-1-ona (LabMol91), (92) 400 MHz, CDCl_3	208
Anexo 113 - Espectro de RMN ^{13}C (2 <i>E</i>)-1-(4-tert-butilfenil)-3-(furan-2-il)prop-2-em-1-ona (LabMol91), (92) 400 MHz, CDCl_3	209
Anexo 114 - Espectro de IV (2 <i>E</i>)-1-(4-tert-butilfenil)-3-(furan-2-il)prop-2-em-1-ona (LabMol91), (92) KBr	210
Anexo 115 - Espectro de massas e cromatograma (2 <i>E</i>)-1-(4-tert-butilfenil)-3-(furan-2-il)prop-2-em-1-ona (LabMol91), (92).....	211
Anexo 116 - Espectro de RMN ^1H (2 <i>E</i>)-1-[4-(metilsulfonil)fenil]-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-em-1-ona (LabMol92), (93) 400 MHz, CDCl_3	212

Anexo 117 - Espectro de RMN ^{13}C (2 <i>E</i>)-1-[4-(metilsulfonil)fenil]-3-(5-nitrofurano-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol92), (93), 400 MHz, CDCl_3	213
Anexo 118 - Espectro de IV (2 <i>E</i>)-1-[4-(metilsulfonil)fenil]-3-(5-nitrofurano-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol92), (93) KBr.	214
Anexo 119 - Espectro de massas e cromatograma (2 <i>E</i>)-1-[4-(metilsulfonil)fenil]-3-(5-nitrofurano-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol92), (93).	215
Anexo 120 - Espectro de RMN ^1H (2 <i>E</i>)-1-[4-(metilsulfonil)fenil]-3-(5-nitrotiofeno-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol93), (94) 400 MHz, CDCl_3	216
Anexo 121 - Espectro de RMN ^{13}C (2 <i>E</i>)-1-[4-(metilsulfonil)fenil]-3-(5-nitrotiofeno-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol93), (94) 400 MHz, CDCl_3	217
Anexo 122 - Espectro de IV (2 <i>E</i>)-1-[4-(metilsulfonil)fenil]-3-(5-nitrotiofeno-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol93), (94) KBr	218
Anexo 123 - Cromatograma da (2 <i>E</i>)-1-[4-(metilsulfonil)fenil]-3-(5-nitrotiofeno-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol93), (94).	219
Anexo 124 - Espectro de RMN ^1H (2 <i>E</i>)-3-(clorotiofeno-2-il)-1-[4-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)fenil]prop-2-en-1-ona (LabMol94), (95), 400 MHz, CDCl_3	220
Anexo 125 - Espectro de RMN ^{13}C (2 <i>E</i>)-3-(clorotiofeno-2-il)-1-[4-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)fenil]prop-2-en-1-ona (LabMol94), (95) 400 MHz, CDCl_3	221
Anexo 126 - Espectro de IV (2 <i>E</i>)-3-(clorotiofeno-2-il)-1-[4-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)fenil]prop-2-en-1-ona (LabMol94), (95), KBr.	222
Anexo 127 - Espectro de massas e cromatograma (2 <i>E</i>)-3-(clorotiofeno-2-il)-1-[4-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)fenil]prop-2-en-1-ona (LabMol94), (95).....	223
Anexo 128 - Espectro de RMN ^1H (2 <i>E</i>)-1-(4-metilfenil)-3-(5-nitrotiofeno-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol95), (96) 400 MHz, CDCl_3	224
Anexo 129 - Espectro de RMN ^{13}C (2 <i>E</i>)-1-(4-metilfenil)-3-(5-nitrotiofeno-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol95), (96), 400 MHz, CDCl_3	225

Anexo 130 - Espectro de IV (2 <i>E</i>)-1-(4-metilfenil)-3-(5-nitrotiofen-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol95), (96), KBr.	226
Anexo 131 - Espectro de massas e cromatograma (2 <i>E</i>)-1-(4-metilfenil)-3-(5-nitrotiofen-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol95), (96) 400 MHz, CDCl ₃	227
Anexo 132 - Mapa radial de similaridade do <i>hit</i> (93) em comparação aos compostos ativos, inativos do conjunto de dados, fármacos de primeira escolha e fármacos usados em cepas resistentes.....	228
Anexo 133 - Mapa radial de similaridade do <i>hit</i> (85) em comparação aos compostos ativos, inativos do conjunto de dados, fármacos de primeira escolha e fármacos usados em cepas resistentes.....	228
Anexo 134 – Resultado da análise de predição dos compostos como bloqueadores da hERG no servidor pred-hERG e no filtro de PAINS desenvolvidos no LabMol.	229
Anexo 135 – Resultado da análise de predição de metabolismo em modelos de QSAR desenvolvidos no LabMol.	230

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

μM	Micromolar
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Prótons
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
ALH	Aceptores de ligação de hidrogênio
AS	Acessibilidade sintética
ATCC	Coleção americana de tipos de cultura (do inglês, <i>American Type Culture Collection</i>)
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
CADD	Planejamento de fármacos assistido por computador (do inglês, <i>Computer-Assisted Drug Design</i>)
CAMH	Meio de cultura Mueller Hinton
CAS	Serviços de resumo de substâncias químicas (do inglês, <i>Chemical Abstract Services</i>)
CCD	Cromatografia de camada delgada
CCR	Taxa de classificação correta (do inglês, <i>Correction Classification Rate</i>)
CDC	Centro para prevenção e controle de doenças (do inglês, <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>)
ChEMBL	Laboratório europeu de bioinformática e biologia molecular (do inglês, <i>Chemogenomics European Bioinformatics Molecular Biology Laboratory</i>)
CHS	Chalcona sintase
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CoMFA	Análise Comparativa de Campos Moleculares (do inglês, <i>Comparative Molecular Field Analysis</i>)
CoMSIA	Análise comparativa de índices de similaridade molecular (do inglês, <i>Comparative Molecular Similarity Index Analysis</i>)
DLH	Doadores de ligação de hidrogênio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOTS	Tratamento de curta duração com observação direta (do inglês, <i>Directly Observed Treatment Short-course</i>)
DS-TB	Tuberculose sensível (do inglês, <i>Drug-sensitive tuberculosis</i>)

EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FBS	Soro bovino fetal (do inglês, <i>Fetal Bovine Serum</i>)
FOS	Síntese funcional direcionada (do inglês, <i>Function-Oriented Synthesis</i>)
GBM	Máquina de elevação de gradiente (do inglês, <i>Gradient Boosting machine</i>)
GHIT	Tecnologia global de inovação em saúde (do inglês, <i>Global Health Innovative Technology</i>)
GLP	Boas práticas de laboratório (do inglês, <i>Good Laboratory Practice</i>)
HBSS	Solução salina balanceada de Hanks' (do inglês, <i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>)
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês, <i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
HTS	Triagem biológica em alta vazão (do inglês, <i>High Throughput Screening</i>)
INH	isoniazida
InhA	Enoíl redutase de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
ITR	Instituto de pesquisa em tuberculose (do inglês, <i>Institute for Tuberculosis Research</i>)
IUPAC	União internacional de química pura e aplicada (do inglês, <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
KatG	Enzima catalase-peroxidase micobacteriana
KNIME	(do inglês, <i>Konstanz Information Miner</i>)
LabMol	Laboratório de Planejamento de Fármacos e Modelagem Molecular
LAM	Lipoarabinomanana
LBDD	Planejamento de fármacos baseado na estrutura do ligante (<i>Ligand Based Drug Design</i>)
LM	Lipomanana
LogP	Valor calculado do coeficiente de partição n-octanol/água
LORA	Ensaio de recuperação de baixos índices de oxigênio (do inglês, <i>Low Oxygen Recovery Assay</i>)
LTBI	Infecção latente da tuberculose (do inglês, <i>Latent tuberculosis infection</i>)
<i>M. tb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MABA	Ensaio de microplaca azul de alamar (do inglês, <i>Microplate Assay Blue Alamar</i>)
MACSS	<i>The Molecular ACCess System structural keys</i>
MDR-TB	Tuberculose multirresistente (do inglês, <i>Multidrug-resistant tuberculosis</i>)
MEM	Meio essencial mínimo
MIC	Concentração inibitória mínima (do inglês, <i>Minimum inhibitory concentration</i>)
mINH	Cepa com monoresistência a INH (do inglês, <i>Monoresistant INH</i>)

ML	Aprendizado de máquina (do inglês, <i>Machine learning</i>)
mM	Milimolar
MMPA	Análise de amostras de pares moleculares (do inglês, <i>Matched Molecular of Pairs Analysis</i>)
mRMP	Cepa com monorresistência a RMP (do inglês, <i>Monoresistant RMP</i>)
NCE	Novas entidades químicas (do inglês, <i>New Chemical Entities</i>)
NFA	5-Nitrofuraldeído
NFT	5-Nitrotiofencarboxaldeído
NTM	Micobactérias não-tuberculose (do inglês, <i>non-tuberculosis mycobacterias</i>)
OECD	Organização de cooperação para o desenvolvimento econômico (do inglês, <i>Organization of Economic Co-operation and Development</i>)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PDA	Detector de arranjos de diódos (do inglês, <i>Photodiode Array Detector</i>)
PDB	Bando de dados de proteínas (do inglês, <i>Protein Data Bank</i>)
PubChem	(do inglês, <i>PubChem search data</i>)
PZAase	Pirazinamidase
QSAR	Relações quantitativas estrutura atividade (do inglês, <i>Quantitative structure activity relationship</i>)
QSAR-3D	Relações quantitativas estrutura atividade tridimensionais (do inglês, <i>Tridimensional Quantitative structure activity relationship</i>)
QSPR	Relações quantitativas entre propriedade e estrutura (<i>quantitative structure–property relationships</i>)
RF	Floresta de aleatorização (do inglês, <i>Random Forest</i>)
Rf	Fator de retardação (do inglês, <i>Retardation factor</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês, <i>Ribonucleic acid</i>)
Ro5	Falha da regra do 5 de Lipinski
Rot	Número de rotâmeros
RPMI	Instituto memorial park Roswell (do inglês, <i>Roswell Park Memorial Institute</i>)
Rv3547	deazaflavina nitroredutase dependente
SAR	Relação estrutura-atividade (do inglês, <i>Structure activity-relationship</i>)
SBDD	Planejamento de fármacos baseados na estrutura (do inglês, <i>Structure Based Drug Design</i>)
Se	Sensitividade
SI	Índice de seletividade (do inglês, <i>selectivity index</i>)
Sp	Especificidade

SVM	Máquina de suporte de vetor (do inglês, <i>Support Vector Machine</i>)
TB	Tuberculose
TFA	Ácido trifluoracético
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
tPSA	Área de superfície polar (do inglês, <i>Polar Surface Área</i>)
UFC	Unidade formadora de colônia
UIC	Universidade de Illinois em Chicago (do inglês, <i>University of Illinois at Chicago</i>)
UV	Ultravioleta
VS	Triagem virtual (do inglês, <i>Virtual Screening</i>)
XDR-TB	Tuberculose extensivamente resistente (do inglês, <i>Extensively drug-resistant tuberculosis</i>)

Face ao panorama atual da pandemia de tuberculose (TB) no mundo, agravado pela co-infecção com o vírus HIV e o surgimento de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb.*) resistentes aos fármacos utilizados, é urgente a pesquisa e descoberta de novos fármacos anti-TB. O presente trabalho objetivou o planejamento, a síntese e avaliação biológica de novos compostos com atividade anti-TB, candidatos a fármacos para TB. Foram desenvolvidos estudos de relação entre estrutura e atividade (SAR) utilizando o método *Matched Pair Molecular Analysis* (MMPA) e modelos binários de relações quantitativas entre estrutura e atividade (QSAR) utilizando combinação de descritores (*fingerprints*) moleculares e métodos de aprendizado de máquina. Substituições bioisotéricas foram propostas para planejar novas aril e heteroaril chalconas utilizando as informações obtidas nas análises de SAR e QSAR. Trinta e três compostos foram selecionados pelo modelo de QSAR por consenso para a síntese. Estes compostos foram sintetizados e suas estruturas foram confirmadas por métodos espectroscópicos no infravermelho (IV), de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) e de carbono (RMN de ^{13}C) e espectrometria de massas (EM). Os compostos que apresentaram elevado grau de pureza ($\geq 95\%$ em CLAE) foram testados contra cepas de *M. tb.* H37Rv (sensíveis) e resistentes a rifampicina (RMP) ou isoniazida (INH). Além disso, também foram testados em ensaios de citotoxicidade em células de mamíferos e espectro de atividade. Foram identificados 22 *hits* com atividade anti-TB, com concentração inibitória mínima (MIC) em *M. tb.* H37Rv em ensaios em condições aeróbias (MABA) $<10\text{ }\mu\text{M}$. Destes, 12 compostos exibiram potente atividade na replicação de *M. tb.* em escala nanomolar, com valores de MIC em MABA $<1\text{ }\mu\text{M}$ e em micromolar em condições anaeróbias (LORA) com MIC $<10\text{ }\mu\text{M}$. Ademais, esses compostos também apresentaram potente atividade inibitória contra cepas monoresistentes a RMP ou INH (MIC $<1\text{ }\mu\text{M}$ e MIC $<10\text{ }\mu\text{M}$, respectivamente). Os *hits* também demonstraram baixa citotoxicidade em células de mamífero (células Vero) e índice de seletividade entre 11 e 545 para *M. tb.* A mesma seletividade foi verificada no ensaio de espectro de atividade frente a quatro cepas comensais e seis cepas de micobactérias não-tuberculose (NTMs), em que os compostos apresentaram amplo espectro contra as cepas NTMs. Estes resultados demonstraram que a combinação das estratégias *in silico* para o planejamento de aril e heteroaril chalconas foi eficiente na identificação de novos compostos que se mostraram potentes, seletivos e promissores candidatos a protótipos de fármacos anti-TB.

In view of the current panorama of tuberculosis (TB) pandemic in the world, aggravated by co-infection with the HIV virus and the emergence of resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb.*), The research and discovery of new Anti-TB drugs. The present work aimed at the planning, synthesis and biological evaluation of new compounds with anti-TB activity, candidates for TB drugs. Structure and activity relationship (SAR) studies were developed using Matched Pair Molecular Analysis (MMPA) and binary models of quantitative relations between structure and activity (QSAR) using a combination of molecular fingerprints and machine learning methods. Bioisosteric replacement were proposed to plan new aryl and heteroaryl chalcones using the information obtained from SAR and QSAR analyses. Thirty-three compounds were selected by the consensus QSAR model for the synthesis. These compounds were synthesized and their structures confirmed by infrared (IR), hydrogen nuclear magnetic resonance (^1H NMR) and carbon (^{13}C NMR) spectroscopic methods and mass spectrometry (MS). Compounds which showed high purity ($\geq 95\%$ in HPLC) were tested against strains of *M. tb.* H37Rv (sensitive) and resistant to rifampicin (RMP) or isoniazid (INH). In addition, they were also tested in mammalian cell cytotoxicity assays and activity spectrum. We identified 22 hits with anti-TB activity, with minimum inhibitory concentration (MIC) in *M. tb.* H37Rv in aerobic conditions (MABA) $< 10\ \mu\text{M}$. Of these, 12 compounds exhibited potent *M. tb.* replication activity on nanomolar scale, with MIC values in MABA $< 1\ \mu\text{M}$ and in micromolar under anaerobic conditions (LORA) with MIC $< 10\ \mu\text{M}$. In addition, these compounds also showed potent inhibitory activity against monoresistant strains at RMP or INH (MIC $< 1\ \mu\text{M}$ and MIC $< 10\ \mu\text{M}$, respectively). Hits also demonstrated low cytotoxicity in mammalian cells (Vero cells) and selectivity index between 11 and 545 for *M. tb.* The same selectivity was verified in the activity spectrum assay against four commensal strains and six strains of non-tuberculosis mycobacteria (NTMs), in which the compounds presented broad spectrum against the NTMs strains. These results demonstrated that the combination of *in silico* strategies for the design of aryl and heteroaryl chalcones was efficient in identifying new compounds that proved to be potent, selective and promising candidates for prototypes of anti-TB drugs.

1.1. Tuberculose (TB)

1.1.1. Etiologia e Patologia

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa crônica resultante da infecção por *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb.*) e outras micobactérias do complexo tuberculose, que incluem *M. africanum*, *M. microtti*, *M. bovis*, *M. pinnipedii* e *M. caprae*. A infecção ocorre diretamente pelo contato direto pessoa-pessoa pela inalação de gotículas de saliva expelidas pela fala, tosse ou espirro de indivíduos infectados (Figura 1) (COLE; RICCARDI, 2011; GUERRA; OCHOA; TAMAYO, 2011). Primariamente, a TB é uma doença pulmonar, entretanto, pode também afetar outros órgãos sendo classificada neste caso como TB extrapulmonar (MCKAY; CORNER; BYRNE, 1967).

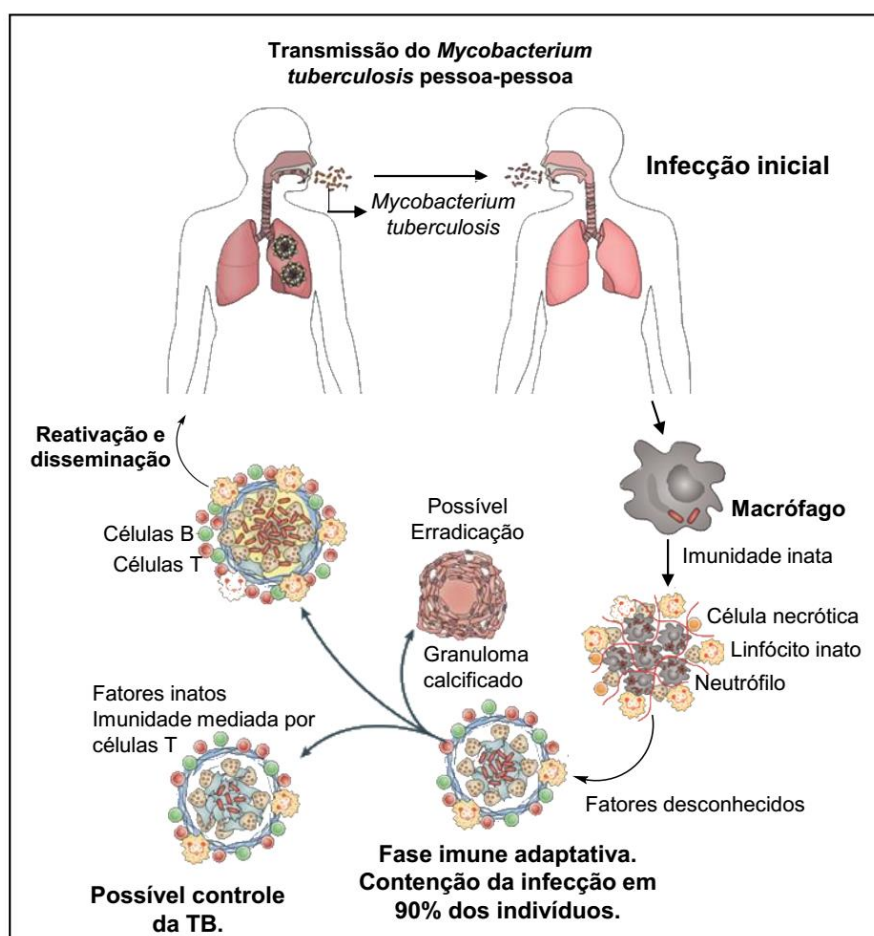


Figura 1 - Ciclo de patogenicidade de *M. tuberculosis*, (adaptado de Nunes-Alves et. al, 2014).

Pacientes com TB pulmonar ativa são a principal fonte de infecção e transmissão do *M. tb*.

A infecção ocorre com a deposição de gotículas contendo bacilos nos alvéolos (ORME, 2014). Embora os bacilos possam infectar diferentes células, os macrófagos alveolares são o principal alvo (Figura 1). O estágio inicial da infecção caracteriza-se pela resposta imune inata, que envolve o recrutamento de células do sistema pró-inflamatórias para o pulmão como: neutrófilos, células NK (do inglês *natural killer*), células T CD4+, bem como células B e T CD8+ (TANG; YAM; CHEN, 2016). A indução da resposta humoral iniciará somente após a disseminação do *M. tb*. para os linfonodos. Nos linfonodos ocorre a apresentação dos antígenos bacterianos pelas células dendríticas (células T) que identificam o antígeno específico e se diferenciam em células T maduras e efetoras. Quando as células T efetoras migram para a região infectada no pulmão, combinam-se a outros leucócitos e formam os granulomas (NUNES-ALVES et al., 2014).

Os granulomas são estruturas organizadas que contêm macrófagos, linfócitos e fibroblastos (Figura 1). Dentro do granuloma, os interferons-gama secretados pelas células T CD4⁺ ativam os macrófagos que podem restringir a dispersão e a replicação do *M. tb*. (ERNST, 2012). Embora o sistema imune humano possa controlar a infecção por *M. tb*., esta resposta pode conduzir a não eliminação total do patógeno criando apenas uma contenção resultando na infecção latente de TB (SALGAME et al., 2015).

A infecção latente de TB é o estado de resposta imune persistente ao estímulo por *M. tb*. sem manifestação clínica ativa. A exposição ao *M. tb*. frequentemente resulta no desenvolvimento da infecção latente com cerca de 5 a 10% dos casos evoluindo para forma ativa da doença nos dois primeiros anos (SALGAME et al., 2015). Este é um dado preocupante tendo em vista que cerca de um terço da população mundial possui LTBI (WHO, 2015a). Sugere-se que baixas concentrações de oxigênio e nutrientes nos granulomas que se formam após o controle primário, associados a fatores como a produção de óxido nítrico e TNF- α , sejam capazes de manter o bacilo na forma latente através de uma barreira de contenção (PALOMINO; LEÃO; RITACCO, 2007).

A falha na contenção devido à resposta imunológica insuficiente resulta no próximo estágio da lesão, pois permite aos bacilos escaparem a periferia do centro caseoso, esses são novamente fagocitados por macrófagos provocando o agravamento da lesão e a progressão da doença liberando bacilos infectantes nas vias aéreas, resultando na transmissão da TB (Figura 1). Este quadro geralmente ocorre em pacientes imunocomprometidos como pacientes em idade avançada, portadores do vírus HIV, em quimioterapia ou quadro clínico de desnutrição (MADKOUR, 2004).

1.1.2. Bases Epidemiológicas

As descobertas da estreptomicina (SM) (1) em 1944 por Selman Wakasman, e em seguida da isoniazida (INH) (2) (Figura 2) em 1952, gerou expectativas de que a TB poderia ser erradicada (JASSAL; BISHAI, 2009). Entretanto, no início da década de 90 constatou-se o retorno da TB em índices mundialmente alarmantes ao ponto de ser considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) uma doença de emergência global (WHO, 2011). Essa constatação foi atribuída a fatores como a prevalência da co-infecção com HIV, o aparecimento de cepas resistentes aos fármacos usados na terapia anti-TB e a indicadores socioeconômicos como globalização, aumento de migração, má-nutrição, dificuldade de acesso a cuidados médicos pelas populações de baixa renda, empobrecimento populacional e condições precárias de saneamento e habitação (DYE, 2006).

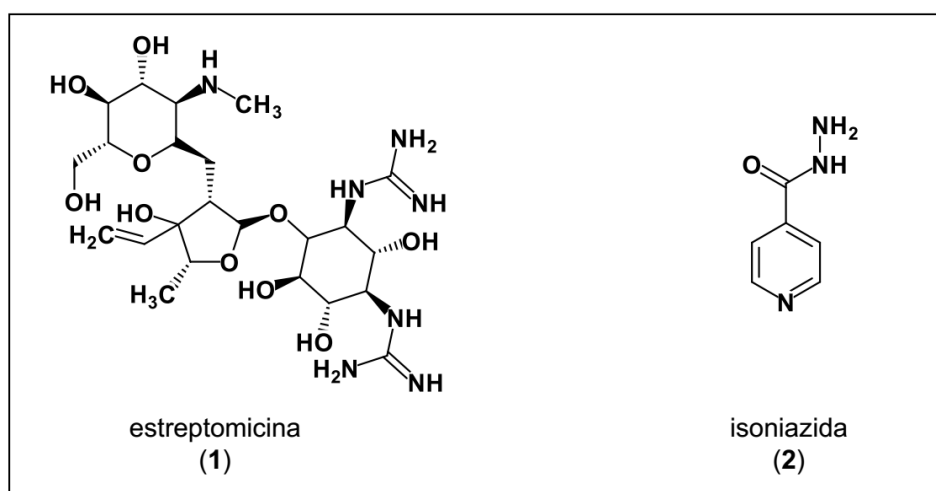


Figura 2 - Representação das estruturas químicas dos fármacos estreptomicina (SM, **1**) e isoniazida (INH, **2**).

Até 2014, a TB era a segunda maior causa de morte por doença infecciosa no mundo, apenas atrás da infecção por HIV (KAKKAR; DAHIYA, 2014). No entanto, no relatório anual de 2015, informação reproduzida no último relatório publicado em outubro de 2016, o número de mortes causadas por TB ultrapassou o número de mortes causadas por HIV (1,4 milhão de mortes incluindo 400.000 mortes associadas a co-infecção TB/HIV), tornando-se a maior causa de morte por doença infecciosa no mundo (WHO, 2015b, 2016)

A estimativa da incidência mundial de novos casos de TB em 2015 (Figura 3) foi de 10,4 milhões de casos (5,9 milhões entre homens, 3,5 milhões mulheres e 1 milhão de crianças), o equivalente a 142 casos a cada 100.000 pessoas e 1,2 milhão de casos de TB associado a HIV. Dos 10,4 milhões de novos casos de TB, cerca de 61% concentram-se no sudeste da Ásia e em regiões do Pacífico ocidental, onde Índia, Indonésia e a China. O continente africano responde por 26% do total de novos casos. Esse alto valor de incidência

pode ser relacionado a alta densidade demográfica, o que favorece a transmissão por contágio direto em aglomerações humanas. O continente europeu e as Américas apresentam menor proporção, juntas somam 13% do total de casos. No Brasil em 2015, 81.137 casos de TB foram notificados, o qual 73.221 são novos casos e reincidência (WHO, 2016).

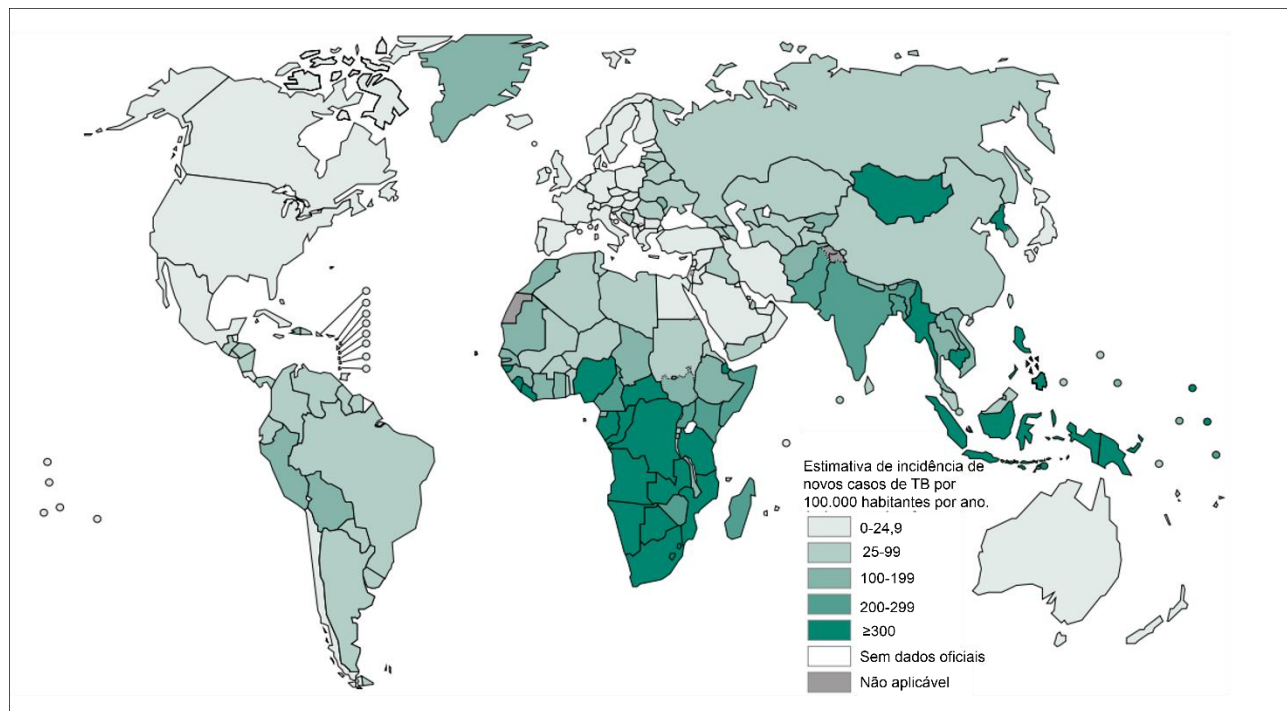


Figura 3 - Incidência de novos casos de TB no mundo no ano de 2015, (adaptado de WHO, 2016).

A incidência e a mortalidade de TB são agravadas pelo desenvolvimento de cepas resistentes à quimioterapia anti-TB. Se essa resistência está associada a INH (2) e rifampicina (RMP) (3), a cepa é classificada como multirresistente (MDR-TB do inglês *Multidrug-resistant tuberculosis*) (IZUMIZONO et al., 2011; ZUMLA et al., 2012). A MDR-TB representa grande ameaça ao controle global da TB (ZUMLA; NAHID; COLE, 2013), já que no ano de 2015 estimou-se que 250.000 pessoas morreram por MDR-TB (WHO, 2016).

No entanto, se a cepa apresentar resistência a INH (2) e RMP (3), somada a algum fármaco da classe das fluorquinolonas (4) e no mínimo três fármacos das seis classes de fármacos de segunda escolha a exemplo de canamicina (5), etioamida (6), ciclosserina (7), e ácido *p*-aminossalicílico (8), representados da Figura 4, a cepa é classificada como extensivamente resistente (XDR-TB do inglês, *Extensively drug-resistant tuberculosis*) (JASSAL; BISHAI, 2009), termo usado pela primeira vez na literatura em março de 2005, em um relatório publicado pela OMS e pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) (ZUMLA et al., 2012).

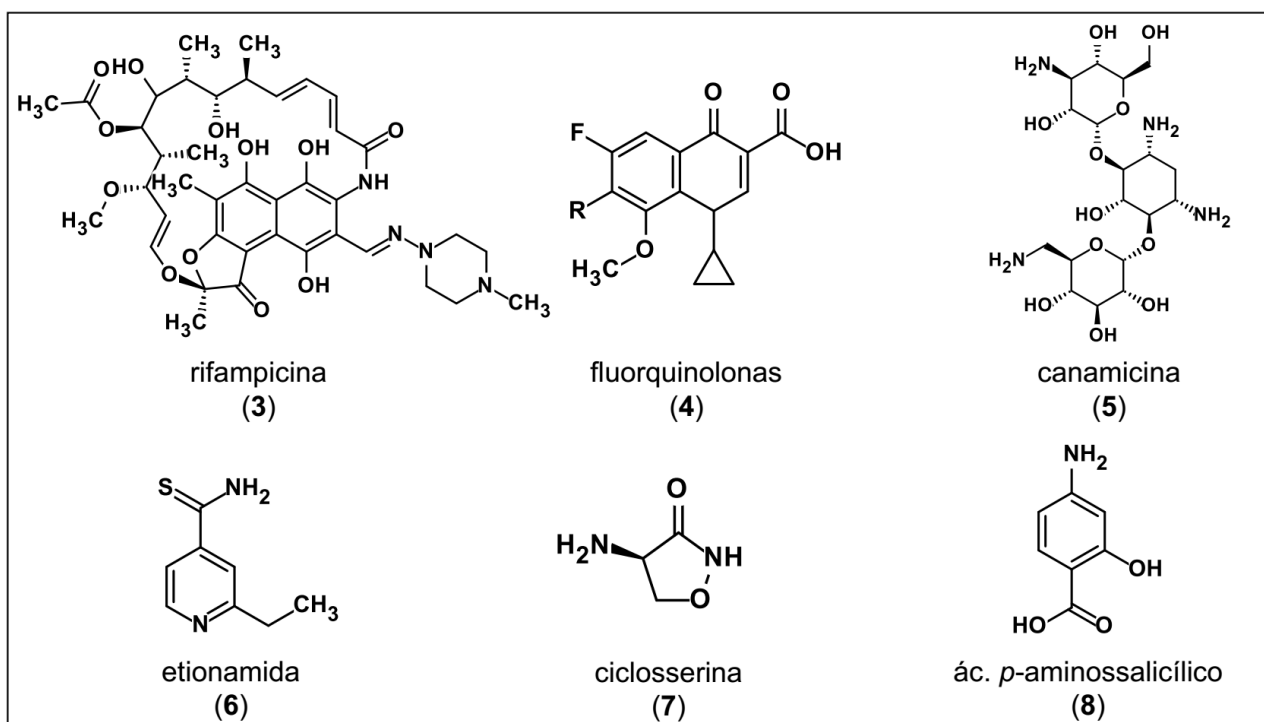


Figura 4 - Representação das estruturas químicas dos fármacos rifampicina (RMP, 3), fluorquinolonas (4), canamicina, etonamida, ciclosserina e ác. *p*-aminossalicílico.

1.1.3. *Mycobacterium tuberculosis*

O *M. tb.*, pertencente ao gênero *Mycobacterium*, é classificado como bactéria álcool ácido-resistente (Figura 5A), Gram-positiva, devido à sua parede celular rica em lipídeos e ausência de membrana celular externa (KAYSER et al., 2005). As colônias de *M. tb.* têm o formato de migalhas de pão ou de couve-flor, são secas, acromógenas e branco-acinzentadas ou amarelo-acastanhadas (Figura 5B) (SIMEÃO et al., 2009).

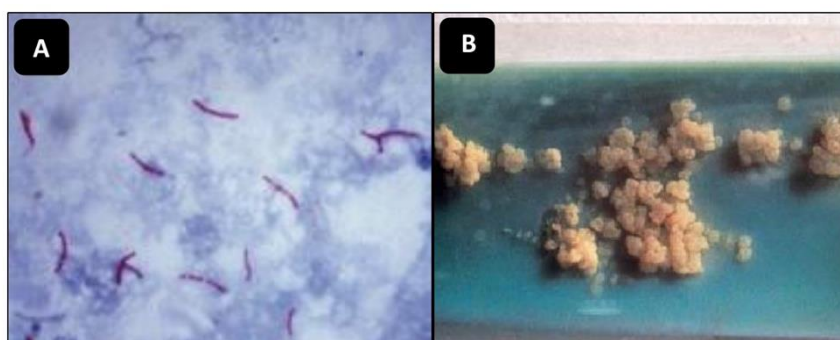


Figura 5 - Esfregaço contendo *M. tb.* corado por metodologia de Ziehl-Neelsen (álcool-ácido resistente) em pré-diagnóstico de TB (A). Cultura de *M. tb.* após quatro semanas de incubação (B) Fonte: (Kayser et al., 2005).

Geneticamente é classificado como do grupo dos actinomicetos. Apresenta morfologia de haste ou bastão curvo, mas também apresenta como coco-bacilos, sendo raramente pleomórfico, de acordo com as condições de crescimento e idade da cultura. Microscopicamente não possui diferenciação entre as espécies, não apresentando

motilidade nem esporulação, sua parede bacteriana provavelmente possui a maior concentração de lipídeos em bactérias já estudadas (MADKOUR, 2004; PALOMINO; LEÃO; RITACCO, 2007).

Os lipídeos constituem mais da metade do peso seco do *Mycobacterium*, entretanto, esta composição pode variar durante o ciclo de vida em meio de cultura devido à composição dos nutrientes. Características próprias dos lipídeos conferem ao *Mycobacterium* algumas propriedades idiossincrásicas como a rigidez, hidrofobicidade e resistência à fármacos contudo, contribuem com o crescimento lento em algumas espécies pela limitação na absorção de nutrientes (RATLEDEGE; DALE, 1999).

1.1.3.1 Envelope celular

A distinção entre as micobactérias do complexo tuberculose e micobactérias não tuberculose (NTMs) é feita a partir de seu envelope celular. O envelope celular especificamente do *M. tb.* é apresentado como um complexo diagrama estrutural conforme apresentado na Figura 6. A membrana citoplasmática da micobactéria não possui grandes diferenças quando comparada a outros microrganismos, exceto pela presença de alguns lipopolissacarídeos que são compartilhados por todos actinomicetos (PALOMINO; LEÃO; RITACCO, 2007).

O envelope celular confere proteção osmótica às micobactérias, regulando a passagem de solutos do citoplasma para o ambiente externo. A membrana contém proteínas que apresentam diferentes funções como: mensurar a concentração de moléculas no ambiente externo. Sinalizar para o maquinário genético e metabólico no citoplasma para sintetizar proteínas intracelulares. Fazer catabolismo. Interferir na síntese da parede e membrana celular durante a divisão do *Mycobacterium*. Participar da montagem e secreção de proteínas extra citoplasmáticas; e replicação do DNA (BARKER, 2012).

Externo à membrana celular apresenta-se a parede celular de constituição única entre os procariotos. Sua camada mais interna é constituída de peptideoglicanos, responsáveis pela integridade estrutural da micobactéria, esses, apresentam número elevado de ligações cruzadas (Figura 6) que no *Mycobacterium* possui grau de reticulação dos peptideoglicanos em cerca de 70-80%. Enquanto que, em outros procariotos é cerca de 20 a 30% (PALOMINO; LEÃO; RITACCO, 2007; SMITH, 2003).

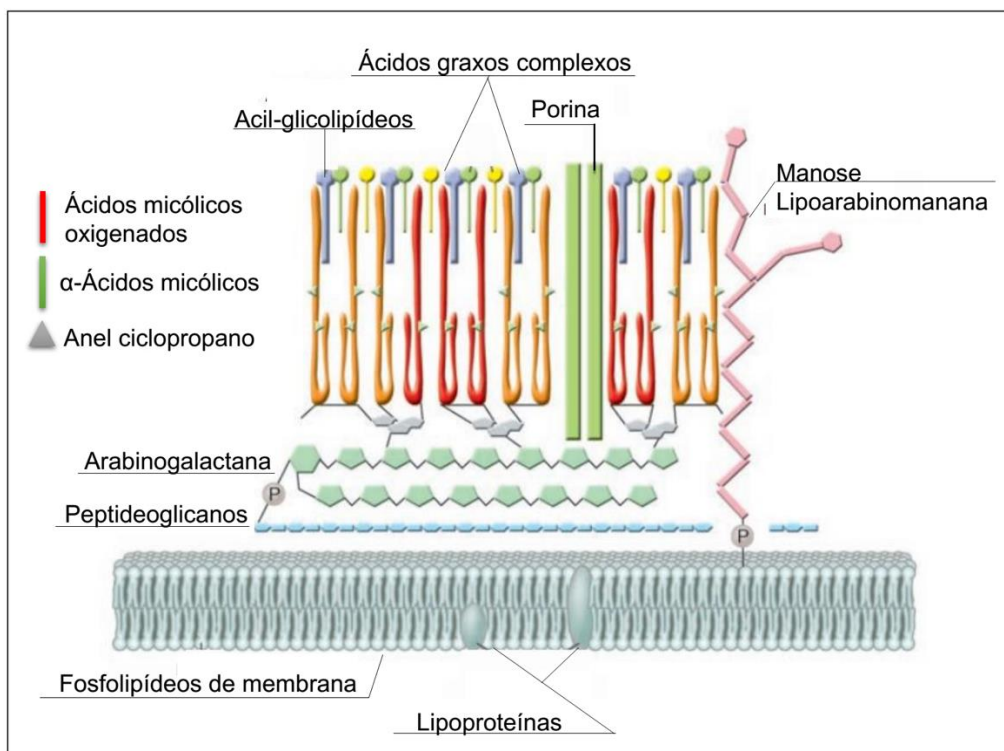


Figura 6 – Representação esquemática da estrutura da parede celular micobacteriana (adaptado de Riley, 2006).

O peptidoglicano está covalentemente ligado ao arabinogalactano, um polissacarídeo ramificado no qual suas subunidades exteriores são ésteres ligados aos ácidos micólicos (ácidos graxos de alto peso molecular), que se apresentam como estruturas de cadeia longa contendo entre 60 e 90 átomos de carbono. Estas cadeias possuem ramificações com grupamentos metila, insaturações e anéis ciclopropanos, que contribuem para a integridade estrutural do *M. tb.* e sua virulência, protegendo-o também de espécies reativas de oxigênio (TAKAYAMA; WANG; BESRA, 2005). Glicolípídeos como os manosídeos, fosfaditil-mioinositol, lipomanana (LM) e lipoarabinomana (LAM), são observados ancorados à membrana plasmática estendendo-se até a porção exterior da parede celular. Esta ainda apresenta proteínas que são responsáveis por sua construção durante o ciclo de vida do bacilo no qual a sua espessura está ligada a fatores ambientais (RILEY, 2006).

1.1.4. Quimioterapia

O tratamento farmacológico da TB teve início com a descoberta da SM (**1**) em 1944, primeiro fármaco usado no tratamento com atividade comprovada contra *M. tb.*, interferindo na biossíntese de proteínas ao interagir com a subunidade 30S do ribossomo (VILLEMAGNE et al., 2012). Essa descoberta delineou o desenvolvimento de novos fármacos anti-TB, como o ácido *p*-aminossalicílico (PAS) (**8**) (Figura 8) em 1948, a INH (**2**)

um dos fármacos mais ativos usados na terapia anti-TB em 1952, seguido da pirazinamida (PZA) (9) em 1954. O etambutol (EMB) (10) na década de 60 e a RMP (3) (Figura 7) no início da década de 70. Adicionalmente, representou uma inovação no tratamento da terapia anti-TB, pela ação tanto em formas replicantes quanto não-replicantes, que pode ser justificado pelo seu mecanismo de ação ao inibir a síntese de RNA bacteriano pela ligação a subunidade β da cadeia polimerase DNA dependente (TRIPATHI et al., 2012; ZUMLA; NAHID; COLE, 2013).

Tradicionalmente, a quimioterapia contra a TB é dividida em fármacos de primeira escolha, que compreendem a INH (2), RMP (3), PZA (9) e EMB (10) (Figura 7), e os de segunda escolha, recomendados a pacientes que apresentaram resistência aos fármacos de primeira escolha (Tabela 1) e incluem aminoglicosídeos injetáveis como a SM (1), canamicina (KM) (11), amicacina (AMK) (12); polipeptídeos injetáveis como capreomicina (CAP) (13); além de etionamida (ETN) (14), ciclosserina (CLS) (15), fluorquinolonas (4) injetáveis e orais como ciprofloxacino (CFX) (16), levofloxacino (LFX) (17), moxifloxacino (MFX) (18), ofloxacino (OFX) (19) e gatifloxacino (GFX) (20) (Figura 8) (VILLEMAGNE et al., 2012; WONG; COHEN; BISHAI, 2013).

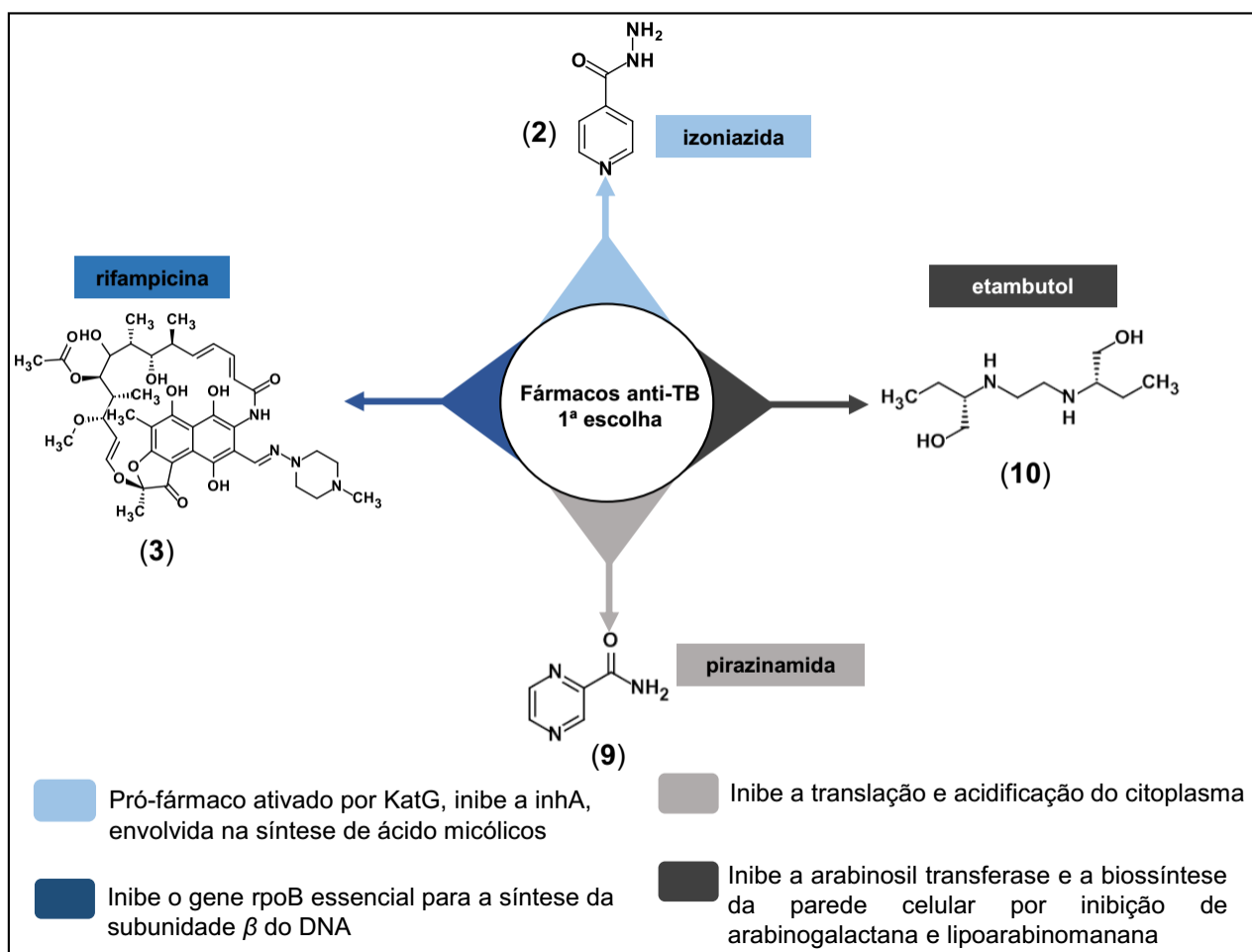


Figura 7 - Estruturas químicas e mecanismo de ação de fármacos anti-TB de primeira escolha.

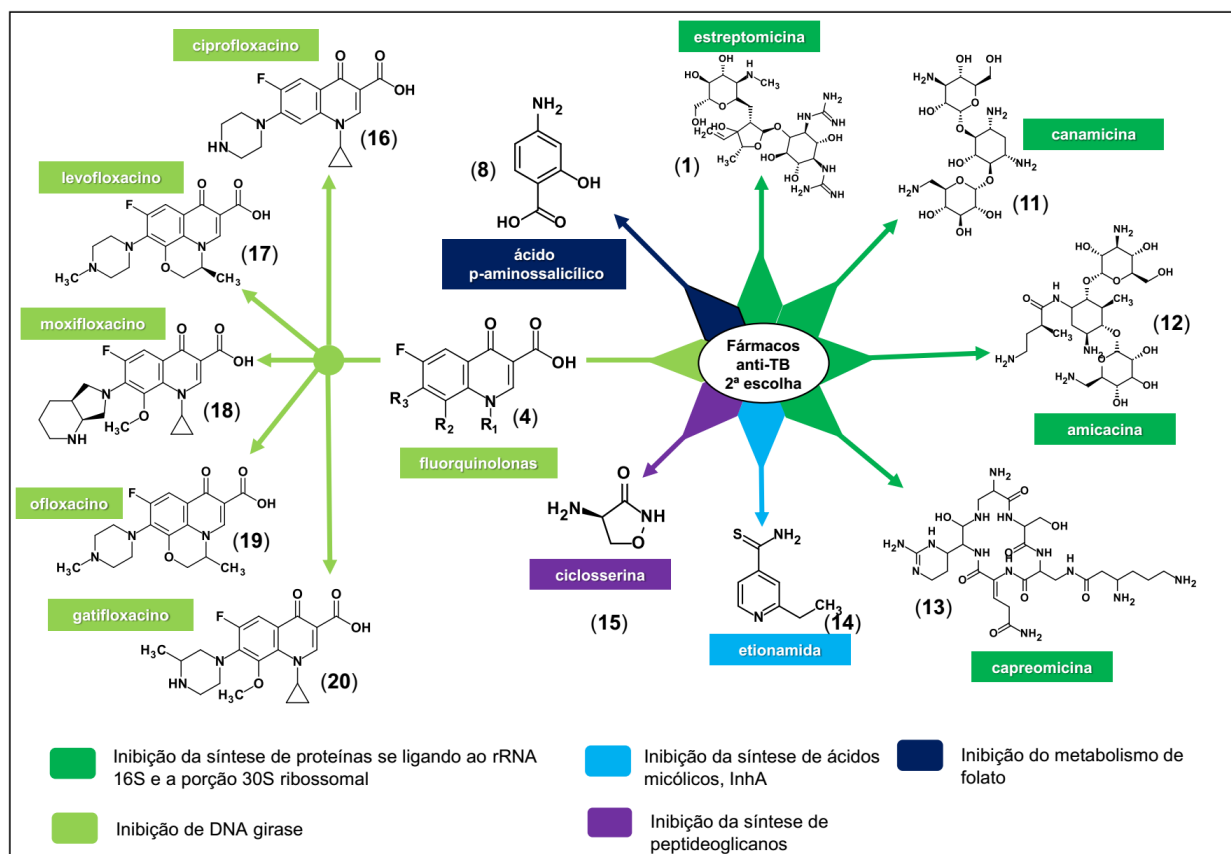


Figura 8 - Estruturas químicas e mecanismos de ação dos fármacos anti-TB de 2ª escolha.

Tabela 1 - Mecanismo de resistência dos fármacos anti-TB de 1ª e 2ª escolha. (Adaptado de SUNDARAMURTHI et al., 2016; ZUMLA; NAHID; COLE, 2013).

Fármaco	Mecanismo de resistência	Referência
INH (2)	Mutações específicas nos genes do inhA,	(GREEN; GARNEAU-TSODIKOVA, 2013)
RMP (3)	Mutações no estiramento 81bp do gene rpoB,	(LEWIS et al., 2002)
PZA (9)	Mutações nos genes da enzima conversora de PZAase	(SHI et al., 2011)
EMB (10)	Mutações nos genes embA ou embB resultam no aumento do MIC.	(LEWIS et al., 2002)
SM (1)	Mutações no gene rpsL	(SUNDARAMURTHI et al., 2016)
KM (11)	Mutações no gene Rrs	(SUNDARAMURTHI et al., 2016)
AMK (12)	Mutações no gene Rrs	(SUNDARAMURTHI et al., 2016)
CAP (13)	Mutações no gene Rrs	(SUNDARAMURTHI et al., 2016)
ETN (14)	Mutações no gene da inhA	(SUNDARAMURTHI et al., 2016)
CLS (15)	Mutações no gene alr e ddlA	(SUNDARAMURTHI et al., 2016)
CFX (16)	Mutações no gene gyrB e gyrA	(SUNDARAMURTHI et al., 2016)
LFX (17)	Mutações no gene gyrB e gyrA	(SUNDARAMURTHI et al., 2016)
MFX (18)	Mutações no gene gyrB e gyrA	(SUNDARAMURTHI et al., 2016)
OFX (19)	Mutações no gene gyrB e gyrA	(SUNDARAMURTHI et al., 2016)
GFX (20)	Mutações no gene gyrB e gyrA	(SUNDARAMURTHI et al., 2016)

Para obter sucesso no tratamento da TB, a OMS propõe uma estratégia global de trabalho intensivo de tratamento com observação direta (DOTS, do inglês *Directly Observed Treatment Short-course*) para combate da TB no período de 2006-2015 (WHO, 2015c)

O DOTS é constituído de cinco elementos: (i) compromisso político com financiamento aumentado e sustentável, (ii) diagnóstico de qualidade, (iii) tratamento padronizado, (iv) gestão eficaz e fornecimento de medicamentos e (v) monitoramento e avaliação do impacto dos sistemas de medição (SHI; SUGAWARA, 2010; WHO, 2015d).

Esta estratégia compõe um conjunto de ações organizadas pela OMS para controle e redução dos números de casos de TB no mundo entre 2006 e 2015, quando comparado aos índices de 1990 (WHO, 2015c).

O complexo esquema terapêutico adotado para o tratamento da TB e o longo tempo de duração e o desenvolvimento de cepas resistentes são as maiores limitações para o sucesso no controle da TB. O tratamento padrão para a TB sensível (DS-TB do inglês *Drug Sensitive Tuberculosis*) aos fármacos de primeira escolha recomendado pela OMS é de 6 meses. Nos dois primeiros meses administra-se a combinação de quatro fármacos INH (2), RMP (3), PZA (9) e EMB (10), nos quatro meses restantes é mantida a combinação INH (2) e RMP (3) (TRIPATHI et al., 2012; TYLER; ENGMAN, 2001).

Nos casos de resistência, o tempo recomendado de tratamento é de dois anos, em que os pacientes são tratados com fármacos de segunda escolha, que em geral são mais tóxicos, injetáveis, de maior custo e menos eficazes (ZUMLA; NAHID; COLE, 2013).

A única medida preventiva disponível atualmente para TB é a vacina BCG (Bacilo de Calmette-Guérin) que previne o desenvolvimento de TB fatal em crianças (CALMETTE; PLOTZ, 1929). Contudo, em adultos a eficácia e proteção é questionável, não existindo ainda no mercado nenhuma vacina eficaz para prevenção de TB em adultos (WHO, 2016).

1.1.5. Novas terapias para tratamento e prevenção da TB

Por um período de 42 anos, a descoberta da RMP (3) foi à última inovação terapêutica para o tratamento da TB. Entretanto, a ineficácia contra cepas MDR-TB, XDR-TB e a co-infecção com HIV fez esse panorama mudar. Mesmo sendo ativa contra cepas replicantes e latentes, somada à associação com outros fármacos do regime terapêutico no combate a DS-TB (MA et al., 2010).

Essa mudança foi iniciada no ano 2000, em que uma reunião com 120 representantes de universidades, indústrias farmacêuticas e agências governamentais e não-governamentais de todo o mundo iniciaram um debate para discutir a necessidade de novos tratamentos para TB, concebendo um grupo denominado Aliança Global para o Desenvolvimento de Fármacos para TB, a *TB Alliance* (<http://tballiance.org>) (TBALLIANCE, 2015).

A criação da *TB Alliance* representou um grande avanço que culminou no desenvolvimento e aprovação da bedaquilina (TMC207) (21) em 2014. A bedaquilina foi o primeiro fármaco anti-TB aprovado após 42 anos da descoberta da RMP (3), e o primeiro

fármaco aprovado para pacientes portadores de cepas MDR-TB. Quimicamente, é classificada como uma diarilquinolina (Figura 9), sendo ativa em formas replicantes e não replicantes de *M. tb*. Seu mecanismo de ação é inovador com relação a todos os outros fármacos anti-TB, atua pela inibição da ATP sintase e da bomba de prótons do *M. tb*. (HARDS et al., 2015; KAKKAR; DAHIYA, 2014).

Outro fármaco recém-aprovado para TB foi a delamanida (OPC-67683) (22), um derivado diidronitroimidazoxazólico (Figura 9). Seu mecanismo de ação é a inibição da síntese da parede celular, mais especificamente dos componentes ácido metóximicólico e ácido cetomicólico. É classificada como pró-fármaco, pois é dependente de ser ativado pela enzima deazaflavina nitroredutase (Rv3547). O metabólito ativo inibe a síntese de ácidos micólicos. Para evitar o aparecimento de resistência recomenda-se o uso de delamanida apenas para pacientes adultos que apresentam quadro de MDR-TB e que o regime terapêutico aprovado não tenha apresentado eficácia para evitar o surgimento de resistência (XAVIER; LAKSHMANAN, 2014).

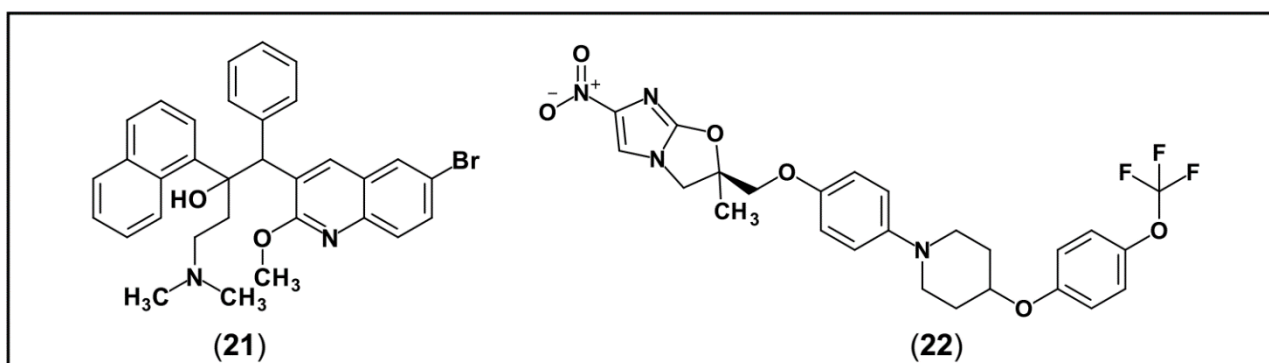


Figura 9 – Representação das estruturas químicas dos fármacos bedaquilina (21) e delamanida (22).

Ainda assim, o esforço para o desenvolvimento de novos fármacos anti-TB é continuado. A organização *Working Group on New TB Drugs* (<http://www.newtbdrugs.org>), ligada diretamente a *TB Alliance*, disponibiliza *pipeline* para o desenvolvimento de novos fármacos anti-TB (Figura 10), o qual lista compostos que estão em fase de descoberta e em fase de desenvolvimento.

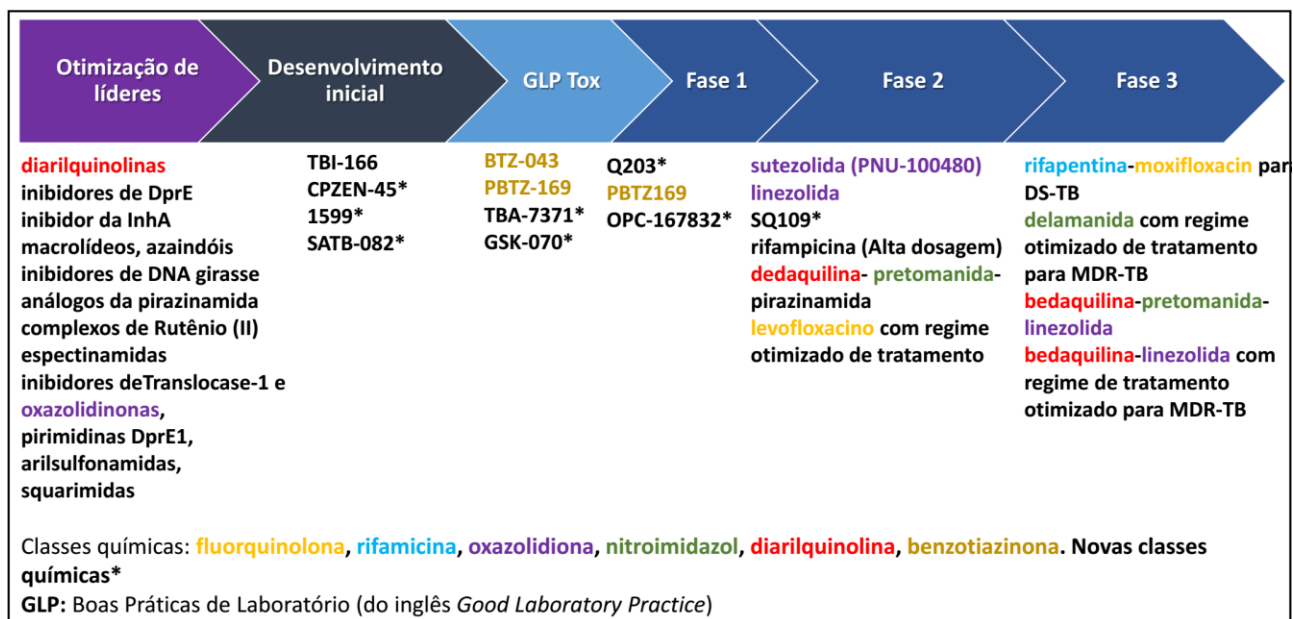


Figura 10 - Pipeline de descoberta de novos fármacos anti-TB e seus estágios de desenvolvimento (adaptado de <http://www.newtbdrugs.org.br>).

Desse *pipeline*, alguns compostos já são fármacos aprovados que estão sendo reposicionados para a TB, a exemplo de macrolídeos e inibidores de DNA girase, enquanto que outros estão sendo testados em associação (bedaquilina-pretomanida-pirazinamida) ou com regime de dose otimizado (levofloxacino). Além disso, existem também novas classes químicas, como a espectinamida 1599 (**23**), em desenvolvimento inicial (ensaio *in vitro*, pré-clínicos), o BTZ043 (**24**) (ensaio de toxicidade pré-clínicos, GLP Tox (boas práticas de laboratório, do inglês *Good Laboratory Practice*)) e Q203 (**25**) (fase 1) (Figura 11) (NEWTBDRUGS, 2015).

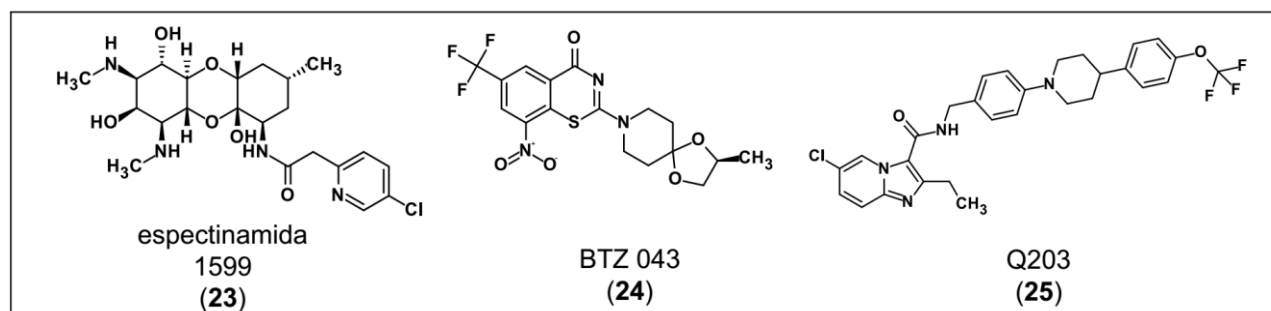


Figura 11 - Representação da estrutura química de novas classes químicas de candidatos a fármacos anti-TB.

A espectinamida 1599 (**23**) (Figura 11), análogo semissintético da espectinomicina, foi planejado por planejamento de fármacos baseado na estrutura (SBDD, do inglês *Structure-Based Drug Design*) com inibição seletiva ribossomal. Em estudos *in vitro* (**23**) apresenta potente atividade anti-TB e ausência de resistência cruzada com fármacos da terapia existente, sendo ativo contra as formas MDR e XDR-TB. Seu mecanismo chave é a modificação estrutural para escapar da bomba de efluxo RV1258c que provoca *up-*

regulation em cepas MDR-TB que implica na tolerância a fármacos induzida por macrófagos (LEE et al., 2014).

O BTZ043 (**24**) (Figura 11) inibe a síntese da parede celular bloqueando a decaprenil-fosforibose-2'-epimerase (DprE1) que é necessária para a síntese de D-arabinofuranose componente da arabinogalactana e arabinomanana. Este mecanismo de ação torna este composto altamente seletivo para micobactérias (NEWTBDRUGS, 2015).

O Q203 (**25**) (Figura 11), candidato a fármaco submetido a registro no FDA, é um potencial agente anti-TB em estudos clínicos de fase 1 pertence à classe dos imidazopiridina amida (IPA) compostos que inibem o crescimento do *M. tb.* bloqueando o complexo citocromo bc₁ (PETHE et al., 2013).

Para evitar o avanço da TB no mundo, a prevenção também é buscada com o desenvolvimento de vacinas que possam ser mais efetivas para prevenir a TB em crianças e recém-nascidos que contém o Bacilo Calmette-Guérin. O *pipeline* de pesquisa de novas vacinas anti-TB também está disponível pelo *Working Group on New TB Drugs* (<http://www.newtbdrugs.org/pipeline/vacines>).

Em fase clínica 3 encontra-se a vacina *Vaccae*TM. Esta vacina é um lisato específico desenvolvido pela companhia farmacêutica chinesa Anhui Zhifei Longcom Biologic Pharmacy Co., Ltd. e está licenciada pela *China Food and Drug Administration* (WHO, 2016).

1.2. Indústria farmacêutica e desenvolvimento de fármacos anti-TB

A indústria farmacêutica é a maior responsável pelo desenvolvimento e comercialização de fármacos no mundo, com volume de vendas no ano de 2015 cerca de 954 bilhões de dólares. Deste montante, o mercado de antibacterianos aparece ranqueado em sétimo lugar no topo das 20 classes terapêuticas como maior número de vendas, comercializando cerca de, 38 bilhões de dólares no ano de 2015 (IMSHEALTH, 2016). Mesmo diante deste panorama, a pesquisa, desenvolvimento e inovação (PD&I) de novos fármacos é um processo longo, podendo requerer um período de até 15 anos. Complexo porque necessita a integração de várias áreas de inovação, conhecimento, tecnologia e alto investimento (LOMBARDINO; LOWE, 2004).

Estudo publicado por DiMasi e colaboradores em 2003 no *Journal of Health Economics* (DIMASI; HANSEN; GRABOWSKI, 2003) estimou que o custo para o desenvolvimento de novo fármaco em média seria por volta de US\$ 800 milhões, incluindo o preço das falhas e o “custo com o tempo”. Entretanto, uma nova análise feita pela mesmo

grupo, usando metodologia semelhante, estimou que o custo em 2013 seria da ordem de US\$ 2,6 bilhões, ou seja, um aumento de 145% (MULLARD, 2014).

No âmbito do mercado farmacêutico, os investimentos e a competitividade entre as indústrias farmacêuticas estão relacionados ao desenvolvimento e descoberta de fármacos na categoria *blockbusters* (*i.e.* termo em inglês para designar fármacos inovadores que atingem valores de vendas anuais superiores a US\$ 1 bilhão por ano) (IOANNIDIS, 2013; KHANNA, 2012). A atorvastatina (Lipitor®) e o sildenafil (Viagra®), ambos da Pfizer, são exemplos de fármacos *blockbusters* com valores de vendas de US\$ 12 bilhões em 2008 e US\$ 1,8 bilhão em 2003, respectivamente (NATURE, 2009; NEUMEYER; KIRKPATRICK, 2004).

Ainda que tenha ocorrido avanços na terapia contra TB com a aprovação da bedaquilina (21) e delamanida (22), estes novos fármacos são indicados apenas em infecções multirresistentes. O esquema constituído por INH (2), RMP (3), PZA (9) e EMB (10) ainda é a terapia mais eficaz e preconizada pela OMS para o tratamento da TB sensível. No entanto, este esquema de combinação de fármacos possui tempo de uso prolongado, custo elevado e o aumento do número de casos associados a cepas resistentes são fatores que fundamentam a pesquisa de novos fármacos anti-TB. De acordo com a TB Alliance é necessário reduzir a quantidade de fármacos usados, o tempo de duração e custo do tratamento, alcançando taxa completa de cura (Figura 12) (TBALLIANCE, 2015).

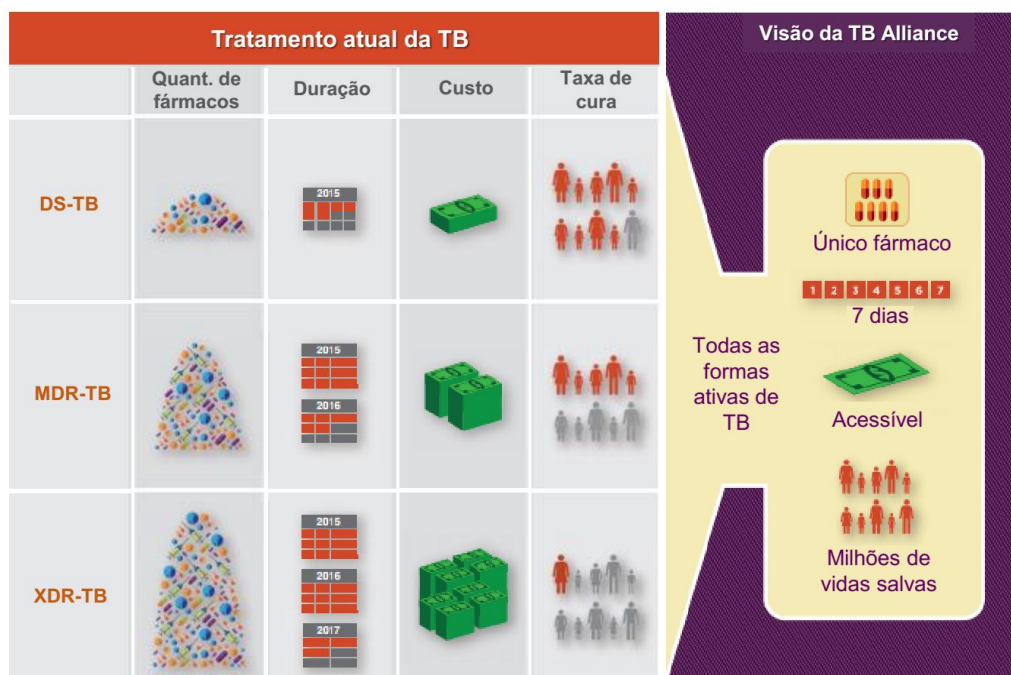


Figura 12 - Projeção da TB Alliance para o tratamento da TB (adaptado de TBAlliance, 2015).

Guiados pelos requisitos específicos para a TB, um comitê coordenado pelo fundo de tecnologia inovadora global em saúde (GHIT, do inglês *Global Health Innovative Technology*) concebeu critérios específicos para o desenvolvimento de novos *hits* para o tratamento da TB (KATSUNO et al., 2015). O primeiro critério caracteriza o *hit* pela potência celular, no qual um *hit* deve possuir uma concentração inibitória mínima (MIC) contra cepa de *M. tb.* H37Rv $< 10\ \mu\text{M}$ sobre condições de replicação ou aeróbia (MABA) (CHO; LEE; FRANZBLAU, 2015). A substância deve possuir diferença maior que 10 vezes no teste de citotoxicidade contra células de mamíferos e o MIC contra *M. tb.* H37Rv. Além disso, o *hit* deve apresentar evidências de relação estrutura atividade (SAR) entre os análogos (KATSUNO et al., 2015).

Já o segundo critério é relacionado a caracterização do protótipo. Um composto protótipo também é caracterizado pela potência *in vitro*, devendo apresentar MIC contra *M. tb.* H37Rv $< 1\ \mu\text{M}$ sob as condições do MABA e MIC $< 10\ \mu\text{M}$ sob condições não-replicantes em condições anaeróbias (LORA) (CHO; LEE; FRANZBLAU, 2015). Além disso deve apresentar atividade *in vitro* em cepas resistentes a pelo menos um dos fármacos INH (**2**) ou RMP (**3**), indicando novo mecanismo de ação; possuir demonstração de atividade bactericida *in vitro*, indicado por curvas de tempo de morte que mostram queda nas unidades formadoras de colônias (UFCs) ao longo de 14 dias; apresentar biodisponibilidade oral em roedores, eficácia do tratamento oral em modelo de infecção aguda em ratos (ORME, 1998) e indicação preliminar de segurança, que deve ser demonstrada em hERG (PRIEST; BELL; GARCIA, 2008).

1.2.1. Aril e heteroaril chalconas

As aril chalconas são compostos de baixo peso molecular, biossintetizados em resposta a estímulos ambientais e precursores de flavonóides e isoflavonóides (NOWAKOWSKA, 2007; SAHU et al., 2012).

Quimicamente as aril chalconas (1,3-diaril-2-propen-1-onas) (**26**) e as heteroaril chalconas (**27**) são compostos que possuem dois anéis aromáticos unidos por uma cadeia aberta constituída de três átomos de carbono em um sistema carbonílico α,β insaturado como representado na Figura 13 (NASIR ABBAS BUKHARI et al., 2013; SAHU et al., 2012).

Quanto à numeração dos anéis, as chalconas são comparadas às acetofenonas, que as difere dos flavonoides, cujo anel A recebe números ordinais seguidos de um apóstrofo (') e o anel B recebe somente a numeração ordinal (Figura 13) (SIMÕES et al., 2010).

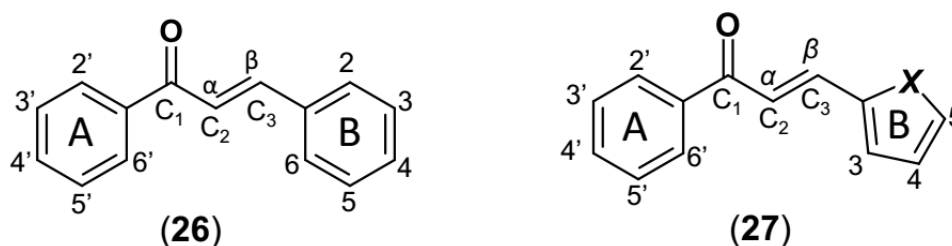


Figura 13 - Representação da estrutura geral do núcleo fundamental de aril (26) e heteroaril chalconas (27).

A conjugação de duplas ligações do núcleo chalcônico produz o deslocamento dos elétrons π para o carbono da carbonila, aumentando o caráter eletrofílico dos anéis aromáticos (MATHEW et al., 2014). Apresentam isomeria *trans* (*E*) e *cis* (*Z*), entretanto o isômero *E* (Figura 13) é termodinamicamente mais estável, pois a configuração *Z* possui impedimento estérico provocado pela repulsão dos pares de elétrons do oxigênio da carbonila e do anel B (DUCKI et al., 1998).

O nome chalcona deriva do grego *chalcos*, que significa bronze. Este nome foi dado pela primeira vez por Kostanecki e Tambor em 1899. Estes compostos geralmente apresentam coloração amarela, contudo, em meio alcalino sua coloração é vermelha, que contribui com a pigmentação de flores, tornando-as atrativas a pássaros e insetos para a polinização (REPANAS; KATSORI; HADJIPAVLOU-LITINA, 2013).

Plantas que contêm chalconas como a *Glycirrhiza*, *Piper* e *Ruscus* são muito usadas na Ásia, África e América do Sul como plantas medicinais. No mercado farmacêutico, as aril chalconas já possui um representante, a metachalcona, nome comercial Auxibilina® (28), cuja indicação é atividade colerética e colagoga (NI; MENG; SIKORSKI, 2004). Outro representante em estudos pré-clínicos é a sofalcona (PubChem CID: 5282219) (29), com atividade antiulcerosa, representados na figura 14 (ISOMOTO et al., 2005; TANAKA et al., 2009).

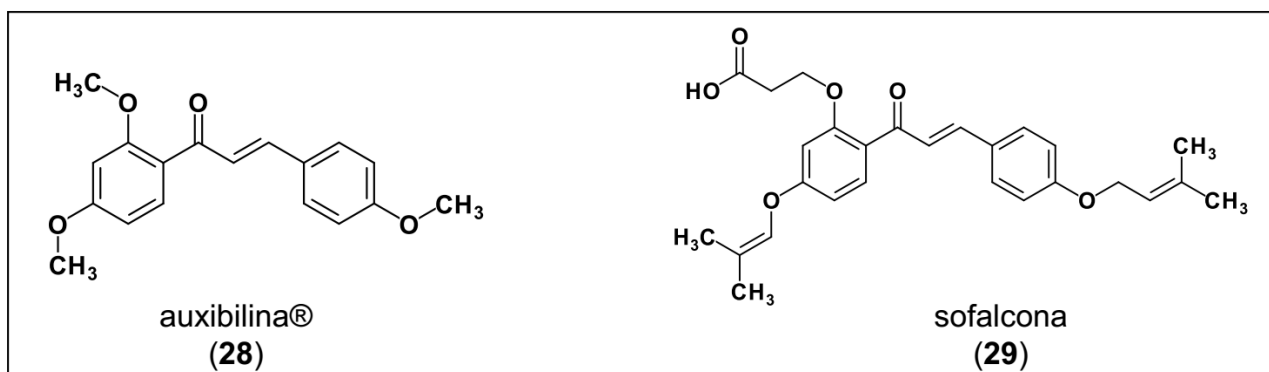
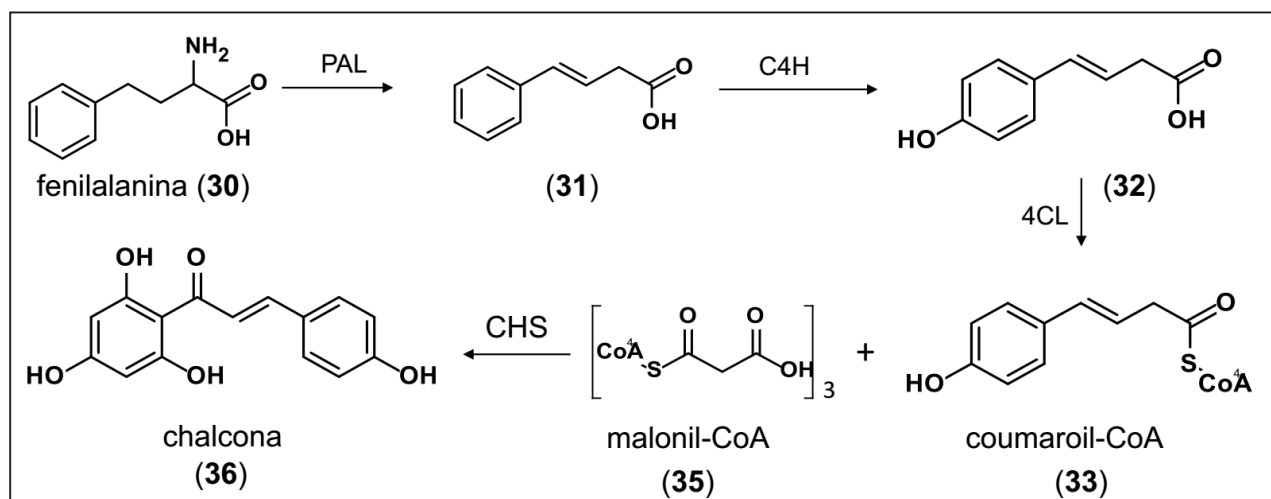


Figura 14 - Representação das estruturas químicas da auxibilina e da sofalcona.

A via bioquímica que melhor representa a biossíntese de chalconas é a da chalcona sintase (CHS), que envolve a condensação de três moléculas de malonilcoenzima-A (CoA)

e uma molécula de *p*-coumaril (Figura 15). As moléculas condensadas são descarboxiladas no sítio ativo da CHS e o resultado da descarboxilação é um grupo carbânion acetil-CoA que age como nucleófilo na formação do enolato (FERRER et al., 1999). Esta atividade é crucial para a biossíntese de fitoalexinas isoflavonóides antimicrobianas, antocianinas que dá pigmentação as pétalas e a síntese de flavonoides (JEZ; NOEL, 2000).



PAL: fenilalanina amônia-liase; C4H: ácido cinâmico 4-hidrolase, citocromo P450 monoxigenase; 4CL: coenzima A 4-coumarato ligase

Figura 15 - Via bioquímica de biossíntese de chalconas.

Já as aril chalconas sintéticas são produtos de condensação entre aldeídos aromáticos e acetofenonas na presença de catalizador alcalino. Este método se refere a tradicional condensação de Claisen-Schmidt, representado na Figura 16 (LIU et al., 2012; NASIR ABBAS BUKHARI et al., 2013; SIVAKUMAR et al., 2007).

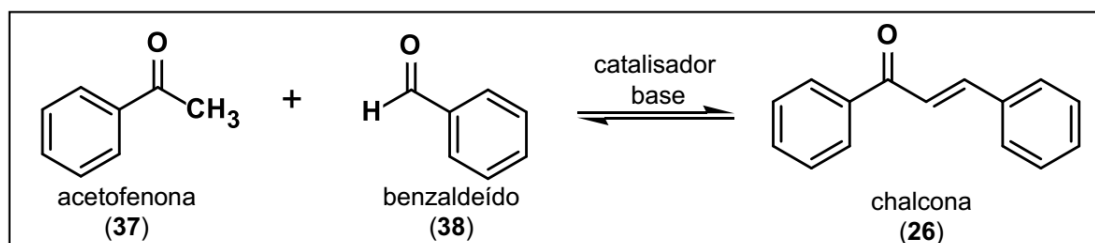


Figura 16 - Esquema geral da síntese de chalconas pela condensação clássica de Claisen-Schmidt.

Entretanto, outras metodologias de síntese de aril e heteroaril chalconas já foram reportadas, como: irradiação por micro-ondas (SRIVASTAVA, 2008), Método de Von-Konstanecki (NASIR ABBAS BUKHARI et al., 2013), Síntese de Flavonas de Ganguly's (GANGULY et al., 2005), Acilação de Friedel-Crafts (BOHM, 1998), Olefinação de Julia-Kocienski (KUMAR et al., 2010) e Técnica de Grinding (VIBHUTE; MOKLE, 2009). Todas essas diferentes metodologias de síntese tem como variável o uso de diferentes catalisadores (NASIR ABBAS BUKHARI et al., 2013).

A estrutura das aril e heteroaril chalconas são alvo de estudo de diversos grupos de pesquisa devido a fatores como: (i) estrutura relativamente simples, (ii) permitir rápida síntese, (iv) ligar diversos substituintes e (v) apresentar amplo espectro de atividade biológica já descrita em literatura, como: atividade antitumoral (SYAM et al., 2012), antioxidante (AOKI et al., 2008), anti-inflamatória (CHEN et al., 2013), antidiabética (MAHAPATRA; ASATI; BHARTI, 2015), antirretroviral (RIZVI et al., 2012), antimalárica (HANS et al., 2010), antileishmania (CHEN et al., 2001), anti-helmíntica (OUATTARA et al., 2011), antifúngica (LÓPEZ et al., 2001), anti-hipertensiva (AVILA-VILLARREAL et al., 2013), anti-histamínica (YAMAMOTO et al., 2004), ansiolítica (JAMAL; ANSARI; RIZVI, 2008), hipnótica (CHO et al., 2011), antiespasmódica (SATO et al., 2007), e antituberculose (CHIARADIA et al., 2008; HANS et al., 2010; MASCARELLO et al., 2010; NOWAKOWSKA, 2007) (Figura 17).

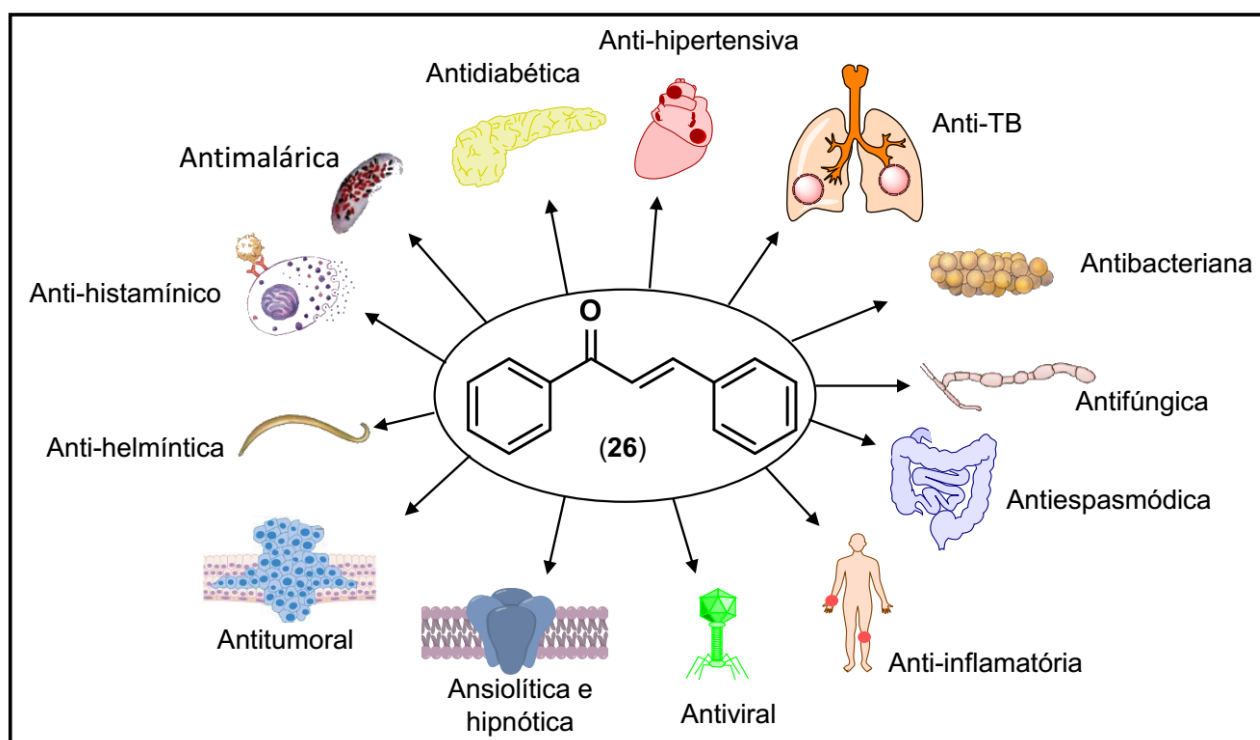


Figura 17 - Diferentes atividades biológicas apresentadas por chalconas

A atividade antituberculose de aril chalconas reportada na literatura refere-se a produtos naturais, como a licochalcona A (**39**) ($MIC \leq 59 \mu M$) (NOWAKOWSKA, 2007) e a isobavachalcona (**40**) ($MIC = 55 \mu M$) (GARCÍA et al., 2012), ou sintéticas como: (2E)-1-(3-hidroxifenil)-3-(fenantren-9-il)prop-2-en-1-ona (**41**) ($MIC = 97 \mu M$) (LIN et al., 2002), (2E)-3-(4-metoxifenil-1-[2-(prop-2-in-1-iloxi)fenil]prop-2-en-1-ona (**42**) ($31 \mu M$) (HANS et al., 2010), (2E)-1-(2,5-dimetoxifenil)-3-(naftalen-2-il)prop-2-en-1-ona (**43**) ($8,4 \mu M$) de inibição da enzima tirosina fosfatase PtpA de *M. tb.* ($12 \mu M$) (CHIARADIA et al., 2008) (Figura 18).

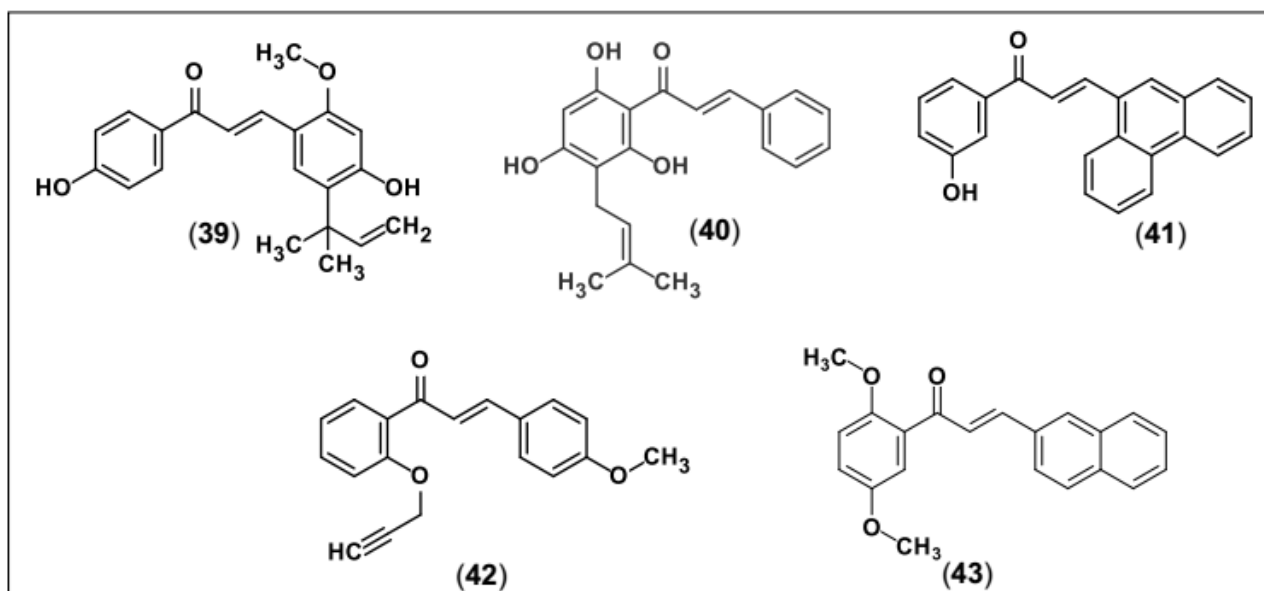


Figura 18 - Estruturas químicas de algumas chalconas naturais e sintéticas reportadas na literatura com atividade anti-TB.

1.2.2. Planejamento de fármacos

A gênese planejada de novos fármacos está estruturada em duas etapas: (i) planejamento: compreende a identificação, a validação de alvos, a identificação e otimização de compostos protótipos; (ii) desenvolvimento: compreende os ensaios pré-clínicos e clínicos (Figura 19) (ELEBRING; GILL; PLOWRIGHT, 2012; XIANG et al., 2012).

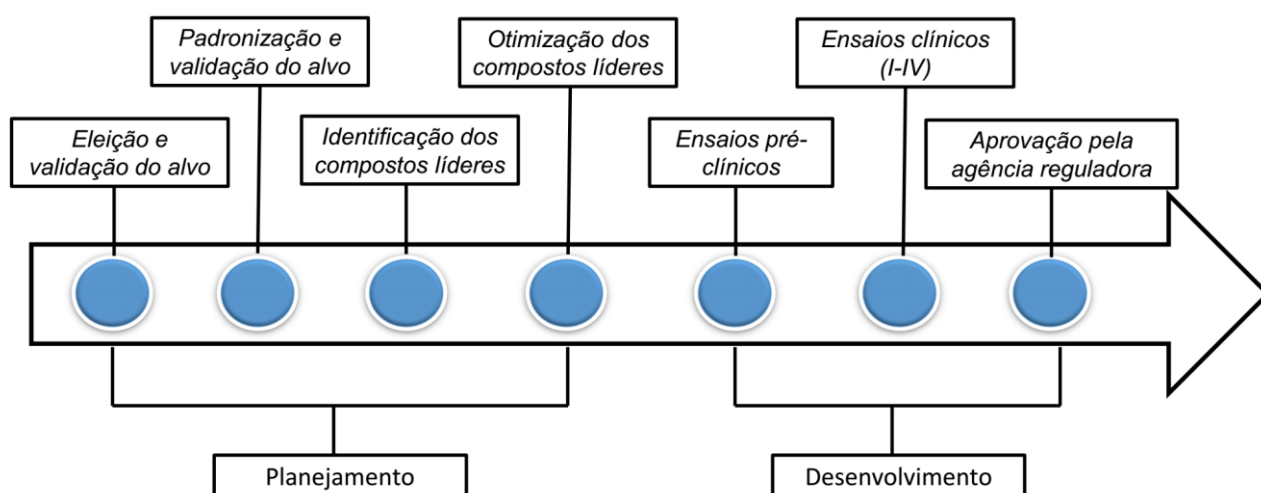


Figura 19 - Gênese de novos fármacos (ELEBRING; GILL; PLOWRIGHT, 2012).

Na etapa de planejamento, a identificação e a validação do alvo é uma etapa-chave para a descoberta de fármacos (TANG et al., 2006). O alvo consiste em macromoléculas

que frequentemente são proteínas que devem estar intrinsecamente relacionadas com a fisiopatologia, pois casos sejam essenciais para determinada via bioquímica regular o bloqueio pode interferir um processo fisiológico regular e trazer prejuízo ao indivíduo (NOGRADY; WEAVER, 2005). Selecionado o alvo, a validação deve ser feita, podendo ser através de bloqueio de genes que o expressam (*gene knockout*) e observando a influência da ausência da expressão desses genes no processo fisiopatológico. Especificamente em patologias causadas por microrganismos, o processo de validação avalia a sobrevivência destes microrganismos na ausência da expressão desses genes. Validado o alvo bioquímico, o estágio seguinte é a padronização do ensaio biológico para identificar ligantes (*hits*) que *in vitro* sejam capazes de modular a resposta biológica do alvo (BRAGA et al., 2014b).

A identificação de *hits* pode ser feita, por exemplo, através de ensaios de triagem biológica em alta vazão (HTS, do inglês *High Throughput Screening*) ou por triagem virtual (VS, do inglês *Virtual Screening*). Após identificados os *hits*, podem ser otimizadas suas propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas (ADME). Podem ser identificadas as relações entre estrutura atividade e relações quantitativas entre estrutura e atividade, para obtenção de informações que possam guiar o planejamento e a síntese de novas entidades químicas (NCE) com propriedades otimizadas (MACARRON et al., 2011; V. C. GUIDO; OLIVA; D. ANDRICOPULO, 2011).

Durante etapa de desenvolvimento as NCEs são avaliadas em ensaios de pré-clínicos e clínicos. Nos ensaios pré-clínicos, a segurança e a eficácia dos candidatos a fármacos são avaliadas em estudos *in vivo*, e se aprovados, são iniciados os testes clínicos em humanos. Os ensaios clínicos são divididos em quatro fases: (i) fase I: os testes são realizados em um pequeno grupo de voluntários saudáveis (20 a 100) para realizar estudos de toxicidade; (ii) fase II: os ensaios são conduzidos em grupo maior de voluntários (100 a 300) com objetivo de avaliar a dosagem, a eficácia e a segurança; (iii) fase III: o número de voluntários pode ser até 3.000 pessoas de origem geográfica diferente e escolhidos aleatoriamente para avaliação de propriedades farmacocinéticas. Um estudo comparativo aos fármacos usados no tratamento padrão é desenvolvido para avaliar a eficácia do novo candidato a fármaco, que se aprovado, é submetido à aprovação dos órgãos reguladores (FDA, EMEA, ANVISA) (LOMBARDINO; LOWE, 2004).

A fase IV ocorre com o medicamento sendo comercializado em que é realizado monitoramento de farmacovigilância pelas agências reguladoras, para verificar possíveis efeitos adversos a longo prazo (DIMASI et al., 2010).

1.2.3. Estratégias de planejamento *in silico* de fármacos

O avanço no campo computacional em *hardware*, aliado aos avanços nas áreas de genômica, proteômica, metabolômica e biologia estrutural, com a elucidação e disponibilização de estruturas 3D de proteínas relacionadas a processos biológicos em bancos de dados de proteínas (PDB, do inglês *Protein Data Bank*), permitiu a concepção e o desenvolvimento do planejamento de fármacos auxiliado por computador (CADD, do inglês *Computer-Aided Drug Design*). Nesse sentido o CADD envolve o planejamento, descoberta e otimização de compostos biologicamente ativos como candidatos a novos fármacos utilizando o auxílio de ferramentas computacionais (ROGNAN, 2007; TANG et al., 2006; YOUNG, 2009).

A compreensão das propriedades estruturais e químicas do alvo macromolecular com seu ligante capazes de modular funções alvo específicas que permite o planejamento e a descoberta de inibidores de proteínas pelo conceito de complementaridade molecular (APAROY; REDDY; REDDANNA, 2012). Um novo ligante biologicamente ativo pode ser planejado com propriedades estéricas, eletrônicas e de interação complementares ao alvo biológico, a partir do uso da informação tridimensional (3D) da estrutura da proteína. Esta estratégia é denominada de planejamento de fármacos baseado na estrutura (SBDD, do inglês *Structure-Based Drug Design*). Quando o alvo macromolecular (proteína) não apresenta ligante conhecido, o sítio de ação pode ser usado para buscar fragmentos e construir novos ligantes, o qual é denominado como planejamento *de novo* (BRAGA et al., 2014b). A estratégia de planejamento de fármacos baseado no ligante (LBDD, do inglês *Ligand-Based Drug Design*) fundamenta-se nas características estruturais de ligantes disponíveis ou de um ligante endógeno/substrato (ANDRICOPULO; SALUM; ABRAHAM, 2009). A integração dessas estratégias gera informações complementares e consiste em uma situação ideal para o planejamento e descoberta de novos fármacos (SHIM; MACKERELL, 2011).

1.2.3.1. Relações quantitativas entre estrutura química e atividade (QSAR)

Os avanços computacionais obtidos nas últimas décadas, aumentou consideravelmente a capacidade de coletar, analisar e armazenar informações químicas e biológicas, favorecendo o rápido desenvolvimento dessas áreas. Técnicas modernas experimentais como a química combinatória e HTS produziram informações químicas e biológicas em alta escala que estão acumuladas em base de dados. Como exemplo pode-

se citar as bases de dados ChEMBL (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>) e PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) que possuem informações de conjuntos de milhares de compostos testados diferentes ensaios biológicos e que estão disponíveis para acesso por toda a comunidade científica.

Essas informações podem ser usadas para construir e validar modelos computacionais que, juntamente as bases do QSAR sejam capazes de prever a atividade biológica novos compostos como potência e seletividade, otimizar a estrutura de compostos já conhecidos e identificar compostos com características farmacocinéticas indesejáveis ou toxicidade.

1.2.3.2. Princípios do QSAR

O método de QSAR é descrito como método matemático e estatístico de análise de dados capaz de desenvolver modelos para predição correta da atividade biológica de compostos a partir da relação estabelecida entre a estrutura química e a atividade biológica. Logo, para a construir modelos de QSAR dois tipos de informação são necessárias: conjunto de dados com atividade biológica definida e descritores calculados desses compostos (Figura 20) (TROPSHA, 2010). Essa relação é gerada pela aplicação de métodos estatísticos que pode ser definida de forma genérica como $P_i = k' (D_1, D_2, \dots, D_n)$, o qual P_i é a atividade biológica ou propriedade da molécula, $D_1, D_2, \dots, D_n$ são propriedades estruturais (descritores) calculadas (ou, em alguns casos, medidas experimentalmente) e k' é um peso definido pelo algoritmo computacional e atribuído aos descritores para se calcular as propriedades das moléculas (PUZYN; LESZCZYŃSKI; CRONIN, 2010). Ademais, os métodos estatísticos estabelecem pesos aos descritores e os ajusta a equação que relaciona a estrutura química e atividade biológica (TROPSHA, 2010).

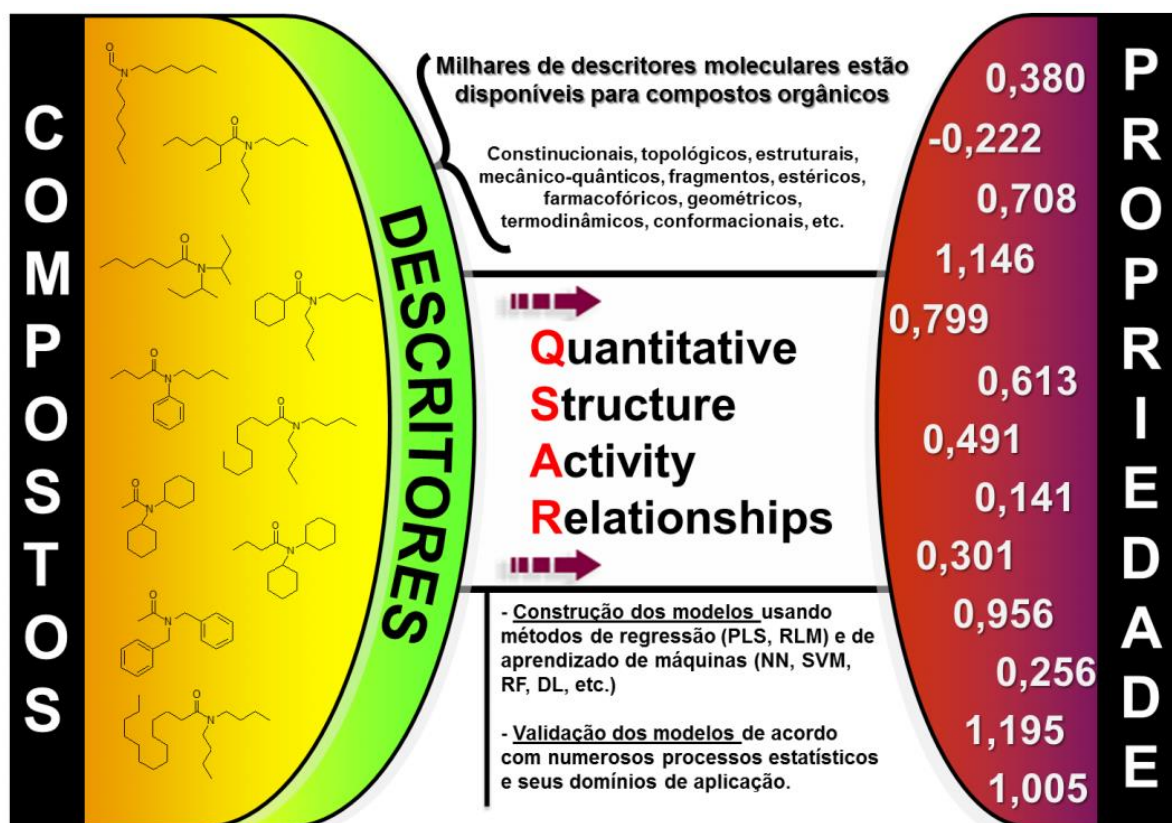


Figura 20 - Representação esquemática da geração de modelos de QSAR (adaptado de TROPSHA, 2010). PLS: *partial least squares*; RLM: regressão linear múltipla; NN: *neural networks*; SVM: *Support vector machine*; RF: *random forest*; DL: *deep learning*

1.2.3.3. Descritores moleculares

O descritor molecular é o resultado de um procedimento matemático lógico que codifica informações químicas da representação simbólica de uma molécula em um número útil para desenvolvimento do modelo (TODESCHINI; CONSONNI, 2000). Os descritores moleculares abrangem o campo de estudo multi- e interdisciplinaridade, pois envolvem diferentes teorias de conhecimentos em álgebra, teoria dos grafos, teoria da informação, química computacional, química orgânica e físico-química. (PUZYN; LESZCZYŃSKI; CRONIN, 2010; TODESCHINI; CONSONNI, 2000).

Milhares de descritores estão disponíveis para serem usados e estes podem ser classificados base no tipo de informação estrutural que podem descrever. Em geral são classificados quanto a “dimensionalidade”. Os descritores unidimensionais (1D), baseados em propriedades físico-químicas e da fórmula molecular (ex., massa molecular, refratividade molar, logP, entre outros); bidimensionais (2D), que descrevem propriedades que podem ser calculadas de representação 2D (ex., número de átomos, número de ligações, índices de conectividade, entre outros); e tridimensionais (3D), que dependem da

conformação das moléculas (ex., volume de Van der Waals, área de superfície acessível ao solvente, entre outros) (XUE; BAJORATH, 2000).

Entretanto, existe outra classificação relacionada a natureza dos descritores, os quais são classificados como: (i) constitucionais, que são derivados da composição atômica do composto (e.g., peso molecular, números de átomos e ligações); (ii) topológicos; (iii) geométricos, derivados de coordenadas 3D (e.g., volume molecular, área de superfície polar, entre outros); (iv) eletrostáticos, que são derivados da substituição de cargas parciais (e.g., índices de polaridade, carga parciais, entre outros); (v) quanto-mecânicos, que são derivados das funções de onda dos elétrons (e.g., energia dos orbitais moleculares) e (vi) impressões digitais moleculares (do inglês *fingerprints*), que calculam a frequência de um dado fragmento molecular em uma molécula (e.g., MACCS e *FeatMorgan*) (TODESCHINI; CONSONNI, 2000).

1.2.3.4. Aprendizado de máquina

O aprendizado de máquina (ML, do inglês *Machine Learning*) são algoritmos de inteligência artificial que podem ser usados para desenvolvimento de sistemas capazes de aprender a partir de seu ambiente de forma automática. Esse sistema de aprendizado toma decisões a partir de experiências acumuladas com base na solução bem sucedida de problemas anteriores (DOBCHEV; PILLAI; KARELSON, 2014). Esse aprendizado é construído de três estágios: (i) representação dos dados; (ii) otimização da hipótese; (iii) generalização. Na sua aplicação na construção de modelos de QSAR por exemplo, os compostos são codificados em descritores moleculares e uma hipótese (equação) é gerada para tentar estabelecer uma relação dos descritores com a atividade biológica e essa relação é otimizada. Por exemplo, supõe-se que determinada atividade biológica Y é descrita linearmente em função de único descritor molecular x , conforme estabelecido pela Equação 1.

$$Y(x) = a + bx \quad \text{Equação 1}$$

Com o objetivo de encontrar valores para os parâmetros a e b , algoritmos computacionais são utilizados para minimizar esses valores, de forma que se ajustem e sejam capazes de descrever os dados de entrada denominado conjunto treinamento. Em seguida, é testada a capacidade de generalização da hipótese gerada, essa generalização está relacionada à capacidade da hipótese de prever corretamente a tarefa que não foi usada para a construção dos modelos que é o conjunto teste (WELLING, 2011).

1.2.3.5. Boas práticas de desenvolvimento e validação

Nos últimos anos, diretrizes e recomendações de boas práticas de desenvolvimento e validação de modelos de QSAR foram publicadas (CHERKASOV et al., 2014; TROPSHA, 2010). A mais importante é a publicação da OECD (*Organization of Economic Co-operation and Development*) no ano de 2004, o qual sugere que, a construção e validação dos modelos de QSAR siga cinco princípios: (i) atividade biológica ou propriedade definida; (ii) algoritmo claro; (iii) ter domínio de aplicabilidade (DA) definido; (iv) avaliação apropriada da robustez e preditividade; e (v) realizar a interpretação mecanística, que significa encontrar relações entre os descritores e a atividade biológica ou propriedade, para compreender melhor o mecanismo de ação de uma estrutura química ou aprofundar o conhecimento biológico sobre a propriedade em estudo (CHERKASOV et al., 2014; DEARDEN; CRONIN; KAISER, 2009; OECD, 2015; TROPSHA, 2010).

1.2.4. Estratégias de modificação molecular

As modificações moleculares podem aprimorar as propriedades farmacocinéticas ou farmacodinâmicas de um fármaco ou de composto líder, tornando-se uma abordagem fundamental ao longo da história na descoberta de novos fármacos. Vários são os exemplos de fármacos obtidos de modificações moleculares, que incluem: a morfina, codeína, estradiol, a cimetidina entre outros. Diferentes estratégias de modificação molecular podem ser usadas para planejar um novo fármaco e.g. hibridização molecular, latenciação, simplificação e bioisosterismo entre outras (DUTRA et al., 2012; TISHLER, 1964). Contudo esta última será descrita abaixo mais detalhadamente abaixo, pois, foi a estratégia de modificação usada neste trabalho.

1.2.4.1. Bioisosterismo

É uma estratégia de modificação molecular usada em Química Medicinal para o planejamento racional de novos fármacos, aplicada em compostos líderes. O sucesso dessa estratégia está em desenvolver novas substâncias terapeuticamente atrativas. A do uso promissor dessa estratégia é comprovação do crescimento significativo de classes terapêuticas distintas provenientes de modificações de empregam essa estratégia de planejamento. Pode-se citar algumas razões para usar o bioisosterismo no planejamento racional de novos fármacos e.g. otimizar a atividade farmacológica, aumentar a seletividade para um determinado receptor ou subtipo de isoforma enzimática, redução de efeitos

adversos ou tóxicos e otimização de propriedades farmacocinéticas (CHEESERIGHT, 2009; LIMA; BARREIRO, 2005).

Pela definição da IUPAC, um bioisómero é um composto que resulta de modificações moleculares em compostos ou subunidades estruturais de compostos bioativos que apresentam volumes, formas, distribuições eletrônicas e propriedades físico-químicas semelhantes capazes de apresentar propriedades biológicas similares (PATANI; LAVOIE, 1996). Contudo, o primeiro conceito dessa estratégia de modificação molecular foi proposta em 1919 por Lagmuir a partir do conceito de isosterismo para modificação de compostos líderes, estudando o comportamento químico e reatividade de grupos químicos, substituintes e moléculas que possuem átomos com o mesmo número de elétrons de valência (PATANI; LAVOIE, 1996). Entretanto o termo “bioisosterismo” só foi introduzido em 1950 por Harris Friedman, ao descrever que substâncias estruturalmente relacionadas apresentavam efeitos biológicos reconhecidos no mesmo receptor sendo agonista ou antagonistas, ou seja, os compostos poderiam apresentar isosterismo e não ser bioisómeros (MEANWELL, 2011).

Aplicar estratégia de bioisosterismo de forma segura exige conhecimento das propriedades farmacóforas afim de não prejudicar os efeitos farmacológicos do protótipo. No entanto, vias de inativação metabólica assim como propriedades físico-químicas que regulam os efeitos adversos e a biodisponibilidade do novo protótipo deve ser diferente da molécula líder para permitir que a modificação pretendida tenha abrangência compatível com a definição de bioisosterismo (BROWN, 2012).

Em uma busca na literatura pode-se citar alguns exemplos de fármacos de sucesso obtidos por estratégia de modificação bioisotérica e.g., procaína (45) obtida da substituição bioisotérica do -NH- da procainamida (44) pelo -O- do éster aumentando a lipossolubilidade e a atividade anestésica (Figura 21) (WERMUTH, 2008).

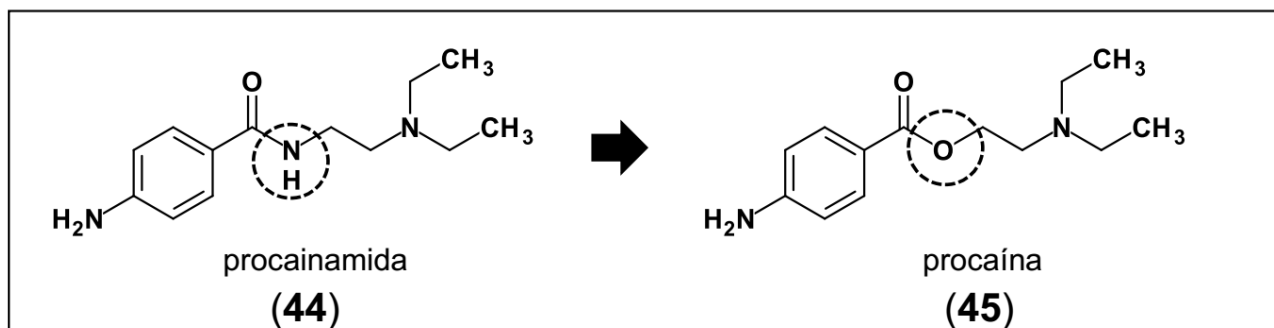


Figura 21 - Modificação bioisotérica da procainamida em procaína.

2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

Em maio de 2014, durante a assembleia anual da OMS em Genebra na Suíça uma resolução foi aprovada com uma ambiciosa estratégia global para TB entre 2015 e 2035. Esta estratégia objetiva acabar com a epidemia mundial de TB com metas de redução do número de mortes em 95% e redução do número de novos casos em 90%. Para chegar a essas metas, marcos intercalares foram estabelecidos em 2020, 2025 e 2030 (WHO, 2014).

Esta estratégia ambiciosa reforça o acordo proposto na carta signatária que criou a *TB Alliance* que tem como missão acelerar o desenvolvimento de novos fármacos para tratamento da TB. No entanto, este desenvolvimento precisa ser direcionado para permitir que estes novos compostos possam representar ganhos reais na terapia anti-TB. De acordo com o proposto no *item IX* da carta signatária (TBALLIANCE, 2015), em que o desenvolvimento de fármacos reduza o período de tratamento e aumente a eficácia, que do ponto de vista farmacoeconômico possa reduzir o custo com um único paciente, aumentando proporcionalmente o número de pacientes tratados.

Diante do exposto, o objetivo geral deste trabalho foi o planejamento de novas aril e heteroaril chalconas com atividade antituberculose, como paradigma de Química Medicinal moderna que envolve a integração de métodos computacionais e experimentais, com o planejamento, estudos de modelagem molecular, síntese e avaliação biológica.

Os objetivos específicos foram:

- Derivar regras de relação entre estrutura e atividade (SAR) a partir de chalconas com atividade antituberculose descritas na literatura;
- Desenvolver e validar modelos de QSAR;
- Planejar novos compostos usando as regras de SAR e os modelos de QSAR gerados;
- Predizer a atividade das chalconas planejadas utilizando os modelos de QSAR desenvolvidos para guiar a síntese dos compostos planejados;
- Sintetizar as substâncias planejadas e selecionadas;
- Avaliar a atividade antituberculose, citotóxica e espectro de atividade dos compostos sintetizados.

3.1. Planejamento racional

O planejamento racional de novas chalconas foi dividido em três etapas: (i) desenvolvimento estudos de relações entre estrutura-atividade (SAR) de chalconas descritas na literatura com atividade anti-TB, propondo modificações biossotéricas utilizando ferramentas computacionais com base na identificação dos fragmentos favoráveis e desfavoráveis para atividade; (ii) desenvolvimento e validação de modelos de QSAR para guiar a síntese de novas chalconas; (iii) e prever a atividade biológica desses novos compostos utilizando os modelos de QSAR (Figura 22).

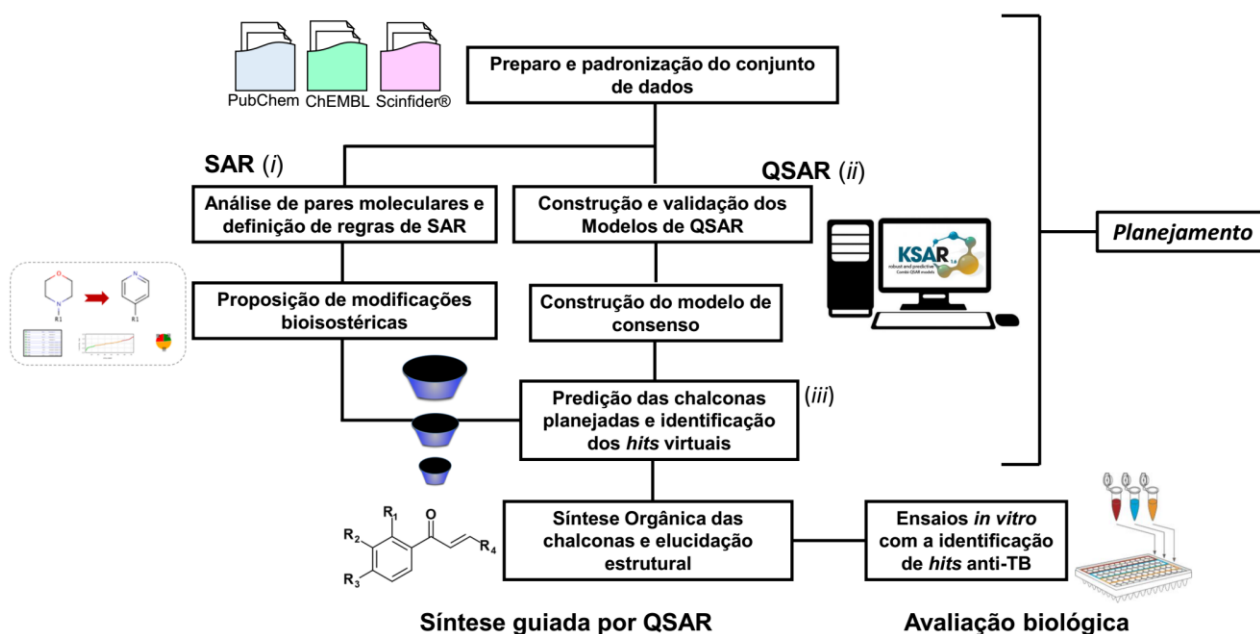


Figura 22 – Fluxograma do planejamento racional realizado para a descoberta de chalconas anti-TB.

3.2. Geração e preparo do conjunto de dados

O conjunto de dados foi gerado utilizando 604 chalconas com atividade antituberculose em cepas de *M. tb.* H37Rv disponíveis nas bases de dados: PubChem BioAssay (<http://www.pubchem.ccbi.nlm.nih.gov/>) (AID:1626 e AID:1949), ChEMBL (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>) e SciFinder (<https://www.scifinder.cas.org/scifinder/>) (AHMAD et al., 2013; ANANTHAN et al., 2009; BUKHARI et al., 2013; HANS et al., 2010;

KONIECZNY et al., 2007; LIN et al., 2002; MARRAPU et al., 2011; REYNOLDS et al., 2012; SIVAKUMAR et al., 2007). A busca destas estruturas foi feita utilizando dados de IC₅₀ como *endpoint* para selecionar os compostos ativos e inativos. Os compostos que apresentaram nos ensaios de inibição do crescimento de *M.tb.* H37Rv IC₅₀ ≤ 10 µM foram definidos como ativos e IC₅₀ > 10 µM inativos.

Em seguida, o conjunto de dados foi cuidadosamente preparado utilizando a metodologia proposta por Fourches, et. al, 2010, utilizando o software *Standardizer* (v.15.1.26.0, ChemAxon, Budapest, Hungary (<http://www.chemaxon.com>)). Basicamente, contraíções foram removidos e quimiotipos específicos como grupos nitro e aromáticos foram normalizados. Foi verificada a presença e remoção de duplicatas (compostos idênticos reportados mais de uma vez, com valores de atividade biológica distintos).

3.3. Estudos de relação entre estrutura e atividade (SAR)

O conjunto de dados foi usado o desenvolvimento estudos de SAR. Esses estudos foram realizados utilizando o método MMPA (do inglês, *Matched Molecular Pairs Analysis*) (DOSSETTER; GRIFFEN; LEACH, 2013; GRIFFEN et al., 2011; HU et al., 2012). A análise de MMPA revela mudanças em uma propriedade medida (e.g. a perda ou ganho de atividade), resultante de mudanças específica na estrutura (CUMMING et al., 2013). Estas variações permitiram o desenvolvimento de regras de SAR usadas para o planejamento de novas chalconas antituberculose.

3.4. Geração de bioisósteros

As regras de SAR desenvolvidas foram usadas para o planejar novas chalconas utilizando o programa BROOD v.2.0 (Openeye Scientific Software, Santa Fe, USA) e o servidor *SwissBioisostere* (<http://www.swissbioisostere.ch>) (WIRTH et al., 2013).

Foram usados os compostos **LabMol63 (46)**, **LabMol64 (47)** e **LabMol65 (48)** líderes do conjunto de dados para a geração de bioisósteros. Priorizou-se a posição 4' do anel A e o nitroheterociclo B para os três compostos como demonstrado na Figura 22 de acordo com as regras de SAR desenvolvidas na análise de MMPA.

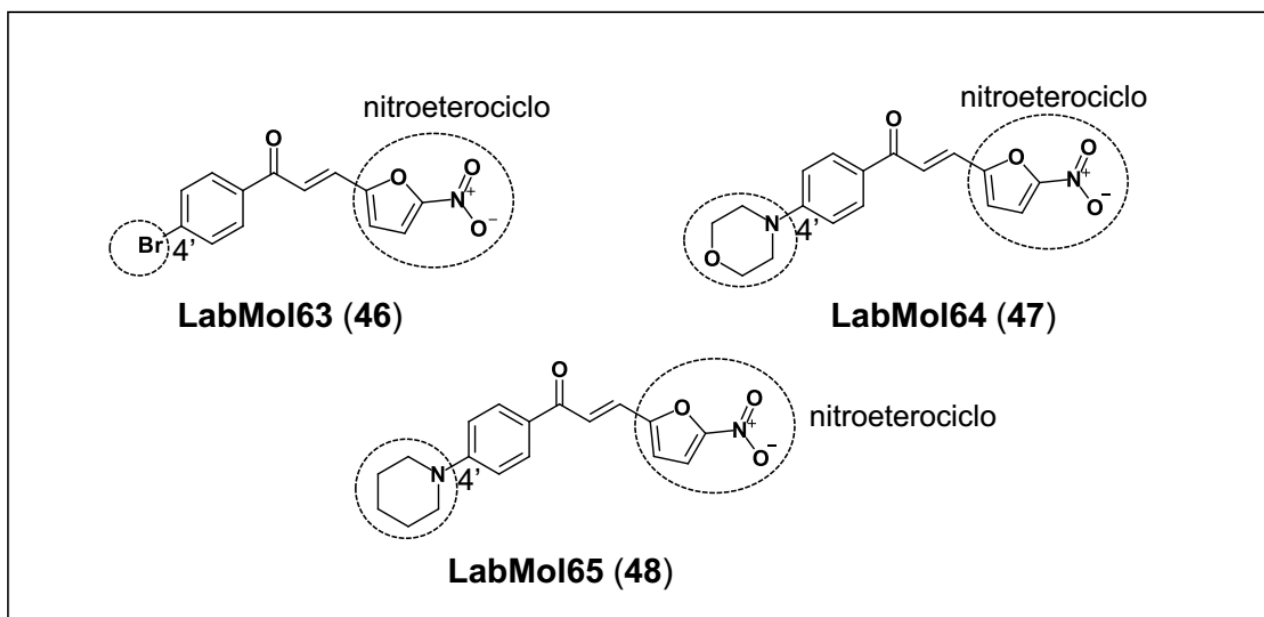


Figura 23 - Estruturas mais promissoras do conjunto de dados escolhidas para proposição de modificações bioisostéricas nos fragmentos em destaque para o planejamento de novas aril e heteroaril chalconas.

A proposição dos novos fragmentos bioisostéricos feitos a partir do BROOD foi feita a partir da base fragmentos própria do programa, o qual foi dado o *input* do arquivo com a estrutura dos compostos líderes nos formatos Mol, SDF ou *Smiles*, foi analisado as propriedades calculadas como logP, doadores e aceptores de ligação de hidrogênio, número de ligações rotacionáveis, área de superfície polar e acessibilidade sintética. Foram atribuídos pesos aos fragmentos para as proposições bioisostéricas. Uma lista de bioisósteros foi gerada para cada composto líder. Na base de dados *SwissBioisostere* o *input* no servidor foi dado apenas com a estrutura dos fragmentos dos compostos líderes, que foram comparados a base de fragmentos com dados de atividade biológica e propriedades físico-químicas própria do servidor. Nas listas de fragmentos gerados foram selecionados fragmentos bioisósteros com maior valor de potência em ensaios bioquímicos e logP que contribuíram com o aumento da lipossolubilidade.

3.5. QSAR

3.5.1. Divisão do conjunto de dados

O conjunto de dados original foi dividido em conjunto modelagem e conjunto teste utilizando o algoritmo de *Kennard Stone* (GALVÃO et al., 2005). O conjunto modelagem corresponde a 80% do conjunto de dados e foi usado para a geração dos modelos,

enquanto que o conjunto teste representa 20% do conjunto de dados é usado para validação externa.

3.5.2. Cálculo de descritores

Descritores químicos bidimensionais (2D) de código aberto baseados em *fingerprints* foram calculados usando o módulo do RDKit (<http://www.rdkit.org>) disponível para a plataforma KNIME (MAZANETZ et al., 2012). Neste estudo, cinco diferentes *fingerprints* moleculares foram usados: MACCS, Morgan, FeatMorgan, Avalon e AtomPairs. Estes descritores refletem a ausência (0) ou a presença (1) de fragmentos ou subestruturas para cada composto tornando-os uma forma eficiente de codificação da estrutura química dos compostos

3.5.2.1. MACCS

Os *fingerprints* MACCS constituem 166 subestruturas associadas ao padrão SMARTS uma linguagem de consulta para pesquisa de subestruturas moleculares desenvolvida pela *Daylight Chemical Informations Systems* (O'BOYLE; MORLEY; HUTCHISON, 2008). Primeiramente foram planejados para pesquisas de subestrutura e tornando-os muitas vezes utilizados para estudos de avaliação comparativa.

3.5.2.2. Morgan

Descritores Morgan são baseados em *fingerprints* ECFP4-like e foram calculados com 1024 *bits* e raio atômico 2. Estes descritores são fragmentos topológicos circulares baseados no algoritmo Morgan (MORGAN, 1965; RINIKER; LANDRUM, 2013; ROGERS; HAHN, 2010). Inicialmente, um identificador numérico é atribuído para cada átomo. Em um segundo estágio, cada iteração tem o efeito de criar um identificador que representa subestruturas circulares em torno do átomo central cada vez maiores. Ao final, identificadores duplicados são removidos e as informações armazenadas em *bits*. O tamanho dessas subestruturas e o número de descritores são determinados pelo tamanho do raio selecionado e comprimento dos *bits* determinados pelo usuário (ROGERS; HAHN, 2010).

3.5.2.3. FeatMorgan

FeatMorgan é um tipo de impressão *fingerprint* baseado no algoritmo Morgan que combina o *fingerprint* digital RDKit Morgan com recursos de características farmacofóricas. O farmacóforo é um conjunto de características estéricas e eletrônicas essenciais para a interação com alvo biológico e atividade biológica (BRAGA et al., 2014a).

3.5.2.4. Avalon

O descritor Avalon é similar ao *fingerprint Daylight*, que é um gerador de *fingerprints* que enumera alguns caminhos e classes de recurso gráfico molecular com as posições do *bit fingerprint*. São funções de *hash* que podem baseadas usando dados de mapas de tamanho arbitrário e dados de tamanho fixo. No entanto, os códigos de *hash* para todos os estilos de recursos e de caminho são calculados implicitamente enquanto eles enumerados (GEDECK; ROHDE; BARTELS, 2006).

3.5.2.5. AtomPairs

AtomPairs, foram implementados por Carhart e colaboradores (CARHART; SMITH; VENKATARAGHAVAN, 1985). São definidas em termos dos ambientes atômicos como a separação dos caminhos mais curtos entre todos os pares de átomos (AT) ou separação de centros descritivos por uma distância topológica fixa: $AT_i-AT_j-Dist_{ij}$, onde $Dist_{ij}$ é o caminho mais curto (o número de ligações) entre AT_i e AT_j . Além disso, esses fingerprints representam as informações sobre o tipo de elemento, o número de elétrons π e o número de átomos vizinhos não ligados a hidrogênio (BASKIN; VARNEK, 2008).

3.5.3. Métodos de Aprendizado de Máquina.

Construir modelos de QSAR estatisticamente aceitáveis requer a combinação entre descritores moleculares que descrevem a informação química e classificadores de aprendizado de máquina, para gerar equações da relação entre estrutura e atividade biológica. Neste trabalho, foram usados três diferentes métodos aprendizado de máquina: *Support Vector Machine* (SVM), *Gradient Boosting Machine* (GBM), *Random Forest* (RF).

3.5.3.1. *Support Vector Machine (SVM)*

O SVM é uma abordagem baseada em desenvolvido por Vapnik (VAPNIK, 2000) como metodologia geral de modelagem de dados, com o objetivo de minimizar o risco estrutural e teoria de aprendizagem estatística. O SVM mapeia dados em um hiperplano dimensional a exemplo de descritores ou fingerprints, usando uma função de kernel que é tipicamente linear, radial ou polinomial. Assim, o SVM busca uma separação ótima entre duas classes a exemplo de ativos e inativos.

3.5.3.2. *Gradient Boosting Machine (GBM)*

O método GBM difere dos métodos de árvores de classificação ou de regressão, pois são treinados e combinados sequencialmente. O princípio deste algoritmo é gerar modelos de computador por uma sequência de árvores, sobrepondo uma sobre a outra em que, cada árvore sucessiva é construída a partir dos resíduos de predição da árvore anterior. Os dados são particionados de dados simples e são determinados em cada passo do algoritmo da árvore, e os desvios dos valores observados a partir dos respectivos resíduos para cada partição são computadas (NATEKIN; KNOLL, 2013).

3.5.3.3. *Random Forest (RF)*

O *Random Forest* é um algoritmo baseado em árvore de decisão cuja a previsão que cria uma coleção de árvores de decisão descorrelacionadas e a previsão é definida pela maioria a partir do conjunto de árvores, 1/3 do conjunto treinamento de cada árvore é extraído enquanto os dois terços restantes é usado para construir os modelos. Cada árvore na RF é construída pelo método CART e a melhor divisão a melhor divisão gerada entre os descritores investigados aleatoriamente em cada ponto é escolhido. As árvores são cultivadas na sua maior extensão, por fim o RF é usado para prever o conjunto teste, os valores de classificação previstos pela maior presença em uma das classes. A proporção obtida por um classe pode fornecer a indicação de uma predição correta (BREIMAN, 2001).

3.5.4. Validação dos modelos de QSAR

Os modelos de QSAR desenvolvidos foram validados utilizando a estratégia de validação cruzada externa de 5-fold (Figura 22). Neste procedimento o conjunto de dados foi dividido em cinco subconjuntos com o mesmo número de estruturas. Inicialmente, quatro

subconjuntos representando 80% dos compostos foram retirados para geração dos modelos (conjunto treinamento) e os demais 20% para sua validação (conjunto teste). Esse procedimento foi repetido até que cada subconjunto foi retirado uma vez para o conjunto teste. (FOURCHES; MURATOV; TROPSHA, 2010).

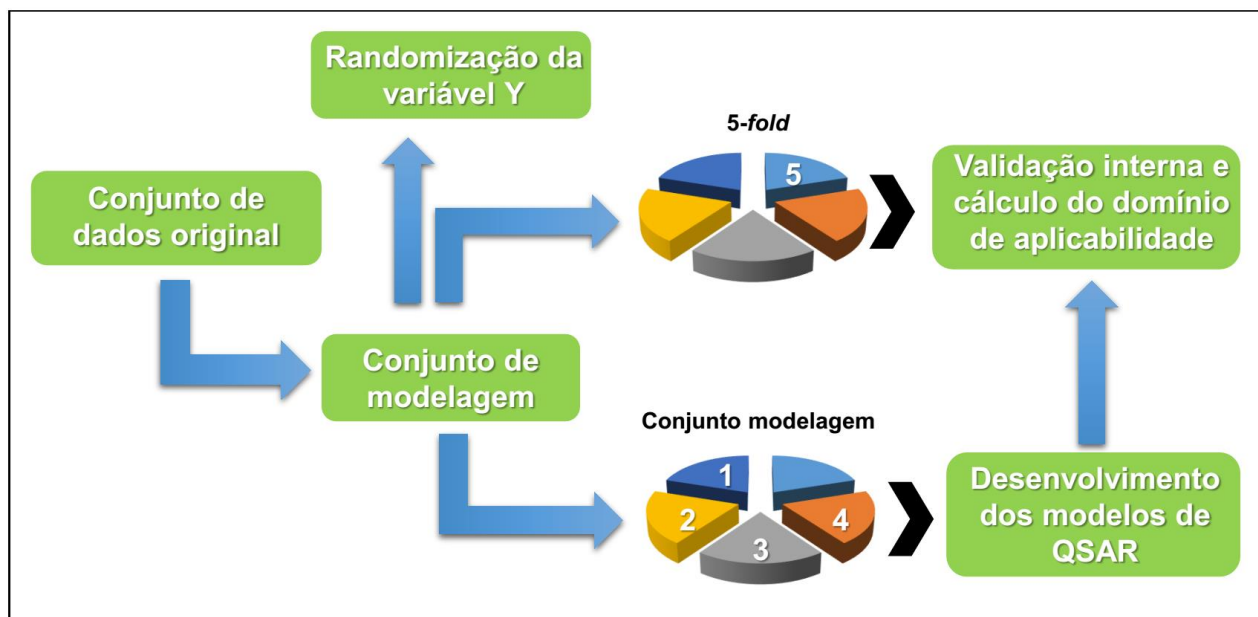


Figura 24 - Fluxograma do método de geração de modelos de QSAR utilizando o método de validação cruzada 5-fold (adaptado de Tropsha, 2010).

A avaliação da preditividade dos modelos de QSAR foi realizada utilizando quatro métricas diferentes: taxa de classificação correta (CCR), coeficiente kappa de Cohen, sensibilidade (Se) e especificidade (Sp) (BRAGA; ANDRADE, 2013).

A CCR avalia a percentual de moléculas que o modelo de QSAR foi capaz de classificar corretamente. Calcula-se o CCR pela equação (2).

$$CCR = \frac{Se + Sp}{2} \quad (2)$$

O coeficiente Kappa de Cohen é uma análise de concordância entre as previsões do modelo e os dados experimentais (COHEN, 1960). Este parâmetro estatístico é calculado a partir das seguintes equações:

$$Pr(a) = \frac{VP + VN}{N} \quad (3)$$

$$Pr(e) = \frac{(VP + FP) \times (VP + FN) + (VN + FN) \times (VN + FP)}{N} \quad (4)$$

$$k = \frac{Pr(a) - Pr(e)}{1 - Pr(e)} \quad (5)$$

O Pr (a) representa a concordância relativa observada entre o modelo de classificação predita e a classificação conhecida, e Pr (e) é a probabilidade hipotética de concordância. Diante disto a análise de k resulta de valores entre -1 (discordância) e 1 (concordância), os valores entre 0,6 e 1 define o modelo como preditivo.

A sensibilidade (Se) avalia o percentual de compostos ativos preditos pelo modelo de QSAR corretamente. Observa-se que se a Se do modelo for igual a zero, os compostos ativos foram classificados como inativos, no entanto se a Se = 1, o modelo foi capaz de classificar corretamente os compostos ativos do conjunto de dados. A equação (6) expressa o cálculo de Se.

$$Se = \frac{VP}{VP + FN} \quad (6)$$

A especificidade (Sp) é a métrica que avalia o percentual de compostos inativos preditos pelo modelo de QSAR corretamente. Assim como na SE os valores de Sp variam entre 0 e 1, de forma que Sp = 0 o modelo classificará todos os compostos inativos como ativos, já Sp = 1 os compostos inativos serão classificados corretamente pelo modelo. A Sp é expressa pela equação 7.

$$Sp = \frac{VN}{VN + FP} \quad (7)$$

3.5.5. Permutação da variável Y

O teste de permutação da variável Y foi usado para todos os modelos gerados da combinação entre *fingerprints* moleculares e métodos de aprendizado de máquina. É uma ferramenta utilizada na validação de modelo QSAR, em que o desempenho do modelo original na descrição de dados é comparado a de modelos construídos aleatoriamente, se resposta desta permutação for semelhante aos modelos de predição ou mesmo superior, significa que o modelo classifica aleatoriamente, entretanto o valor menor significa menor correlação entre a variante e o descritor confirmando a robustez e a preditividade do modelo (RÜCKER; RÜCKER; MERINGER, 2007).

3.5.6. Modelo de consenso

Após a construção dos modelos de QSAR utilizando diferentes combinações de *fingerprints* e métodos de aprendizado de máquina, estes foram utilizados para gerar o modelo por consenso, que foi derivado do cálculo da média dos quinze modelos individuais. No modelo de consenso, o valor final de predição para cada composto é a estimativa através da inclusão de uma média dos valores previstos a partir do conjunto de modelos de QSAR (FOURCHES; MURATOV; TROPSHA, 2016).

Esse consenso foi usado como filtro para identificar nas listas de bioisósteros geradas nas ferramentas BROOD e *Swissbioisostere* para classificação e seleção dos compostos planejados para a síntese orgânica.

3.6. Síntese orgânica

3.6.1. Solventes e Reagentes

- Acetonitrila A955-1 Optima® LC/MS, CAS: 75-05-8, lot:152777;
- Metanol A456-1 Optima® LC/MS adequado para UHPLC-UV, CAS: 67-56-1, lot: 148574;
- Dimetilsulfóxido deuterado (DMSO d_6) 99.9% lot#MKBT1410U, CAS: 2206-27-1 (Sigma-Aldrich);
- Clorofórmio deuterado ($CDCl_3$) 99.9 atom, lot#MKBT4127V, CAS: 865-49-6 (Sigma-Aldrich);
- 5-Cloro-2-tiofeno-carboxaldeído, 95%, CAS: 4701-17-1, 18427MD;
- 4'-Metilacetofenona, 95% 04416PD, CAS: 122-00-9 (Sigma-Aldrich);
- 4'-Bromoacetofenona, 98%, 10609TB, CAS: 99-90-1 (Sigma-Aldrich);
- 5-(2-tienil)-3-izoxazolcarbaldeído, CAS: 465514-11-8;
- 3-5-dimetil-4-isoxazolcarbaldeído, CAS: 54593-26-9;
- 5-metil-3-fenil-4-isoxazolcarbaldeído; CAS: 87967-95-1;
- 2'-Bromoacetofenona, 98%, 06220BJ, CAS: 70-11-1 (Sigma-Aldrich);
- 2'-Metilacetofenona, 98%, 07315BD, CAS: 577-16-2 (Sigma-Aldrich);
- 2'-Nitrobenzaldeído, 98%, 05205DC, CAS: 552-89-6 (Sigma-Aldrich);
- 3'-Bromoacetofenona, 99%, Lot#STBC7864V, CAS: 2142-63-4 (Sigma-Aldrich);
- 3'-Iodoacetofenona, 97%, 75796MJ, CAS: 14452-30-3 (Sigma-Aldrich);

- 3'-Metilacetofenona, 98%, 06329CD, CAS: 585-74-0 (Sigma-Aldrich);
- 4'-(1-Pirrolidinil)acetofenona, CDS001511 (Sigma-Aldrich);
- 4'-(Imidazol-1-il)acetofenona, 96%, 108001EE, CAS: 10041-06-2 (Sigma-Aldrich);
- 4'-Acetilbifenil, 98%, Lot#MKBS9349V, CAS: 92-91-1 (Sigma-Aldrich);
- 4'-Aminoacetofenona, 99%, 07912DC, CAS: 99-92-3 (Sigma-Aldrich);
- 4'-Ciclohexilacetofenona, 99%, 01317KD, CAS:18594-05-3, (Sigma-Aldrich);
- 4'-Iodoacetofenona, 98%, 11511D, CAS: 13329-40-3 (Sigma-Aldrich);
- 4'-Morfolinoacetofenona, 99%, 10503KE, CAS: 39901-98-0 (Sigma-Aldrich);
- 4'-Nitrobenzaldeído, 98%, 11729TD, CAS: 555-16-8 (Sigma-Aldrich);
- 4'-Piperazinacetofenona, 94%, Lot#MKBR2847V, CAS: 51639-48-6 (Sigma-Aldrich);
- 4'-Piperidinoacetofenona, 97%, Lot: 02525BB-107; CAS:10342-85-5 (Sigma-Aldrich);
- 4'-Terc-butilacetofenona, 97%, 11428LH, CAS: 943-27-1 (Sigma-Aldrich);
- 5-Nitro-2-furaldeído, 99%, 0812DD, CAS: 698-63-5 (Sigma-Aldrich);
- 5-Nitro-2-furaldeído, 99%, Lot:#STBD7904V (Sigma-Aldrich);
- 5-Nitro-2-tiofenocarboxaldeído, 98%, Lot#MKBK7005, CAS: 4521-33-9 (Sigma-Aldrich);
- Furfural, 99%, Lot:#SHBD3699V, CAS: 98-01-1 (Sigma-Aldrich);
- Pirrol-2-carboxaldeído, 98%, Lot#BCBL7225V, CAS: 1003-29-8 (Sigma-Aldrich);
- 2,4-dinitrofenilhidrazina, 97%, D199203, CAS: 119-26-6 (Sigma-Aldrich);
- Resazurina sódica (7-hidroxi-3H-fenoxazin-2-ona-10-oxido, sódico), CAS: 62758-13-8 (Sigma-Aldrich);
- Salicilaldeído, 98%, Batch#09409MB, CAS: 90-02-8 (Sigma-Aldrich);
- *p*-Anisalaldeído, 98%, 09127CB, CAS: 123-11-5 (Sigma-Aldrich);
- 3'-Nitrobenzaldeído, 99%, 14712CB, CAS: 99-61-6 (Sigma-Aldrich);
- Ácido acético
- Ácido sulfúrico
- Acetato de etila
- Metanol
- Hexano
- *p*-Dimetilaminobenzaldeído
- Hidróxido de sódio
- Tetraidrofurano

3.6.2. Equipamentos e acessórios

- HPLC-SPD-M10A Shimadzu, *column Nucleodur 100-5 CN-RP column 205x4.6mm*;
- LCMS-2020 *Liquid Chromatograph Mass Spectrometer*, *coluna Agilent XDB-C18, 35 μM, 21 x 20 nm*;
- *Büchi Rotavapor R-200, Büchi heating bath B-490*;
- *Spectroline Model CM-10, fluorescence analysis cabinet, spectronics corporation Westburg, New York, USA, short wave UV: 254 nm; long wave UV 356 nm*;
- *Perkin Elmer Victor 2 V Multilabel Counter 1420-040 Microplate Reader*;
- Agitadores magnéticos;
- Bomba de vácuo;
- Aparelho para determinação de faixa de fusão;
- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Avance™ III HD 400 MHz, Bruker, frequência de resolução < 0,005 Hz;
- *Microwave Synthesis Reactor, Monowave 300, Anton Paar*.

3.6.3. Mecanismo reacional geral de síntese de chalconas

Na primeira etapa de adição, a carbonila da acetofenona se torna um íon enolato nucleófilo pela abstração do hidrogênio pela base, o nucleófilo reage com o grupo carbonila eletrofílico do aldeído aromático, a protonação do alcoxi forma um intermediário neutro restabelecendo o catalisador alcalino. Na segunda etapa, ocorre a desidratação para obtenção da insaturação da enona, e pôr fim a obtenção da chalcona (**55**) (Figura 25) (CLAYDEN et al., 2001).

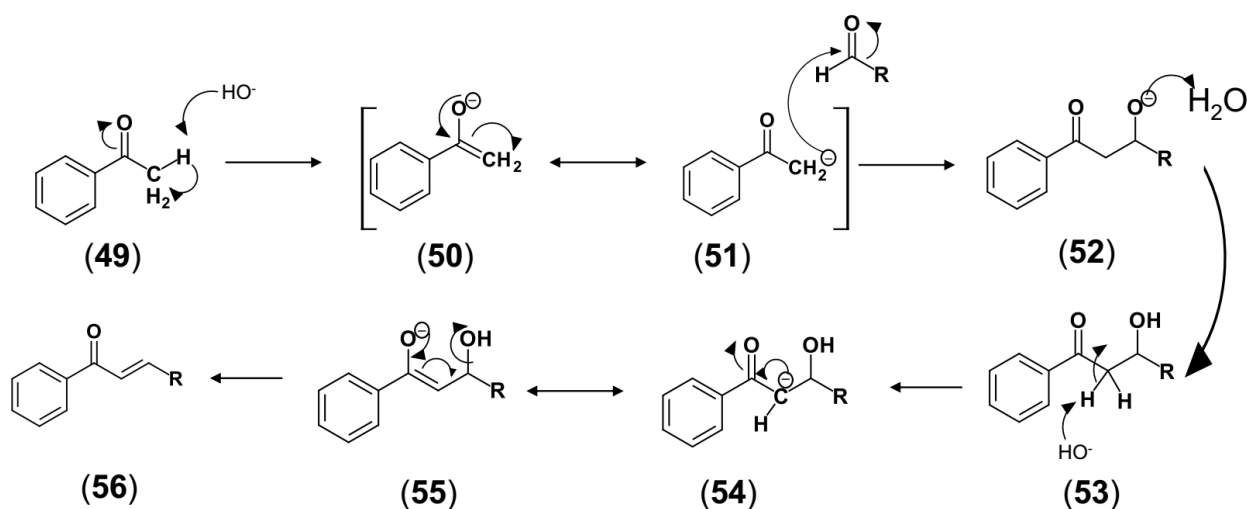


Figura 25 – Esquema do mecanismo clássico da reação de condensação de Claisen-Schmidt (adaptado de CLAYDEN et al., 2001).

3.6.3.1. Síntese de 1,3-diarilprop-2-en-1-onas e heteroaril chalconas

As aril e heteroaril chalconas foram obtidas pelo método de condensação aldólica clássica de Claisen-Schmidt por meio de catálise alcalina. As acetofenonas substituídas, benzaldeídos substituídos ou pirrolcarboxaldeído em quantidades equimolares (1,0 mmol) foram diluídos em 1 mL de etanol, em meio básico (NaOH, 20%), 0,140 mL. A mistura reacional foi mantida sob agitação a temperatura ambiente por período de 10-24 horas. A formação do produto foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD) revelado em câmara escura com luz ultravioleta (UV 254 nm) e em 2,4-dinitrofenilhidrazina que permite a identificação de aldeídos e cetonas. Concluída a formação do produto foi adicionado água a temperatura 0 °C para a precipitação. O precipitado foi lavado em água gelada e filtrado à vácuo, o produto em dessecador e posteriormente recristalizado em metanol.

As nitroeteroaril chalconas foram obtidas pelo método de condensação aldólica de Claisen-Schmidt adaptada (TAWARI et al., 2010), em solvente e catalisador ácido (Figura 26). Acetofenonas substituídas e nitroheterocícos foram diluídos em quantidades equimolares (0,5 mmol) em 1 mL de ácido acético (AcOH) e 0,057 mL de ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄). A mistura reacional foi mantida sob refluxo a temperatura de 100°C e em agitação durante 4 a 24 horas de acordo com o substituinte da acetofenona. A formação do produto foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD) revelado em câmara escura com luz ultravioleta (UV 254 nm) e em revelador (2,4-dinitrofenilhidrazina). Concluído a formação do produto foi adicionado metanol resfriado (-10°C) a mistura reacional para precipitação. O precipitado foi filtrado à vácuo em cerca de 150 mL de metanol resfriado (-10°C) e seco em dessecador.

A pureza dos compostos foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) no aparelho Shimadzu com detector de arranjos de diodos (PDA) para detecção de impurezas, coluna 205x4,6mm, nas condições: fase móvel água/0.1% ácido trifluoracético (TFA) e acetonitrila com fluxo de 1 mL/min.

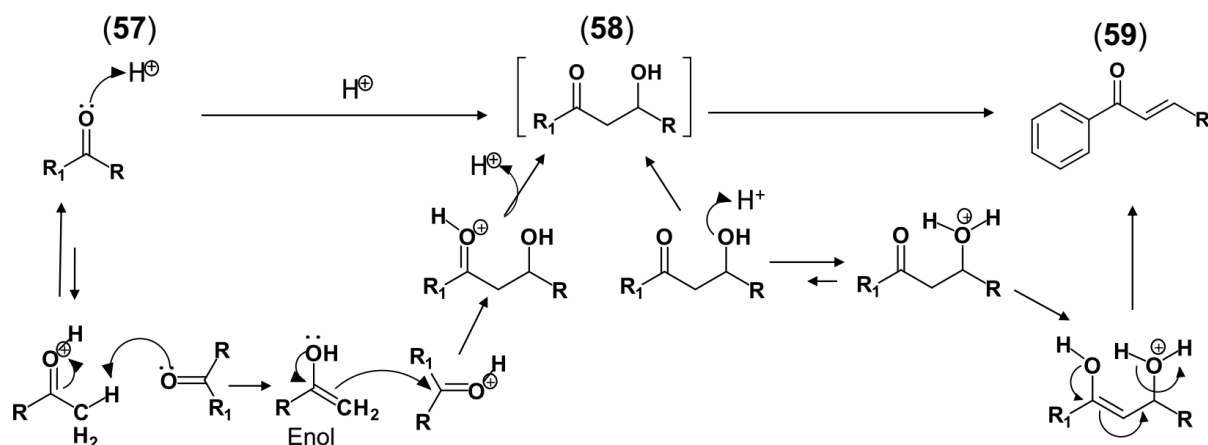


Figura 26 – Esquema do mecanismo da reação de condensação em meio ácido adaptado de Claisen-Schmidt (adaptado de CLAYDEN et al., 2001).

Algumas variações foram feitas nessa metodologia para buscar o aumento de rendimento. Para esse teste, **(83)** foi sintetizado pelo método descrito acima e posteriormente foram variados alguns parâmetros e.g., variação da concentração do catalizador (0,5 e 0,25 mmol), tempo (20, 30, e 72 h), aquecimento (30 °C e 100 °C), aumento da escala dos reagentes de partida (5x), método de isolamento (água 0 °C) e o uso de micro-ondas (100 °C, 2 h, potência de 120 Watts).

3.6.4. Ensaios de atividade anti-TB

Os ensaios de atividade antituberculose foram realizados durante o estágio sanduíche no exterior, no *Institute for Tuberculosis Research* (ITR) na *University of Illinois at Chicago* (UIC), sob a supervisão do Prof. Dr. Scott G. Franzblau.

Os ensaios anti-TB foram divididos em três etapas: (i) ensaios em cepas sensíveis replicantes de *M. tb.* H37Rv (MABA do inglês *Microplate Assay Blue Alamar*); (ii) ensaios em cepas sensíveis não replicantes (LORA do inglês *Low Oxygen Recovery Assay*); e (iii) ensaios em cepas resistentes a RMP (**3**) ou a INH (**2**).

3.6.4.1. MABA

A concentração inibitória mínima (MIC) em condições aeróbicas foi determinada utilizando a metodologia de MABA (CHO; LEE; FRANZBLAU, 2015). Cepas de *M. tb.* H37Rv (ATCC 27294) foram incubadas em 200 µL de meio 7H12 (pH = 7,4) em microplacas de 96 poços juntamente com os compostos testes por 7 dias a 37°C em incubadora de CO₂ 5%, 95% de humidade. Uma solução de azul de alamar ou resazurina 0,6 mM e Tween 80

20% (5:3) foram adicionados as microplacas (32,5 μ L), que permaneceram incubadas por mais 24 horas a 37°C. O MIC foi determinado efetuando a redução da fluorescência de 90% relativa ao controle devido à oxidação da resazurina a resorufina (azul-rosa), em leitor de microplacas por medição da excitação em fluorescência (530 nm) e emissão (590 nm) (Figura 27).

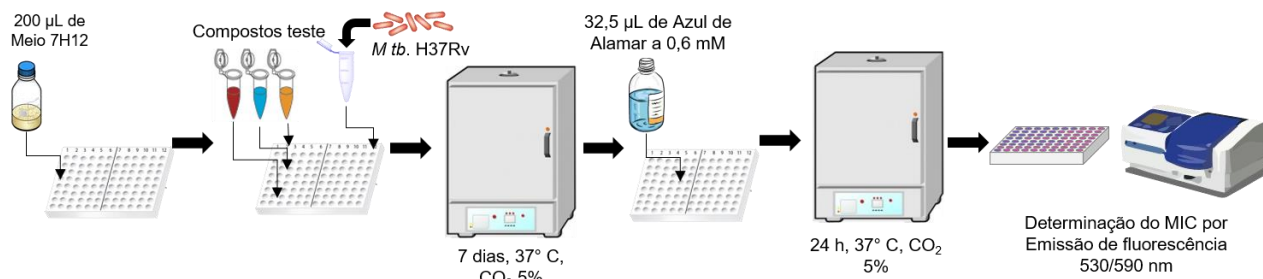


Figura 27 - Fluxograma do procedimento experimental dos ensaios de inibição do crescimento do *M. tb. H37Rv* em MABA (sistema aeróbico).

3.6.4.2. LORA

Em condições anaeróbicas, o MIC foi determinado utilizando a metodologia de LORA (CHO et al., 2007; CHO; LEE; FRANZBLAU, 2015). Cepas de *M. tb. H37Rv* (ATCC 27294) modificadas com plasmídio luciferase foram incubadas em 200 μ L de 7H12 (pH = 7,4) em microplacas de 96 poços juntamente com os compostos-teste pelo período de 10 dias em jarra anaeróbica (Figura 28). Ao final desse período, as microplacas foram transferidas para uma incubadora de CO₂ a 5%, com 95% de humidade, a 37°C, para recuperação da hipóxia por um período de 28 horas. No décimo primeiro dia, as microplacas foram removidas da incubadora e adicionou-se 100 μ L de uma solução *n*-decanal 1% diluída dez vezes em PBS de uma solução estoque de *n*-decanal 10%. O MIC foi calculado pela redução de 90% da luminescência em leitor de microplacas (Figura 28).

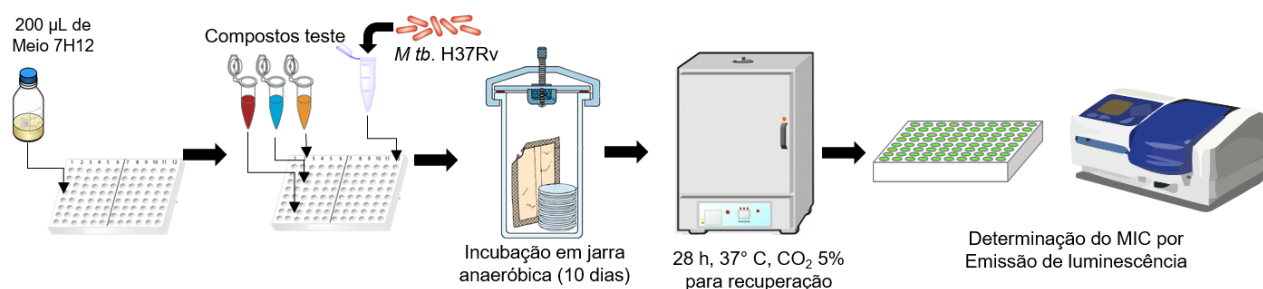


Figura 28 - Fluxograma do procedimento experimental dos ensaios de inibição do crescimento do *M. tb. H37Rv* em LORA (sistema anaeróbico).

3.6.4.3. Avaliação biológica em cepas isogênicas resistentes a RMP e INH

A metodologia de MABA (Figura 24) (CHO; LEE; FRANZBLAU, 2015; COLLINS; FRANZBLAU, SCOTT G., 1997) foi empregada para determinar o MIC em condições aeróbicas, utilizando cepas isogênicas de *M. tb.* H37Rv ATCC com monorresistência a RMP (ATCC 35838) e INH (ATCC 35822). As cepas foram incubadas em 200 µL de meio 7H12 (pH = 7,4) em microplacas de 96 poços juntamente com os compostos teste por 7 dias a 37°C, em incubadora de CO₂ 5%, com 95% de humidade. Uma solução de azul de alamar ou resazurina 0,6 mM e Tween 80 20% (5:3) foi adicionada às microplacas (32,5 µL), que permaneceram incubadas por mais 24 h a 37°C. O MIC foi determinado efetuando a redução da fluorescência de 90% relativa ao controle devido à oxidação da resazurina a resorufina (azul-rosa) (Figura 25), em leitor de microplacas por medição da excitação em fluorescência (530 nm) e emissão (590 nm).

3.6.5. Avaliação de citotoxicidade em células Vero

Células de mamíferos Vero (rim de macaco) (ATCC CRL-1586) foram cultivadas em meio essencial mínimo (MEM) com soro fetal bovino 10% (*Fetal Bovine Serum-FBS*), e adicionou-se antibióticos (penicilina e estreptomicina) para evitar a contaminação das células. As células usadas no ensaio foram preparadas e lavadas em HBSS (1x pH = 7,4) e Tripsina-EDTA 0,25%, centrifugadas e verificou-se sua integridade por microscopia óptica. Após o tratamento, a solução estoque de células final deveria possuir concentração de 3-5x10⁵ células por mL de meio MEM (Figura 29).

Cem microlitros da suspensão de células foram incubados juntamente com os compostos teste em incubadora de CO₂ a 5%, por um período de 72 horas. A cada 24 horas foi feita a inspeção visual. Após esse período, foi adicionado 20 µL de resazurina 0,6 mM em cada poço e incubou-se por mais 4 horas. A citotoxicidade (IC₅₀) foi determinada em leitor de microplacas por medição da absorbância (530 nm) e excitação (590 nm), utilizando a base de dados IC₅₀ ITR.

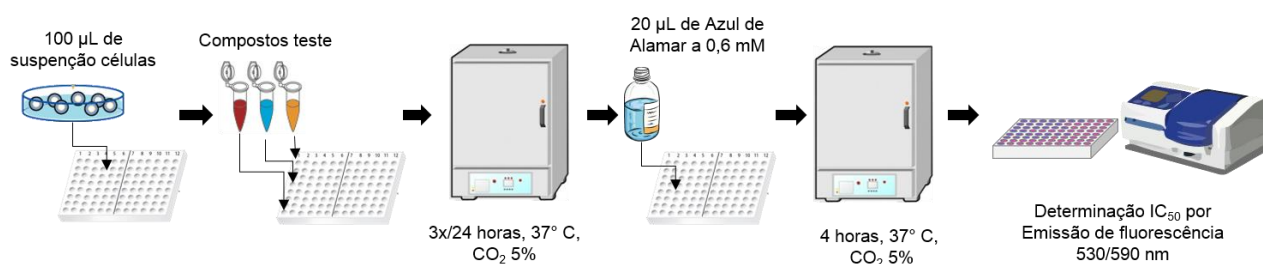


Figura 29 - Fluxograma do procedimento experimental de avaliação de citotoxicidade em células Vero.

3.6.6. Avaliação do espectro de atividade

A avaliação do espectro de atividade foi realizada utilizando os microrganismos: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) inoculados em meio Mueller Hinton (CAMH) (pH = 7,4); *Candida albicans* (ATCC 90028) em meio RPMI (pH = 7,4), *Mycobacterium smegmatis* (ATCC MC2155) em meio 7H12 (pH = 7,4); *M. abscessus* (ATCC 19977), *M. chelonae* (ATCC 35752), *M. marinum* (ATCC 927), *M. avium* (ATCC 15769), *M. kansasii* (ATCC 12478) e *M. bovis* (ATCC 35734) em meio 7H9 (pH = 7,4) enriquecido com OADC (ácido oleico, albumina bovina, dextrose e catalase). Para *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans*, as culturas foram diluídas em 1:100.000 e 1:10.000 e incubadas a 37°C, sendo o MIC determinado em leitor de microplacas a uma absorbância de 570 nm. Os outros microrganismos foram inoculados em meio Middlebrook 7H9 Broth com 0,2% de glicerol (v/v), 0,05% de Tween 80 enriquecido com OADC (ácido oléico, albumina bovina, dextrose e catalase) em placas de 96 poços em incubadoras de CO₂ 5%, temperatura de 30°C (*M. chelonae* 3 dias e *M. marinum* 5 dias) e 37°C (*M. smegmatis*, *M. abscessus* 3 dias, *M. avium* 6 dias, *M. kansasii* e *M. bovis* 7 dias). 0,6 mM de resazurina foi adicionada às placas após o primeiro período de incubação e a leitura foi realizada para cada cepa (*M. smegmatis*, *M. abscessus*, *M. chelonae* e *M. marinum* 4 horas, *M. avium*, *M. kansasii* e *M. bovis* 24 horas). O MIC foi determinado efetuando a redução da fluorescência de 90% relativa ao controle devido à oxidação da resazurina (azul-rosa), em leitor de microplacas por medição da excitação em fluorescência (530 nm) e emissão (590 nm).

4.1. Planejamento de novas chalconas antituberculose

4.1.1. Análise de SAR

Na análise de SAR, compostos do conjunto de dados foram comparados em pares, pelo método denominado MMPA (DOSSETTER; GRIFFEN; LEACH, 2013; KRAMER et al., 2014). A similaridade estrutural entre os pares de compostos foi avaliada pelo coeficiente de Tanimoto (BAJUSZ; RÁCZ; HÉBERGER, 2015), como pode ser observado na Figura 30.

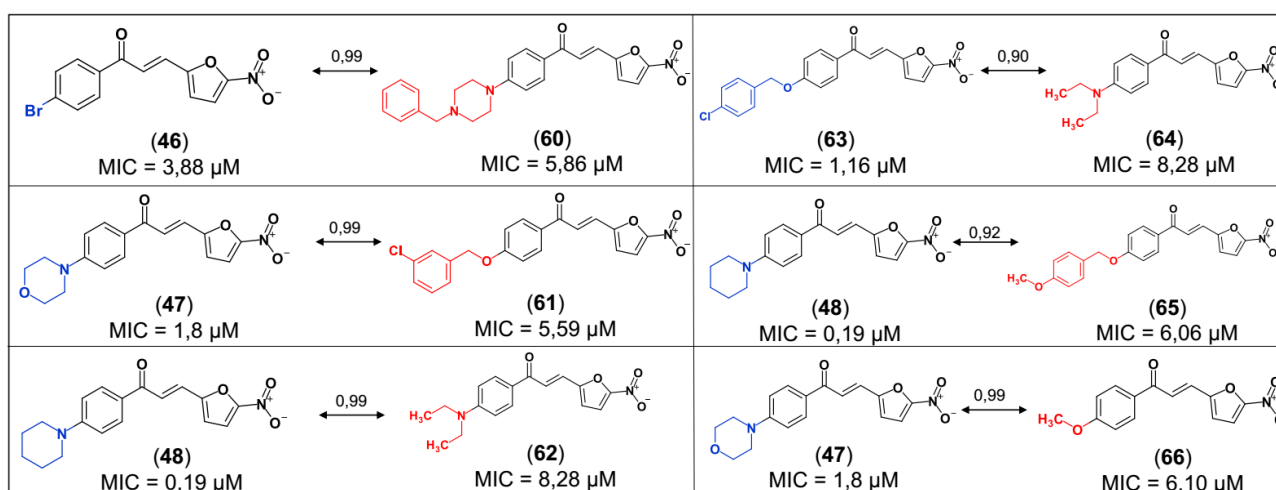


Figura 30 - MMPA de pares moleculares selecionados das chalconas e heteroaril chalconas com atividade anti-TB relacionadas na literatura. O número acima das setas indica o Coeficiente Tanimoto entre o par molecular (alta similaridade estrutural, coeficiente de Tanimoto > 0,90). Os grupos em azul e vermelho representam as diferenças estruturais entre as moléculas.

O resultado desta análise permitiu investigar quais fragmentos contribuem para a atividade anti-TB (azul) e quais são desfavoráveis (vermelho), gerando as regras de SAR.

A partir dessa análise, foi possível derivar as regras de SAR a seguir (Figura 31): grupos hidrofóbicos, átomos de halogênios e aceptores de ligação de hidrogênio na posição R₄, substituições hidrofóbicas na posição R₃ e o nitrofurano como anel B são favoráveis para atividade anti-TB. Além disso, a presença de átomos de halogênio adicionais nas posições R₂, R₃, R₅, R₆, grupos nitro e metoxila na posição R₄, grupo arila não substituído como anel B, grupos dimetilamino, metoxila e metilsulfônica nas posições R₈ e R₉, são desfavoráveis para atividade anti-TB (Figura 31).

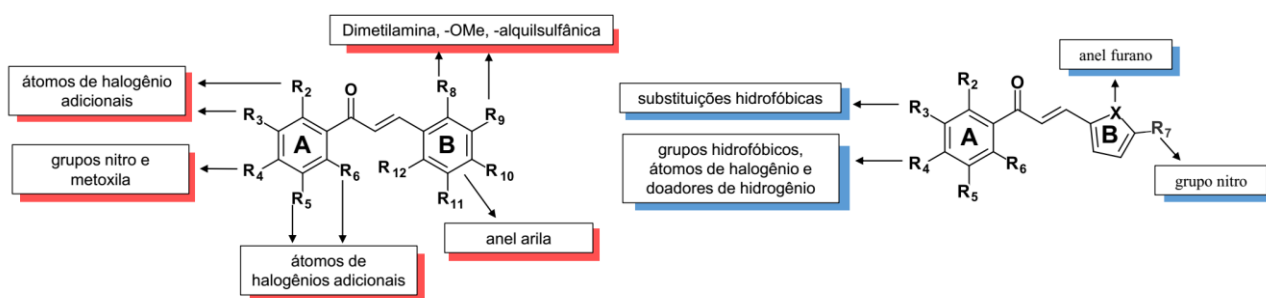


Figura 31 - Regras de SAR derivadas para o planejamento de novas aril e heteroaril chalconas anti-TB. Grupos em azul são favoráveis para a atividade anti-TB e em vermelho são desfavoráveis.

A análise comparativa de MMPA juntamente com as regras de SAR desenvolvidas contribuíram para a proposição das modificações bioisostéricas, possibilitando assim, o planejamento de moléculas derivadas de chalconas. Estas, posteriormente tiveram suas atividades anti-TB previstas, utilizando os modelos de QSAR e foram selecionadas para a síntese orgânica.

4.1.2. Desenvolvimento e validação de modelos de QSAR

O conjunto de dados foi modelado utilizando cinco diferentes tipos de descritores moleculares (*fingerprints*) e três métodos de aprendizado de máquina, resultando em 15 diferentes modelos. Os resultados estatísticos dos 15 modelos de QSAR gerados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros estatísticos dos modelos de QSAR desenvolvidos para o conjunto de dados.

Modelos	CCR	Kappa	Se	Sp	Cobertura
MACCS-GBM	0,73	0,46	0,76	0,70	0,71
AtomPairs-GBM	0,71	0,41	0,71	0,70	0,71
Morgan-GBM	0,76	0,51	0,77	0,74	0,68
FeatMorgan-GBM	0,74	0,47	0,76	0,71	0,66
Avalon-GBM	0,74	0,47	0,79	0,68	0,77
MACCS-RF	0,75	0,51	0,79	0,72	0,71
AtomPairs-RF	0,75	0,50	0,73	0,77	0,71
Morgan-RF	0,76	0,52	0,79	0,73	0,68
FeatMorgan-RF	0,75	0,50	0,70	0,80	0,66
Avalon-RF	0,74	0,49	0,76	0,73	0,77
MACCS-SVM	0,77	0,53	0,77	0,76	0,71
AtomPairs-SVM	0,74	0,48	0,74	0,74	0,71
Morgan-SVM	0,76	0,53	0,80	0,73	0,68
FeatMorgan-SVM	0,76	0,51	0,75	0,76	0,66
Avalon-SVM	0,73	0,46	0,72	0,74	0,77
Consensus*	0,77	0,53	0,79	0,74	1,00

GBM: *Gradient Boosting Machine*; SVM: *Support Vector Machine*; RF: *Random Forest*; CCR: Taxa de classificação correta; Kappa: coeficiente kappa de Cohen's; Se: sensibilidade; Sp: especificidade. *Modelo de consenso foi desenvolvido pela média das predições de todos os 15 modelos individuais.

O conjunto de dados foi balanceado antes da geração dos modelos, visando manter a mesma proporção de compostos ativos e inativos (1:1). Os resultados obtidos da validação externa cruzada por *5-fold* demonstrou alta capacidade preditiva dos modelos gerados. O melhor modelo individual gerado foi o modelo MACCS-SVM com valores de CCR = 0,77, Kappa = 0,53, Se = 0,77 e Sp = 0,76. A capacidade preditiva dos modelos, demonstrada pela taxa de classificação correta, bem como a predição de compostos ativos como verdadeiramente ativos e de inativos como verdadeiramente inativos foram superiores a 70% para todos os modelos. Na tentativa de ampliar a capacidade preditiva dos modelos foi realizada uma média entre os 15 modelos gerados a fim de se obter um modelo de consenso (Tabela 2). O modelo de consenso demonstrou alta capacidade preditiva com valores de CCR = 0,77, Kappa = 0,53, Se = 0,79 e Sp = 0,74.

Mesmo não apresentando aumento significativo quando comparado aos modelos individuais, justifica-se o uso do modelo de consenso para fazer as predições dos compostos planejados pois é possível obter mais informações químicas utilizando diversidade de descritores químicos do que se utilizarmos somente o melhor modelo individual.

Para avaliar a robustez dos modelos de QSAR utilizou-se o teste de aleatorização da variável Y, cujos resultados são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultados estatísticos da randomização da variável Y.

Models	CCR	Kappa	Se	Sp
MACCS-GBM	0,558±0,035	0,12±0,076	0,558±0,057	0,56±0,027
AtomPairs-GBM	0,536±0,027	0,078±0,055	0,551±0,037	0,537±0,029
Morgan-GBM	0,533±0,032	0,068±0,063	0,524±0,035	0,542±0,042
FeatMorgan-GBM	0,564±0,035	0,132±0,07	0,561±0,053	0,565±0,037
Avalon-GBM	0,545±0,036	0,095±0,073	0,556±0,049	0,536±0,041
MACCS-RF	0,54±0,043	0,081±0,085	0,551±0,1	0,527±0,082
AtomPairs-RF	0,533±0,035	0,069±0,069	0,547±0,107	0,52±0,079
Morgan-RF	0,521±0,027	0,047±0,053	0,51±0,107	0,533±0,109
FeatMorgan-RF	0,54±0,036	0,083±0,069	0,52±0,116	0,562±0,097
Avalon-RF	0,532±0,037	0,066±0,078	0,524±0,112	0,543±0,099
MACCS-SVM	0,538±0,043	0,08±0,083	0,562±0,063	0,516±0,065
AtomPairs-SVM	0,54±0,018	0,079±0,034	0,547±0,038	0,531±0,044
Morgan-SVM	0,54±0,016	0,094±0,034	0,558±0,052	0,533±0,045
FeatMorgan-SVM	0,536±0,026	0,074±0,055	0,534±0,054	0,538±0,042
Avalon-SVM	0,546±0,021	0,095±0,047	0,557±0,031	0,537±0,041

GBM: *Gradient Boosting Machine*; SVM: *Support Vector Machine*; RF: *Random Forest*; CCR: Taxa de classificação correta; Kappa: coeficiente kappa de Cohen; Se: sensibilidade; Sp: especificidade

O teste de permutação da variável Y foi executado em 10 permutações, reconstruindo os modelos após permutar os dados dos valores de atividade do conjunto

treinamento. Os resultados obtidos na permutação demonstraram valores estatísticos significativamente mais baixos do que os modelos construídos com as atividades reais. Os valores de CCR em torno de 0,5 indicam correlação aleatória dos modelos gerados com as permutações da variável Y, classificando moléculas ativas como inativas. Com isso, observou-se que os modelos de QSAR gerados são preditivos e robustos.

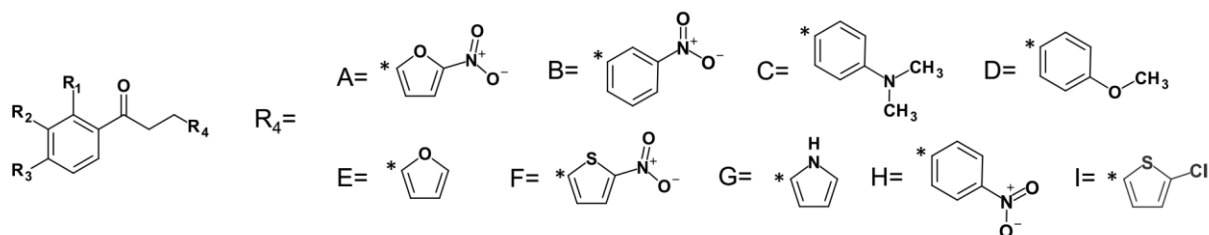
Ao final, o modelo de consenso foi usado para a predição das atividades anti-TB de todas as chalconas planejadas, a fim de auxiliar na seleção de compostos para a síntese.

4.1.3. Geração de bioisósteros

Bioisósteros foram gerados a partir do arquivo de fragmentos do programa BROOD v.2.0. Utilizou-se como base para modificação molecular bioisostérica três compostos líderes do conjunto original, provenientes do trabalho de Tawari, 2010 (TAWARI et al., 2010). Estes três compostos também foram novamente sintetizados e utilizados como padrão nos ensaios biológicos e renomeados como **LabMol63 (46)**, **LabMol64 (47)** e **LabMol65 (48)**.

Apresenta-se na Tabela 4 os bioisósteros planejados bem como as suas propriedades. Pode-se observar que os compostos planejados apresentados na Tabela 4 obedecem a regra do 5 de Lipinski modificada para o planejamento de novos fármacos, ou seja, todos os compostos possuíram $cLog P \leq 5$, massa molecular ≤ 500 Da, área de superfície polar $\leq 140\text{\AA}$, ≤ 5 doadores de ligação de hidrogênio, ≤ 10 aceptores de ligação de hidrogênio e número de rotâmeros ≤ 10 (VEBER et al., 2002; VIETH et al., 2004). Estes parâmetros, juntamente com a acessibilidade sintética, contribuíram para a classificação e seleção destes compostos para a predição no modelo de QSAR, síntese e avaliação biológica anti-TB.

Tabela 4 – Propriedades moleculares de bioisósteros aril e heteroaril chalconas selecionados para síntese.



Código	Estruturas				AS	LogP	LogD	MM	tPSA	DLH	ALH	Rot
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄								
LabMol66 (67)	H	H		A	0,46	2,95	2,71	309	93	0	5	5
LabMol67 (68)	H	H		B	0,47	3,21	4,79	336	63	0	4	5
LabMol68 (69)	H	H	C(CH ₃) ₃	A	0,49	3,27	4,52	299	73	0	4	5
LabMol69 (70)	H	H		C	0,53	4,85	5,64	327	20	0	2	5
LabMol70 (71)	H	H		D	0,50	4,89	5,38	314	26	0	2	5
LabMol71 (72)	H	H	SCH ₃	E	0,38	2,96	3,58	244	30	0	2	4
LabMol72 (73)	H	H		A	0,46	3,88	5,09	325	73	0	4	5
LabMol73* (74)	H	H		A	0,45	0,86	1,18	327	88	1	4	5
LabMol74 (75)	H	H		A	0,46	3,56	4,63	319	73	0	4	5
LabMol75 (76)	CH ₃	H	H	A	0,44	2,26	3,49	257	73	0	4	4
LabMol76 (77)	H	I	H	D	0,41	3,67	4,66	364	26	0	2	4
LabMol77 (78)	H	H	(CH ₂) ₃ CH ₃	A	0,52	3,34	4,83	299	73	0	4	7
LabMol78 (79)	H	H	-I	A	0,56	2,80	3,91	369	73	0	4	4
LabMol79 (80)	H	CH ₃	H	A	0,44	2,35	3,49	257	73	0	4	4
LabMol80 (81)	H	H		E	0,46	3,32	3,91	281	33	0	3	4
LabMol81 (82)	H	H		A	0,47	2,23	3,49	312	76	0	4	5
LabMol82 (83)	H	Br	H	A	0,45	2,64	3,75	322	73	0	4	4
LabMol83 (84)	H	Br	H	B	0,41	3,95	4,50	317	26	0	2	4

AS: acessibilidade sintética, tPSA: área de superfície polar, DLH: doadores de ligação de hidrogênio, ALH: aceptores de ligação de hidrogênio, Rot: rotâmeros, Ro5: falha da regra do 5 de Lipinski. Todas as propriedades foram obtidas no programa vBrood.

Continuação da tabela 4 - Propriedades físico-químicas calculadas e características moleculares de bioisósteros aril e heteroaril chalconas selecionados para síntese.

Código	Estruturas				AS	LogP	LogD	MM	tPSA	DLH	ALH	Rot
	R ₁	R ₂	R ₃ *	R ₄								
LabMol84 (85)	H	H		F	0,46	2,08	3,64	325	78	0	4	5
LabMol85 (86)	H	H	C(CH ₃) ₃	G	0,43	3,66	4,44	253	32	1	2	4
LabMol86 (87)	H	H	C(CH ₃) ₃	F	0,51	4,02	5,45	315	60	0	4	5
LabMol87 (88)	H	H	(CH ₂) ₃ CH ₃	F	0,48	4,10	5,76	315	60	0	4	7
LabMol88 (89)	H	H		F	0,54	4,57	6,02	341	60	0	4	5
LabMol89 (90)	H	H		F	0,45	1,73	3,80	344	72	0	4	5
LabMol90 (91)	H	H		H	0,54	3,21	4,79	336	63	0	4	5
LabMol91 (92)	H	H	C(CH ₃) ₃	E	0,43	4,07	4,50	254	30	0	2	4
LabMol92 (93)	H	H	SCH ₃	A	0,54	2,29	3,61	289	73	0	4	5
LabMol93 (94)	H	H	SCH ₃	F	0,54	3,03	4,54	305	60	0	3	5
LabMol94 (95)	H	H		I	0,49	3,60	4,30	314	34	0	3	4
LabMol95 (96)	H	H	CH ₃	F	0,44	2,78	4,42	273	60	0	4	4

AS: acessibilidade sintética, tPSA: área de superfície polar, DLH: doadores de ligação de hidrogênio, ALH: aceptores de ligação de hidrogênio, Rot: rotâmeros, Ro5: falha da regra do 5 de Lipinski. Todas as propriedades foram obtidas no programa vBrood

4.1.4. Predição da atividade de novas chalconas planejadas

Uma lista de 30 chalconas planejadas foi submetida à predição da atividade anti-TB utilizando o modelo de QSAR por consenso (Tabela 5). Os compostos foram classificados em ativos com a probabilidade $\geq 50\%$ e inativos com a probabilidade $\leq 50\%$. Dessa forma, foi possível priorizar para a síntese aqueles compostos que foram preditos como ativos. Contudo, também foram selecionados alguns compostos preditos como inativos, a fim de validar a predição do modelo a partir dos ensaios experimentais.

Tabela 5 - Predição da probabilidade de atividade anti-TB dos compostos planejados para atividade anti-TB.

Código	Consenso
(67)	100%
(68)	90%
(69)	100%
(70)	0%
(71)	0%
(72)	0%
(73)	100%
(74)	100%
(75)	100%
(76)	100%
(77)	70%
(78)	80%
(79)	100%
(80)	100%
(81)	20%
(82)	100%
(83)	100%
(84)	40%
(85)	90%
(86)	0%
(87)	40%
(88)	60%
(89)	80%
(90)	90%
(91)	80%
(92)	0%
(93)	80%
(94)	50%
(95)	40%
(96)	60%

Dos 30 compostos selecionados para a síntese, 20 foram classificados pelo modelo como ativos (50 – 100%) e nove compostos foram classificados como inativos (<50%). Todos esses 30 compostos foram sintetizados posteriormente.

4.2. Síntese Orgânica

4.2.1. Síntese de aril e heteroaril chalconas

Utilizou-se a condensação aldólica clássica em meio alcalino de Claisen-Schmidt para sintetizar seis compostos aril chalconas e quatro heteroaril chalconas, descritas no item **3.6.3**.

Além disso, foram sintetizados 22 compostos nitroeteroaril chalconas uma cloroeteroaril chalcona, descritos no item **3.6.3.1** pela condensação de Claisen-Schmidt adaptada usando catalisador ácido sulfúrico, visto que, principalmente o 5-nitro-2-furaldeído (**97**) apresenta caráter álcali sensitivo, formando em meio básico o ânion 5-nitro-furan-2-il-metenodiol (**98**) que, mesmo acidificando o meio não ocorre o retorno para 5-nitro-2-

furaldeído (**99**) (Figura 32) (CISAK; RZESZOWSKA-MODZELEWSKA; BRZEZINSKA, 2001).

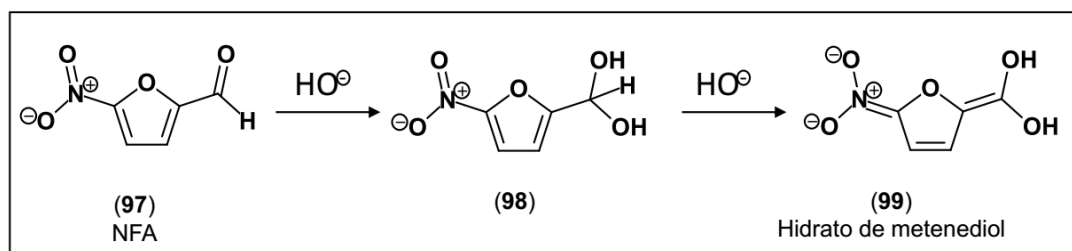


Figura 32 - Formação do intermediário metanediol em meio alcalino, justificando a síntese na presença de catalisador ácido.

Os resultados das propriedades físicas dos 33 compostos sintetizados estão apresentados na Tabela 6. De modo geral, os compostos foram obtidos em rendimentos que variaram de 6 a 89%, observando que as variações ocorreram em ambos anéis A e B. Os compostos que demonstraram maior rendimento reacional foram os derivados arila (**68**) (84%) e (**91**) (89%).

Tabela 6 – Síntese das aril e heteroaril chalconas anti-TB planejadas, rendimento reacional, fator de retenção (Rf), faixa de fusão e pureza dos 33 compostos.

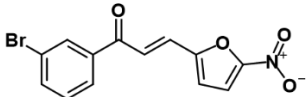
Código	Rend. (%)	Rf	Ponto de Fusão °C	Pureza (%)
(46)	33	0,86 ^a	181-182	98,1
(47)	13	0,33 ^a	84 - 86	98,1
(48)	17	0,66 ^a	219 - 220	98,4
(67)	12	0,34 ^b	230-232	99,0
(68)	84	0,84 ^a	180-181	99,9
(69)	22	0,88 ^a	178-180	99,8
(70)	53	0,47 ^a	162-164	99,3
(71)	25	0,52 ^a	150-152	100,0
(72)	19	0,55 ^a	112-114	99,0
(73)	44	0,68 ^a	160-162	98,5
(74)	42	0,47 ^c	220-221	98,0
(75)	62	0,52 ^a	118-200	99,2
(76)	9	0,59 ^a	112-114	99,2
(77)	6	0,61 ^a	108-110	99,6
(78)	10	0,55 ^a	98-100	97,9
(79)	33	0,58 ^a	192-194	99,4
(80)	17	0,56 ^a	140-141	97,9
(81)	30	0,60 ^a	180-182	99,3
(82)	36	0,38 ^a	241-242	96,8
(83)	32	0,57 ^a	157-158	99,9
(84)	41	0,62 ^a	88-90	99,6
(85)	55	0,35 ^b	222-223	98,9
(86)	5,5	0,48 ^a	156-158	99,8
(87)	63	0,62 ^a	190-192	99,5
(88)	38	0,63 ^a	144-145	99,7
(89)	64	0,65 ^a	180-182	99,7
(90)	9	0,59 ^a	239-240	98,6
(91)	89	0,78 ^a	196-198	99,5
(92)	7	0,76 ^a	82-84	99,8
(93)	24	0,5 ^a	158-160	99,1
(94)	61	0,63 ^a	202-204	99,2
(95)	17	0,55 ^a	177-179	99,2
(96)	68	0,50 ^a	192-194	99,4

^aHex:Acoet (7:3); ^bHex:Acoet (1:9); e ^cHex:Acoet (1:1)

A pureza dos compostos foi determinada por CLAE $\geq 95\%$ e também pela variação do ponto de fusão de 1 a 2 °C. Este grau de pureza é uma exigência para validação de *hits* em ensaios biológicos na triagem primária para doenças infecciosas.

Na Tabela 7 a variação das condições para a síntese do composto (**83**) durante a reação demonstrou aumento de rendimento significativo (87%), principalmente após substituição do metanol pela água no isolamento do produto, já o micro-ondas mostrou-se vantajoso no ganho de tempo reduzindo para 2 horas de reação com o mesmo rendimento da reação em refluxo.

Tabela 7 - Variação das condições reacionais na síntese do composto (**83**).

Código	Condições	Rend.(%)	Tempo reacional
 (83)	Refluxo, precipitação em água;	87	20 h
	Refluxo, redução da concentração do catalisador e precipitação em água;	56	30 h
	Temperatura ambiente (37 °C) por 24 h + refluxo 48 h;	64	72 h
	Refluxo, com aumento de escala (5x);	40	20 h
	Micro-ondas;	37	2 h

Os compostos tiveram suas estruturas elucidadas pelas técnicas de espectroscopia de infravermelho (IV) (Tabela 8), de RMN de ^1H , de ^{13}C (Tabelas 9 – 16) e espectrometria de massas (Tabela 8). Nos espectros no IV, a carbonila apresentou números de onda de 1618 – 1663 cm^{-1} , os carbonos da olefina apresentou números de onda 1593 – 1691 cm^{-1} e o grupo nitro apresentou dois números de onda, 1475 – 1597 e 1301 - 1355 cm^{-1} .

Tabela 8 - Absorção em IV de carbonila, olefina, grupo nitro e cloro das aril e heteroaril chalconas e atribuição de massas dos compostos sintetizados.

Código	Número de onda (cm^{-1})	Atribuição	[M+H] (m/z)
(46)	1663, 1607, 1475 e 1301	$\nu(\text{C}=\text{O})$, $\nu(\text{C}=\text{C}\alpha\beta)$ e $\nu(\text{Ar}-\text{NO}_2)$	-
(47)	1660, 1601, 1515 e 1355	$\nu(\text{C}=\text{O})$, $\nu(\text{C}=\text{C}\alpha\beta)$ e $\nu(\text{Ar}-\text{NO}_2)$	329
(48)	1642, 1607, 1578 e 1354	$\nu(\text{C}=\text{O})$, $\nu(\text{C}=\text{C}\alpha\beta)$ e $\nu(\text{Ar}-\text{NO}_2)$	327
(67)	1662, 1609, 1566 e 1352	$\nu(\text{C}=\text{O})$, $\nu(\text{C}=\text{C}\alpha\beta)$ e $\nu(\text{Ar}-\text{NO}_2)$	310
(68)	1651, 1610, 1588 e 1349	$\nu(\text{C}=\text{O})$, $\nu(\text{C}=\text{C}\alpha\beta)$ e $\nu(\text{Ar}-\text{NO}_2)$	327
(69)	1651, 1596, 1527 e 1354	$\nu(\text{C}=\text{O})$, $\nu(\text{C}=\text{C}\alpha\beta)$ e $\nu(\text{Ar}-\text{NO}_2)$	300
(70)	1647, 1603	$\nu(\text{C}=\text{O})$, $\nu(\text{C}=\text{C}\alpha\beta)$	328
(71)	1647, 1597	$\nu(\text{C}=\text{O})$, $\nu(\text{C}=\text{C}\alpha\beta)$	315
(72)	1656, 1596	$\nu(\text{C}=\text{O})$, $\nu(\text{C}=\text{C}\alpha\beta)$	245
(73)	1651, 1593, 1526 e 1353	$\nu(\text{C}=\text{O})$, $\nu(\text{C}=\text{C}\alpha\beta)$ e $\nu(\text{Ar}-\text{NO}_2)$	326
(74)	1618, 1609, 1580 e 1354	$\nu(\text{C}=\text{O})$, $\nu(\text{C}=\text{C}\alpha\beta)$ e $\nu(\text{Ar}-\text{NO}_2)$	-
(75)	1660, 1598, 1597 e 1352	$\nu(\text{C}=\text{O})$, $\nu(\text{C}=\text{C}\alpha\beta)$ e $\nu(\text{Ar}-\text{NO}_2)$	320
(76)	1663, 1608, 1483 e 1348	$\nu(\text{C}=\text{O})$, $\nu(\text{C}=\text{C}\alpha\beta)$ e $\nu(\text{Ar}-\text{NO}_2)$	258
(77)	1657, 1600	$\nu(\text{C}=\text{O})$, $\nu(\text{C}=\text{C}\alpha\beta)$	365
(78)	1652, 1607, 1594 e 1351	$\nu(\text{C}=\text{O})$, $\nu(\text{C}=\text{C}\alpha\beta)$ e $\nu(\text{Ar}-\text{NO}_2)$	300
(79)	1658, 1606, 1579 e 1351	$\nu(\text{C}=\text{O})$, $\nu(\text{C}=\text{C}\alpha\beta)$ e $\nu(\text{Ar}-\text{NO}_2)$	-
(80)	1661, 1606, 1579 e 1349	$\nu(\text{C}=\text{O})$, $\nu(\text{C}=\text{C}\alpha\beta)$ e $\nu(\text{Ar}-\text{NO}_2)$	258
(81)	1648, 1604	$\nu(\text{C}=\text{O})$, $\nu(\text{C}=\text{C}\alpha\beta)$	282
(82)	1643, 1610, 1578 e 1354	$\nu(\text{C}=\text{O})$, $\nu(\text{C}=\text{C}\alpha\beta)$ e $\nu(\text{Ar}-\text{NO}_2)$	313
(83)	1664, 1607, 1566 e 1354	$\nu(\text{C}=\text{O})$, $\nu(\text{C}=\text{C}\alpha\beta)$ e $\nu(\text{Ar}-\text{NO}_2)$	321

Continuação da Tabela 8 - Absorção em IV de carbonila, olefina, grupo nitro e cloro das aril e heteroaril chalconas e atribuição de massas dos compostos sintetizados.

Código	Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição	[M+H] (m/z)
(84)	1662, 1594	$\nu(\text{C=O})$, $\nu(\text{C=C}\alpha\beta)$	-
(85)	1663, 1605, 1595 e 1339	$\nu(\text{C=O})$, $\nu(\text{C=C}\alpha\beta)$ e $\nu(\text{Ar-NO}_2)$	326
(86)	-	-	254
(87)	1657, 1691, 1586 e 1334	$\nu(\text{C=O})$, $\nu(\text{C=C}\alpha\beta)$ e $\nu(\text{Ar-NO}_2)$	316
(88)	1657, 1598, 1593 e 1330	$\nu(\text{C=O})$, $\nu(\text{C=C}\alpha\beta)$ e $\nu(\text{Ar-NO}_2)$	316
(89)	1656, 1606, 1589 e 1334	$\nu(\text{C=O})$, $\nu(\text{C=C}\alpha\beta)$ e $\nu(\text{Ar-NO}_2)$	-
(90)	1648, 1604, 1584 e 1335	$\nu(\text{C=O})$, $\nu(\text{C=C}\alpha\beta)$ e $\nu(\text{Ar-NO}_2)$	345
(91)	1655, 1609, 1593 e 1336	$\nu(\text{C=O})$, $\nu(\text{C=C}\alpha\beta)$ e $\nu(\text{Ar-NO}_2)$	337
(92)	1655, 1605	$\nu(\text{C=O})$, $\nu(\text{C=C}\alpha\beta)$	255
(93)	1658, 1607, 1589 e 1354	$\nu(\text{C=O})$, $\nu(\text{C=C}\alpha\beta)$ e $\nu(\text{Ar-NO}_2)$	290
(94)	1654, 1604, 1589 e 1331	$\nu(\text{C=O})$, $\nu(\text{C=C}\alpha\beta)$ e $\nu(\text{Ar-NO}_2)$	-
(95)	1645, 1608 e 810	$\nu(\text{C=O})$, $\nu(\text{C=C}\alpha\beta)$ e $\nu(\text{Ar-Cl})$	315
(96)	1659, 1609, 1594 e 1336	$\nu(\text{C=O})$, $\nu(\text{C=C}\alpha\beta)$ e $\nu(\text{Ar-NO}_2)$	274

No espectros de RMN ¹H, os prótons olefínicos H- α e H- β aparecem como dubletos δ 7,60 – 7,80 e δ 7,48 – 7,55 ppm, respectivamente. A evidência de isomeria *E* das aril e heteroaril chalconas é demonstrada pela constante de acoplamento dos hidrogênios olefínicos (15 – 16 Hz) (Tabelas 9, 11, 13 e 15).

Nos espectros de RMN de ¹³C, os deslocamentos químicos dos carbonos olefínicos C- α and C- β aparecem em 115,2 – 128,0 e 130,0 – 145,0 ppm, respectivamente.

Tabela 9 - Deslocamentos químicos de RMN de ^1H em ppm dos compostos (46 a 48) e (67 a 71).

Compostos (δ de ^1H (J, Hz))								
Posições	(46)	(47)	(48)	(67)	(68)	(69)	(70)	(71)
Anel A								
2'	7,95 (d, 8,0)	8,02 (d, 8,0)	7,97 (d, 9,2)	8,32 (d, 8,0)	8,01 (d, 8,0)	8,01 (d, 8,4)	8,10 (d, 8,0)	8,09 (d, 8,0)
3'	7,70 (d, 8,0)	7,04 (d, 9,2)	6,99 (d, 9,2)	7,97 (d, 8,0)	6,91 (d, 8,0)	7,55 (d, 8,4)	7,72 (d, 8,0)	7,71 (d, 8,0)
4'	-	-	-	-	-	-	-	-
5'	7,70 (d, 8,0)	7,04 (d, 9,2)	6,99 (d, 9,2)	7,97 (d, 8,0)	6,91 (d, 8,0)	7,55 (d, 8,4)	7,72 (d, 8,0)	7,71 (d, 8,0)
6'	7,95 (d, 8,0)	8,02 (d, 8,0)	7,97 (d, 9,2)	8,32 (d, 8,0)	8,01 (d, 8,0)	8,01 (d, 8,4)	8,10 (d, 8,0)	8,09 (d, 8,0)
Hidrogênios olefínicos								
H- α	7,72 (d, 15,0)	7,88 (d, 15,0)	7,86 (d, 15,0)	7,94 (d, 16,0)	7,80 (d, 16,0)	7,77 (d, 15,0)	7,40 (m)	7,45 (d, 12,0)
H- β	7,58 (d, 15,0)	7,51 (d, 15,0)	7,44 (d, 15,0)	7,63 (d, 16,0)	7,69 (d, 16,0)	7,55 (d, 15,0)	7,84 (d, 15,0)	7,45 (d, 12,0)
Anel B								
2	-	-	-	-	8,51 (s)	-	7,58 (d, 8,0)	7,61 (m)
3	6,87 (d, 4,0)	7,42 (d, 3,6)	7,40 (d, 4,0)	7,83 (d, 4,0)	-	7,39 (d, 4,0)	6,71 (d, 8,0)	6,93 (m)
4	7,39 (d, 4,0)	7,80 (d, 3,6)	7,80 (d, 4,0)	7,48 (d, 4,0)	7,91 (d, 8,0)	6,84 (d, 4,0)	-	-
5	-	-	-	-	7,60 (t, 8,0)	-	6,71 (d, 8,0)	6,93 (m)
6	-	-	-	-	8,23 (d, 8,0)	-	7,58 (d, 8,0)	7,61 (m)
Substituintes								
	Bromo	Morfolina	Piperidina	Imidazol	Piperidina	<i>t</i> -butila	Fenila	Fenila
2"	-	3,73 (m, 2H)	4,43 (s, 2H)	9,07 (s)	3,43 (s, 2H)	-	7,66 (d, 8,0)	7,64 (m)
3"	-	3,41 (m, 2H)	1,60 (s, 2H)	8,15 (s)	1,69 (s, 2H)	-	7,84 (m)	7,46 (m)
4"	-	-	1,60 (s, 2H)	7,52 (s)	1,69 (s, 2H)	-	7,40 (m)	7,39 (m)
5"	-	3,41 (m, 2H)	1,60 (s, 2H)	-	1,69 (s, 2H)	-	7,84 (m)	7,46 (m)
6"	-	3,73 (m, 2H)	4,43 (s, 2H)	-	3,43 (s, 2H)	-	7,66 (d, 8,0)	7,64 (m)
CH ₃	-	-	-	-	-	1,37 (s, 9H)	3,05 (s, 6H)	3,84 (s, 3H)

Tabela 10 - Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C em dos compostos (46 a 48) e (67 a 71).

Compostos (δ de ^{13}C)								
Posições	(46)	(47)	(48)	(67)	(68)	(69)	(70)	(71)
Anel A								
1	130,4	125,6	125,7	126,3	126,0	134,2	138,0	137,4
2'	129,7	130,4	130,7	130,7	130,6	128,2	129,1	129,3
3'	131,8	113,1	112,7	121,0	112,8	125,4	128,3	127,4
4'	123,9	154,1	153,5	139,6	154,1	152,8	146,0	145,5
5'	131,8	113,1	112,7	121,0	112,8	125,4	128,3	127,4
6'	129,7	130,4	130,7	130,7	130,6	128,6	129,1	129,3
Carbonos olefínicos								
1	187,1	185,2	185,2	187,2	186,3	187,7	190,3	190,2
C- α	128,1	116,9	125,3	119,2	121,6	124,8	122,9	120,0
C- β	128,5	126,6	125,9	135,8	139,2	127,3	145,1	144,8
Anel B								
1	-	-	-	-	136,8	-	127,9	128,4
2	135,4	127,1	154,2	153,2	123,7	157,2	130,5	130,5
3	116,4	114,9	115,1	129,0	148,2	115,8	114,7	114,7
4	112,7	133,1	112,9	114,9	124,4	112,7	152,3	162,0
5	152,4	153,8	154,2	152,1	129,4	157,2	114,7	114,7
6	-	-	-	-	133,8	-	130,5	130,5
Substituintes								
	Bromo	Morfolina	Piperidina	Imidazol	Piperidina	<i>t</i> -butila	Fenila	Fenila
1''	-	-	-	-	-	34,8	140,4	140,2
2''	-	65,8	47,9	135,9	48,0	30,6 (3C)	127,5	129,3
3''	-	46,6	24,9	129,0	24,9	-	128,3	128,4
4''	-	-	23,9	118,9	23,9	-	129,1	129,3
5''	-	46,6	24,9	-	24,9	-	128,3	128,4
6''	-	-	47,9	-	48,0	-	127,5	129,3
4''-N-2(CH ₃)	-	-	-	-	-	-	40,3	-
4''-OCH ₃	-	-	-	-	-	-	-	55,6

Tabela 11 - Deslocamentos químicos de RMN de ^1H em ppm dos compostos (72 a 79).

Compostos (δ de ^1H (J, Hz))								
Posições	(72)	(73)	(74)	(75)	(76)	(77)	(78)	(79)
Anel A								
2'	7,95 (d, 6,8)	8,00 (d, 8,0)	8,00 (d, 8,8)	8,16 (d, 8,4)	-	8,32 (s)	8,00 (d, 8,4)	7,91 (d, 8,4)
3'	7,29 (d, 6,8)	7,37 (d, 8,0)	6,90 (d, 8,8)	7,77 (d, 8,4)	7,44 (s)	-	7,35 (d, 8,4)	7,78 (d, 8,4)
4'	-	-	-	-	7,31 (s)	7,24 (s)	-	-
5'	7,29 (d, 6,8)	7,37 (d, 8,0)	6,90 (d, 8,8)	7,77 (d, 8,4)	7,31 (s)	7,89 (d, 8,0)	7,35 (d, 8,4)	7,78 (d, 8,4)
6'	7,95 (d, 6,8)	8,00 (d, 8,0)	8,00 (d, 8,8)	8,16 (d, 8,4)	7,61 (s)	7,96 (d, 8,0)	8,00 (d, 8,4)	7,91 (d, 8,4)
Hidrogênios olefínicos								
H- α	7,58 (d, 12,4)	7,77 (d, 15,6)	7,79 (d, 15,6)	7,83 (d, 15,2)	7,41 (s)	7,79 (d, 15,6)	7,78 (d, 15,6)	7,70 (d, 15,6)
H- β	7,51 (d, 12,4)	7,54 (d, 15,6)	7,51 (d, 15,6)	7,59 (d, 15,2)	7,35 (s)	7,73 (d, 15,6)	7,55 (d, 15,6)	7,56 (d, 15,6)
Anel B								
2	-	-	-	-	-	7,61 (d, 8,4)	-	-
3	6,50 (d, 2,4)	6,84 (d, 3,6)	6,78 (d, 4,0)	6,78 (d, 4,0)	6,83 (d, 3,6)	6,95 (d, 8,4)	6,84 (d, 4,0)	6,87 (d, 4,0)
4	6,70 (d, 2,4)	7,38 (d, 3,6)	7,38 (d, 4,0)	7,38 (d, 4,0)	7,37 (d, 3,6)	-	7,39 (d, 4,0)	7,39 (d, 4,0)
5	7,51 (s)	-	-	-	-	6,95 (d, 8,4)	-	-
6	-	-	-	-	-	7,61 (d, 8,4)	-	-
Substituintes								
	Metila	Ciclohexila	Piperazina	Fenila	Metila	Metila	N-butil	-
CH ₃	2,52 (s, 3H)	-	-	-	2,50 (s)	55,0 (s)	-	-
1"	-	2,61 (s)	-	-	-	-	35,3 (s)	-
2"	-	2,18 (s)	3,44 (s, 2H)	7,67 (d, 7,2)	-	-	32,8 (s)	-
3"	-	1,89 (s)	1,69 (s, 2H)	7,50 (s)	-	-	21,9 (s)	-
4"	-	1,78 (s)	-	7,44 (d, 7,2)	-	-	13,4 (s)	-
5"	-	1,89 (s)	1,69 (s, 2H)	7,50 (s)	-	-	-	-
6"	-	2,18 (s)	3,44 (s, 2H)	7,67 (d, 7,2)	-	-	-	-
		1,39 (m, 6H))	-	-	-	-	-	-
NH	-		1,69 (s)	-	-	-	-	-

Tabela 12 - Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C em ppm dos compostos (72 a 79).

Compostos (δ de ^{13}C)								
Posições	(72)	(73)	(74)	(75)	(76)	(77)	(78)	(79)
Anel A								
1'	134,6	134,6	125,7	135,4	137,3	136,9	134,4	136,0
2'	129,0	128,5	130,8	128,0	131,4	139,9	128,5	129,5
3'	125,2	127,0	112,7	126,9	127,9	94,0	128,5	137,8
4'	145,7	152,9	153,5	145,9	131,1	140,8	149,2	101,4
5'	125,2	127,0	112,7	126,9	128,7	129,8	128,5	137,8
6'	129,0	128,5	130,8	128,0	125,3	127,1	128,5	129,5
Carbonos olefínicos								
1	188,6	187,7	185,2	187,6	193,0	188,5	187,7	187,4
C- α	119,2	124,8	125,3	124,6	115,7	118,6	127,3	123,9
C- β	130,5	127,3	125,9	128,0	128,2	145,1	124,6	128,1
Anel B								
1	-	-	-	-	-	126,9	-	-
2	151,9	154,1	154,2	152,7	152,5	130,0	152,8	152,4
3	116,2	112,8	115,1	116,1	116,1	114,1	112,7	116,4
4	112,8	115,8	112,9	112,8	112,8	161,5	115,8	112,7
5	145,0	154,1	154,2	152,5	137,6	114,1	152,8	152,4
6	-	-	-	-	-	130,0	-	-
Substituintes								
	Metila	Ciclohexila	Piperazina	Fenila	Metila	Metila	Butila	4'-Iodo
4'-SCH ₃	14,9	-	-	-	-	-	-	-
2'-CH ₃	-	-	-	-	20,2	-	-	-
4'-CH ₃	-	-	-	-	-	55,0	-	-
1"	-	44,3	-	139,2	-	-	35,3	-
2"	-	33,6	47,9	127,1	-	-	32,8	-
3"	-	26,3	24,9	128,6	-	-	21,9	-
4"	-	25,6	-	127,6	-	-	13,4	-
5"	-	26,3	24,9	128,6	-	-	-	-
6"	-	33,6	47,9	127,1	-	-	-	-

Tabela 13 - Deslocamentos químicos de RMN de ^1H em ppm dos compostos (80 a 87).

Posições	Compostos (δ de ^1H (J, Hz))							
	(80)	(81)	(82)	(83)	(84)	(85)	(86)	(87)
	Anel A							
2'	7,86 (s)	8,00 (d, 8,8)	8,03 (d, 8,8)	8,18 (s)	8,13 (s)	8,42 (d, 8,0)	7,95 (d, 8,4)	7,96 (d, 8,4)
3'	-	6,90 (d, 8,8)	6,59 (d, 8,8)	-	-	8,05 (d, 8,0)	7,50 (d, 8,4)	7,55 (d, 8,4)
4'	7,45 (s)	-	-	7,76 (8,0)	7,70 (d, 8,0)	-	-	-
5'	7,45 (s)	6,90 (d, 8,8)	6,59 (d, 8,8)	7,44 (t, 7,6, 8,0)	7,39 (d, 8,0)	8,05 (d, 8,0)	7,50 (d, 8,4)	7,55 (d, 8,4)
6'	7,86 (s)	8,00 (d, 8,8)	8,03 (d, 8,8)	7,98 (d, 7,6)	7,93 (d, 8,0)	8,42 (d, 8,0)	7,95 (d, 8,4)	7,96 (d, 8,4)
	Hidrogênios olefinicos							
H- α	7,76 (d, 15,6)	7,58 (d, 15,2)	7,82 (d, 15,6)	7,69 (d, 15,6)	7,80 (15,6)	8,05 (d, 16,0)	7,77 (d, 15,6)	7,80 (d, 15,6)
H- β	7,55 (d, 15,6)	7,50 (d, 15,2)	7,52 (d, 15,6)	7,57 (d, 15,6)	7,35 (15,6)	7,94 (d, 16,0)	7,19 (d, 15,6)	7,52 (d, 15,6)
	Anel B							
2	-	-	-	-	7,62 (d, 8,8)	-	-	-
3	6,85 (d, 4,0)	6,50 (dd, 3,2)	6,77 (d, 4,0)	6,88 (d, 4,0)	6,95 (d, 8,8)	7,84 (d, 4,0)	6,72 (s)	-
4	7,39 (d, 4,0)	6,67 (d, 3,2)	7,38 (d, 4,0)	7,39 (d, 4,0)	-	8,17 (d, 4,0)	6,34 (s)	7,88 (d, 4,4)
5	-	7,54 (m)	-	-	6,95 (d, 8,8)	-	7,00 (s)	-
6	-	-	-	-	7,62 (d, 8,8)	-	-	-
	Substituintes							
CH ₃	Metila	Piperidina	Pirrolidina	-	Metila	Imidazol	<i>t</i> -butila	<i>t</i> -butila
1"	2,48 (s)	-	-	-	3,87 (s)	-	1,36 (s, 9H)	1,37 (s, 9H)
2"	-	-	-	-	-	-	-	-
3"	-	3,40 (s)	3,42 (s, 4H)	-	-	9,80 (s)	-	-
4"	-	1,68 (s)	2,07 (s, 4H)	-	-	7,95 (d, 8,0)	-	-
5"	-	1,68 (s)	2,07 (s, 4H)	-	-	8,42 (d, 8,0)	-	-
6"	-	1,68 (s)	3,42 (s, 4H)	-	-	-	-	-
	-	3,40 (s)	-	-	-	-	-	-

Tabela 14 - Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C em ppm dos compostos (80 a 87).

Compostos (δ de ^{13}C)								
Posições	(80)	(81)	(82)	(83)	(84)	(85)	(86)	(87)
Anel A								
1'	138,8	126,6	125,5	138,5	139,9	131,5	135,5	134,2
2'	125,5	130,3	130,9	131,2	131,0	130,6	127,8	128,1
3'	134,0	112,9	110,7	123,9	122,5	122,0	125,1	125,4
4'	128,7	153,9	153,6	136,0	134,9	146,4	155,7	157,1
5'	128,3	112,9	110,7	128,4	129,7	122,0	125,1	125,4
6'	124,8	130,3	130,9	126,7	126,5	130,6	127,8	128,1
Carbonos olefínicos								
1	188,3	186,8	185,0	186,9	188,6	187,2	189,6	187,8
C- α	116,0	119,2	124,3	122,8	118,9	121,7	115,4	124,6
C- β	127,5	128,6	125,6	130,0	145,1	138,5	133,9	146,1
Anel B								
1	-	-	-	-	126,9	-	-	-
2	152,8	151,7	153,6	152,3	130,0	135,5	128,9	134,0
3	112,8	114,6	113,0	116,5	114,1	130,6	114,6	128,7
4	112,8	112,0	114,9	112,7	161,5	125,1	111,0	129,1
5	138,4	143,9	151,1	151,9	114,1	151,9	122,6	151,6
6	-	-	-	-	130,0	-	-	-
Substituintes								
	Metila	Piperidina	Pirrolidina	-Br	Metila	Imidazol	<i>t</i> -butila	<i>t</i> -butila
3'-CH ₃	20,2	-	-	-	-	-	-	-
4-OCH ₃	-	-	-	-	55,0	-	--	-
1''	-	-	-	-	-	-	34,6	34,6
2''	-	48,1	42,2	-	-	137,1	30,7 (3C)	30,7 (3C)
3''	-	24,9	24,0	-	-	135,2	-	-
4''	-	23,9	24,0	-	-	120,6	-	-
5''	-	24,9	42,2	-	-	-	-	-
6''	-	48,1	-	-	-	-	-	-

Tabela 15 - Deslocamentos químicos de RMN de ^1H em ppm dos compostos (88 a 96).

Posições	Compostos (δ de ^1H (J, Hz))								
	(88)	(89)	(90)	(91)	(92)	(93)	(94)	(95)	(96)
Anel A									
2'	7,95 (d, 8,0)	7,95 (d, 8,0)	7,99 (d, 9,2)	7,99 (d, 8,0)	7,99 (d, 8,4)	8,00 (d, 8,0)	7,95 (d, 8,0)	8,13 (d, 8,0)	7,94 (d, 8,0)
3'	7,34 (d, 8,0)	7,37 (d, 8,0)	6,93 (d, 9,2)	6,90 (d, 8,0)	7,52 (d, 8,4)	7,34 (d, 8,0)	7,34 (d, 8,0)	7,54 (d, 8,0)	7,35 (d, 8,0)
4'	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5'	7,34 (d, 8,0)	7,37 (d, 8,0)	6,93 (d, 9,2)	6,90 (d, 8,0)	7,52 (d, 8,4)	7,34 (d, 8,0)	7,34 (d, 8,0)	7,54 (d, 8,0)	7,35 (d, 8,0)
6'	7,95 (d, 8,0)	7,95 (d, 8,0)	7,99 (d, 9,2)	7,99 (d, 8,0)	7,99 (d, 8,4)	8,00 (d, 8,0)	7,95 (d, 8,0)	8,13 (d, 8,0)	7,94 (d, 8,0)
Hidrogênios olefínicos									
H- α	7,80 (d, 15,6)	7,79 (d, 15,2)	7,79 (d, 15,6)	7,78 (d, 16,0)	7,60 (d, 15,2)	7,76 (d, 16,0)	7,81 (d, 16,0)	7,84 (d, 16,0)	7,81 (d, 16,0)
H- β	7,51 (d, 15,6)	7,52 (d, 15,2)	7,53 (d, 15,6)	7,68 (d, 16,0)	7,48 (d, 15,2)	7,56 (d, 16,0)	7,53 (d, 16,0)	7,24 (d, 16,0)	7,53 (d, 16,0)
Anel B									
2	-	-	-	7,77 (d, 8,0)	-	-	-	-	-
3	7,27 (d, 4,0)	7,27 (d, 4,0)	7,25 (d, 4,0)	8,25 (d, 8,0)	7,52 (d, 8,4)	6,84 (d, 4,0)	7,29 (d, 4,0)	6,94 (d, 4,0)	7,28 (d, 4,0)
4	7,89 (d, 4,0)	7,88 (d, 4,0)	7,89 (d, 4,0)	-	6,52 (s)	7,39 (d, 4,0)	7,89 (d, 4,0)	7,17 (d, 4,0)	7,90 (d, 4,0)
5				8,25 (d, 8,0)	6,72 (s)				
6				7,77 (d, 8,0)					
Substituintes									
	N-butila	Ciclohexil	Morfolina	Piperidina	t-butila	Metila	Metila	Imidazol	Metila
CH ₃	-	-	-	-	1,37 (s, 9H)	2,56 (s)	2,57 (s)	-	2,47 (s)
1"	2,71 (s, 2H)	2,61 (s)	-	-	-	-	-	-	-
2"	1,65 (s, 2H)	1,89 (s, 2H)	3,88 (d, 4,8, 2H)	3,41 (s, 2H)	-	-	-	7,98 (s)	-
3"	1,38 (s, 2H)	1,47 (s, 2H)	3,38 (t, 4,8, 2H)	1,69 (s, 2H)	-	-	-	7,38 (s)	-
4"	0,95 (s, 3H))	1,79 (s), 1,30 (s)	-	1,69 (s, 2H)	-	-	-	7,19 (s)	-
5"	-	1,47 (s, 2H)	3,38 (t, 4,8, 2H)	1,69 (s, 2H)	-	-	-	-	-
6"	-	1,89 (s, 2H)	3,88 (d, 4,8, 2H)	3,41 (s, 2H)	-	-	-	-	-

Tabela 16 - Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C em ppm dos compostos (88 a 96).

Compostos (δ de ^{13}C)									
Posições	(88)	(89)	(90)	(91)	(92)	(93)	(94)	(95)	(96)
Anel A									
1'	134,5	134,0	130,4	130,0	135,1	132,9	129,2	136,5	134,5
2'	128,3	128,4	130,4	130,6	128,0	128,7	128,5	130,3	128,7
3'	128,5	126,9	112,9	112,7	125,1	124,7	124,7	120,8	129,6
4'	149,1	154,0	154,1	154,1	156,1	146,6	146,0	138,8	144,6
5'	128,5	126,9	112,9	112,7	125,1	124,7	124,7	120,8	129,6
6'	128,3	128,4	130,4	130,6	128,0	128,7	128,5	130,3	128,7
Carbonos olefínicos									
1	187,7	187,7	185,6	186,2	188,7	186,6	186,9	187,7	188,1
C- α	128,7	124,7	124,8	125,6	119,0	124,5	124,3	127,7	125,0
C- β	124,6	134,6	133,1	141,3	129,9	127,4	134,2	135,3	134,7
Anel B									
1	-	-	-	139,0	-	-	-	-	-
2	146,1	146,1	146,6	128,2	151,3	152,8	133,0	132,1	134,5
3	134,0	128,7	128,7	123,7	115,5	115,9	128,7	137,1	129,5
4	129,1	129,1	127,3	147,8	112,2	112,8	124,3	117,7	129,1
5	151,5	151,5	146,6	123,7	144,3	152,8	146,6	140,6	146,4
6	-	-	-	128,2	-	-	-	-	-
Substituintes									
	butila	Ciclohexila	Morfolina	Piperidina	<i>t</i> -butila	Metila	Metila	Imidazol	Metila
CH ₃	-	-	-	-	30,7 (3C)	14,3	14,3	-	21,7
1"	35,3	44,3	-	-	-	-	-	-	-
2"	32,8	33,6	66,1	48,0	-	-	-	134,0	-
3"	21,9	26,3	46,8	24,9	-	-	-	131,1	-
4"	13,4	25,6	-	23,9	34,7	-	-	119,9	-
5"	-	26,3	46,8	24,9	-	-	-	-	-
6"	-	33,6	66,1	48,0	-	-	-	-	-

4.3. Avaliação da atividade biológica

4.3.1. Atividade anti-TB em ensaios aeróbicos (MABA) e anaeróbicos (LORA)

Foram realizados ensaios de inibição de crescimento de cepas sensíveis de *M. tb.* com três heteroaril chalconas com atividade já conhecida em MABA (TAWARI et al., 2010) (**46** a **48**) e trinta aril e heteroaril chalconas inéditas, selecionadas pelo modelo de QSAR (**67** a **96**). Os ensaios foram realizados com a finalidade de se avaliar o percentual de inibição do crescimento de *M. tb.* H37Rv em condições aeróbicas (MABA) e em condições anaeróbicas (LORA) (Tabela 17). A validação do ensaio foi feita utilizando como controle positivo cinco fármacos-padrão: RMP (**3**) (0,4 mM), INH (**2**) (0,8 mM), metronidazol (MET) (**100**) (51,2 mM) (Figura 33), CAP (**13**) (3,2 mM) e SM (**1**) (1,6 mM) (Tabela 18).

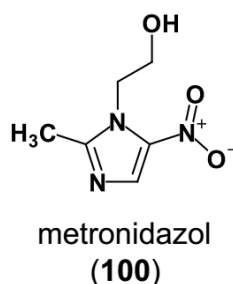


Figura 33 – Representação da estrutura química do metronidazol.

O MET foi usado neste ensaio para validação do ensaio nas condições aeróbia e anaeróbia. Em MABA, o MET não apresenta atividade inibitória no crescimento do *M. tb.*, contudo em sistema anaeróbio, o MET inibe o crescimento do *M. tb.* H37Rv, sendo usado como indicador para verificação se as culturas estão em fase replicante (MABA) ou não-replicante (LORA) (FRANZBLAU et al., 1998).

O perfil de atividade das aril e heteroaril chalconas testadas neste estudo revelou que as nitroeteroaril chalconas demonstraram potente inibição do crescimento de *M. tb.* H37Rv. Vinte e dois compostos (**67**), (**69**), (**73-80**), (**83-85**), (**87**), (**88**) e (**93-96**) demonstraram MIC ≤ 10 μ M no ensaio de MABA incluindo os compostos (**46**), (**47**) e (**48**) que reproduziram os resultados publicados no estudo de Tawari et. al. (KATSUNO et al., 2015). Entre estes vinte e dois compostos, foram identificados 12 potentes *hits* que inibiram o crescimento de *M. tb.* H37Rv em escala nanomolar em MABA (MIC ≤ 1 μ M) e micromolar em LORA (MIC ≤ 10 μ M).

Tabela 17 - Avaliação da atividade anti-TB *in vitro* em MABA, LORA, monoresistência a RMP ou INH, de espectro de atividade em microrganismos comensais e de seletividade em células Vero (SI) dos compostos (46 a 48) e (67 a 96).

	Concentração inibitória mínima (µM)								
	MABA	LORA	rRMP	rINH	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>M. smegmatis</i>	SI
(46)	2,50±0,62	6,76±0,08	0,76±0,10	0,58±0,02	4,93±2,10	>10	0,36±0,11	7,12±0,06	ND
(47)	0,81±0,02	9,85±2,93	0,55±0,02	0,11±0,07	>10	>10	1,19±0,46	>10	123
(48)	3,42±0,43	10,91±3,27	0,07±0,04	<0,03	>10	>10	>10	>10	ND
(67)	1,05±0,29	6,94±0,05	1,19±1,02	1,44±1,05	>10	3,18±1,10	0,34±0,10	>10	94
(68)	>10	>10	-	-	>10	>10	>10	>10	ND
(69)	0,35±0,11	>10	0,29±0,16	0,22±0,14	>10	>10	>10	>10	284
(70)	>10	>10	-	-	>10	>10	>10	>10	ND
(71)	>10	>10	-	-	>10	>10	1,18±0,40	>10	ND
(72)	>10	>10	-	-	>10	>10	>10	>10	ND
(73)	0,81 ± 0,04	3,33±0,72	1,12±0,03	1,23±0,06	>10	>10	>10	>10	122
(74)	0,27±0,06	9,67±2,63	0,76±0,08	0,19±0,04	>10	>10	>10	>10	359
(75)	3,91 ± 1,95	3,18±0,04	3,45±1,05	0,29±0,08	>10	>10	>10	>10	25
(76)	0,57±0,01	4,59±0,01	1,08±0,04	1,07±0,03	6,36±0,09	>10	1,09±0,08	9,50±0,01	41
(77)	4,90±1,83	>10	8,31±1,01	7,75±0,08	>10	8,31±0,35	7,75±0,11	>10	20
(78)	1,31 ± 1,01	4,21±0,22	4,70±0,45	2,23±1,02	>10	>10	2,23±0,00	>10	57
(79)	0,6 ± 0,34	4,12±0,14	1,18±0,25	1,08±0,09	>10	>10	>10	4,62±1,49	166
(80)	1,27±0,04	4,75±0,18	3,78±1,31	1,93±0,08	>10	>10	2,23±0,00	>10	43
(81)	>10	>10	-	-	>10	>10	>10	>10	ND
(82)	>10	4,30±0,00	-	-	>10	>10	>10	>10	ND
(83)	1,32±0,45	5,65±2,22	1,88±0,30	1,12±1,98	>10	>10	1,68±0,29	4,84±0,10	52
(84)	8,54 ± 2,07	8,20±1,60	9,28±2,01	4,94±1,92	>10	>10	>10	>10	11
(85)	0,19 ± 0,15	1,73±0,21	0,60±0,19	0,30±0,06	>10	>10	0,28±0,30	4,39±0,05	225
(86)	>10	>10	-	-	>10	>10	>10	>10	ND
(87)	0,22±0,13	4,18±0,55	0,14±0,01	0,15±0,05	>10	>10	>10	>10	454
(88)	0,54±0,31	5,56±0,66	0,48±0,00	0,31±0,02	>10	>10	>10	>10	81
(89)	>10	5,75±0,01	-	-	>10	>10	>10	>10	ND
(90)	>10	>10	-	-	>10	>10	>10	>10	ND
(91)	>10	>10	-	-	>10	>10	>10	>10	ND
(92)	>10	>10	-	-	>10	>10	>10	>10	ND
(93)	0,66±0,06	5,07±1,03	0,24±0,07	0,80±0,06	>10	>10	0,58	4,81±0,10	61
(94)	0,45±0,20	5,96±2,47	0,14±0,03	0,22±0,01	>10	>10	>10	>10	222
(95)	9,29±0,45	9,75±0,63	8,89±2,03	9,03±1,80	>10	>10	>10	>10	ND
(96)	1,87±0,31	2,05±0,37	1,21±0,01	0,96±0,04	>10	>10	>10	>10	ND

Tabela 18 - Avaliação da atividade anti-TB *in vitro* em MABA, LORA, monoresistência a RMP ou INH, de espectro de atividade em microrganismos comensais e de seletividade em células Vero (SI) dos compostos padrão.

	Concentração inibitória mínima (µM)								
	MABA	LORA	rRMP	rINH	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>M. smegmatis</i>	SI
RMP (3)	0,05	0,19	>1	-	-	-	-	>100	>100
INH (2)	0,41	>256	-	>5	-	-	-	>100	-
MET (100)	>512	31,49	-	-	-	-	-	-	-
CAP (13)	0,99	3,67	-	-	-	-	-	-	-
SM (1)	<0,06	0,23	-	-	-	-		0,47	-
CLF (105)	-	-	-	-	-	-	-	17,77	
AmphB (103)	-	-	-	-	0,85	-	-	-	-
KETO (104)	-	-	-	-	<0,004	-	-	-	-
AMP (101)	-	-	-	-	-	19,21	1,18	-	-
GENT (102)	-	-	-	-	-	3,09	0,25	-	-

CLF: clofazimina; AmphB: anfotericina B; KETO: cetoconazol; AMP: ampicilina; GENT: gentamicina

O *hit* mais potente da série foi o composto (**85**), que apresentou atividade inibitória em MABA de 0,19 μ M, seguido dos compostos (**87**) e (**74**) com MICs em MABA de 0,22 e 0,27 μ M, respectivamente. Estes compostos exibiram atividade inibitória superior a do fármaco-padrão INH (**2**) (0,41 μ M). Em LORA, os resultados de atividade inibitória para estes compostos foi de 1,73 μ M, 4,18 μ M e 9,76 μ M, respectivamente.

A substituição do grupo nitro pelo átomo de cloro no *hit* (**95**) revelou atividade inibitória de 9,29 μ M em MABA e 9,75 μ M em LORA, exibindo inibição em MABA inferior aos compostos nitroeteroaril chalconas.

Os compostos (**70**), (**71**) e (**72**) inativos no modelo QSAR consenso, foram testados para validar experimentalmente o reconhecimento de composto ativos e inativos pelo modelo de predição. Os resultados demonstram que estes compostos não exibiram capacidade de inibir satisfatoriamente o crescimento do *M. tb.* H37Rv em MABA e em LORA.

O composto (**90**) revelou-se incapaz de inibir o crescimento *M. tb.* H37Rv nos testes de MABA e LORA, apesar ser bioisómero do *hit* (**47**) e possuir consenso entre os modelos de QSAR de 90% como ativo.

Duas aril chalconas, (**77**) e (**84**), demonstraram atividade inibitória contra *M. tb.* H37Rv em MABA (MIC = 4,90 μ M e 8,54 μ M respectivamente). Entretanto, somente o (**83**) foi ativo também no ensaio de LORA (8,02 μ M).

Os compostos (**72**), (**81**), (**86**) e (**92**) foram inativos no ensaio de MABA e LORA, revelando a necessidade do grupo nitro estar ligado ao anel heteroarila. Os compostos com maior inibição sobre o crescimento foram o (**72**) e (**86**) que inibiram cerca de, 55% do crescimento em MABA e LORA.

Os vinte e dois 22 *hits* identificados no perfil inibitório nos ensaios de MABA e LORA foram testados para a determinação do perfil de inibição do crescimento de cepas de *M. tb.* H37Rv modificadas com monoresistência a RMP (mRMP) ou INH (mINH). Como pode ser observado na Tabela 17, os vinte e dois *hits* exibiram potente atividade inibitória (MIC $\leq$ 10 μ M) tanto em cepas com resistência a RMP, quanto em cepas com resistência a INH. Dez *hits* demonstraram perfil de atividade inibitória em escala nanomolar (MIC $\leq$ 1 μ M) para as duas cepas.

4.3.2. Citotoxicidade em células Vero

Diante do protocolo do ITR, avaliou-se a citotoxicidade em células Vero para testar a seletividade dos compostos que foram ativos nos ensaios de MABA e LORA. Estas células são usadas por serem de fácil manuseio, possuir características de parênquima hepático e por conter várias enzimas responsáveis pela ativação de diversos xenobióticos (SENTHILRAJA; KATHIRESAN, 2015). Assim, dezoito compostos **(47)**, **(67)**, **(69)**, **(73 a 80)**, **(83 a 85)**, **(87)**, **(88)**, **(93)** e **(94)** foram testados em linhagens de células de rim de mamíferos (*Vero cell*) na concentração de 10 mM. Utilizou-se como controle positivo a RMP também em concentração de 10 mM. Como pode ser observado na Tabela 17, o índice de seletividade (SI, *selectivity index*) desses compostos demonstrou que todos os *hits* testados foram mais seletivos para *M. tb.* H37Rv do que para células de mamíferos, na concentração testada. Destacam-se os compostos que apresentaram os melhores valores de SI, sendo o **(87)** (SI = 454), **(74)** (359), **(69)** (284) e **(85)** (225), ou seja, são 200 a 400 vezes mais potentes em *M. tb.* H37Rv do que em células de mamífero.

4.3.3. Avaliação do espectro de atividade

Investigou-se também a atividade dos compostos frente a quatro cepas comensais; *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* e *M. smegmatis* (Tabela 17) e seis cepas de NTMs; *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. marinum*, *M. avium*, *M. kansasii* e *M. bovis* (Tabela 19). Observou-se que os compostos testados foram mais seletivos para *M. tb.* H37Rv, apresentando espectro de atividade reduzido. Em geral os compostos foram inativos (MIC >10µM) entretanto, os compostos **(46)**, **(47)**, **(67)**, **(71)**, **(76)**, **(78 a 80)**, **(83)**, **(85)** e **(93)**, exibiram MICs de 0,28 – 2,23 µM contra *S. aureus*.

A validação destes ensaios foi feito utilizando com os fármacos-padrão ampicilina (AMP) **(101)** e gentamicina (GENT) **(102)** para *E. coli* e *S. aureus*, anfotericina B (AmphB) **(103)** e cetoconazol (KETO) **(104)** para *C. albicans* e RMP **(3)**, INH **(2)**, CLF **(105)** e SM **(1)** para *M. smegmatis* (Figura 34).

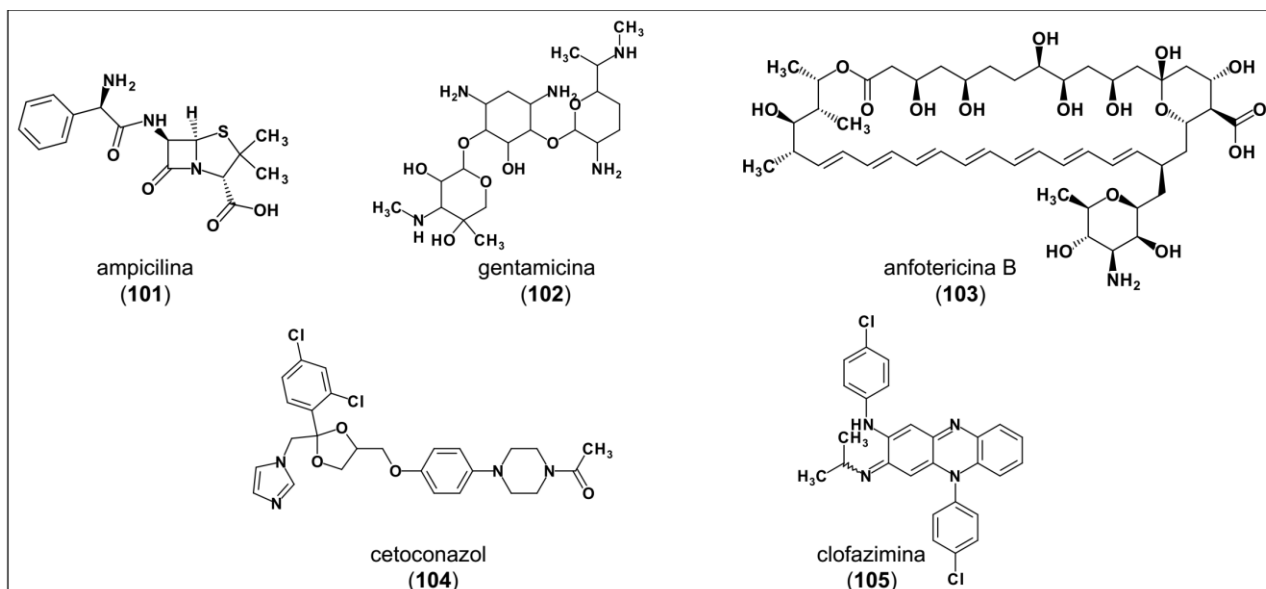


Figura 34 – Representação das estruturas químicas dos fármacos-padrão usados na validação do ensaio de espectro de atividade.

No ensaio de inibição contra NTMs os compostos **(46)**, **(73 a 79)**, **(83 a 85)**, **(87 a 89)**, **(93)**, **(94)** e **(96)** demonstraram amplo espectro exibindo MICs <10 µM contra *M. avium*, *M. kansasii* e *M. bovis*.

Os compostos foram testados a partir de uma solução estoque de concentração igual a 1 mg/mL e validados com fármacos-padrão: rifampicina (RMP) **(3)** (0,4 mM), isoniazida (INH) **(2)** (0,8 mM), canamicina (KM) **(11)** (10 mM), clofazimina (CLF) **(105)** (5 mM).

Tabela 19 - Avaliação do espectro de atividade em cepas de micobactérias não tuberculose (NTMs), demonstrada em MIC (µM).

Concentração inibitória mínima (µM)						
Código	<i>M. abscessus</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. bovis</i>
(46)	>10	>10	>10	3,45±0,08	1,57±0,07	0,23±0,03
(47)	>10	>10	>10	>10	>10	1,85±0,02
(48)	>10	>10	>10	>10	>10	>10
(67)	>10	>10	>10	>10	7,42±0,40	>10
(68)	>10	>10	>10	>10	>10	>10
(69)	>10	>10	>10	>10	>10	>10
(70)	>10	>10	>10	>10	>10	>10
(71)	>10	>10	>10	>10	>10	>10
(72)	>10	>10	>10	>10	>10	>10
(73)	>10	>10	>10	1,67±0,14	0,29±0,00	0,21±0,04
(74)	>10	>10	>10	2,73±0,19	0,49±0,05	0,59±0,02
(75)	>10	>10	>10	1,27±0,07	0,49±0,00	0,59±0,02
(76)	>10	>10	>10	3,04±0,05	1,16±0,00	0,27±0,00
(77)	>10	>10	>10	9,64±0,03	9,40±0,24	9,47±0,37
(78)	>10	>10	>10	3,07±0,18	0,58±0,01	0,36±0,03
(79)	>10	>10	>10	2,38±0,03	0,59±0,01	2,57±3,30
(80)	>10	>10	2,39±0,12	1,92±0,08	0,49±0,40	>10
(81)	>10	>10	>10	>10	>10	>10
(82)	>10	>10	>10	>10	0,39±0,08	2,18±0,08
(83)	>10	>10	>10	2,95±0,63	1,65±0,75	0,18±0,03

Continuação da Tabela 19 - Avaliação do espectro de atividade em cepas de micobactérias não tuberculose (NTMs), demonstrada em MIC (μM).

Código	Concentração inibitória mínima (μM)					
	<i>M. abscessus</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. bovis</i>
(84)	>10	>10	>10	9,82 $\pm$ 0,22	9,21 $\pm$ 0,08	9,38 $\pm$ 0,29
(85)	4,70 $\pm$ 0,00	1,63 $\pm$ 0,04	>10	2,10 $\pm$ 1,31	0,56 $\pm$ 0,03	0,23 $\pm$ 0,03
(86)	>10	>10	>10	>10	>10	>10
(87)	>10	>10	>10	1,08 $\pm$ 0,56	0,92 $\pm$ 0,28	0,50 $\pm$ 0,00
(88)	>10	>10	>10	2,14 $\pm$ 1,10	1,73 $\pm$ 0,76	1,64 $\pm$ 1,07
(89)	>10	>10	>10	5,99 $\pm$ 2,03	9,26 $\pm$ 0,07	2,38 $\pm$ 2,50
(90)	>10	>10	>10	>10	8,27 $\pm$ 0,40	9,12 $\pm$ 0,16
(91)	>10	>10	>10	>10	>10	>10
(92)	>10	>10	>10	>10	>10	>10
(93)	>10	4,66 $\pm$ 0,01	>10	1,39 $\pm$ 0,21	0,30 $\pm$ 0,01	0,26 $\pm$ 0,01
(94)	>10	>10	>10	6,89 $\pm$ 1,37	3,86 $\pm$ 0,72	0,56 $\pm$ 0,01
(95)	>10	>10	>10	>10	9,17 $\pm$ 0,00	9,52 $\pm$ 0,07
(96)	>10	>10	>10	2,30 $\pm$ 0,00	1,54 $\pm$ 0,47	0,98 $\pm$ 0,00
RMP (3)	3,78	>4	>4	0,12	0,13	<0,01
INH (2)	>100	>8	>8	>8	>8	3,79
KM (11)	12,80	46,00	47,60	4,91	17,75	2,79
CLF (105)	0,84	0,32	3,09	<0,02	0,108	0,09

RMP: rifampicina; INH: isoniazida; KM: canamicina; CLF: clofazimina

O estudo de SAR foi desenvolvido como etapa inicial do planejamento de novas chalconas com atividade antituberculose, utilizando o *fingerprint* molecular MACCS keys e coeficiente de Tanimoto na plataforma KNIME, a fim de verificar a similaridade estrutural entre os compostos do conjunto de dados reportado na literatura. Os resultados obtidos nessa análise foram importantes para elucidar quais as principais características que um composto derivado do *scaffold* das chalconas deveria apresentar para possuir atividade contra TB. Artigos que empregam a análise de SAR para otimizar a estrutura de chalconas anti-TB usando modelos de QSAR-3D (CoMFA e CoMSIA) (SIVAKUMAR et al., 2007), e análise visual (CHIARADIA et al., 2012; KONIECZNY et al., 2007; LIN et al., 2002) foram encontradas na literatura. Contudo, o estudo de SAR reportado nestes artigos não foi usado no planejamento inicial da série de compostos a ser avaliada, mas na etapa final a partir dos resultados de avaliação biológica *in vitro*.

Os modelos de QSAR desenvolvidos a partir da combinação de *fingerprints* moleculares e métodos de aprendizado de máquina, foram validados para classificar os compostos planejados. A geração de modelos de QSAR robustos e preditivos depende do uso de um conjunto de dados com adequada distribuição e diversidade estrutural dos dados de atividade biológica entre o conjunto treinamento e teste. Verificou-se a preditividade e a robustez dos modelos a partir dos valores dos parâmetros obtidos e apresentados nas Tabelas 2 e 3, tanto para os modelos individuais quanto para o modelo de consenso

Diversos grupos de pesquisa reportam a utilização da estratégia de QSAR para planejar compostos com atividade anti-TB (JOSHI et al., 2014; KHUNT et al., 2012; KHUNT; KHEDKAR; COUTINHO, 2013; KUMAR et al., 2013; MOHAN KRISHNA et al., 2014; PANCHOLIA et al., 2016). Em geral, estes trabalhos reportam a utilização de métodos de QSAR-3D. Trabalhos que combinam métodos de aprendizado de máquina e descritores moleculares para planejamento e descoberta de novos agentes anti-TB também são encontrados na literatura, e alguns deles com elevada taxa de acerto na identificação de *hits* (EKINS et al., 2013, 2016; MARTINS et al., 2014), demonstrando a eficiência desta abordagem no planejamento de novos compostos. A principal diferença dos trabalhos citados com este trabalho é que os modelos foram gerados para identificar compostos ativos e inativos partindo do *scaffold* de chalconas, limitando o espaço químico, mas

também, apresentando uma taxa de acerto elevada na identificação de *hits*, corroborando com os trabalhos supracitados.

A integração entre o planejamento computacional e as abordagens experimentais se iniciou na síntese orgânica. Os métodos de síntese empregados neste trabalho demonstraram eficiência para a síntese dos compostos planejados, entretanto, observou-se também algumas falhas principalmente na metodologia de catálise ácida que serão discutidas a seguir.

Na catálise ácida o método de isolamento e o processo de purificação diminuíram a eficiência da síntese, pois a evaporação do solvente a pressão reduzida aumentou a concentração do catalisador H₂SO₄, reduzindo o rendimento da reação. Esta metodologia de síntese foi a mesma utilizada por Tawari e colaboradores (SARAVANAMURUGAN et al., 2004), que reportaram baixo rendimento para o composto (**48**), de 42%. Neste trabalho o rendimento obtido para o mesmo composto foi ainda menor, cerca de 17%, corroborando com dados da literatura o qual o uso de catalisadores ácidos como ácido sulfúrico e clorídrico reduzem o rendimento reacional.

Para testar esta hipótese, foram avaliadas diferentes condições de síntese, mas a principal modificação foi o processo de isolamento, substituindo o metanol por água para precipitação do produto. Utilizando este processo, o rendimento foi de 87%, o que aumentou em 2,35 vezes o rendimento inicial, demonstrando que o uso da água ainda se mostra mais vantajoso para o isolamento. Nas cinco condições testadas, variou-se os parâmetros de concentração do catalisador, temperatura, concentração de reagentes de partida e uso de reator de micro-ondas. A redução da quantidade de catalizador, assim como a reação em temperatura ambiente (37 °C), foram capazes de aumentar o rendimento da reação para 56 e 64%, respectivamente (Tabela 7). Entretanto, o aumento da concentração dos materiais de partida e de catalisador em cinco vezes não provocou aumento significativo do rendimento (40%), mesmo usando o método de precipitação e isolamento em água a baixa temperatura.

O uso do aparelho de micro-ondas não trouxe vantagem com relação ao rendimento, que foi o mesmo obtido antes da alteração dos parâmetros de isolamento e de temperatura (37%), mas o ganho de tempo mostrou-se vantajoso, reduzindo para duas horas o tempo reacional, comparado a vinte horas para o método de refluxo. Em estudos publicados na literatura, a síntese em micro-ondas elevou tanto o rendimento quanto diminuiu o tempo de reação (KAKATI; SARMA, 2011; RAYEES AHMAD et al., 2016).

Finalizada a síntese dos compostos selecionados, foi realizada a validação experimental *in vitro* das aril e heteroaril chalconas planejadas a partir dos estudos de SAR

e QSAR. Os ensaios para a avaliação da atividade anti-TB (MABA e LORA) são preconizados pela organização GHIT como critério para descoberta de novos protótipos para TB. Estes ensaios mimetizam as condições de replicação (MABA) e de latência (LORA) do *M.tb in vivo*. Diante dos resultados experimentais promissores observados na Tabela 17, demonstrou-se que a integração entre abordagens computacionais e experimentais para identificação de *hits* anti-TB é vantajosa.

No entanto, alguns pontos devem ser discutidos para melhor compreensão dos resultados. Na Tabela 5, o composto (**82**) foi o único da série predito com classificação de 100% no consenso como ativo, e no ensaio experimental foi inativo em MABA. Em LORA, (**82**) exibiu atividade inibitória, que pode ser explicada pela presença de nitroeterociclo, visto que assim como o MET, esses compostos apresentam comportamento de atividade inibitória em sistemas anaeróbicos. No estudo reportado por Rakesh e colaboradores, os autores avaliaram atividade anti-TB de nitrofuranos pentacíclicos em cepas não-replicas em sistema anaeróbicos e compararam os resultados de inibição com nitroimidazóis com atividade conhecida contra TB (PA-824) (**106**) (Figura 35) e Delamanida (**22**) (RAKESH et al., 2014). Já os compostos (**83**), (**86**) e (**94**) foram ativos quando testados experimentalmente, no entanto o modelo por consenso classificou esses compostos com chance de 40% de ser ativos. Ainda assim, a taxa de acerto geral foi bem elevada, corroborando com os resultados estatísticos do modelo de consenso (CCR = 77%, Se = 79% e Sp = 74%).

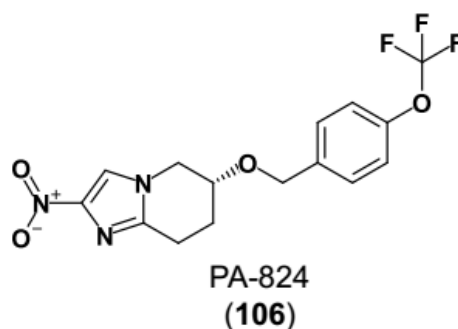


Figura 35 – Representação da estrutura química do composto PA-824.

A análise da atividade do composto (**90**) (Tabela 17) revelou que este foi incapaz de inibir o crescimento *M. tb*. H37Rv nos ensaios de MABA e LORA, apesar de ter sido classificado como ativo pelo modelo de QSAR, com probabilidade de 90%, e ainda, de ser bioisómero do composto (**47**), um dos dez compostos mais ativos experimentalmente. Este resultado se mostra ainda mais surpreendente quando comparamos os nitrotiofenos

identificados como ativos neste estudo **(85)**, **(87)**, **(88)**, **(94)** e os reportados no estudo de Hartkoorn e colaboradores (HARTKOORN et al., 2014), em que os 5-nitrotiofenos exibiram maior potencial de inibição em *M. tb.* replicantes e não replicantes. Uma possível explicação para este resultado pode estar nas propriedades eletrônicas do anel tiofeno quando comparado ao anel furano, do seu bioisómero **(47)**. O anel tiofeno possui seis elétrons π , como demonstrado na Figura 36. O anel tiofeno é estabilizado por uma energia de ressonância igual a 122 kJ mol^{-1} , valor de energia próximo ao do anel benzeno que é de 150 kJ mol^{-1} , o que confere maior estabilidade e menor reatividade ao anel tiofeno quando comparado ao anel furano, que possui energia de ressonância de 68 kJ mol^{-1} , exibindo maior reatividade demonstrando maior dissimilaridade ao anel benzeno (JOULE, 2014).

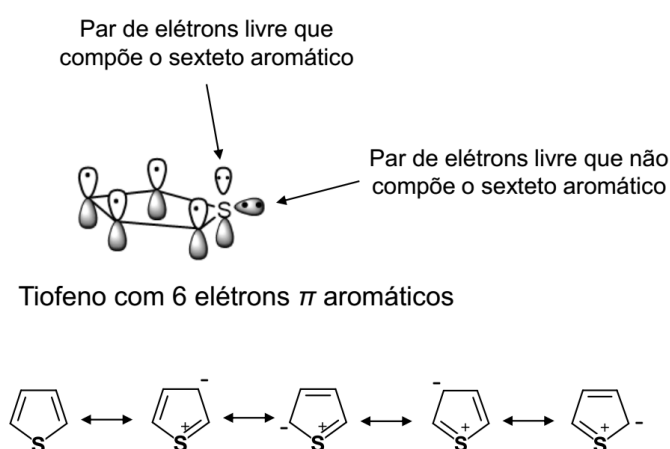


Figura 36 – Demonstração dos seis pares de elétrons π e aromaticidade do anel tiofeno.

A similaridade eletrônica do anel tiofeno comparada ao benzeno pode ter resultado na perda ou redução da atividade anti-TB já que, quando substituídas por benzeno no anel B das chalconas, este gerou perda ou ausência de atividade. Essa análise pode ser também evidenciada através do estudo de blindagem magnética dos anéis furano, pirrol e tiofeno, feito por Horner e Karadakov (HORNER; KARADAKOV, 2013). Os autores demonstram essa diferença na aromaticidade e que os átomos de carbono ligados aos átomos eletronegativos do heterociclo estão menos blindados, tornando-os mais suscetíveis a reatividade. Sendo o furano um anel mais reativo devido ao maior desblindamento dos seus átomos de carbono, isso explicaria a maior atividade do composto **(47)** e a ausência de atividade do composto **(89)**.

Ensaio complementares de atividade foram realizados, como o de atividade em cepas resistentes contra RMP e INH, ensaios de citotoxicidade (atividade em células de mamíferos) e de espectro de atividade em outras cepas de microrganismos. O protocolo do ITR-UIC utiliza esses ensaios para excluir compostos ativos em *M.tb.* que tenham baixa seletividade e compostos inativos contra cepas resistentes. Os compostos planejados neste trabalho se mostraram ativos contra cepas sensíveis tanto em MABA quanto LORA, e também se mostraram ativos contra cepas resistentes a RMP ou INH e elevada seletividade perante os ensaios de citotoxicidade e espectro de atividade. O amplo espectro de atividade dos compostos em cepas do complexo *Mycobacterium*, mais especificamente nas espécies *M. avium*, *M. kansasii* e *M. bovis*, se mostrou vantajoso tendo em vista que essas micobacterioses são também infecções pulmonares (LIMA, 2014).

A partir dos resultados obtidos na avaliação biológica, uma nova análise de SAR pôde ser realizada, comparando os quatro *hits* mais promissores (74), (85), (87) e (93) identificados neste trabalho, com os dois *hits* iniciais utilizados no planejamento (46 a 48), três compostos inativos do conjunto de dados (107 a 109), e aos fármacos de primeira escolha (2, 3, 9 e 10) e fármacos usados no tratamento de pacientes com cepas resistentes (21 e 22). Como os resultados foram similares entre os compostos (74) e (93), e entre (85) e (87), somente os esquemas de (74) e (87) serão demonstrados nesta discussão. Os outros dois (93) e (85) estão demonstrados nos anexos 132 e 133.

Com essa análise, foi possível comparar os compostos identificados neste trabalho com outros já descritos ou utilizados na terapêutica, através de similaridade estrutural utilizando o coeficiente de Tanimoto. Pode-se observar na Figura 37 que o *hit* (74) (verde) não possui elevada similaridade estrutural (Tanimoto <0,7) com nenhum dos compostos inativos do conjunto de dados, nem mesmo aos fármacos de primeira escolha e usados contra cepas resistentes (vermelho).

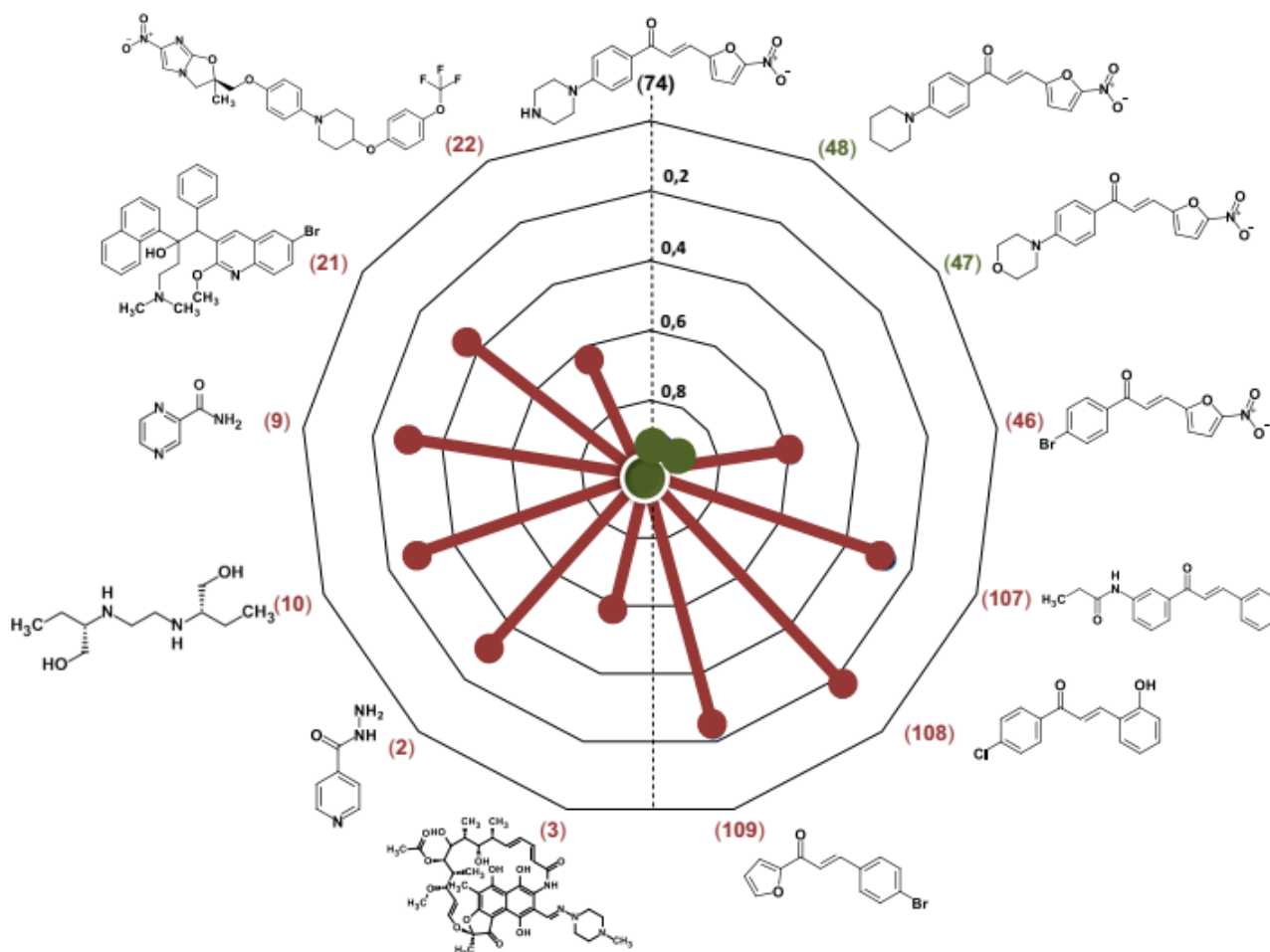


Figura 37 – Mapa radial de similaridade do *hit* (74) comparado com compostos ativos e inativos do conjunto de dados, e ainda com fármacos de primeira escolha e fármacos utilizados em cepas resistentes.

Ao observar a Figura 38, o *hit* (87) também apresenta essa dissimilaridade, e mais ainda para os compostos mais ativos do conjunto de dados. Isso demonstra que, apesar de serem bioisósteros, os anéis furano e tiofeno são dissimilares, corroborando com a literatura que reporta que o anel tiofeno é mais similar ao anel benzeno eletronicamente, bem como o *t*-butila é dissimilar a piperidina, bromo e morfolina (CLAYDEN et al., 2001). A baixa similaridade dos *hits* identificados neste trabalho com outros já reportados e com fármacos que estão em uso clínico é importante pois representa que estes compostos podem ser novos *scaffolds* para o tratamento de cepas sensíveis e resistentes de TB.

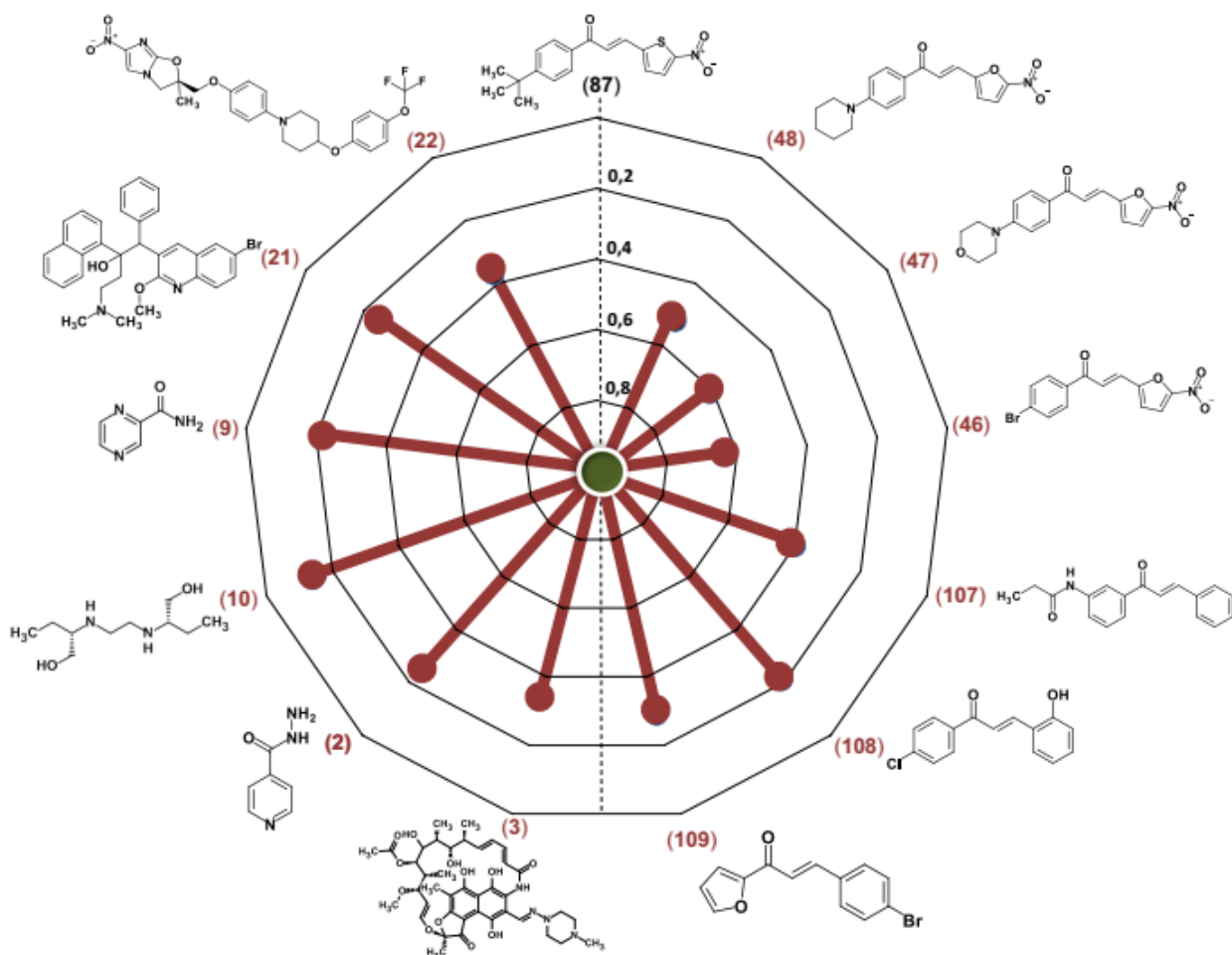


Figura 38 - Mapa radial de similaridade do *hit* (87) comparado com compostos ativos e inativos do conjunto de dados, e ainda com fármacos de primeira escolha e fármacos utilizados em cepas resistentes.

Buscando atender ao máximo os critérios propostos pelo GHIT para descoberta de fármacos para TB (KATSUNO et al., 2015), os compostos foram submetidos ao servidor pred-hERG desenvolvido no LabMol (<http://labmol.farmacia.ufg.br/predherg>) que faz a predição da propriedade de bloqueio do canal hERG, um importante anti-alvo a ser considerado no processo de planejamento de fármacos (BRAGA et al., 2015). A tabela com os resultados dessa predição está apresentada nos anexos (Anexo 134). Essa avaliação demonstrou que nenhum dos compostos planejados foram preditos como bloqueadores da hERG, sugerindo que estes compostos tenham baixa cardiotoxicidade.

Uma das principais barreiras no desenvolvimento de fármacos são propriedades farmacocinéticas (ADME) inadequadas. O metabolismo tem papel crucial para a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos para a TB. Isto porque a co-infecção com o HIV é um dos principais motivos que causa o aumento da incidência e da mortalidade da TB em todo o mundo, devido a imunossupressão provocada pelo HIV. Como o tratamento para as duas doenças é feito a partir de complexos esquemas terapêuticos, a interação medicamentosa a nível de metabolismo torna-se inevitável. O caso mais clássico de

interação é o da RMP que é indutor enzimático do citocromo 3A4 (CYP3A4) com antirretrovirais inibidores de proteases, e.g. indinavir, saquinavir e ritonavir que inibem a CYP3A4. Se esses fármacos forem co-administrados, podem aumentar o risco de hepatotoxicidade, tendo em vista que ambos tratamentos são de longa duração (RATHBUN; LIEDTKE, 2011). Para verificar essa condição de potencial inibição das enzimas do complexo citocromo P450, os compostos planejados foram submetidos a modelos de QSAR de predição de CYP, desenvolvidos e validados no LabMol. A tabela com os resultados dessa análise está reportada anexos (Anexo 135). Como pode ser observado, a maioria dos compostos não foi classificada como inibidor de CYP450. Contudo, o *hit* (85) foi predito como inibidor de CYP3A4 e o mesmo se repetiu para seus bioisómeros (67 e 95). Isso pode ser explicado pela presença do anel imidazólico na posição 4' do anel A, visto que outros fármacos imidazólicos antifúngicos também inibem a enzima CYP3A4. Sendo o (85) um dos *hits* mais promissores em atividade, assim como na predição do bloqueio da hERG, sugere-se a validação experimental das propriedades ADMET, pois em caso de confirma-lo como inibidor, pode-se planejar a otimização buscando reduzir a inibição da CYP.

Outras propriedades ADMET que devem ser levadas em consideração é a absorção e a distribuição, principalmente para os compostos (67), (74) e (85). Isso porque estes compostos podem sofrer protonação devido ao pH do meio fisiológico. Diante dos resultados de Log D calculados no *software MarvinSketch* v.16.5.2, ChemAxon, Budapest, Hungary (<http://www.chemaxon.com>) que faz predição *in silico* de LogD em pH 7,4, os compostos se apresentaram na forma não-ionizada, possuindo boa absorção e podem ser amplamente distribuídos no plasma.

Apesar dos compostos mostrarem-se seguros perante ao ensaio de citotoxicidade em células de mamífero, com SI>10 para todos os compostos mais potentes, questionamentos a respeito da toxicidade destes compostos foram levantados exaustivamente. A justificativa está no fato de que esses compostos apresentam dois grupos reportados na literatura como alertas de toxicidade (Figura 39), o grupo nitro e o grupo aceptor (adutor) de Michael.

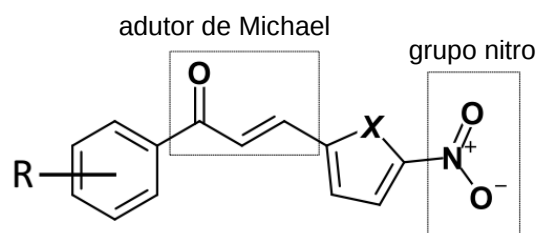


Figura 39 – Representação da estrutura geral de nitroeteroaril chalconas, destacando os grupos adutor de Michael e nitro, considerados como alertas de toxicidade.

Zenger et. al. (2015) publicaram trabalho de relação estrutura-toxicidade de chalconas, em que dezenove chalconas hidroxiladas e metoxiladas foram testadas em ensaios de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium]), HCS (do inglês *High Content Screening*), citocromo C, análise de DNA e ciclo celular. Os resultados demonstraram que o grupo aceptor de Michael tem importante papel na proliferação celular, na redução da massa mitocondrial e no citocromo C, resultando em elevada toxicidade (ZENGER et al., 2015). Estes ensaios podem ser aplicados a série planejada em nosso trabalho, na tentativa de avaliar nível de dano celular, já que a metodologia usada para determinação da citotoxicidade em células de mamíferos foi qualitativa, avaliando apenas o IC₅₀. Entretanto, como já discutido, as células Vero apresentam morfologia semelhante à de parênquima hepático, demonstrando que na concentração testada estes compostos apresentaram segurança.

O grupo nitro é outro alerta de toxicidade também descrito na literatura, devido a liberação de espécies reativas de oxigênio que interagem com o DNA, levando a subsequente inibição de ácidos nucleicos, proteínas e efeito mutagênico (PATTERSON; WYLLIE, 2014). Entretanto, são vários os exemplos de classes de fármacos utilizados na clínica que apresentam o grupo nitro, e.g. antianginosos, anti-hipertensivos, anticoagulantes, analgésicos narcóticos, anti-inflamatórios, antineoplásicos, antiparasitários e antibacterianos.

O sucesso do tratamento antibacteriano com compostos com grupo nitro pode ser evidenciado no esquema terapêutico e.g. metronidazol (7 dias, 400 mg, 2x ao dia) (**100**), secnidazol (dose única 2000 mg) (**110**), tinidazol (2 g, por 3 dias) (**111**), cloranfenicol (**112**), nitrofurantoína (**113**) (7 dias, 100 mg, 2x ao dia) e oxamniquina (**114**) (dose única, 1000 mg), pois o curto tempo de tratamento e a concentração usada evita a toxicidade, a menos que o paciente apresente hipersensibilidade a estes fármacos (Figura 40).

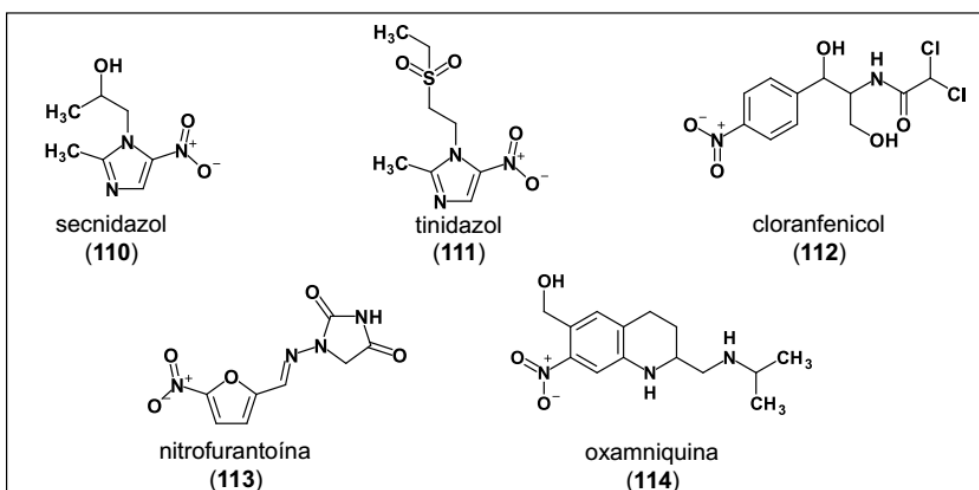


Figura 40 - Representação de estruturas químicas de nitrocompostos antimicrobianos usados na terapêutica.

A identificação preliminar de compostos interferentes em ensaios, PAINS (do inglês, *Pan Assays Interference Compounds*), é essencial para garantir que os compostos estão apresentando atividade realmente na célula ou no alvo em estudo, e não devido a uma atividade inespecífica ou promíscua (BAELL; HOLLOWAY, 2010; BAELL; WALTERS, 2014). Modelos *in silico* para identificação de PAINS, desenvolvidos no LabMol, também foram usados para identificar se os compostos planejados poderiam ser PAINS. A tabela com estes resultados encontra-se nos anexos (Anexo 134). Observou-se que nenhum dos compostos foi identificado como PAINS. O grande painel de perfil de atividade observado das chalconas, dentre elas atividade anti-TB, pode em parte ser justificado pela conformação 1,3-sinplanar entre a carbonila e o alceno, o que facilita a reatividade pela estabilização dos estados de transição do nucleófilo. Dessa forma e conforme previsto pelo modelo de filtro de PAINS, a atividade observada das chalconas neste trabalho não é devido a uma atividade interferente, ou inespecífica. Além disso, recentes discussões têm sido levantadas a respeito do uso de alertas estruturais, pois estes são construídos com base na identificação de fragmentos e não com a molécula como um todo. Assim, estes filtros podem ser muito restritivos e podem excluir estruturas de compostos promissores (CAPUZZI; MURATOV; TROPSHA, 2017).

Como já reportado na literatura, as chalconas possuem atividade anti-TB (GARCÍA et al., 2012; RAKESH et al., 2014; TAWARI et al., 2010), bem como compostos derivados de nitrofuranos (ABDEL-AZIZ et al., 2015) e nitrotiofenos (HARTKOORN et al., 2014). A hibridação destes dois *scaffolds* (chalconas + nitrofuranos ou nitrotiofenos) se mostrou vantajosa para obtenção de compostos com atividade anti-TB, quando comparamos com os trabalhos que reportam chalconas de estrutura clássica, ou somente nitrofuranos ou nitrotiofenos ligados a outros grupos estruturais, com atividade anti-TB. Quando

observamos a mesma combinação reportada no trabalho de Tawari e colaboradores (TAWARI et al., 2010), a série de nitroeteroaril chalconas mostrou-se potente na inibição do crescimento do *M. tb.* H37Rv no ensaio de MABA e seletiva no ensaio em células Vero, com quatro compostos mais ativos que a INH (**2**). Contudo, o êxito deste projeto em encontrar *hits* ativos contra *M. tb.* em relação ao trabalho de Tawari e colaboradores está na ampliação do espaço químico, o que permitiu explorar uma maior variação estrutural devido a estratégia de planejamento usada, direcionando a síntese de compostos preditos pelo modelo QSAR como ativos, resultando em maior eficiência no planejamento.

Diante da proposta da *TBalliance* para redução do tempo de tratamento da TB de seis meses para sete dias em pacientes com DS-TB e da recente aprovação de fármacos nitroeterociclos, como a delamanida (**22**), para uso clínico contra a TB, além de todos os pontos discutidos anteriormente, é possível sugerir que as chalconas planejadas e descobertas neste trabalho sejam potenciais candidatos a protótipos de fármacos anti-TB.

Este trabalho reporta o planejamento, a síntese e a avaliação biológica de novas aril e heteroaril chalconas com atividade antituberculose, utilizando uma integração de métodos computacionais e experimentais. Foram identificados vinte e dois compostos promissores para a pesquisa e o desenvolvimento de novos fármacos anti-TB, seguindo os critérios utilizados para a identificação de *hits* da *Global Health Innovation Technology* (GHIT), para descoberta de fármacos para doenças infecciosas.

Na abordagem computacional, regras de SAR foram derivadas de chalconas com atividade antituberculose descritas na literatura, identificando quais fragmentos eram favoráveis e desfavoráveis para atividade anti-TB. Além disso, modelos de QSAR foram obtidos e validados, utilizando um conjunto de dados de chalconas anti-TB. Os modelos obtidos foram robustos e preditivos para avaliação de compostos que não estavam no conjunto de modelagem. Essas informações contribuíram para o planejamento de novas aril e heteroaril chalconas, utilizando modificações bioisostéricas, que tiveram sua atividade anti-TB predita pelo modelo QSAR de consenso. Assim, foi possível direcionar e/ou priorizar a síntese dos compostos mais promissores.

Trinta compostos foram selecionados para a síntese, foram sintetizados com rendimentos razoáveis e tiveram suas estruturas e pureza confirmadas. Estes compostos foram testados em ensaios para avaliação da atividade anti-TB, citotoxicidade e espectro de atividade.

Com a consecução deste trabalho, foram identificadas 20 chalconas que exibiram potente atividade inibitória e seletividade contra *M.tb.* H37Rv, sendo, portanto, promissoras para o desenvolvimento de candidatos a fármacos anti-TB.

- ABDEL-AZIZ, H. A.-K. et al. Synthesis, in Vitro and in Silico Studies of Some Novel 5-Nitrofuranyl Hydrazones as Antimicrobial and Antitubercular Agents. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 38, n. 10, p. 1617–30, 2015.
- AHMAD, I. et al. Syntheses of lipophilic chalcones and their conformationally restricted analogues as antitubercular agents. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 23, n. 5, p. 1322–5, 1 mar. 2013.
- ANANTHAN, S. et al. High-throughput screening for inhibitors of Mycobacterium tuberculosis H37Rv. **Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)**, v. 89, n. 5, p. 334–53, out. 2009.
- ANDRADE, C. H. **Planejamento racional de novos tuberculostáticos com base na estrutura das enzimas enol redutase e timidina fosfato quinase do Mycobacterium tuberculosis**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2009.
- ANDRICOPULO, A. D.; SALUM, L. L. B.; ABRAHAM, D. J. Structure-based drug design strategies in medicinal chemistry. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 9, n. 9, p. 771–790, jan. 2009.
- AOKI, N. et al. C-geranylated chalcones from the stems of Angelica keiskei with superoxide-scavenging activity. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 7, p. 1308–1310, 2008.
- APAROY, P.; REDDY, K. K.; REDDANNA, P. Structure and ligand based drug design strategies in the development of novel 5-LOX inhibitors. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 22, p. 3763–3778, 2012.
- AVILA-VILLARREAL, G. et al. Antihypertensive and vasorelaxant effects of dihydrospinochalcone-A isolated from Lonchocarpus xuul Lundell by NO production: Computational and ex vivo approaches. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, 20 jul. 2013.
- BAELL, J. B.; HOLLOWAY, G. A. New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. **Journal of medicinal chemistry**, v. 53, n. 7, p. 2719–40, 8 abr. 2010.
- BAELL, J.; WALTERS, M. A. Chemistry: Chemical con artists foil drug discovery. **Nature**,

v. 513, n. 7519, p. 481–483, set. 2014.

BAJUSZ, D.; RÁCZ, A.; HÉBERGER, K. Why is Tanimoto index an appropriate choice for fingerprint-based similarity calculations? **Journal of Cheminformatics**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2015.

BARKER, R. D. **Clinical tuberculosis**. 4^a ed. New York: CRC Press, 2012. v. 40

BASKIN, I.; VARNEK, A. Building a chemical space based on fragment descriptors.

Combinatorial chemistry & high throughput screening, v. 11, n. 8, p. 661–668, 2008.

BOHM, A. **Introduction to Flavonoids**. 1. ed. London: Harwood Academic Pub, 1998.

BRAGA, R. C. et al. Tuning hERG Out: Antitarget QSAR Models for Drug Development.

Current Topics in Medicinal Chemistry, v. 14, p. 1399–1415, 2014a.

BRAGA, R. C. et al. Virtual screening strategies in medicinal chemistry: the state of the art and current challenges. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 14, n. 16, p. 1899–1912, jan. 2014b.

BRAGA, R. C. et al. Pred-hERG: A Novel web-Accessible Computational Tool for Predicting Cardiac Toxicity. **Molecular Informatics**, v. 34, n. 10, p. 698–701, out. 2015.

BRAGA, R. C.; ANDRADE, C. H. Assessing the performance of 3D pharmacophore models in virtual screening: how good are they? **Current topics in medicinal chemistry**, v. 13, n. 9, p. 1127–38, jan. 2013.

BREIMAN, L. Random Forest. **Machine Learning**, p. 1–33, 2001.

BROWN, N. Methods and Principles in Bioisosterism in Medicinal Chemistry. **Medicinal Chemistry : Bioisosteres in Medicinal Chemistry**, v. I, p. 3–14, 2012.

BUKHARI, S. N. A. et al. Current prospects of synthetic curcumin analogs and chalcone derivatives against mycobacterium tuberculosis. **Medicinal chemistry (Shāriqah (United Arab Emirates))**, v. 9, n. 7, p. 897–903, nov. 2013.

CALMETTE, A.; PLOTZ, H. Protective inoculation against tuberculosis with BCG. **Am. Rev. Tuberc.**, v. 18, p. 567–572, 1929.

CAPUZZI, S. J.; MURATOV, E. N.; TROPSHA, A. Phantom PAINS: Problems with the Utility of Alerts for Pan-Assay Interference CompoundS. n. February, 2017.

CARHART, R. E.; SMITH, D. H.; VENKATARAGHAVAN, R. Atom pairs as molecular features in structure-activity studies: definition and applications. **Journal of**

- Chemical Information and Modeling**, v. 25, n. 2, p. 64–73, 1 maio 1985.
- CHEESERIGHT, T. The identification of bioisosteres as drug development candidates. **Innovations in Pharmaceutical Technology**, n. 28, p. 22–26, 2009.
- CHEN, M. et al. Inhibition of Fumarate Reductase in *Leishmania major* and *L. donovani* by Chalcones. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 7, p. 2023–2029, 2001.
- CHEN, Y. H. et al. Evaluation of the anti-inflammatory effect of chalcone and chalcone analogues in a Zebrafish model. **Molecules**, v. 18, p. 2052–2060, 2013.
- CHERKASOV, A. et al. QSAR modeling: Where have you been? Where are you going to? **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 12, p. 4977–5010, 2014.
- CHIARADIA, L. D. et al. Synthetic chalcones as efficient inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase PtpA. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 18, n. 23, p. 6227–30, 1 dez. 2008.
- CHIARADIA, L. D. et al. Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of chalcone derivatives as potent inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatases (PtpA and PtpB). **Journal of medicinal chemistry**, v. 55, n. 1, p. 390–402, 12 jan. 2012.
- CHO, S. et al. Isoliquiritigenin, a chalcone compound, is a positive allosteric modulator of GABA A receptors and shows hypnotic effects. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 413, n. 4, p. 637–642, 2011.
- CHO, S. H. et al. Low-Oxygen-Recovery Assay for High-Throughput Screening of Compounds against Nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 1380–1385, 1 abr. 2007.
- CHO, S. H.; LEE, H. S.; FRANZBLAU, S. Microplate Alamar Blue Assay (MABA) and Low Oxygen Recovery Assay (LORA) for *Mycobacterium tuberculosis*. In: PARISH, T.; ROBERTS, D. M. (Eds.). . **Mycobacteria Protocols**. 3° ed. New York: [s.n.]. p. 281–291.
- CISAK, A.; RZESZOWSKA-MODZELEWSKA; BRZEZINSKA, E. **Reactivity of 5-nitro-2-furaldehyde in alkaline and acidic solutions**, 2001.
- CLAYDEN, J. et al. **Organic Chemistry**. 1° ed. Oxford: Oxford University Press, 2001.
- COHEN, J. A coefficient of agreement for nominal scales. **Educ. Psychol. Meas**, v. 20, n. 3, p. 37–46, 1960.

- COLE, S. T.; RICCARDI, G. New tuberculosis drugs on the horizon. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 570–576, 2011.
- COLLINS, L. A.; FRANZBLAU, SCOTT G. Microplate Almar Blue Assay versus BACTEC 460 System for High-throughput Screening of Compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 5, p. 1004–1009, 1997.
- CUMMING, J. G. et al. Chemical predictive modelling to improve compound quality. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 12, p. 948–962, nov. 2013.
- DEARDEN, J. C.; CRONIN, M. T. D.; KAISER, K. L. E. How not to develop a quantitative structure–activity or structure–property relationship (QSAR/QSPR). **SAR and QSAR in Environmental Research**, v. 20, n. 3–4, p. 241–266, 2009.
- DIMASI, J. A et al. Trends in risks associated with new drug development: success rates for investigational drugs. **Clinical pharmacology and therapeutics**, v. 87, n. 3, p. 272–277, 2010.
- 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.
- DOBCHEV, D.; PILLAI, G.; KARELSON, M. In silico machine learning methods in drug development. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 16, p. 1913–1922, 15 out. 2014.
- DOSSETTER, A. G.; GRIFFEN, E. J.; LEACH, A. G. Matched molecular pair analysis in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 18, n. 15–16, p. 724–731, 2013.
- DUCKI, S. et al. Potent antimitotic and cell growth inhibitory properties of substituted chalcones. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 8, p. 1051–1056, 1998.
- DUTRA, L. A. et al. Antitubercular drug discovery : the molecular modification as promise tool. v. 2, n. January, p. 1–9, 2012.
- DYE, C. Global epidemiology of tuberculosis. **Lancet**, v. 34, n. 1, p. 938–40, 2006.
- EKINS, S. et al. Enhancing hit identification in *Mycobacterium tuberculosis* drug discovery using validated dual-event Bayesian models. **PloS one**, v. 8, n. 5, p. e63240, jan. 2013.
- EKINS, S. et al. Machine Learning Model Analysis and Data Visualization with Small Molecules Tested in a Mouse Model of *Mycobacterium tuberculosis* Infection (2014-

- 2015). **Journal of Chemical Information and Modeling**, p. acs.jcim.6b00004, 2016.
- ELEBRING, T.; GILL, A.; PLOWRIGHT, A. T. **What is the most important approach in current drug discovery: Doing the right things or doing things right?** **Drug Discovery Today** Elsevier Ltd, , 2012.
- ERNST, J. D. The immunological life cycle of tuberculosis. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 8, p. 581–591, 2012.
- FERRER, J. L. et al. Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. **Nature structural biology**, v. 6, n. 8, p. 775–84, ago. 1999.
- FOURCHES, D.; MURATOV, E. N.; TROPSHA, A. Trust, But Verify II: A Practical Guide to Chemogenomics Data Curation. **Journal of Chemical Information and Modeling**, p. DOI:10.1021/acs.jcim.6b00129, jun. 2016.
- FOURCHES, D.; MURATOV, E.; TROPSHA, A. Trust but verify: on the importance of chemical structure curation in chemoinformatics and QSAR modeling research. **J. Chem. Inf. Model.**, v. 50, n. 7, p. 1189–1204, 2010.
- FRANZBLAU, S. G. et al. Rapid, low-technology MIC determination with clinical Mycobacterium tuberculosis isolates by using the microplate Alamar Blue assay. **Journal of clinical microbiology**, v. 36, n. 2, p. 362–6, fev. 1998.
- GALVÃO, R. K. H. et al. A method for calibration and validation subset partitioning. **Talanta**, v. 67, n. 4, p. 736–740, 2005.
- GANGULY, A. K. et al. Synthesis and properties of 3-acyl- γ -pyrones, a novel class of flavones and chromones. **Tetrahedron Letters**, v. 46, n. 23, p. 4119–4121, 2005.
- GARCÍA, A. et al. Recent advances in antitubercular natural products. **European journal of medicinal chemistry**, v. 49, p. 1–23, mar. 2012.
- GEDECK, P.; ROHDE, B.; BARTELS, C. Article QSAR – How Good Is It in Practice ? Comparison of Descriptor Sets on an Unbiased Cross Section of Corporate Data Sets QSAR - How Good Is It in Practice ? Comparison of Descriptor Sets on an Unbiased Cross Section of Corporate Data Sets. p. 1924–1936, 2006.
- GREEN, K. D.; GARNEAU-TSODIKOVA, S. Resistance in tuberculosis: what do we know and where can we go? **Frontiers in microbiology**, v. 4, n. July, p. 208, jan. 2013.
- GRIFFEN, E. et al. Matched molecular pairs as a medicinal chemistry tool. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 22, p. 7739–7750, 2011.
- GUERRA, L. V.; OCHOA, M. C.; TAMAYO, M. Z. Descriptive study of the frequency of

- nontuberculosis mycobacteria in the Baixada Santista region of the state of São Paulo, Brazil. **Journal Bras. Pneumol.**, v. 27, n. 1, p. 36–48, 2011.
- HANS, R. H. et al. Synthesis, antimalarial and antitubercular activity of acetylenic chalcones. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 20, n. 3, p. 942–4, 1 fev. 2010.
- HARDS, K. et al. Bactericidal mode of action of bedaquiline. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. March, p. 2028–2037, 2015.
- HARTKOORN, R. C. et al. Mechanism of action of 5-nitrothiophenes against mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 5, p. 2944–2947, 2014.
- HORNER, K. E.; KARADAKOV, P. B. Chemical bonding and aromaticity in furan, pyrrole, and thiophene: A magnetic shielding study. **Journal of Organic Chemistry**, v. 78, n. 16, p. 8037–8043, 2013.
- HU, X. et al. MMP-Cliffs: Systematic Identification of Activity Cliffs on the Basis of Matched Molecular Pairs. p. 1–8, 2012.
- IMSHEALTH. **Top 20 Global Therapy Areas 2015**. Disponível em: <[https://www.imshealth.com/files/web/Corporate/News/Top-Line Market Data/Top_20_Global_Therapy_Areas_2015.pdf](https://www.imshealth.com/files/web/Corporate/News/Top-Line%20Market%20Data/Top_20_Global_Therapy_Areas_2015.pdf)>. Acesso em: 27 jan. 2017.
- IOANNIDIS, J. P. A. Mega-trials for blockbusters. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 309, n. 3, p. 239–40, 2013.
- ISOMOTO, H. et al. Sofalcone, a mucoprotective agent, increases the cure rate of Helicobacter pylori infection when combined with rabeprazole, amoxicillin and clarithromycin. **World journal of gastroenterology : WJG**, v. 11, n. 11, p. 1629–1633, 2005.
- IZUMIZONO, Y. et al. Identification of novel potential antibiotics for tuberculosis by in silico structure-based drug screening. **European journal of medicinal chemistry**, v. 46, n. 5, p. 1849–56, maio 2011.
- JAMAL, H.; ANSARI, W. H.; RIZVI, S. J. Evaluation of chalcones - A flavonoid subclass, for, their anxiolytic effects in rats using elevated plus maze and open field behaviour tests. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 22, n. 6, p. 673–681, 2008.
- JASSAL, M.; BISHAI, W. R. Extensively drug-resistant tuberculosis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 19–30, 2009.

- JEZ, J. M.; NOEL, J. P. Mechanism of chalcone synthase: pK a of the catalytic cysteine and the role of the conserved histidine in a plant polyketide synthase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 50, p. 39640–39646, 2000.
- JOSHI, S. D. et al. Synthesis, characterization, biological activity, and 3D-QSAR studies on some novel class of pyrrole derivatives as antitubercular agents. **Medicinal Chemistry Research**, v. 23, n. 3, p. 1123–1147, 2014.
- JOULE, J. A. Thiophenes. In: JOULE, J. A. (Ed.). . **Thiophenes**. Manchester: Springer, 2014. p. 1–5.
- KAKATI, D.; SARMA, J. C. Microwave assisted solvent free synthesis of 1,3-diphenylpropenones. **Chemistry Central journal**, v. 5, n. 1, p. 8, 2011.
- KAKKAR, A. K.; DAHIYA, N. Bedaquiline for the treatment of resistant tuberculosis: Promises and pitfalls. **Tuberculosis**, v. 94, n. 4, p. 357–362, 2014.
- KATSUNO, K. et al. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. **Nature Reviews Drug Discovery**, n. October, p. 1–8, 2015.
- KAYSER, F. H. et al. **Basic Principles General Aspects of Medical Microbiology II Bacteriology General Bacteriology Bacteria as Human Pathogens III Mycology General Mycology Fungi as Human Pathogens IV Virology General Virology Viruses as Human Pathogens V Parasitology Protozo**. 1° ed. New York: 2005, 2005.
- KHANNA, I. Drug discovery in pharmaceutical industry: Productivity challenges and trends. **Drug Discovery Today**, v. 17, n. 19–20, p. 1088–1102, 2012.
- KHUNT, R. C. et al. Synthesis, antitubercular evaluation and 3D-QSAR study of N-phenyl-3-(4-fluorophenyl)-4-substituted pyrazole derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, p. 666–678, 2012.
- KHUNT, R. C.; KHEDKAR, V. M.; COUTINHO, E. C. Synthesis and 3D-QSAR analysis of 2-chloroquinoline derivatives as H 37 RV MTB inhibitors. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 82, n. 6, p. 669–684, 2013.
- KONIECZNY, M. T. et al. Acid-catalyzed synthesis of oxathiolone fused chalcones. Comparison of their activity toward various microorganisms and human cancer cells line. **European journal of medicinal chemistry**, v. 42, n. 5, p. 729–33, maio 2007.
- KRAMER, C. et al. Matched molecular pair analysis: Significance and the impact of experimental uncertainty. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, p. 3786–3802,

2014.

- KUMAR, A. et al. Synthesis of chalcones and flavanones using Julia-Kocienski olefination. **Tetrahedron**, v. 66, n. 48, p. 9445–9449, 2010.
- KUMAR, D. et al. Antimycobacterial activity evaluation, time-kill kinetic and 3D-QSAR study of C-(3-aminomethyl-cyclohexyl)-methylamine derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, p. 1365–1369, 2013.
- LEE, R. E. et al. Spectinamides: a new class of semisynthetic antituberculosis agents that overcome native drug efflux. **Nature medicine**, v. 20, n. 2, p. 152–8, 2014.
- LEWIS, K. et al. **Bacterial Resistance to Antimicrobials**. 1^a ed. New York: Dekker, 2002.
- LIMA, A. S. **Fatores e espécies de micobactérias não tuberculosas associadas aos casos de micobacterioses pulmonar e extrapulmonar no estado de Pernambuco**. [s.l.] Fundação Oswaldo Cruz, 2014.
- LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. Bioisosterism : A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design. **Current Medicinal Chemistry**, n. 12, p. 23–49, 2005.
- LIN, Y.-M. et al. Chalcones and flavonoids as anti-tuberculosis agents. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 10, n. 8, p. 2795–802, ago. 2002.
- LIU, Y.-T. et al. Syntheses and biological activity of chalcones-imidazole derivatives. **Research on Chemical Intermediates**, v. 39, n. 3, p. 1037–1048, 21 jun. 2012.
- LOMBARDINO, J. G.; LOWE, J. A. The role of the medicinal chemist in drug discovery--then and now. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 3, n. 10, p. 853–62, out. 2004.
- LÓPEZ, S. N. et al. In vitro antifungal evaluation and structure-activity relationships of a new series of chalcone derivatives and synthetic analogues, with inhibitory properties against polymers of the fungal cell wall. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 9, n. 8, p. 1999–2013, ago. 2001.
- MA, Z. et al. Global tuberculosis drug development pipeline: the need and the reality. **The Lancet**, v. 375, n. 9731, p. 2100–2109, 2010.
- MACARRON, R. et al. Impact of high-throughput screening in biomedical research. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 3, p. 188–195, mar. 2011.
- MADKOUR, M. M. **TUBERCULOSIS**. 1^a ed ed. Germany: Springer, 2004.
- MAHAPATRA, D. K.; ASATI, V.; BHARTI, S. K. Chalcones and their therapeutic targets for the management of diabetes: Structural and pharmacological perspectives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 92, p. 839–865, 2015.

- MARRAPU, V. K. et al. Novel aryloxy azolyl chalcones with potent activity against Mycobacterium tuberculosis H37Rv. **European journal of medicinal chemistry**, v. 46, n. 9, p. 4302–10, set. 2011.
- MARTINS, F. et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel isoniazid derivatives with potent antitubercular activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 81, p. 119–138, 2014.
- MASCARELLO, A. et al. Inhibition of Mycobacterium tuberculosis tyrosine phosphatase PtpA by synthetic chalcones: kinetics, molecular modeling, toxicity and effect on growth. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 18, n. 11, p. 3783–9, 1 jun. 2010.
- MATHEW, B. et al. Heteroaryl chalcones: Mini review about their therapeutic voyage. **Biomedicine and Preventive Nutrition**, v. 4, n. 3, p. 451–458, 2014.
- MAZANETZ, M. P. et al. Drug discovery applications for KNIME: an open source data mining platform. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 12, n. 18, p. 1965–79, jan. 2012.
- MCKAY, K. A.; CORNER, A. H.; BYRNE, J. L. Microbial persistence and latent infection. **Canadian journal of comparative medicine and veterinary science**, v. 31, n. 1, p. 256–259, 1967.
- MEANWELL, N. A. Synopsis of some recent tactical application of bioisosteres in drug design. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 8, p. 2529–2591, 2011.
- MOHAN KRISHNA, K. et al. Design, synthesis and 3D-QSAR studies of new diphenylamine containing 1,2,4-triazoles as potential antitubercular agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 84, p. 516–529, 2014.
- MORGAN, H. L. The Generation of a Unique Machine Description for Chemical Structures-A Technique Developed at Chemical Abstracts Services. **J. Chem. Doc.**, v. 5, p. 107–113, 1965.
- MULLARD, A. New drugs cost US\$2.6 billion to develop. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 13, n. 12, p. 877, 2014.
- NASIR ABBAS BUKHARI, S. et al. Review of Methods and Various Catalysts Used for Chalcone Synthesis. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 10, n. 1, p. 73–83, 1 mar. 2013.
- NATEKIN, A.; KNOLL, A. Gradient boosting machines, a tutorial. **Frontiers in Neurorobotics**, v. 7, n. December, 2013.

- NATURE. News in brief. **Expert review of hematology**, v. 2, n. 2, p. 117–120, 2009.
- NEUMEYER, K.; KIRKPATRICK, P. Tadalafil and vardenafil. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 3, n. 4, p. 295–296, 2004.
- NEWTBDRUGS. **Working Group on New TB Drugs**. Disponível em: <www.newtbdrugs.org>. Acesso em: 22 set. 2015.
- NI, L.; MENG, C. Q.; SIKORSKI, J. A. Recent advances in therapeutic chalcones. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 14, p. 1669–1691, 2004.
- NOGRADY, T.; WEAVER, D. F. **Medicinal Chemistry: A molecular and biochemical approach**. 3^o ed. New York: Oxford University Press, 2005.
- NOWAKOWSKA, Z. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. **European journal of medicinal chemistry**, v. 42, n. 2, p. 125–37, fev. 2007.
- NUNES-ALVES, C. et al. In search of a new paradigm for protective immunity to TB. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 289–299, 2014.
- O'BOYLE, N. M.; MORLEY, C.; HUTCHISON, G. R. Pybel: a Python wrapper for the OpenBabel cheminformatics toolkit. **Chemistry Central journal**, v. 2, p. 5, 2008.
- OECD. **OECD principles for validation, for regulatory purposes, of (Quantitative) Structure-Activity Relationship models**. Disponível em: <<http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/37849783.pdf>>. Acesso em: 16 nov. 2015.
- ORME, I. Cellular and genetic mechanisms underlying susceptibility of animal models to tuberculosis infection. **Novartis Foundation symposium**, v. 217, p. 112-7-9, 1998.
- ORME, I. M. A new unifying theory of the pathogenesis of tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 94, n. 1, p. 8–14, 2014.
- OUATTARA, M. et al. Synthesis and anthelmintic activity of some hybrid Benzimidazolyl-chalcone derivatives. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 10, n. May, p. 767–775, 2011.
- PALOMINO, J. C.; LEÃO, S. C.; RITACCO, V. Tuberculosis 2007. **Chemistry & ...**, p. 687, 2007.
- PANCHOLIA, S. et al. Benzo[d]thiazol-2-yl(piperazin-1-yl)methanones as new anti-mycobacterial chemotypes: Design, synthesis, biological evaluation and 3D-QSAR studies. 2016.
- PATANI, G. A.; LAVOIE, E. J. Bioisosterism: A Rational Approach in Drug Design.

Chemical reviews, v. 96, n. 8, p. 3147–3176, 19 dez. 1996.

PATTERSON, S.; WYLLIE, S. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: Past, present, and future prospects. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 6, p. 289–298, 2014.

PETHE, K. et al. Discovery of Q203, a potent clinical candidate for the treatment of tuberculosis. **Nature medicine**, v. 19, n. 9, p. 1157–60, 2013.

PRIEST, B. T.; BELL, I. M.; GARCIA, M. L. Role of hERG potassium channel assays in drug development. **Channels**, v. 2, n. March 2015, p. 87–93, 2008.

PUZYN, T.; LESZCZYŃSKI, J.; CRONIN, M. **Recent Advances in QSAR Studies: Methods and Applications**. [s.l: s.n.].

RAKESH et al. Pentacyclic Nitrofurans with In Vivo Efficacy and Activity against Nonreplicating Mycobacterium tuberculosis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e87909, 2014.

RATHBUN, R. C.; LIEDTKE, M. D. Antiretroviral drug interactions: Overview of interactions involving new and investigational agents and the role of therapeutic drug monitoring for management. **Pharmaceutics**, v. 3, n. 4, p. 745–781, 2011.

RATLEDEGE, C.; DALE, J. **Mycobacteria: Molecular Biology and Virulence**. 1° ed. Oxford: Blackwell Science, 1999.

RAYEES AHMAD, M. et al. Synthesis of novel chalcone derivatives by conventional and microwave irradiation methods and their pharmacological activities. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 9, p. S931–S935, 2016.

REPANAS, A; KATSORI, A M.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. Chalcones in cancer: understanding their role in terms of QSAR. II part. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 13, n. 7, p. 952–70, jun. 2013.

REYNOLDS, R. C. et al. High throughput screening of a library based on kinase inhibitor scaffolds against Mycobacterium tuberculosis H37Rv. **Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)**, v. 92, n. 1, p. 72–83, jan. 2012.

RILEY, L. W. Of mice, men, and elephants: Mycobacterium tuberculosis cell envelope lipids and pathogenesis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 6, p. 4–7, 2006.

RINIKER, S.; LANDRUM, G. A. Open-source platform to benchmark fingerprints for ligand-based virtual screening. **Journal of cheminformatics**, v. 5, n. 1, p. 26, jan. 2013.

RIZVI, S. U. F. et al. Anti-HIV-1 and cytotoxicity studies of piperidyl-thienyl chalcones and

- their 2-pyrazoline derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, v. 21, n. 11, p. 3741–3749, 2012.
- ROGERS, D.; HAHN, M. Extended-connectivity fingerprints. **Journal of chemical information and modeling**, v. 50, n. 5, p. 742–54, maio 2010.
- ROGNAN, D. Chemogenomic approaches to rational drug design. **British Journal of Pharmacology**, v. 152, n. 1, p. 38–52, 2007.
- RÜCKER, C.; RÜCKER, G.; MERINGER, M. Y-randomization and its variants in QSPR/QSAR. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 47, p. 2345–2357, 2007.
- SAHU, N. K. et al. Exploring pharmacological significance of chalcone scaffold: a review. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 2, p. 209–25, jan. 2012.
- SALGAME, P. et al. Latent tuberculosis infection – Revisiting and revising concepts. **Tuberculosis**, v. 95, 2015.
- SARAVANAMURUGAN, S. et al. Liquid phase reaction of 2'-hydroxyacetophenone and benzaldehyde over ZSM-5 catalysts. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 218, n. 1, p. 101–106, 2004.
- SATO, Y. et al. Isoliquiritigenin, one of the antispasmodic principles of Glycyrrhiza uralensis roots, acts in the lower part of intestine. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 30, n. 1, p. 145–149, 2007.
- SENTHILRAJA, P.; KATHIRESAN, K. In vitro cytotoxicity MTT assay in Vero, HepG2 and MCF -7 cell lines study of Marine Yeast. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 5, n. 3, p. 080–084, 2015.
- SHI, R.; SUGAWARA, I. Development of New Anti-tuberculosis Drug Candidates. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 221, n. 2, p. 97–106, 2010.
- SHI, W. et al. Pyrazinamide inhibits trans-translation in Mycobacterium tuberculosis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 333, n. 6049, p. 1630–1632, 2011.
- SHIM, J.; MACKERELL, A. D. Computational ligand-based rational design: Role of conformational sampling and force fields in model development. **MedChemComm**, v. 2, n. 5, p. 356–370, 2011.
- SIMEÃO, F. C. DOS S. et al. Cord factor detection and macroscopic evaluation of mycobacterial colonies: an efficient combined screening test for the presumptive identification of Mycobacterium tuberculosis complex on solid media. **J. Bras.**

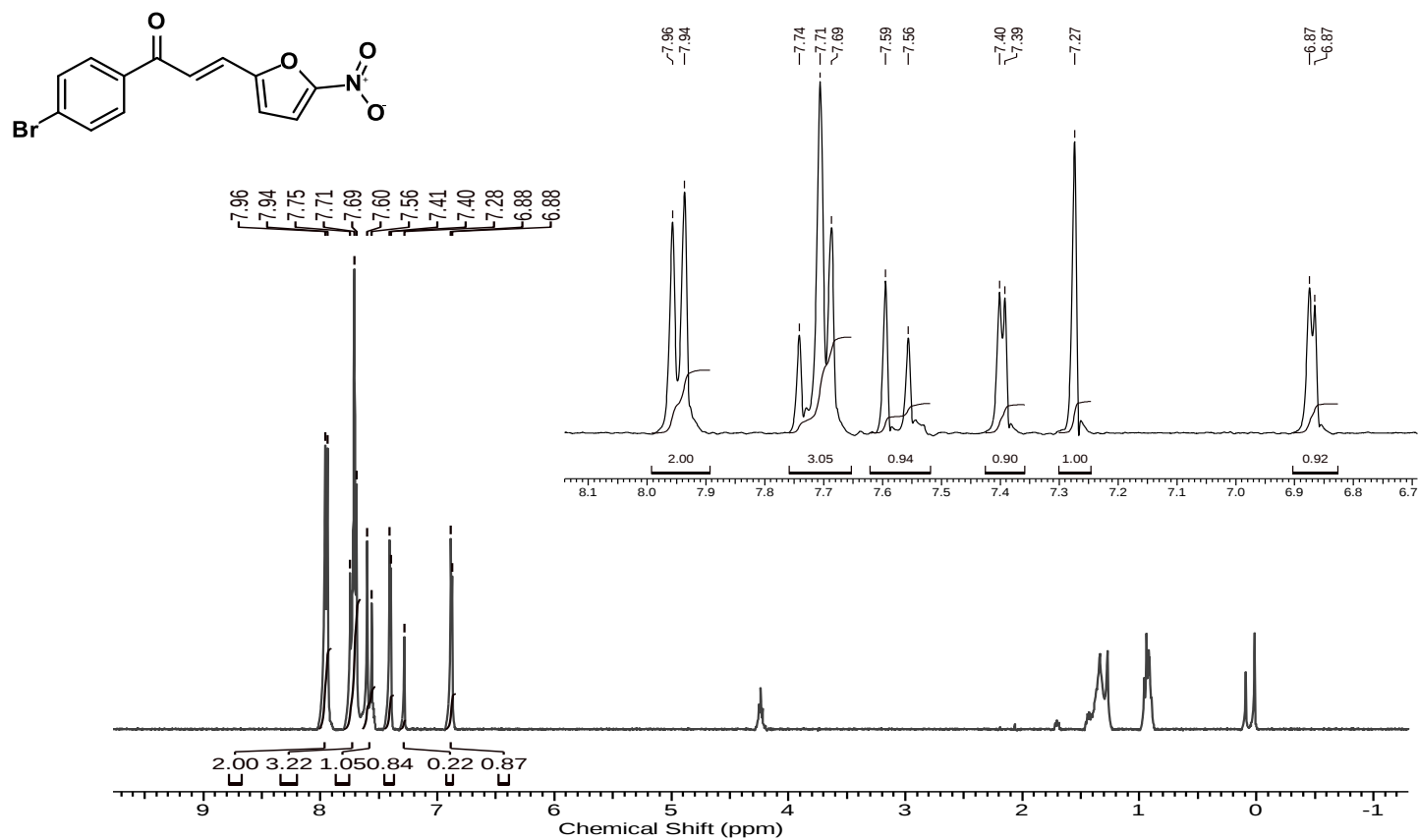
- Pneumol.**, v. 35, n. 12, p. 1212–1216, 2009.
- SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6º ed. [s.l.: s.n.].
- SIVAKUMAR, P. M. et al. Synthesis, antimycobacterial activity evaluation, and QSAR studies of chalcone derivatives. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 17, n. 6, p. 1695–700, 15 mar. 2007.
- SMITH, I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. **Clinical microbiology reviews**, v. 16, n. 3, p. 463–496, 2003.
- SRIVASTAVA, Y. K. Ecofriendly microwave assisted synthesis of some chalcones. **Rasayan Journal of Chemistry**, v. 1, n. 4, p. 884–886, 2008.
- SUNDARAMURTHI, J. C. et al. TBDRUGS - Database of drugs for tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 100, p. 69–71, 2016.
- SYAM, S. et al. Synthesis of chalcones with anticancer activities. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 17, n. 6, p. 6179–95, jan. 2012.
- TAKAYAMA, K.; WANG, C.; BESRA, G. S. Pathway to Synthesis and Processing of Mycolic Acids in Mycobacterium tuberculosis GENETIC ANALYSIS OF SYNTHESIS AND PROCESSING OF MYCOLIC ACID. **Society**, v. 18, n. 1, p. 81–101, 2005.
- TANAKA, H. et al. Biochemical and Biophysical Research Communications Sofalcone , an anti-ulcer chalcone derivative , suppresses inflammatory crosstalk between macrophages and adipocytes and adipocyte differentiation : Implication of heme-oxygenase-1 induction. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 381, n. 4, p. 566–571, 2009.
- TANG, J.; YAM, W.-C.; CHEN, Z. Mycobacterium tuberculosis infection and vaccine development. **Tuberculosis**, v. 98, p. 30–41, 2016.
- TANG, Y. et al. New technologies in computer-aided drug design: Toward target identification and new chemical entity discovery. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 3, n. 3, p. 307–313, 2006.
- TAWARI, N. R. et al. Design, synthesis, and biological evaluation of 4-(5-nitrofur-2-yl)prop-2-en-1-one derivatives as potent antitubercular agents. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 20, n. 21, p. 6175–8, 1 nov. 2010.
- TBALLIANCE. **TB ALLIANCE Putting science to work for a faster TB cure**. Disponível em: <www.tb Alliance.org>. Acesso em: 22 set. 2015.
- TISHLER, M. Molecular Modification in Modern Drug Research. In: **Molecular**

- Modification in Drug Design**. 1° ed. Washington, D.C.: American Chemical Society, 1964. p. 1–14.
- TODESCHINI, R.; CONSONNI, V. **Handbook of Molecular Descriptors**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2000.
- TRIPATHI, R. P. et al. Developments in chemical approaches to treat tuberculosis in the last decade. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 4, p. 488–517, jan. 2012.
- TROPSHA, A. Best Practices for QSAR Model Development, Validation, and Exploitation. **Molecular Informatics**, v. 29, n. 6–7, p. 476–488, 2010.
- TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. v. 31, p. 472–481, 2001.
- V. C. GUIDO, R.; OLIVA, G.; D. ANDRICOPULO, A. Modern Drug Discovery Technologies: Opportunities and Challenges in Lead Discovery. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 14, n. 10, p. 830–839, 2011.
- VAPNIK, V. N. **The Nature of Statistical Learning Theory**. [s.l.: s.n.]. v. 8
- VEBER, D. F. et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615–23, 6 jun. 2002.
- VIBHUTE, A.; MOKLE, S. An efficient and operationally simple synthesis of some new Schiff bases using grinding technique. **Bulletin of the ...**, v. 8, p. 164–168, 2009.
- VIETH, M. et al. Characteristic physical properties and structural fragments of marketed oral drugs. **Journal of medicinal chemistry**, v. 47, n. 1, p. 224–32, 2004.
- VILLEMAGNE, B. et al. Tuberculosis: the drug development pipeline at a glance. **European journal of medicinal chemistry**, v. 51, p. 1–16, maio 2012.
- WELLING, M. **A First Encounter with machine learning**. 1. ed. California: University of California Irvine, 2011.
- WERMUTH, C. G. **The Practice of Medicinal Chemistry**. 3° ed. [s.l.: s.n.].
- WHO. **Global Tuberculosis Control**. Suíça: [s.n.].
- WHO. **Global tuberculosis report 2014 (WHO)**. Disponível em:
<http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/>. Acesso em: 25 abr. 2015.
- WHO. **Latent Tuberculosis Infection (LTBI)**. Disponível em:
<<http://www.who.int/tb/challenges/ltbi/en/>>. Acesso em: 7 out. 2015a.
- WHO. **Global Tuberculosis 2015**. Disponível em:

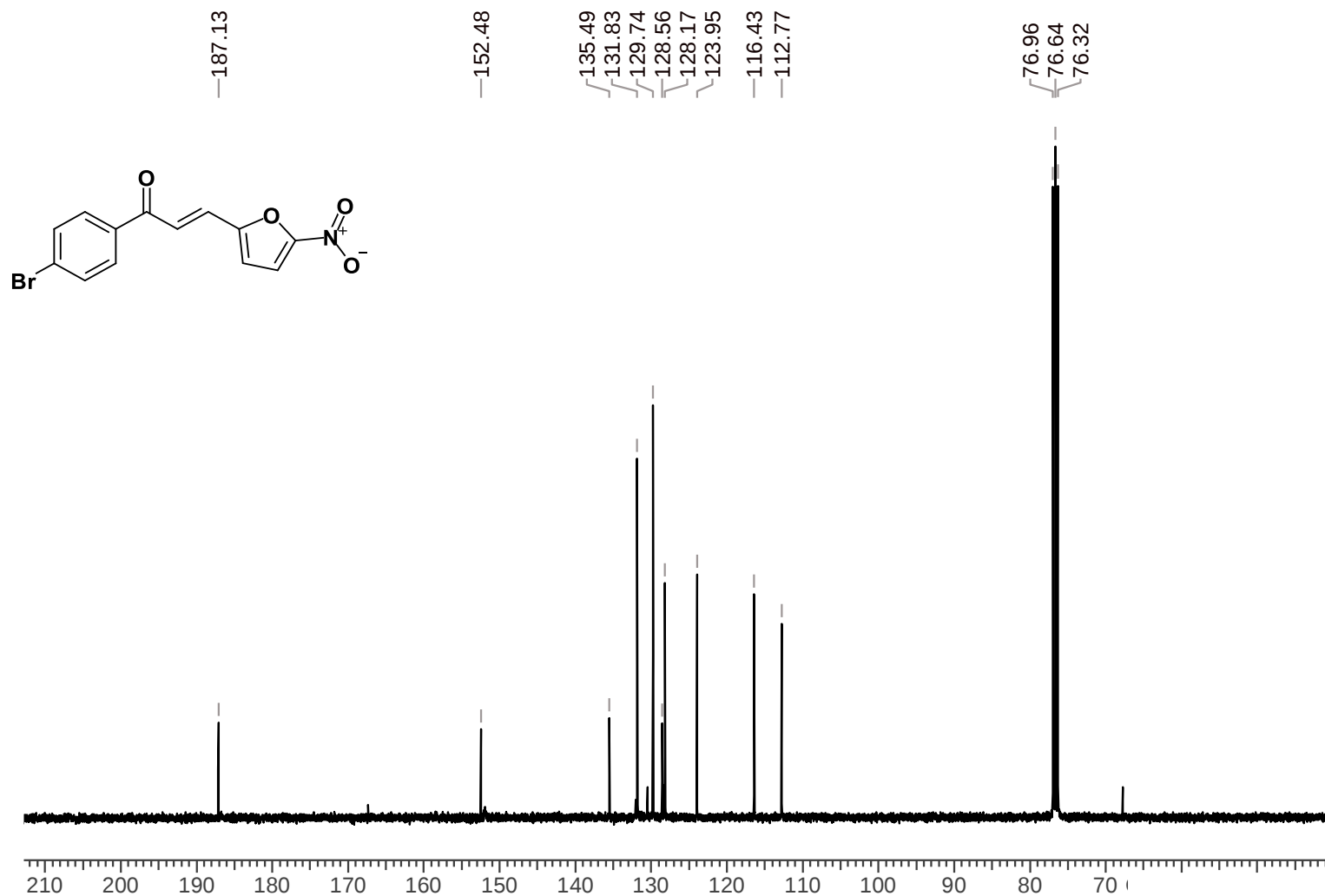
- <http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/>. Acesso em: 28 out. 2015b.
- WHO. **The Stop TB Strategy**. Disponível em:
<http://www.who.int/tb/strategy/stop_tb_strategy/en/>. Acesso em: 8 out. 2015c.
- WHO. **Pursue high-quality DOTS expansion and enhancement**. Disponível em:
<<http://www.who.int/tb/dots/en/>>. Acesso em: 8 out. 2015d.
- WHO. Global Tuberculosis Report 2016. 2016.
- WIRTH, M. et al. SwissBioisostere: A database of molecular replacements for ligand design. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. 1–7, 2013.
- WONG, E. B.; COHEN, K. A.; BISHAI, W. R. Rising to the challenge: New therapies for tuberculosis. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 9, p. 493–501, 2013.
- XAVIER, A.; LAKSHMANAN, M. Delamanid: A new armor in combating drug-resistant tuberculosis. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 5, n. 3, p. 222, 2014.
- XIANG, M. et al. Computer-aided drug design: lead discovery and optimization. **Combinatorial chemistry & high throughput screening**, v. 15, n. 4, p. 328–37, 1 maio 2012.
- YAMAMOTO, T. et al. Anti-allergic activity of naringenin chalcone from a tomato skin extract. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 68, n. 8, p. 1706–1711, 2004.
- YOUNG, D. C. **Computational Drug Design: A guide or computational and medicinal chemists**. 1° ed. New Jersey: Wiley, 2009.
- ZENGER, K. et al. In vitro structure-toxicity relationship of chalcones in human hepatic stellate cells. **Toxicology**, v. 336, p. 26–33, 2015.
- ZUMLA, A. et al. Drug-resistant tuberculosis--current dilemmas, unanswered questions, challenges, and priority needs. **The Journal of infectious diseases**, v. 205 Suppl, n. Suppl 2, p. S228-40, 15 maio 2012.
- ZUMLA, A.; NAHID, P.; COLE, S. T. Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 12, n. 5, p. 388–404, maio 2013.

8.1. Espectros de RMN, IV, Massas e CLAE

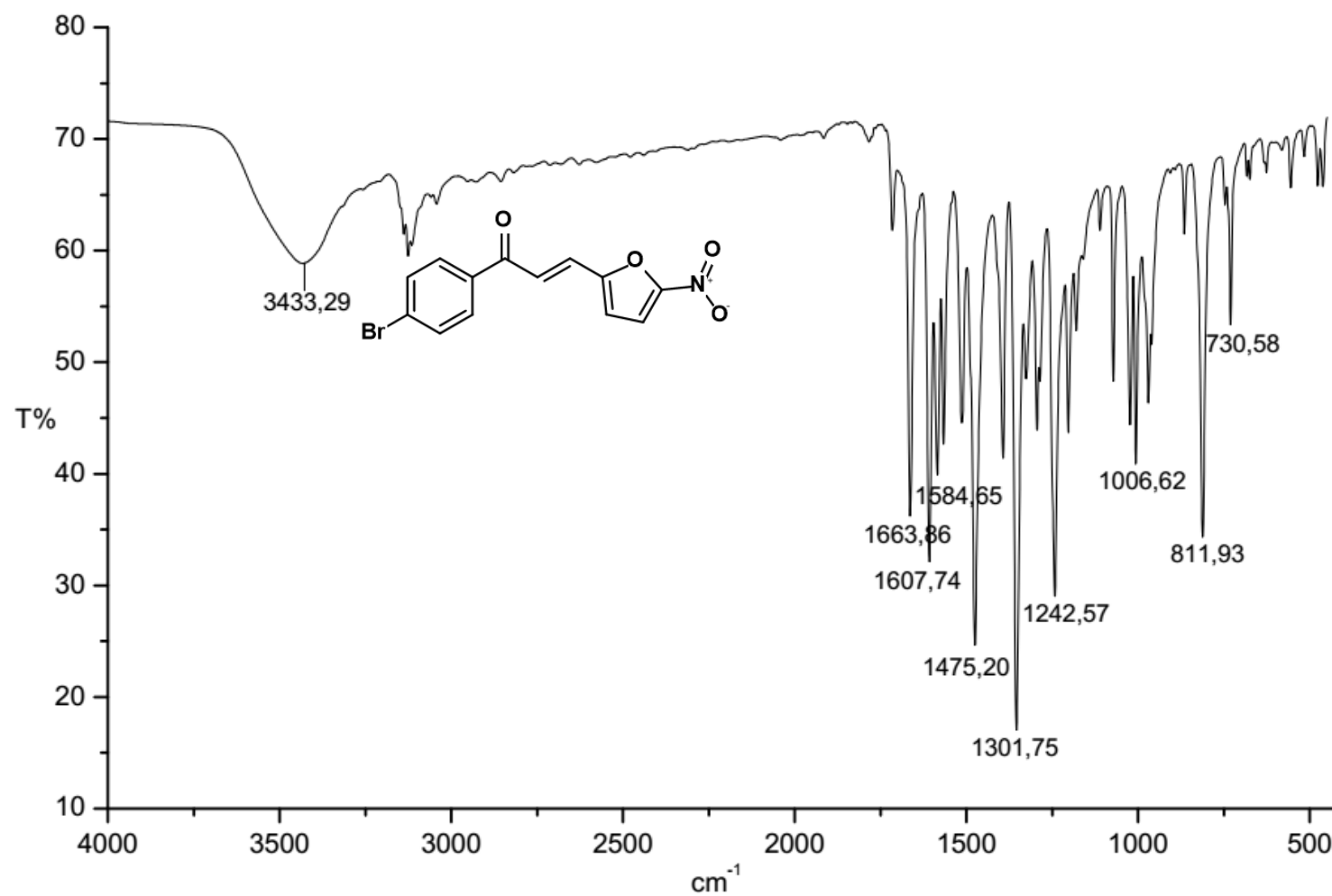
8.2. Figuras de similaridade e tabelas de predição predhERG, PAINS e metabolismo



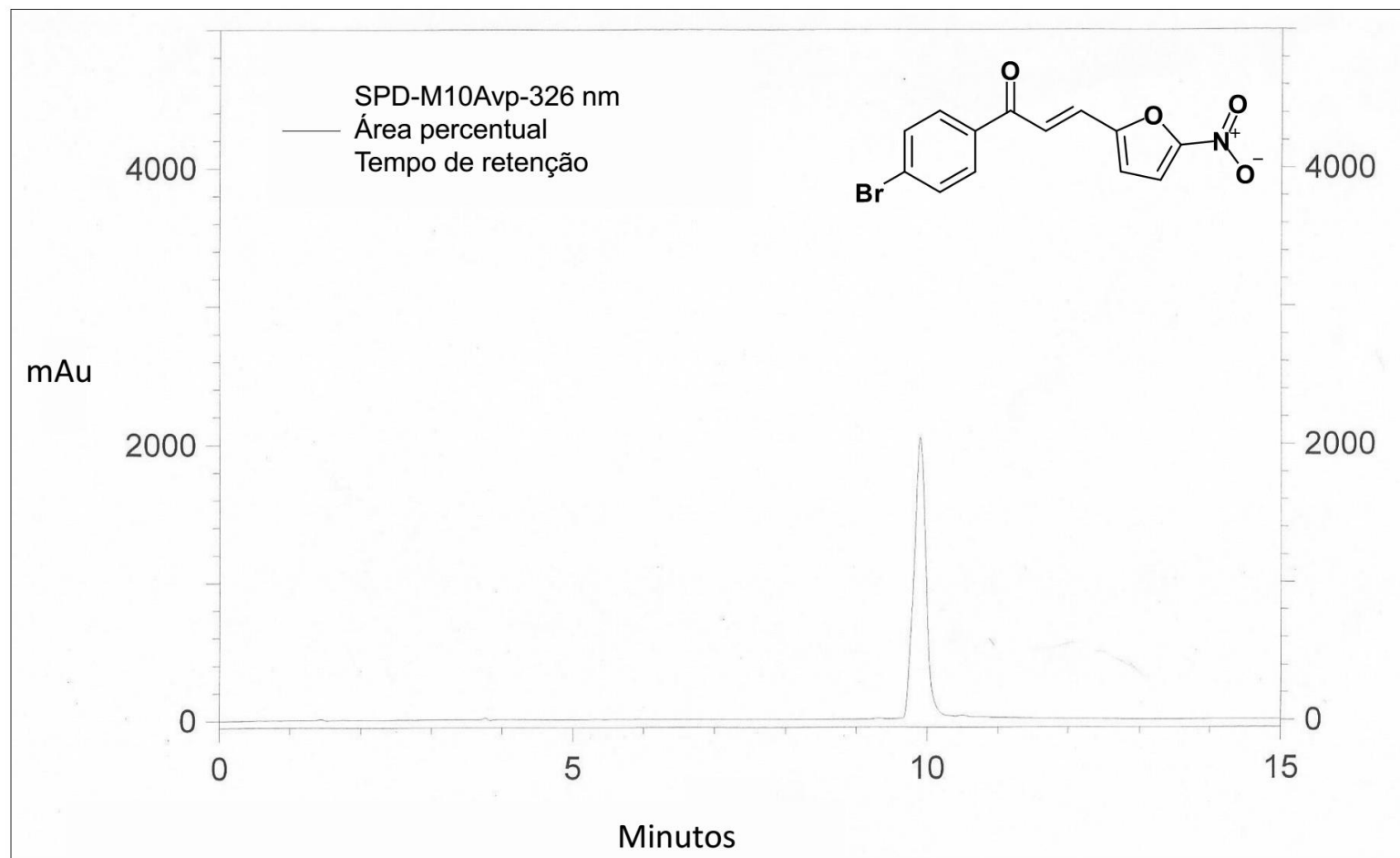
Anexo 1 – Espectro de RMN ¹H da (2E)-1-(4-bromofenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol63**) (**46**), 400 MHz, CDCl₃



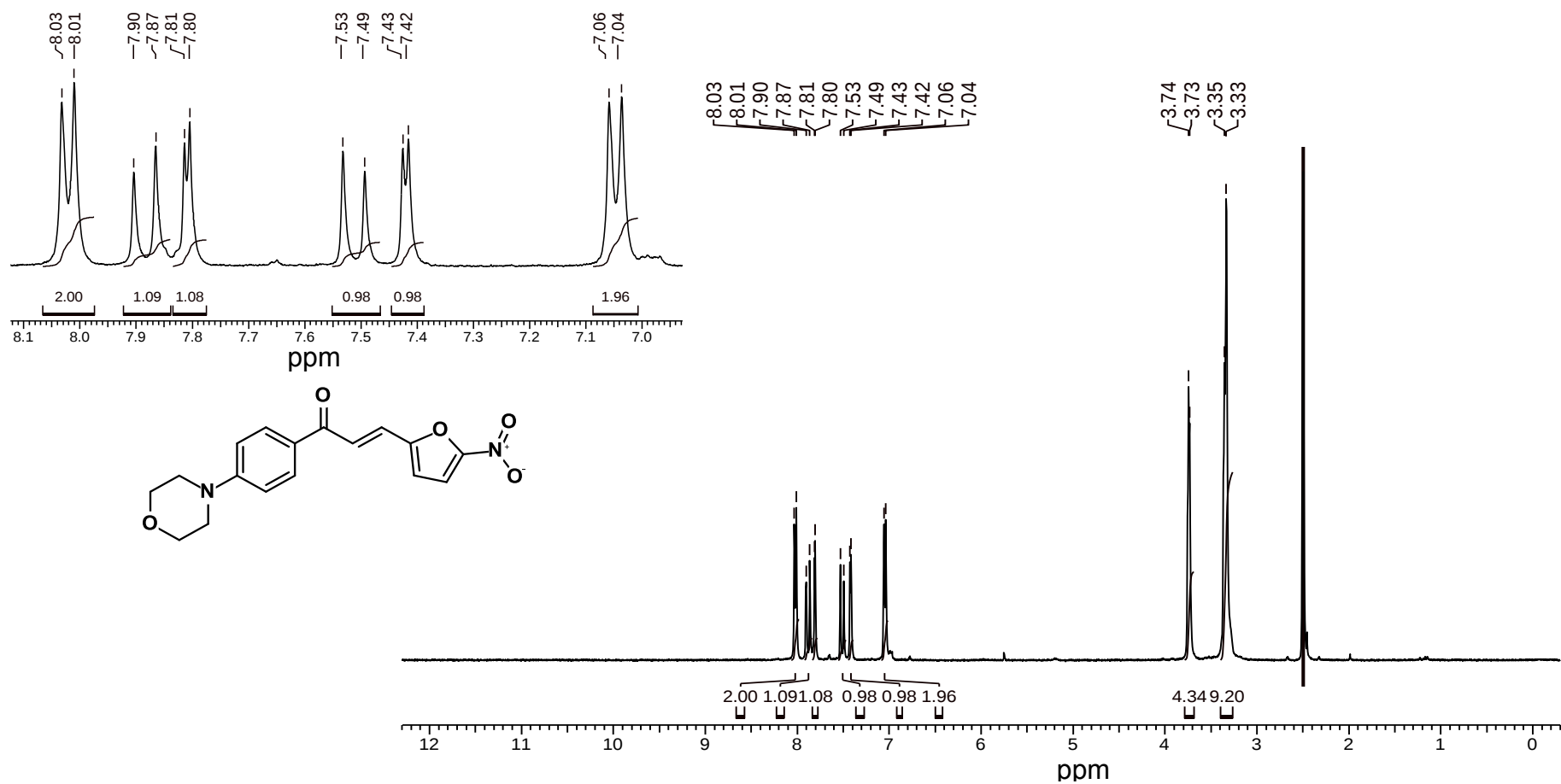
Anexo 2 - Espectro de RMN ¹³C do (2E)-1-(4-bromofenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol63) (46), 400 MHz, CDCl₃



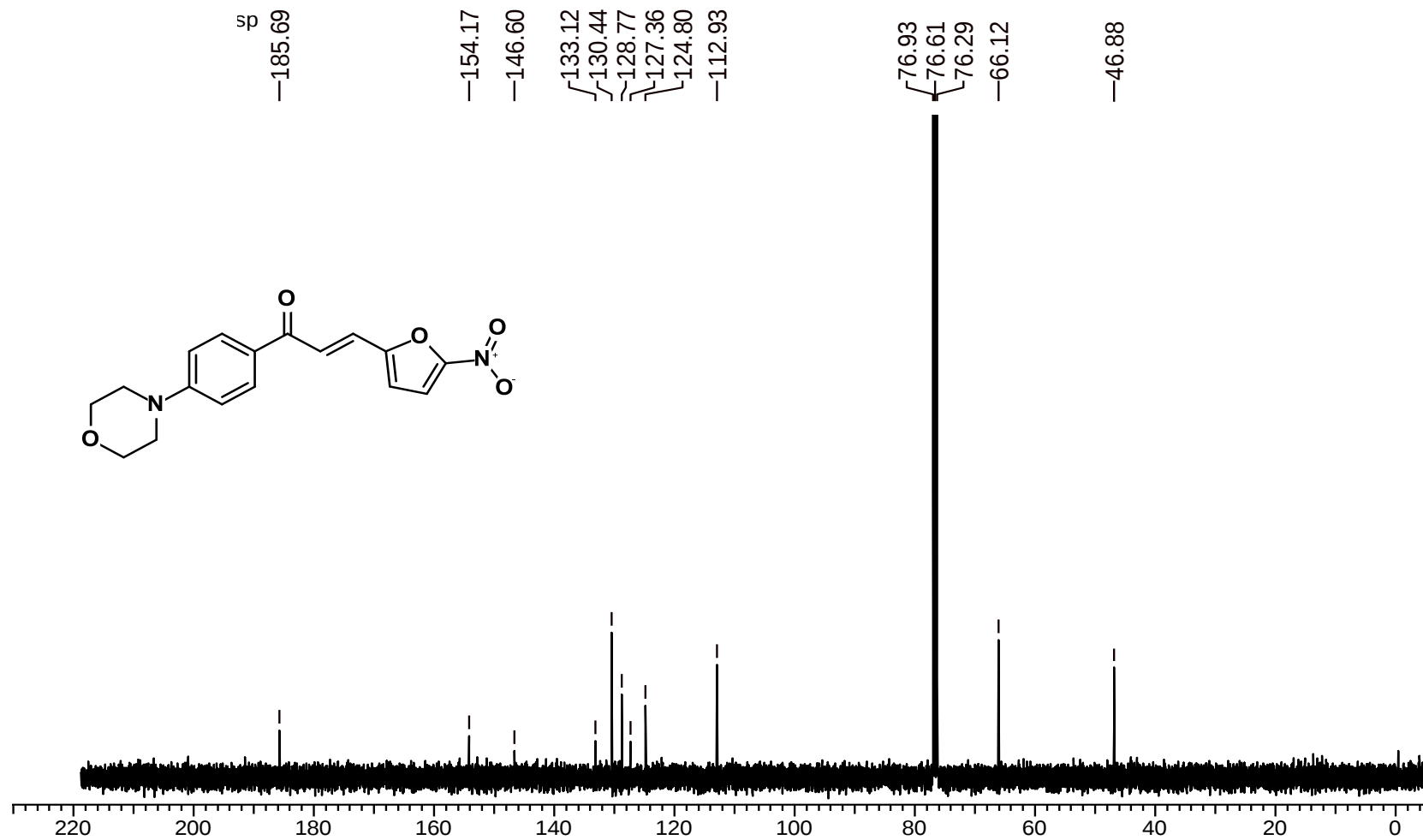
Anexo 3 - Espectro de IV do (2E)-1-(4-bromofenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol63) (46), KBr



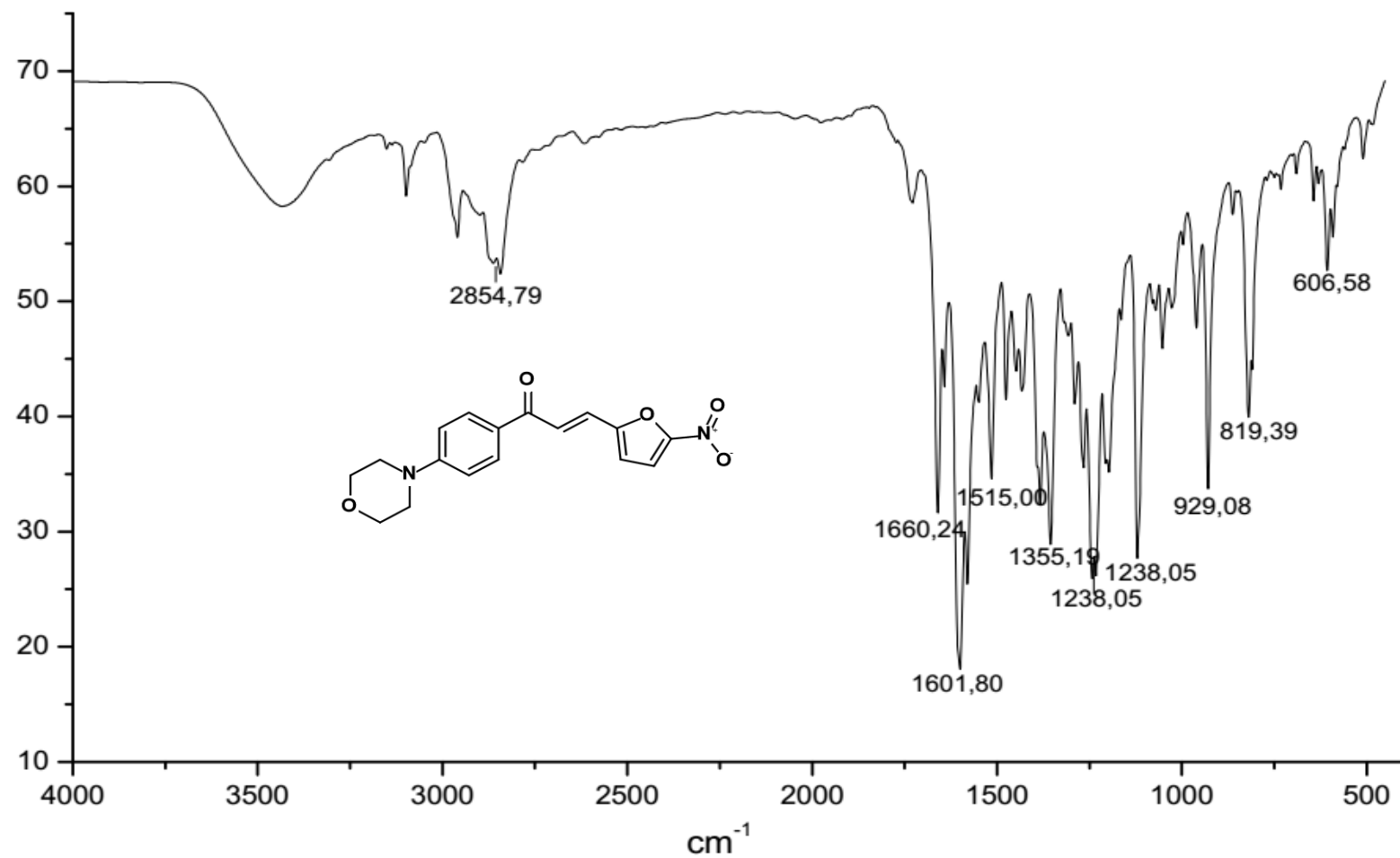
Anexo 4 – Cromatograma do (2E)-1-(4-bromofenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol63**) (**46**).



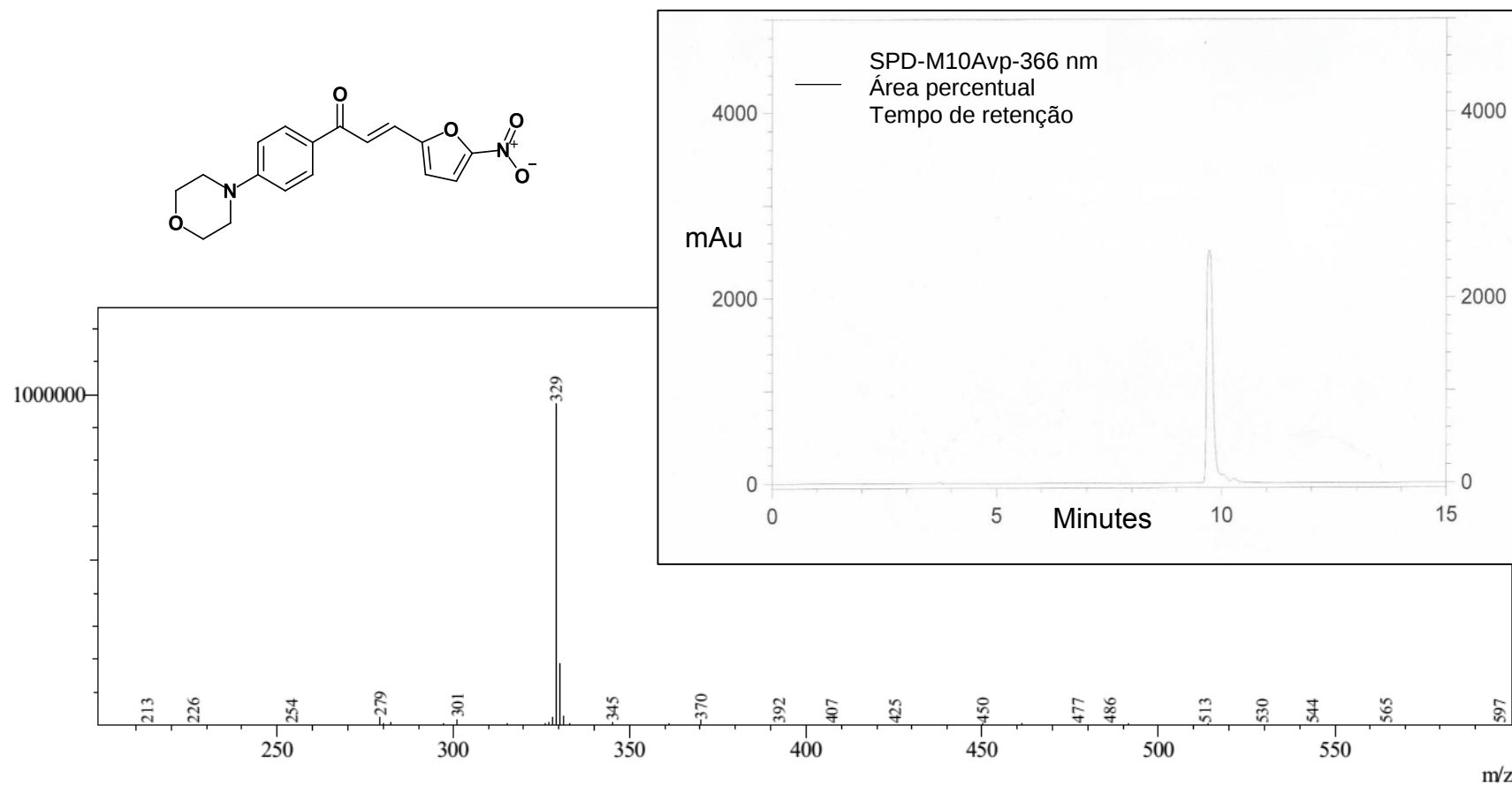
Anexo 5 - Espectro de RMN ¹H do (2*E*)-1-[4-(morfolin-4-il)fenil]-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol64**) (**47**), 400 MHz, DMSO *d*₆



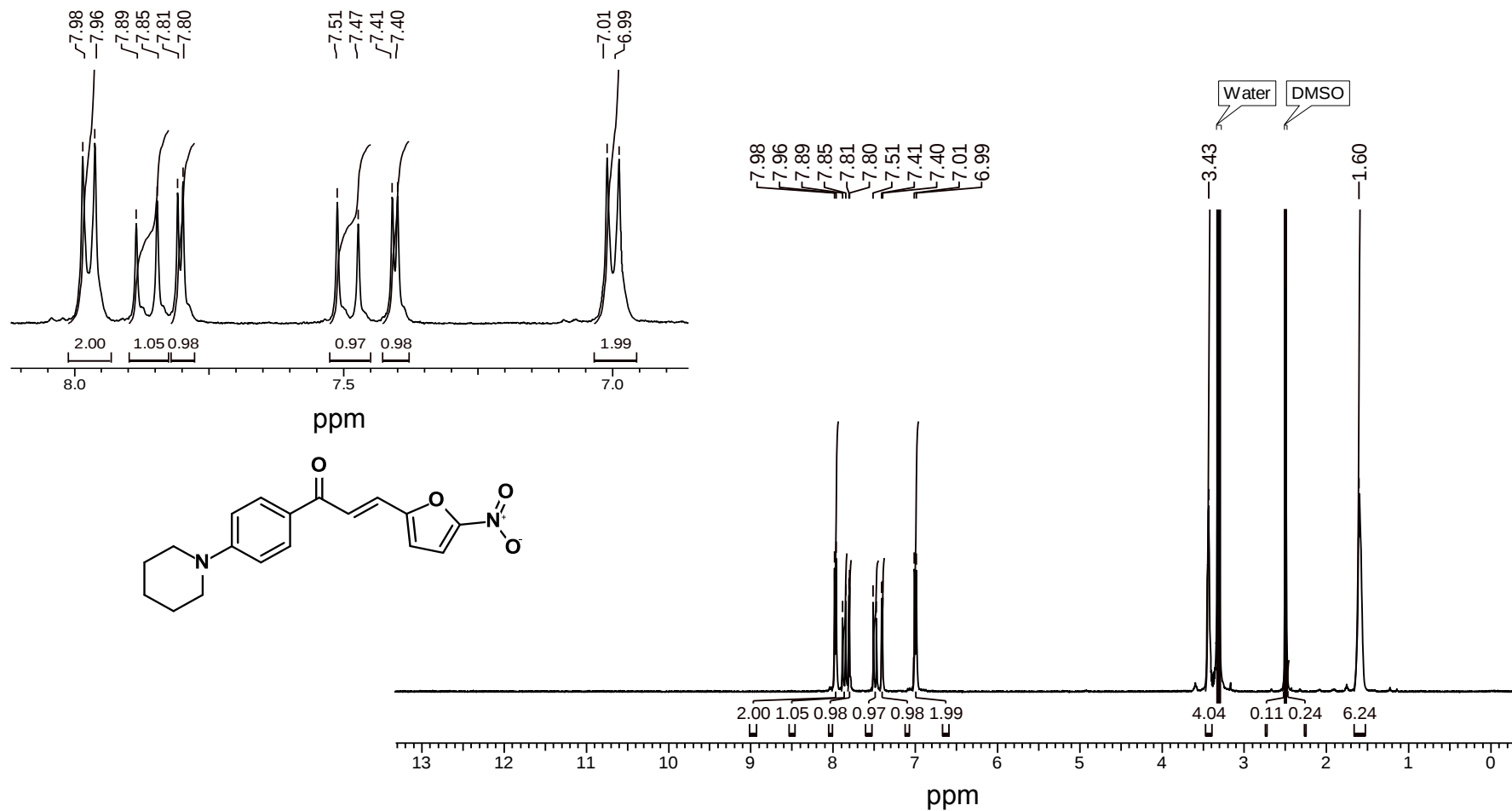
Anexo 6 - Espectro de RMN ¹³C do (2E)-1-[4-(morfolin-4-il)fenil]-3-(5-nitrofurano-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol64) (47), 400 MHz, DMSO *d*₆



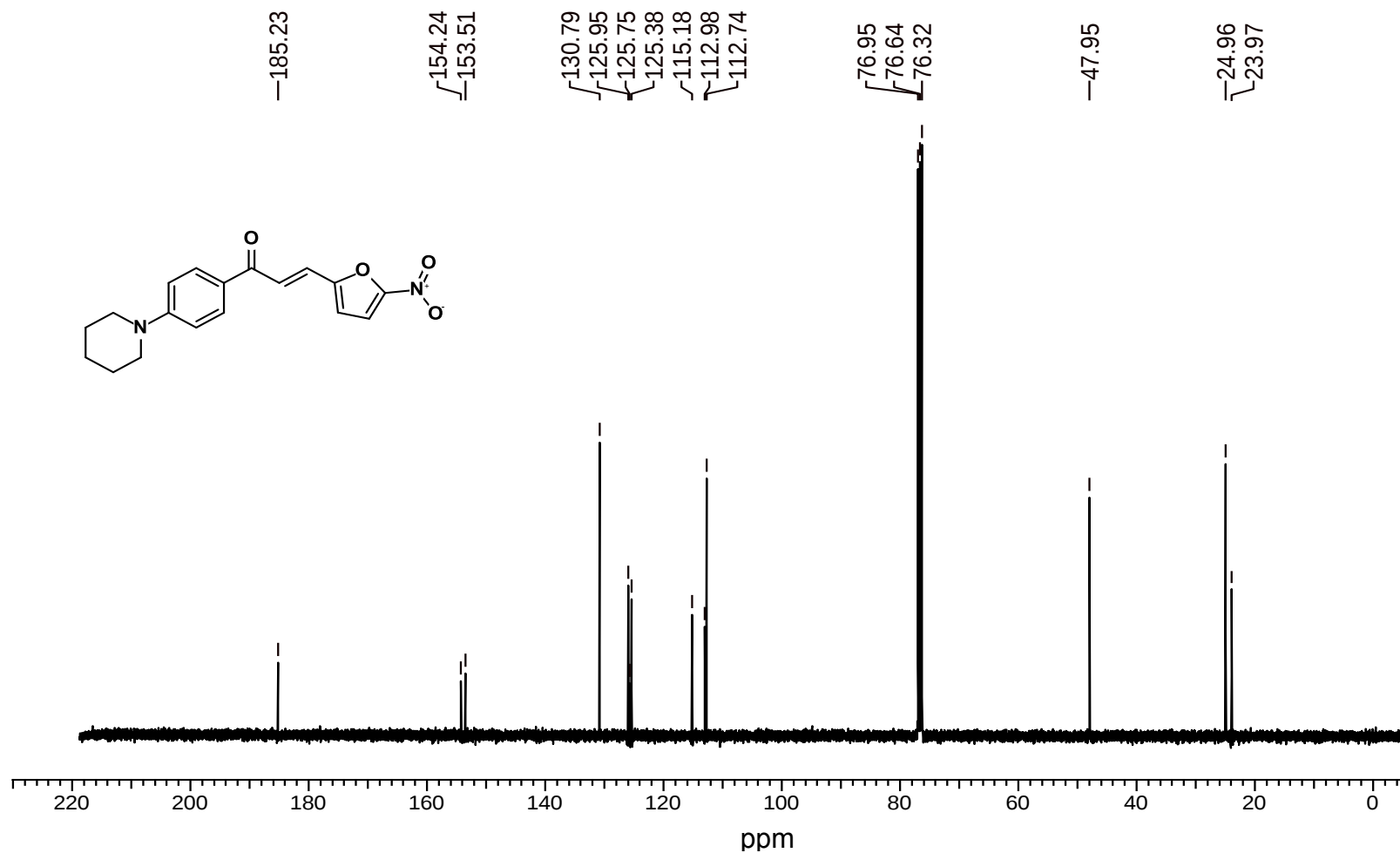
Anexo 7 - Espectro de IV do (2E)-1-[4-(morfolin-4-il)fenil]-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol64) (47), KBr.



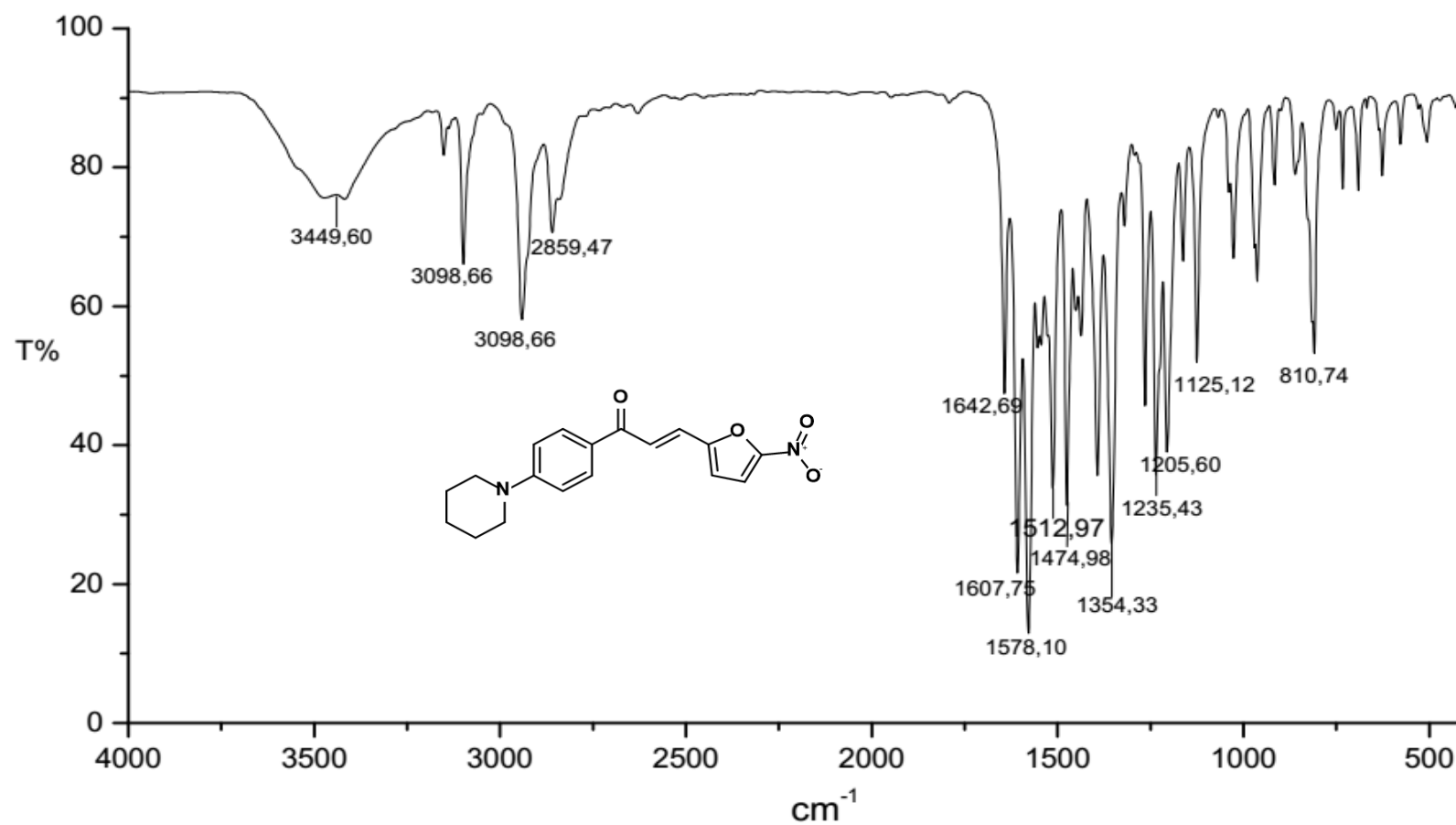
Anexo 8 - Espectro de massas e cromatograma do (2E)-1-[4-(morfolin-4-il)fenil]-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol64**) (47).



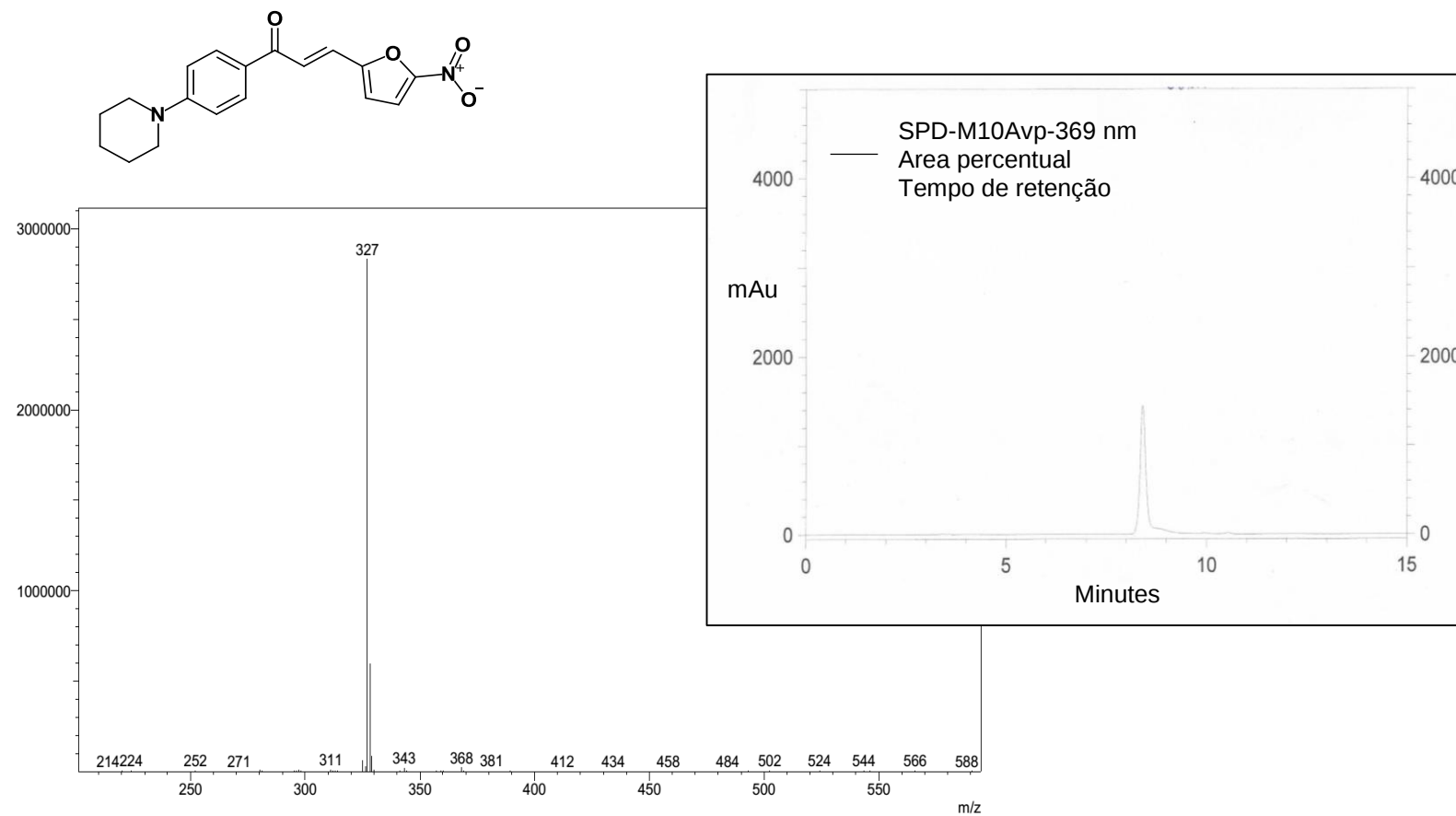
Anexo 9 - Espectro de RMN ^1H do (2E)-3-(5-nitrofuran-2-il)-1-[4-(piperidin-1-il)fenil]prop-2-en-1-one (**LabMol65**) (**48**), 400 MHz, DMSO *d*₆



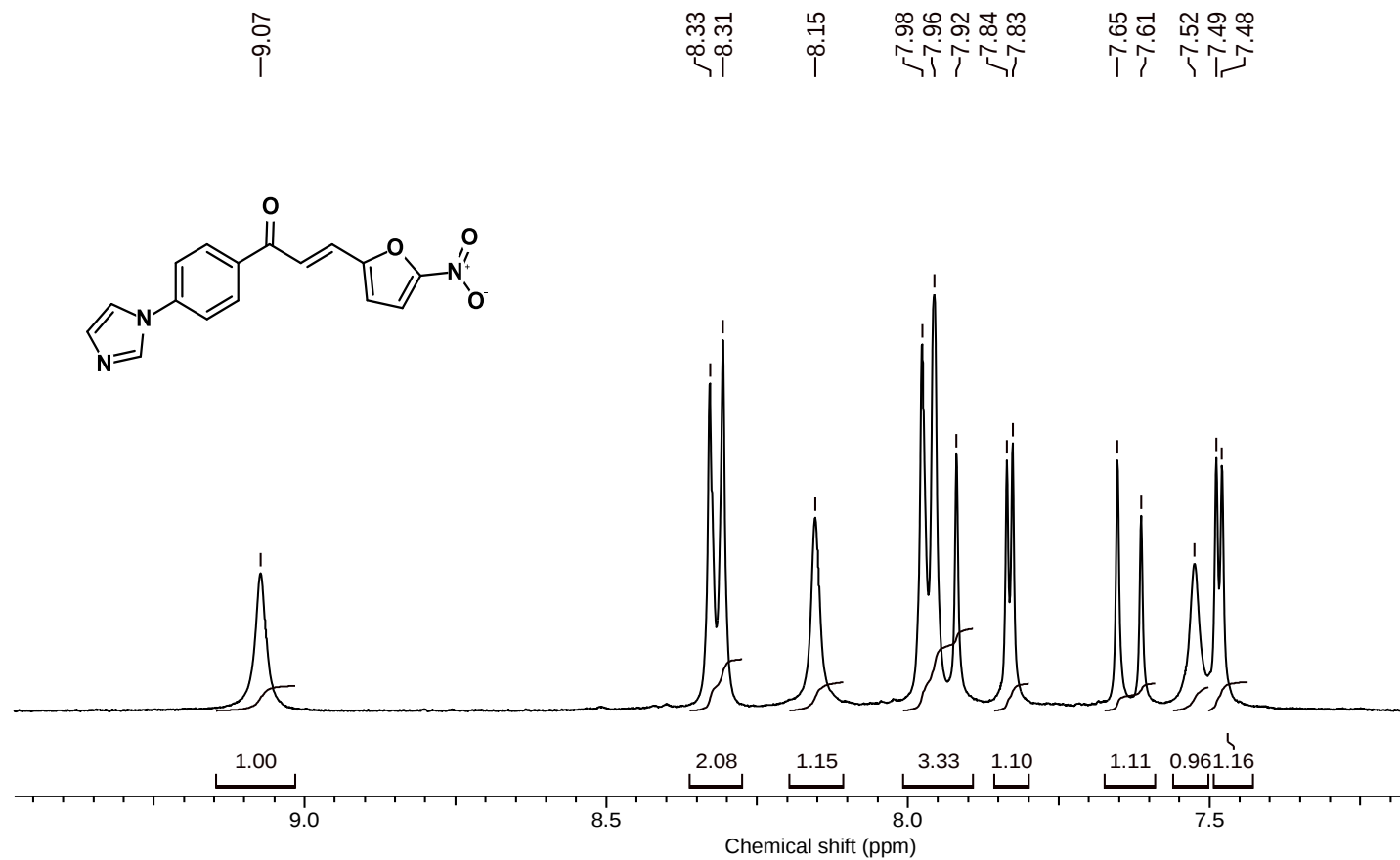
Anexo 10 - Espectro de RMN ¹³C do (2E)-3-(5-nitrofuran-2-il)-1-[4-(piperidin-1-il)fenil]prop-2-en-1-one (**LabMol65**) (**48**), 400 MHz, DMSO *d*₆



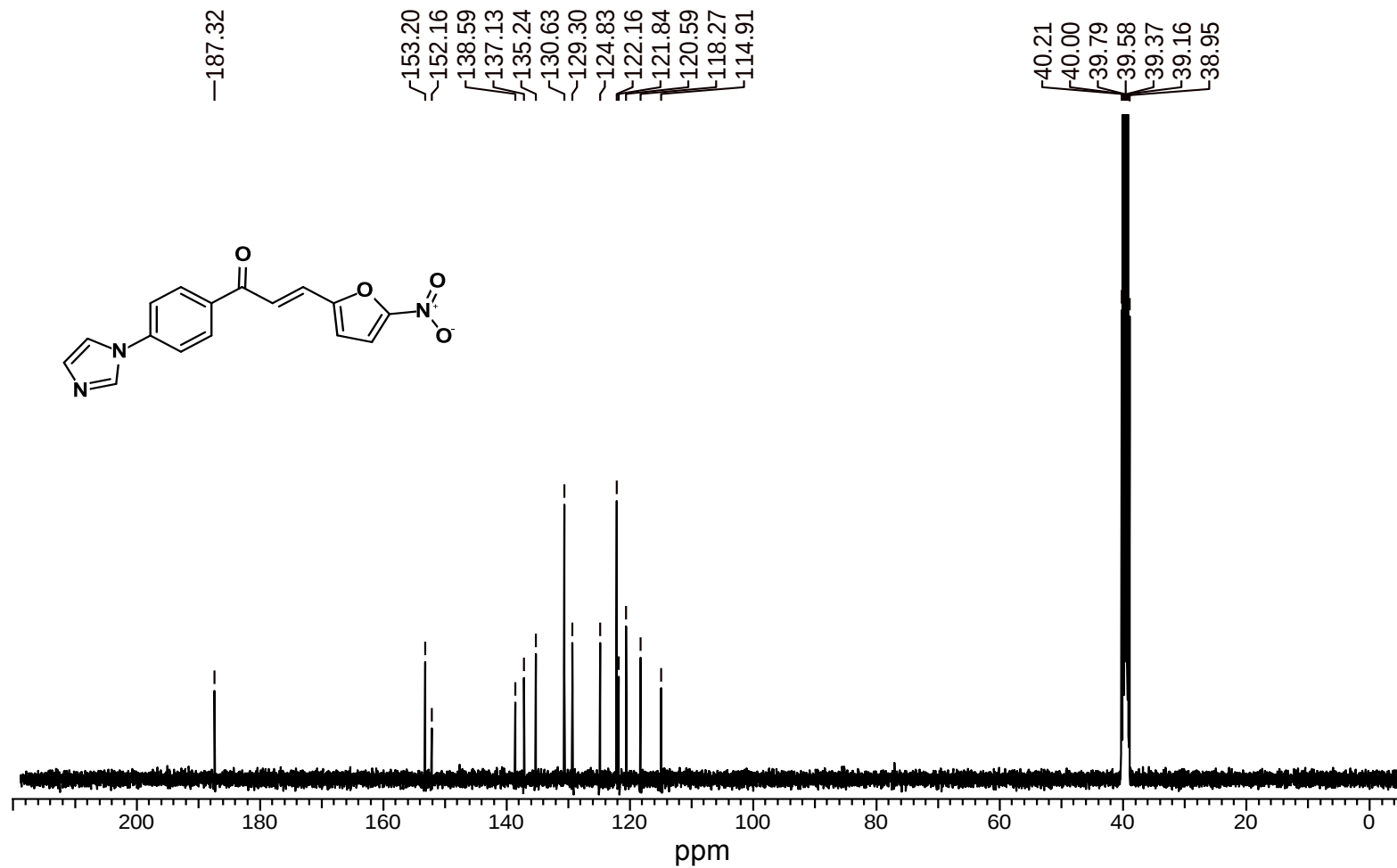
Anexo 11 - Espectro de IV do (2E)-3-(5-nitrofuran-2-il)-1-[4-(piperidin-1-il)fenil]prop-2-en-1-one (**LabMol65**) (**48**), KBr.



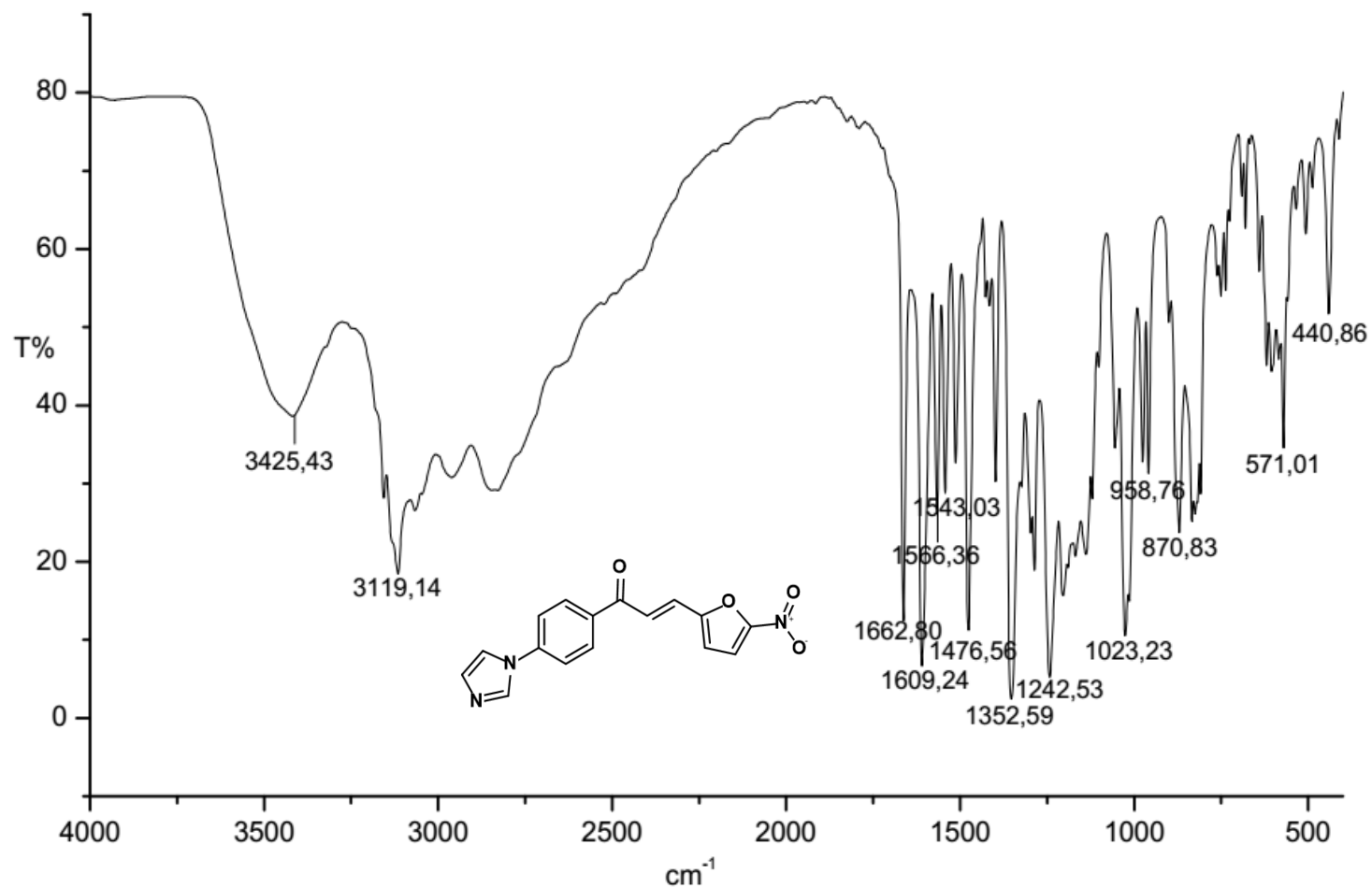
Anexo 12 - Espectro de massas e cromatograma do (2E)-3-(5-nitrofuran-2-il)-1-[4-(piperidin-1-il)fenil]prop-2-en-1-one (**LabMol65**) (**48**),



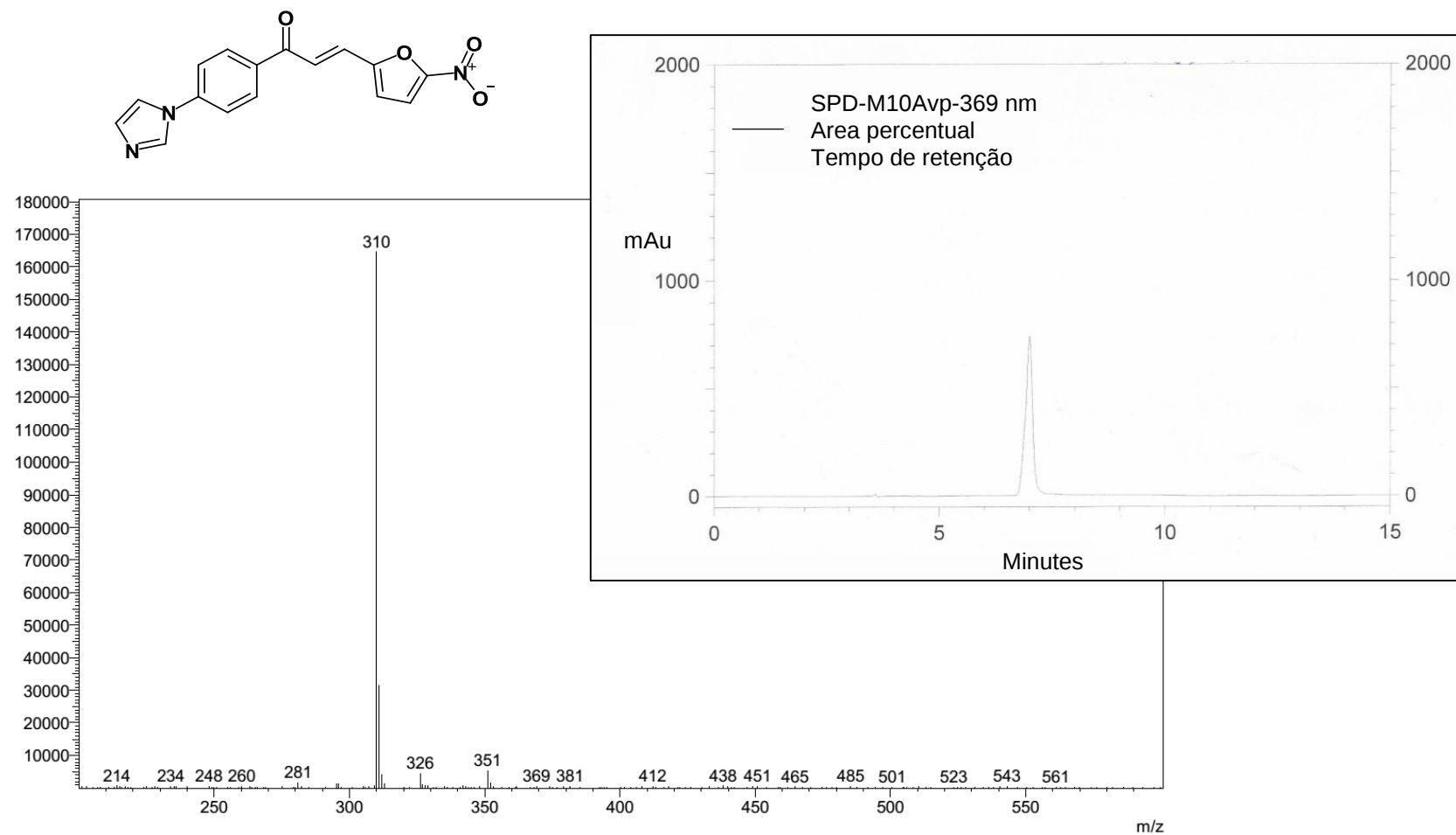
Anexo 13 - Espectro de RMN ¹H do (2E)-1-[4-(1H-imidazol-1-il)fenil]-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol66**) (**67**), 400 MHz, DMSO *d*₆



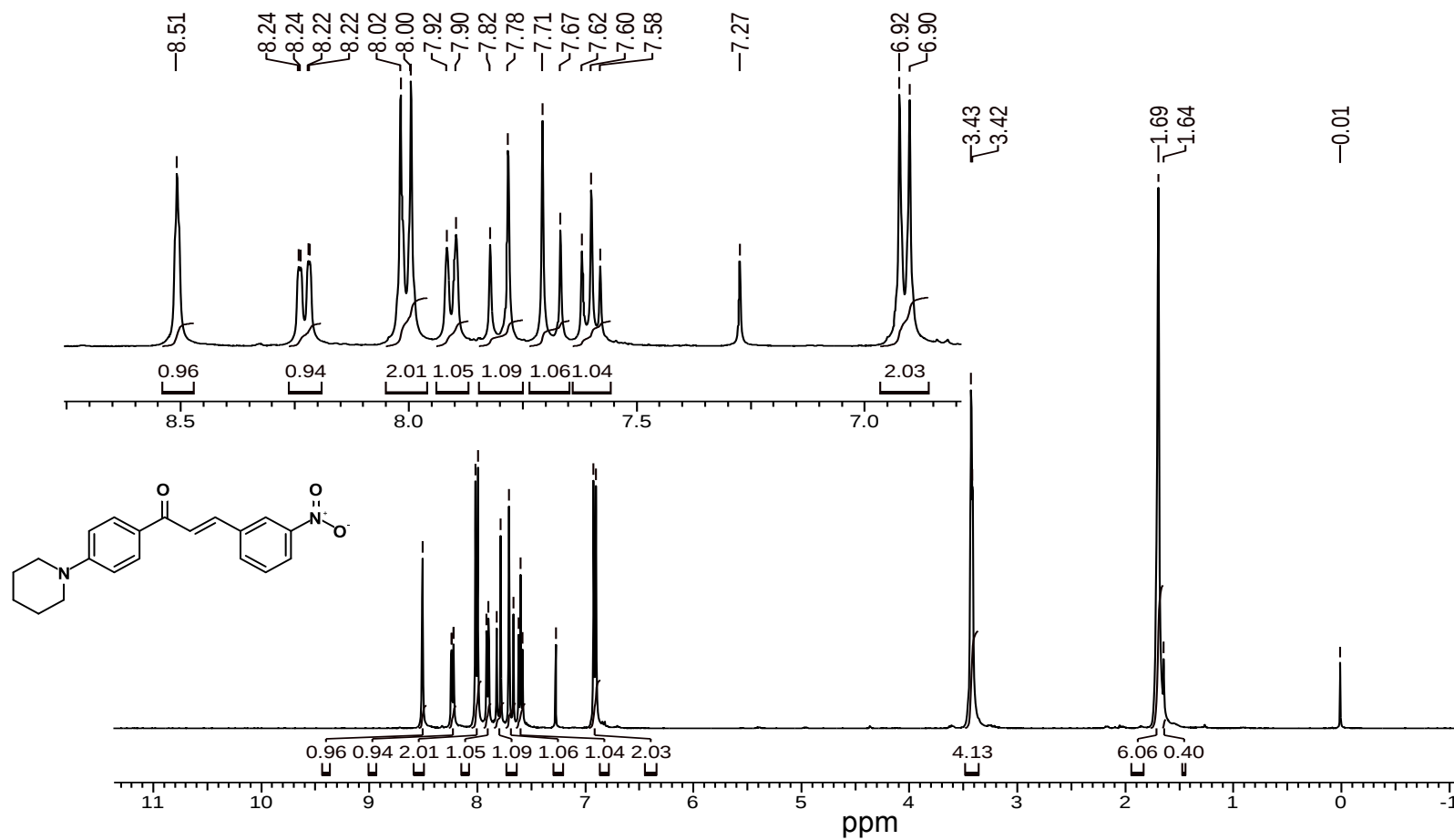
Anexo 14 - Espectro de RMN ¹³C (2E)-1-[4-(1H-imidazol-1-il)fenil]-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol66**) (**67**), 400 MHz, DMSO d₆



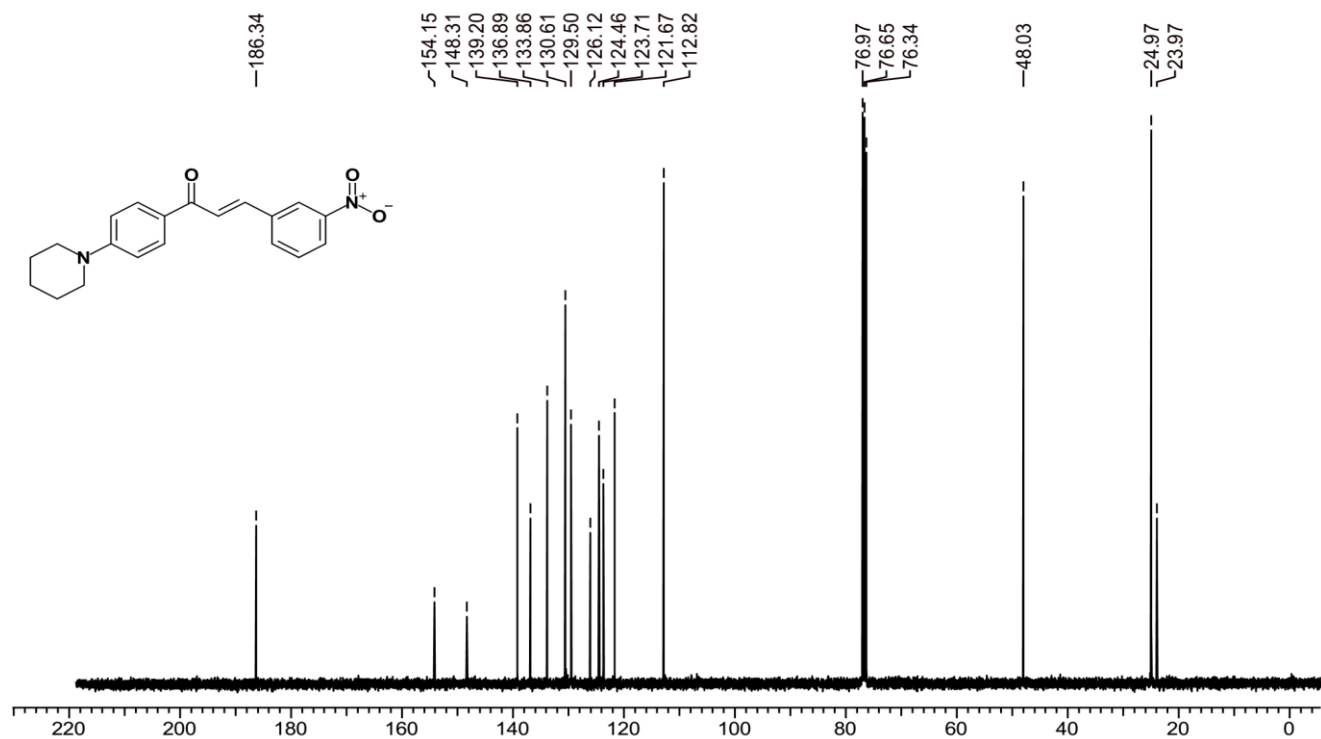
Anexo 15 - Espectro de IV (2E)-1-[4-(1H-imidazol-1-il)fenil]-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol66**) (67), KBr.



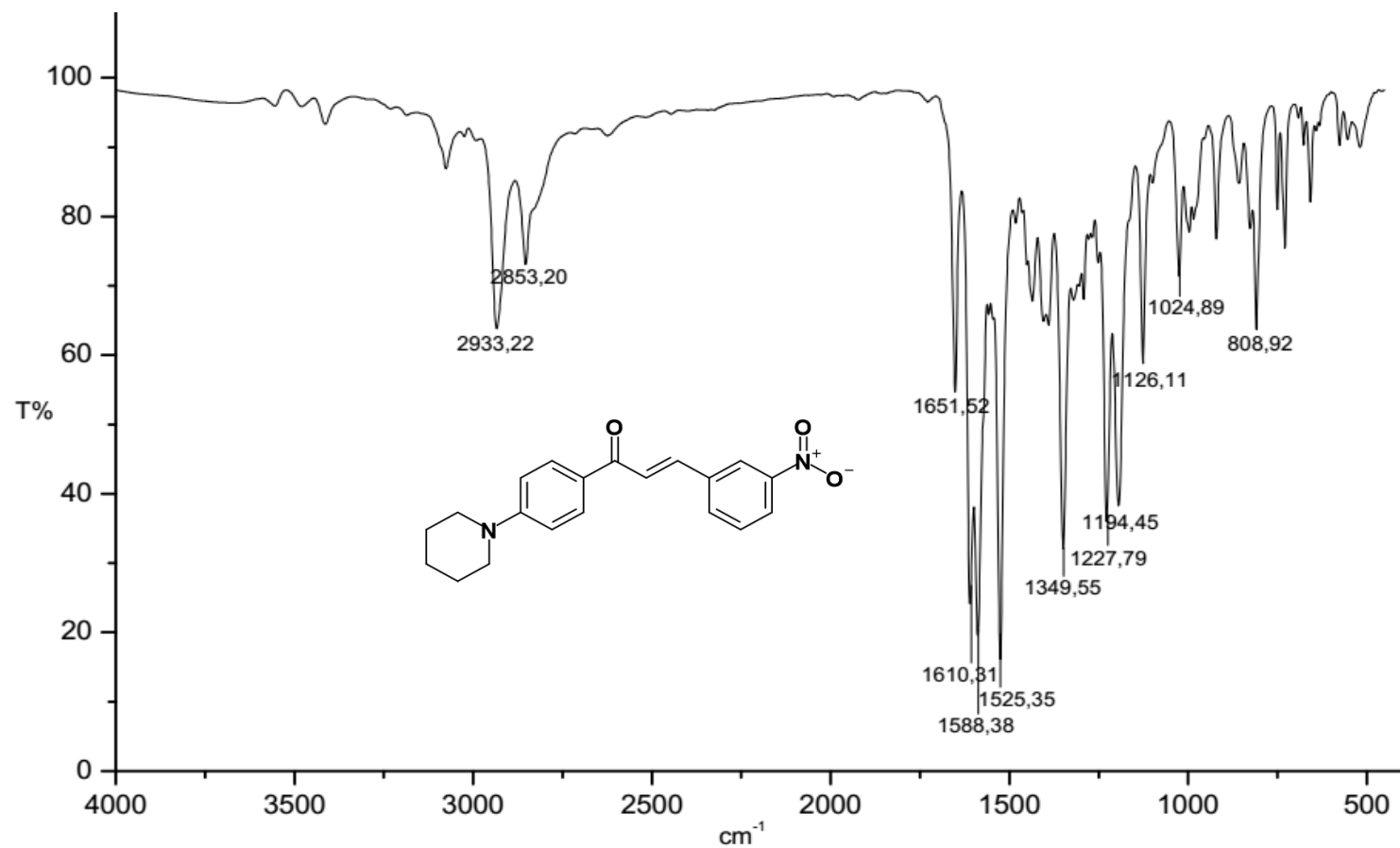
Anexo 16 - Espectro de massas e cromatograma do (2E)-1-[4-(1H-imidazol-1-il)fenil]-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol66**) (**67**).



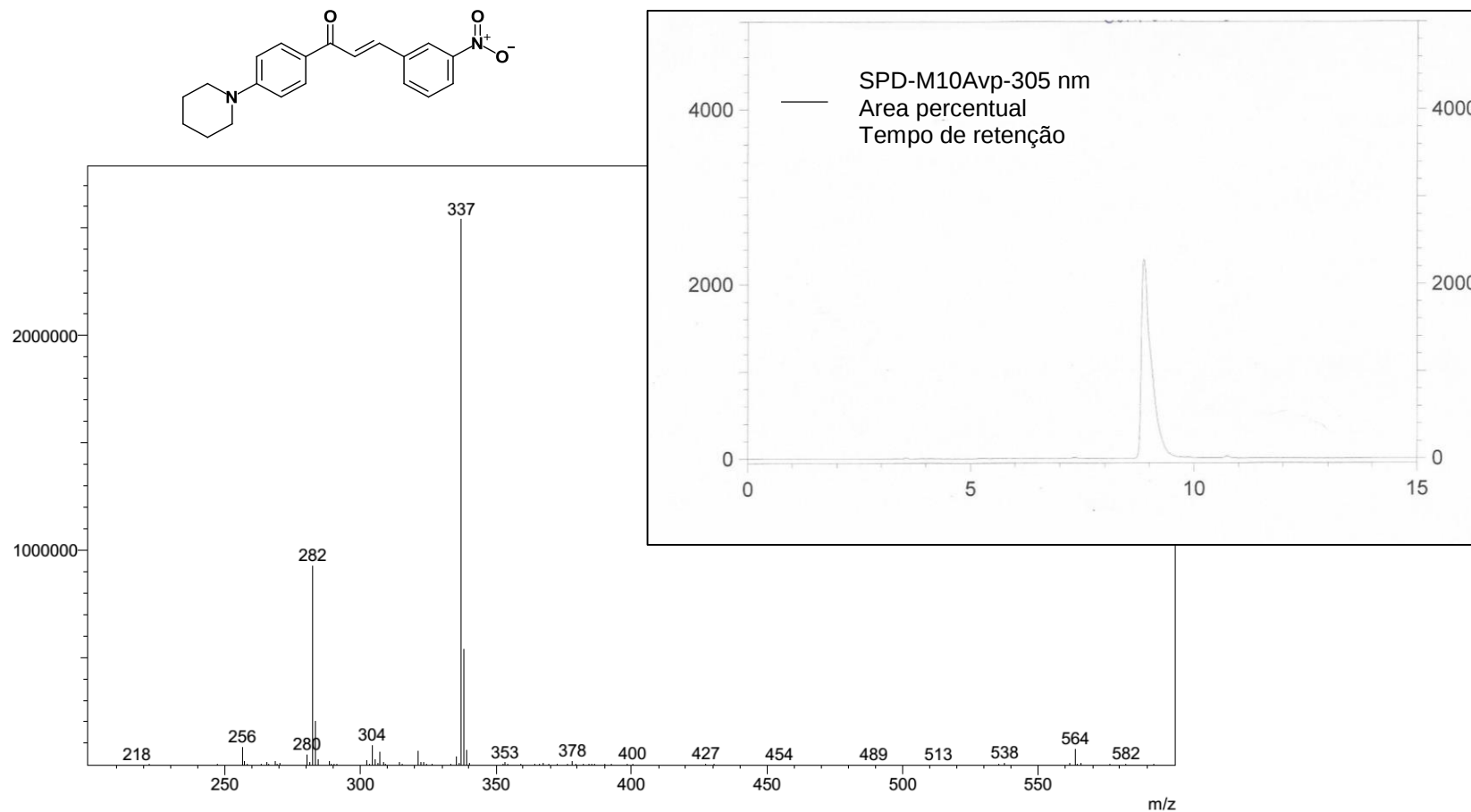
Anexo 17 - Espectro de RMN ¹H do (2E)-3-(3-nitrofenil)-1-[4-(piperidin-1-il)fenil]prop-2-en-1-ona, (**LabMol67**) (**68**), 400 MHz, CDCl₃



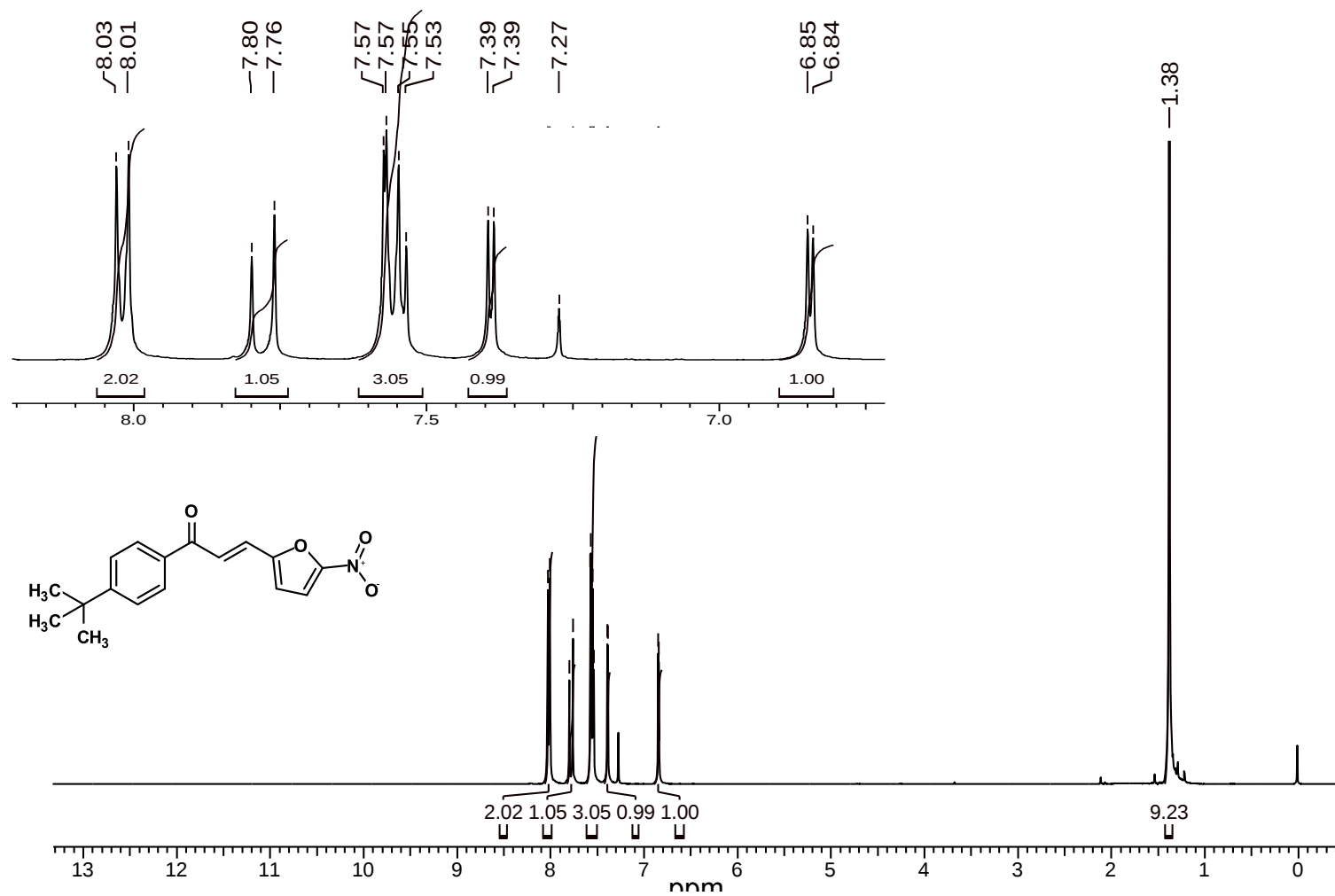
Anexo 18 - Espectro de RMN ¹³C do (2E)-3-(3-nitrofenil)-1-[4-(piperidin-1-il)fenil]prop-2-en-1-ona, (LabMol67) (68), 400 MHz, CDCl₃



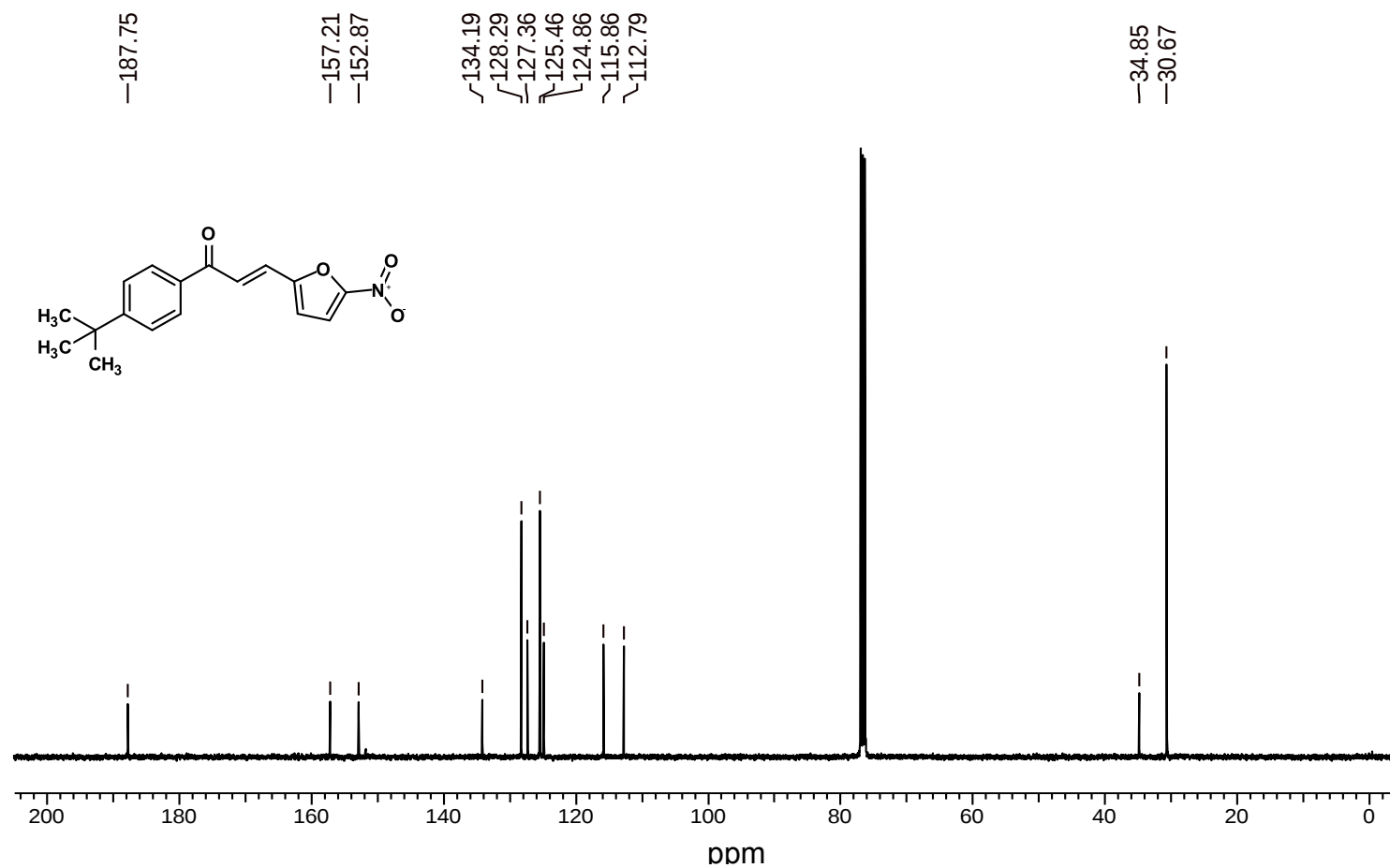
Anexo 19 - Espectro de IV do (2E)-3-(3-nitrofenil)-1-[4-(piperidin-1-il)fenil]prop-2-en-1-ona, (LabMol67) (68), KBr.



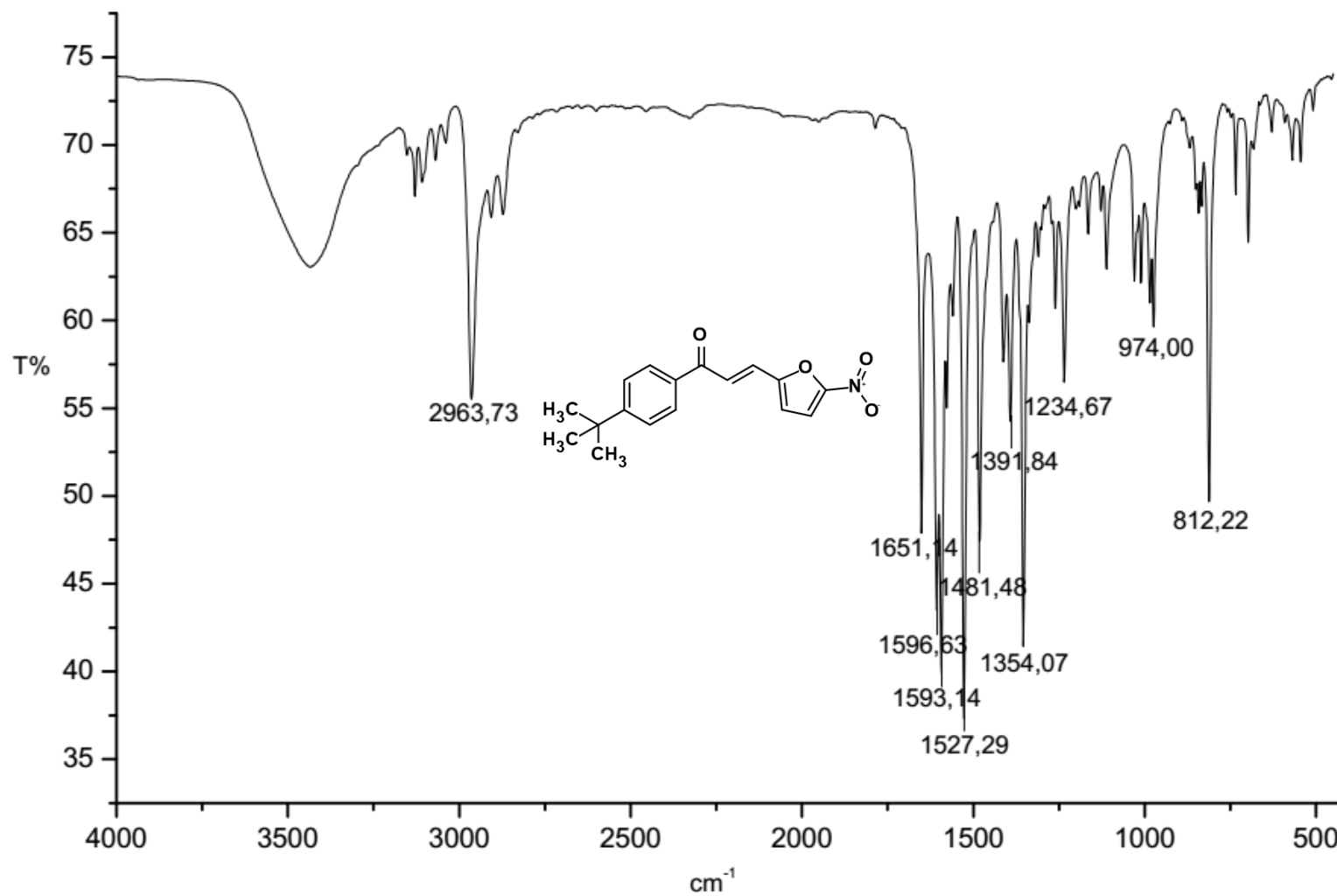
Anexo 20 - Espectro de massas e cromatograma do (2E)-3-(3-nitrofenil)-1-[4-(piperidin-1-il)fenil]prop-2-en-1-ona, (LabMol67) (68).



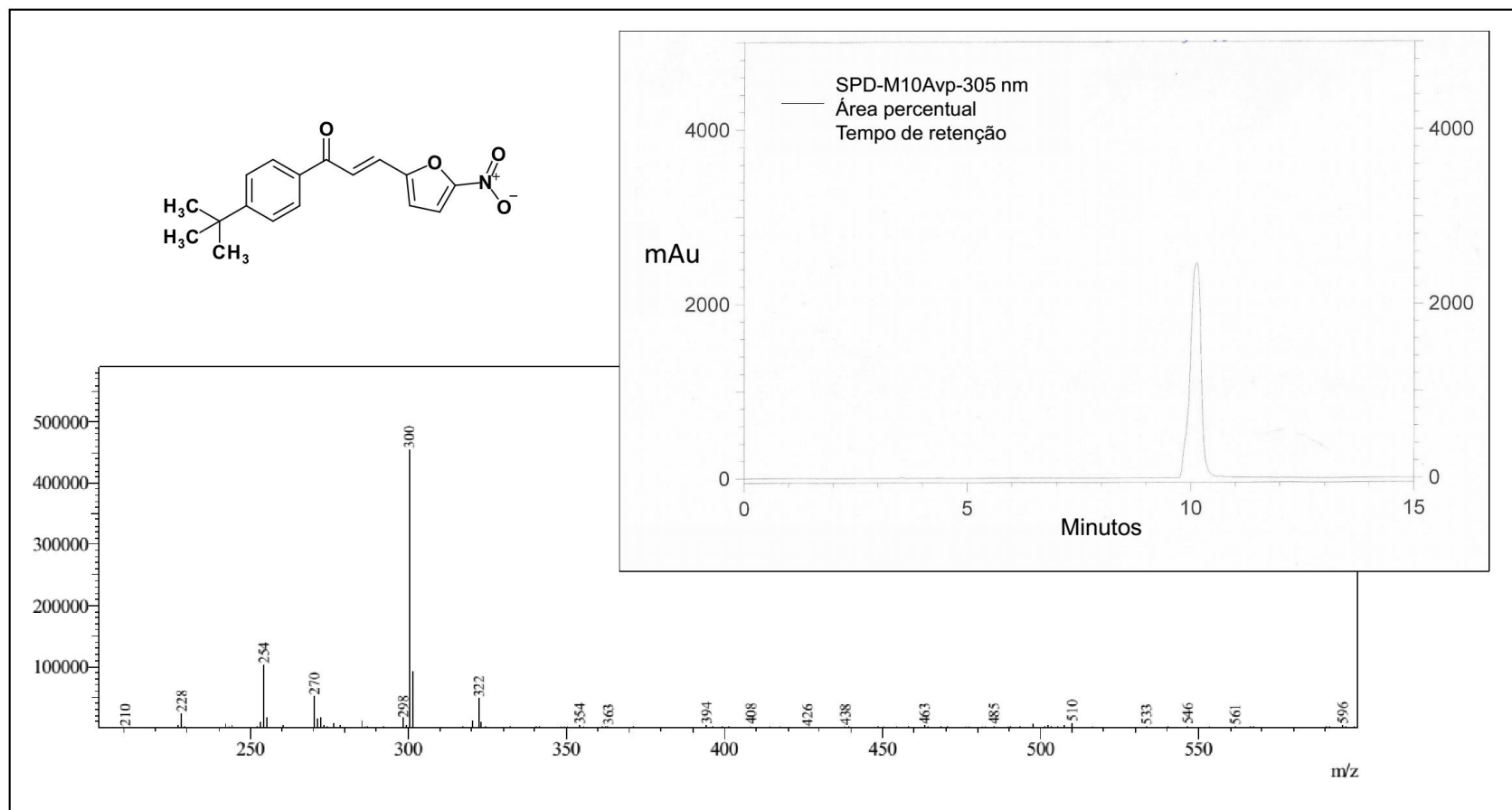
Anexo 21 - Espectro de RMN ¹H do (2E)-1-(4-tert-butilfenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-one (LabMol68) (69), 400 MHz, CDCl₃



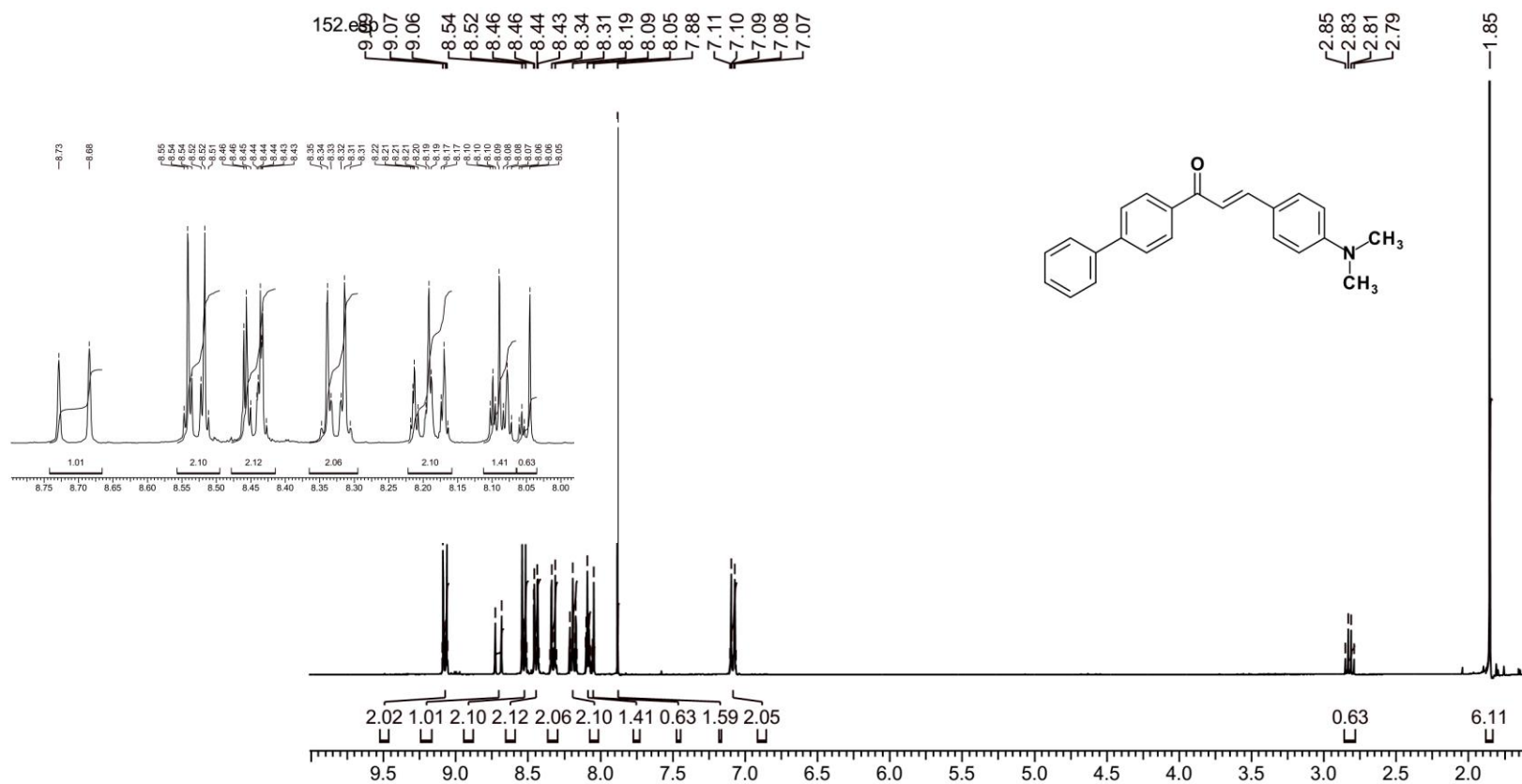
Anexo 22 - Espectro de RMN ¹³C (2E)-1-(4-tert-butilfenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-one (LabMol68) (69), 400 MHz, CDCl₃



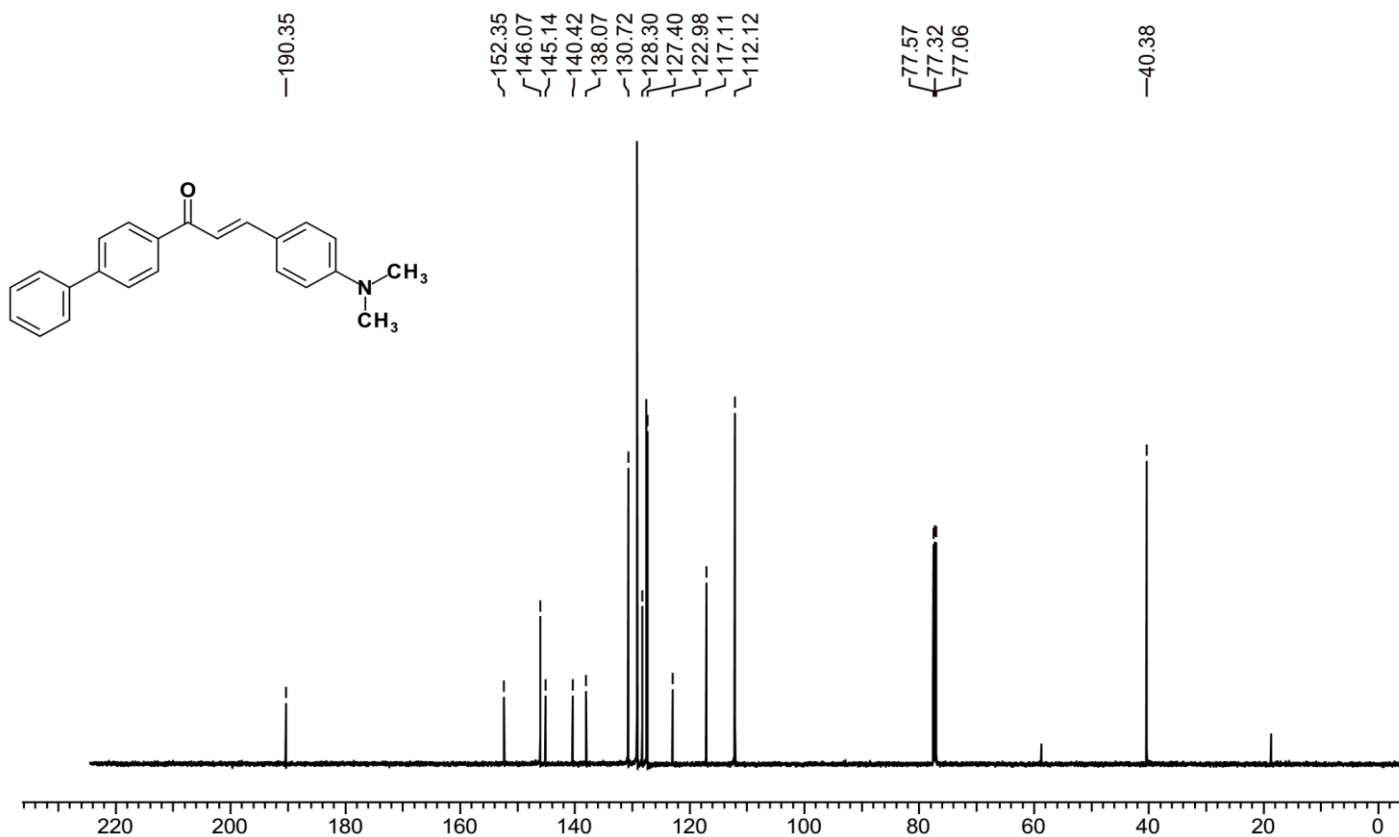
Anexo 23 - Espectro de IV (2E)-1-(4-tert-butilfenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-one (LabMol68) (69), KBr.



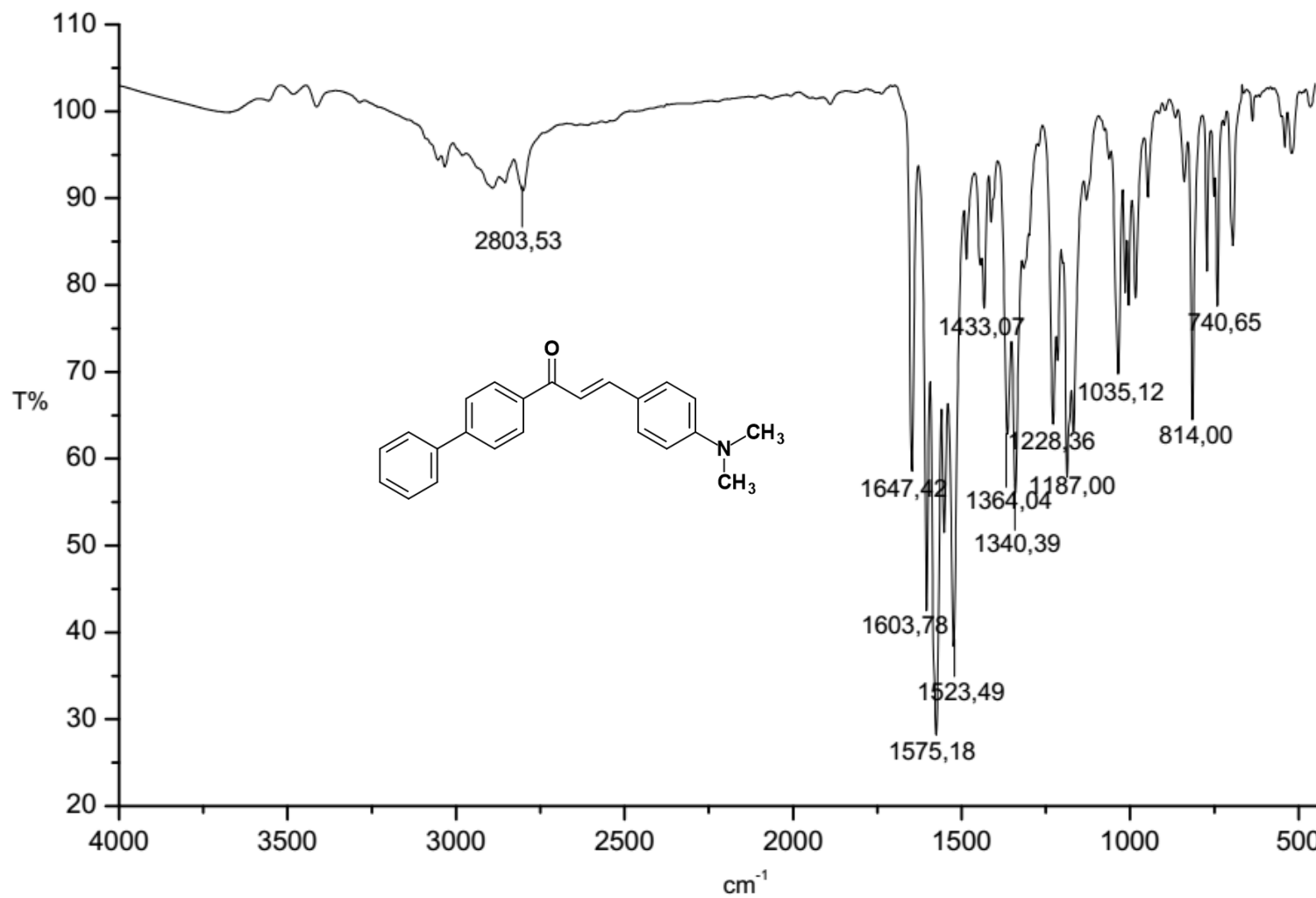
Anexo 24 - Espectro de massas e cromatograma (2E)-1-(4-tert-butilfenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-one (**LabMol68**) (**69**).



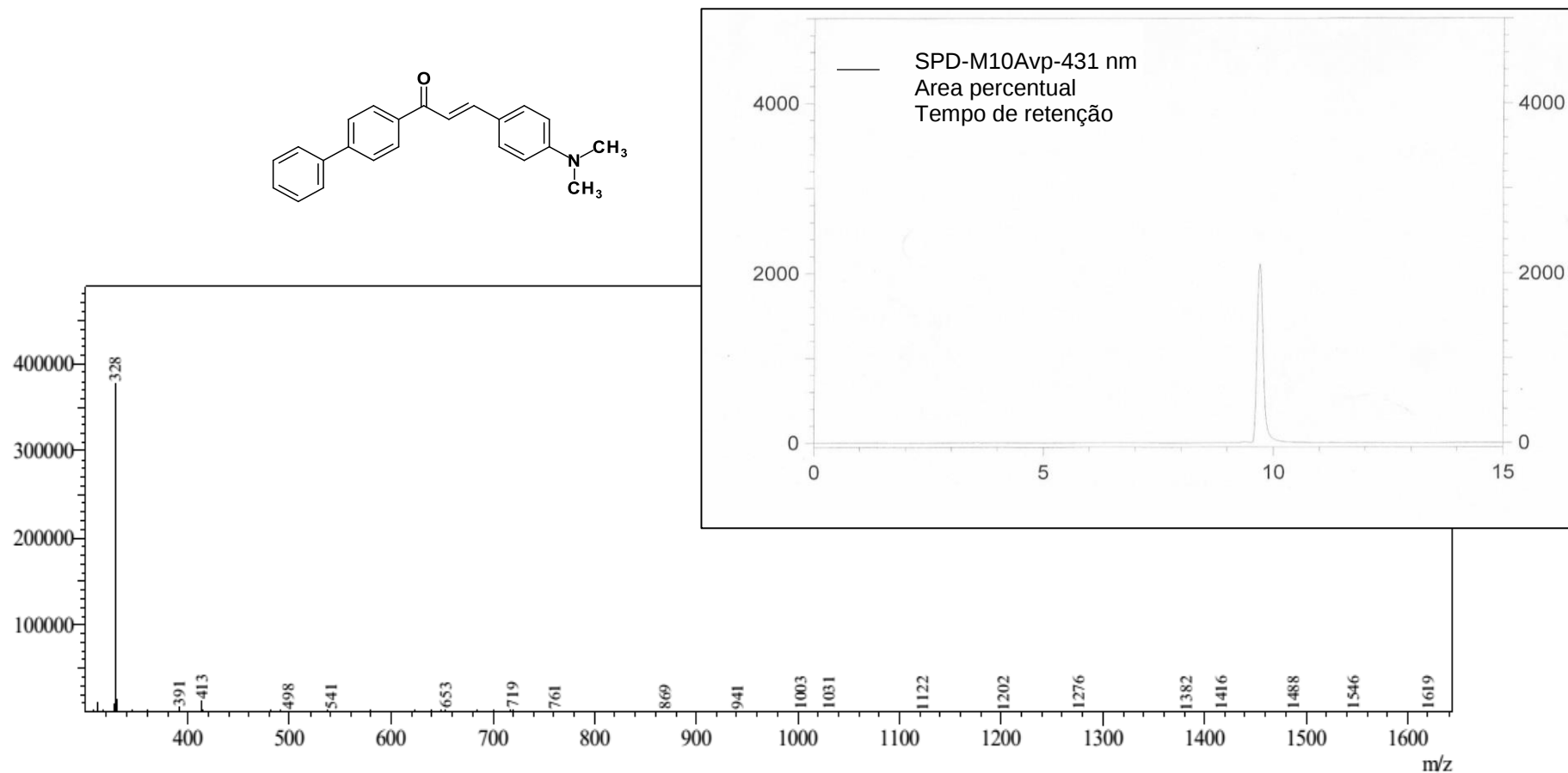
Anexo 25 - Espectro de RMN ¹H do (2E)-3-[4-dimetilamino]fenil]-1-(4-bifenil)prop-2-em-1-ona (**LabMol69**) (**70**), 400 MHz, CDCl₃



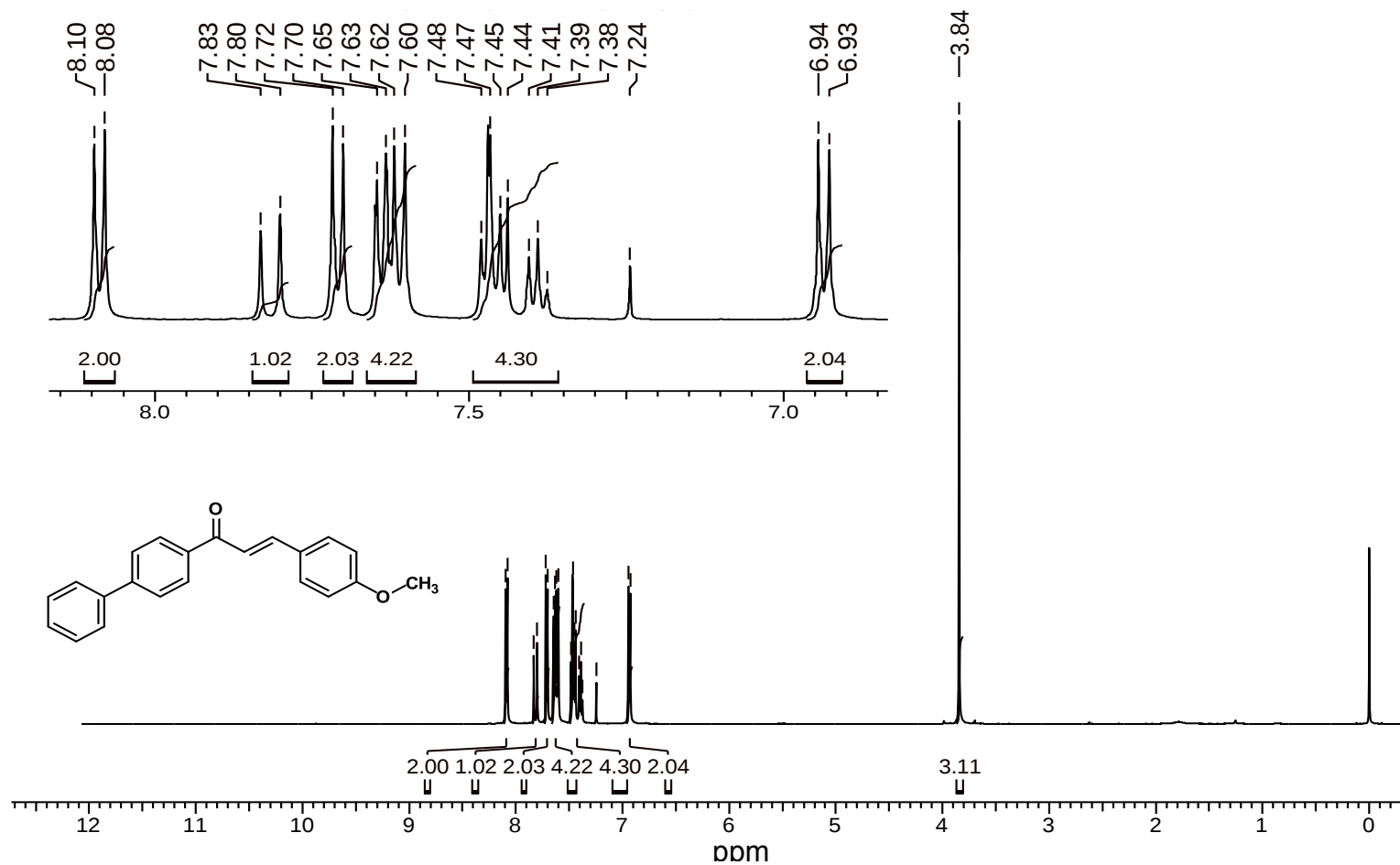
Anexo 26 - Espectro de RMN ¹³C do (2E)-3-[4-dimetilamino]fenil]-1-(4-bifenil)prop-2-em-1-ona (**LabMol69**) (**70**), 400 MHz, CDCl₃



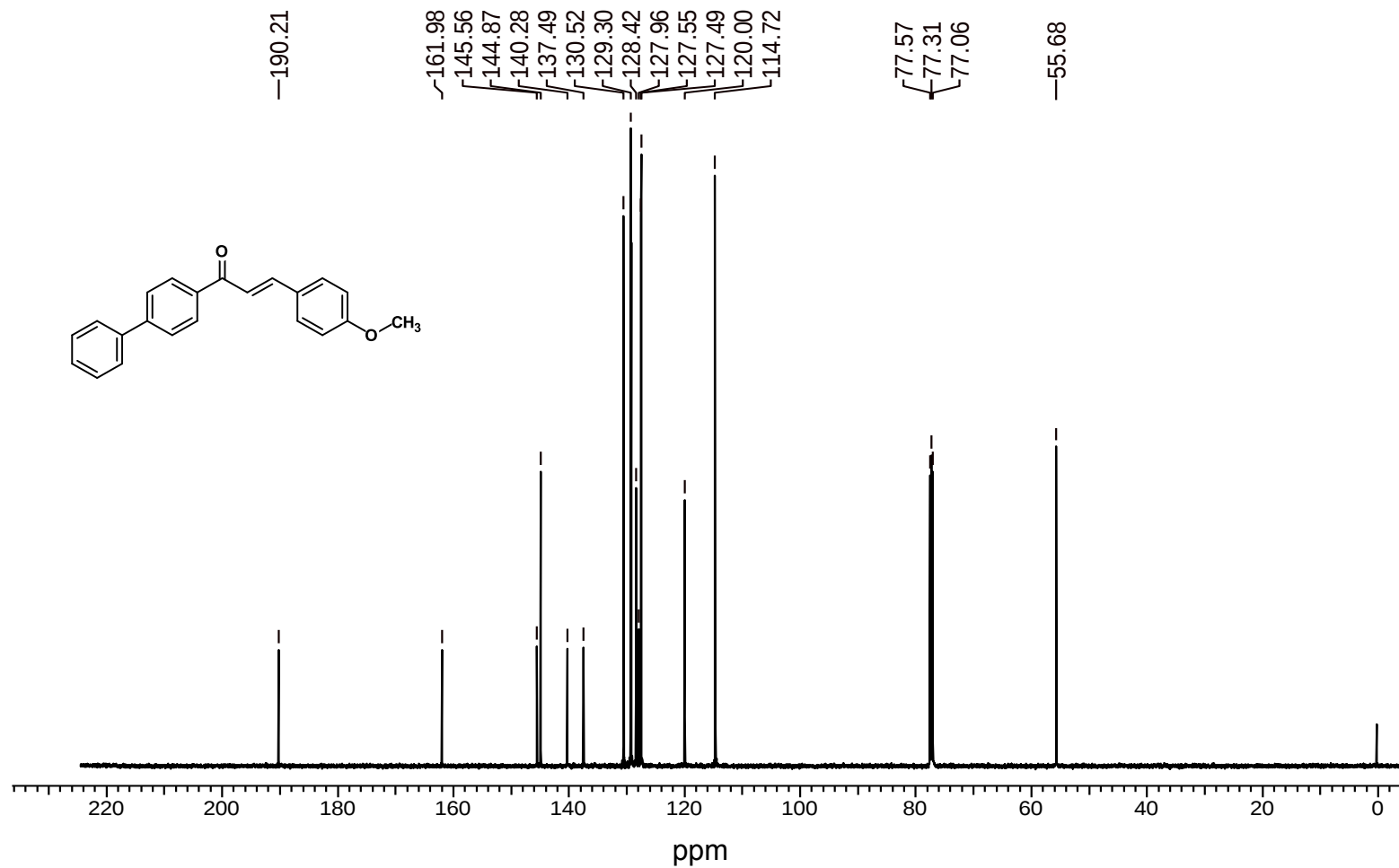
Anexo 27 - Espectro de IV (2E)-3-[4-dimetilamino]fenil]-1-(4-bifenil)prop-2-em-1-ona (**LabMol69**) (70), KBr.



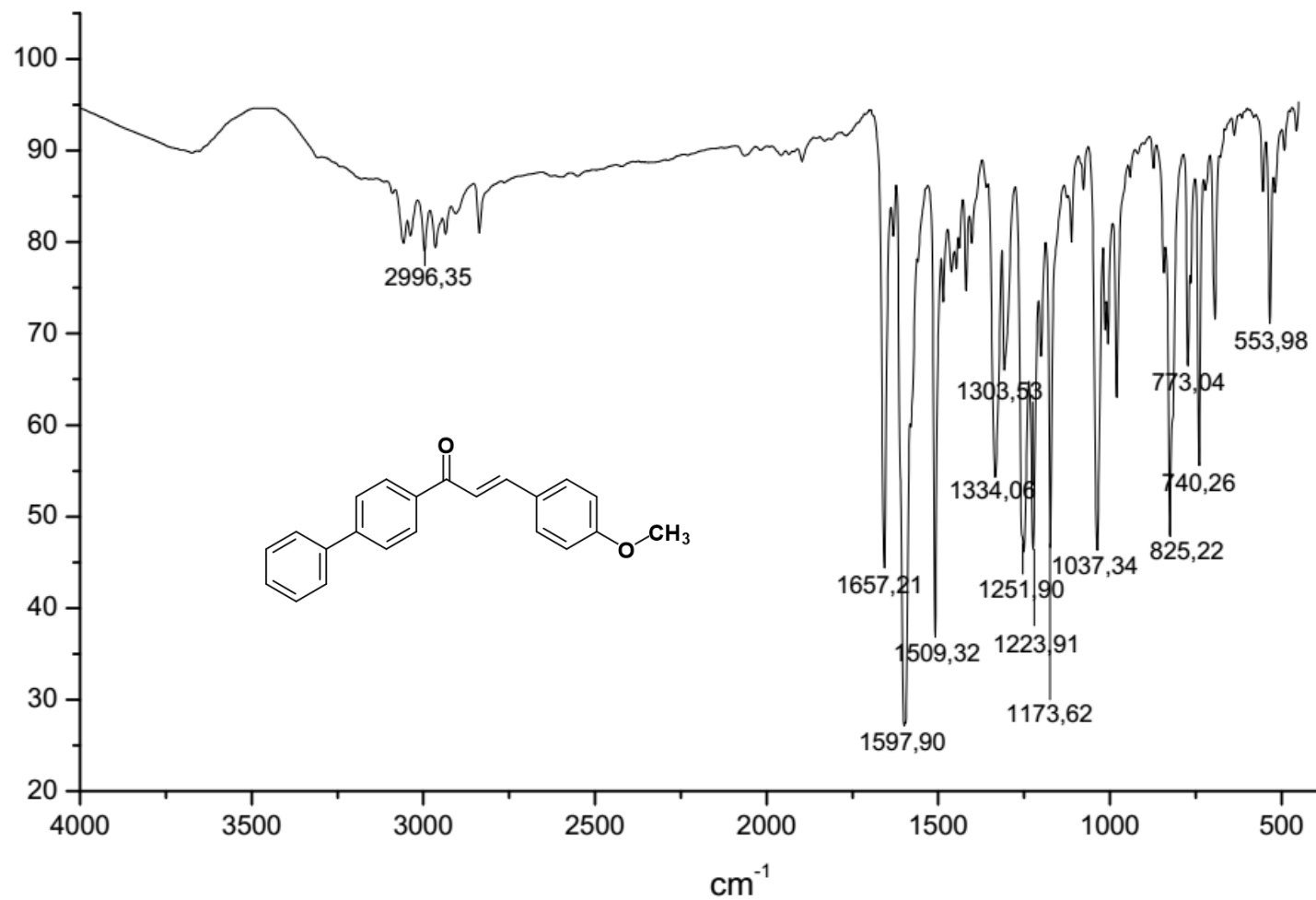
Anexo 28 - Espectro de massas e cromatograma (2E)-3-[4-dimetilamino]fenil]-1-(4-bifenil)prop-2-em-1-ona (LabMol69) (70).



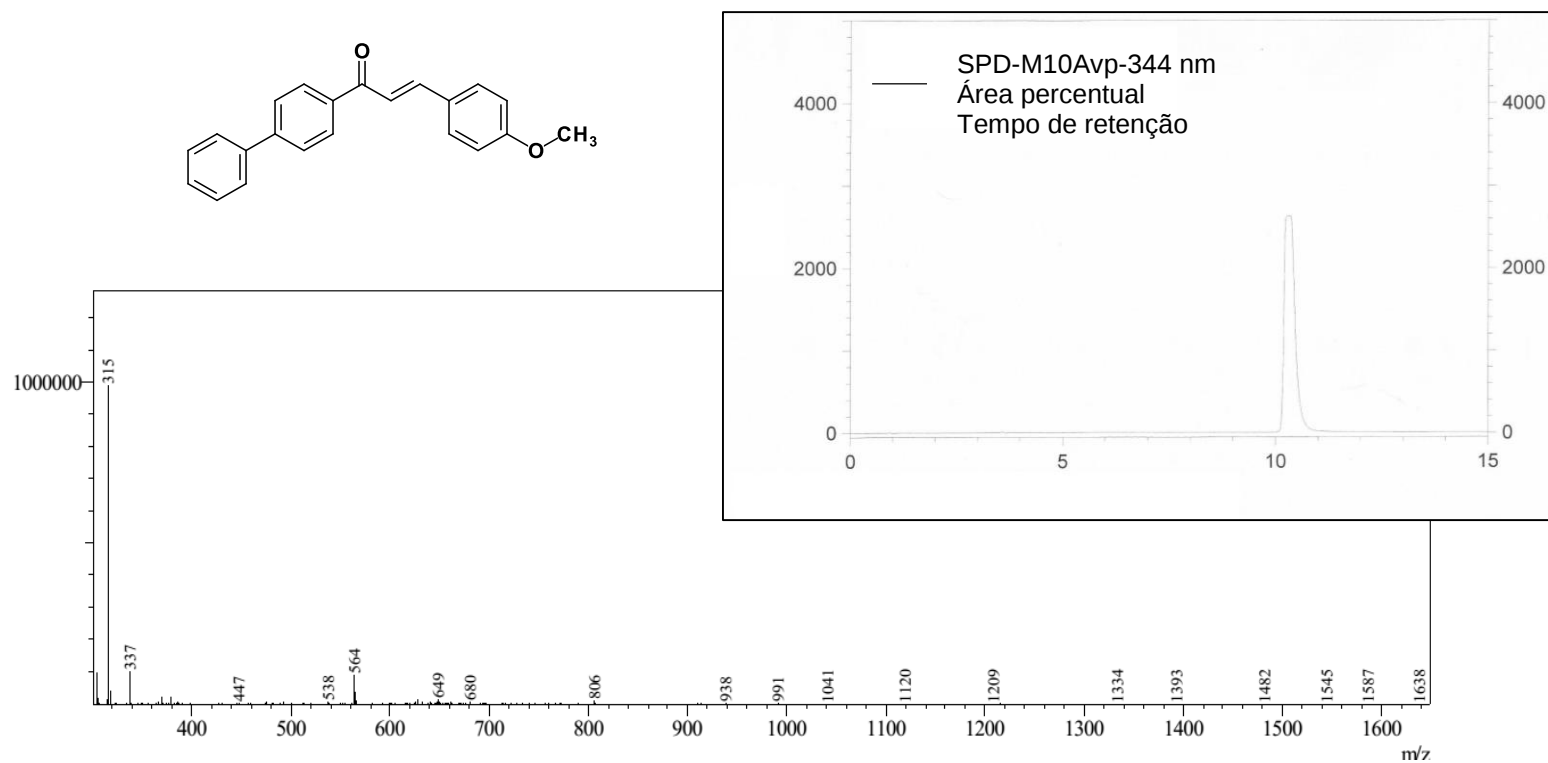
Anexo 29 - Espectro de RMN ¹H do (2E)-3-(4-metoxifenil)-1-(4-bifenil)prop-2-em-1-ona (**LabMol70**) (**71**), 400 MHz, CDCl₃



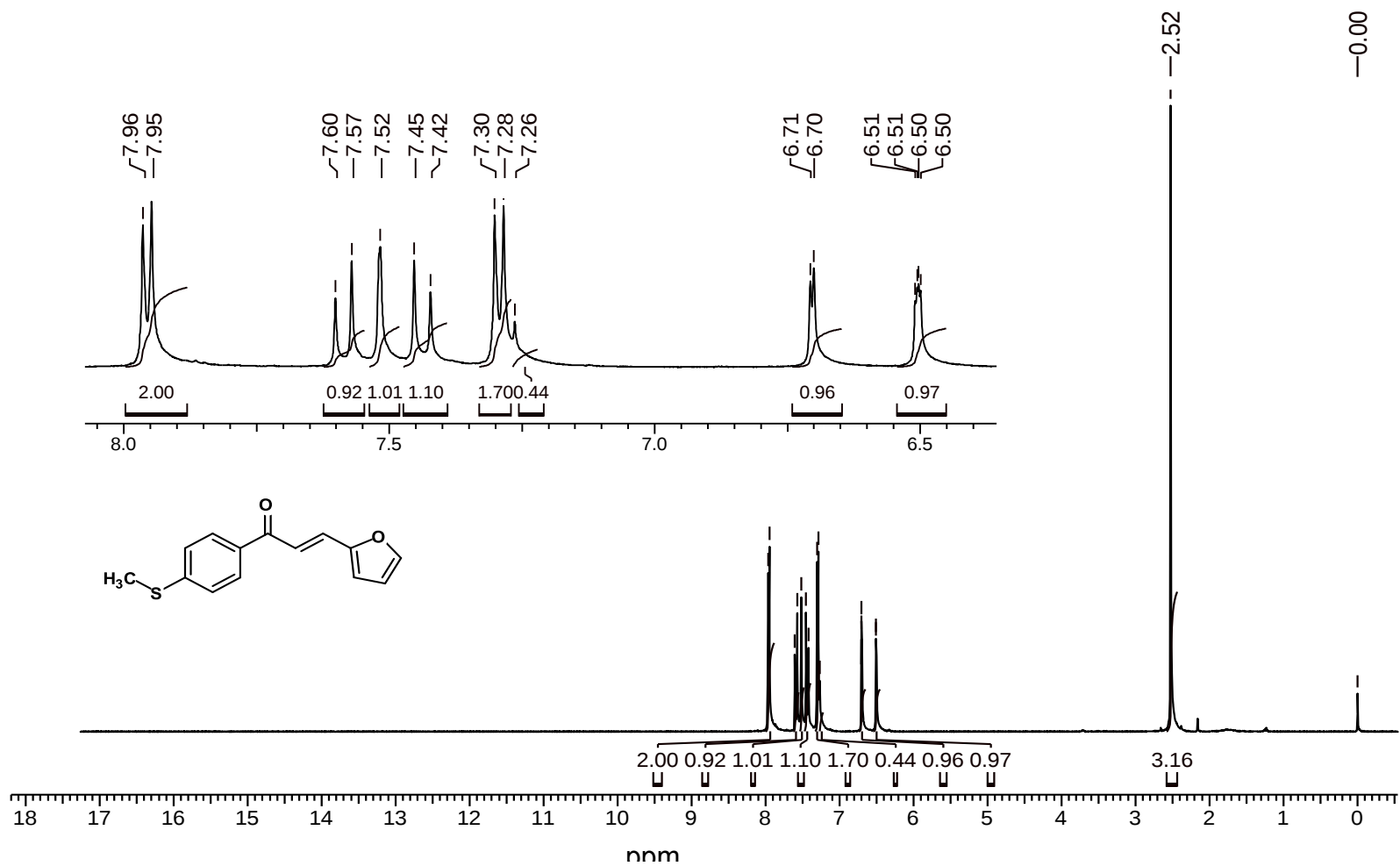
Anexo 30 - Espectro de RMN ¹³C do (2E)-3-(4-metoxifenil)-1-(4-bifenil)prop-2-em-1-ona (**LabMol70**) (**71**), 400 MHz, CDCl₃



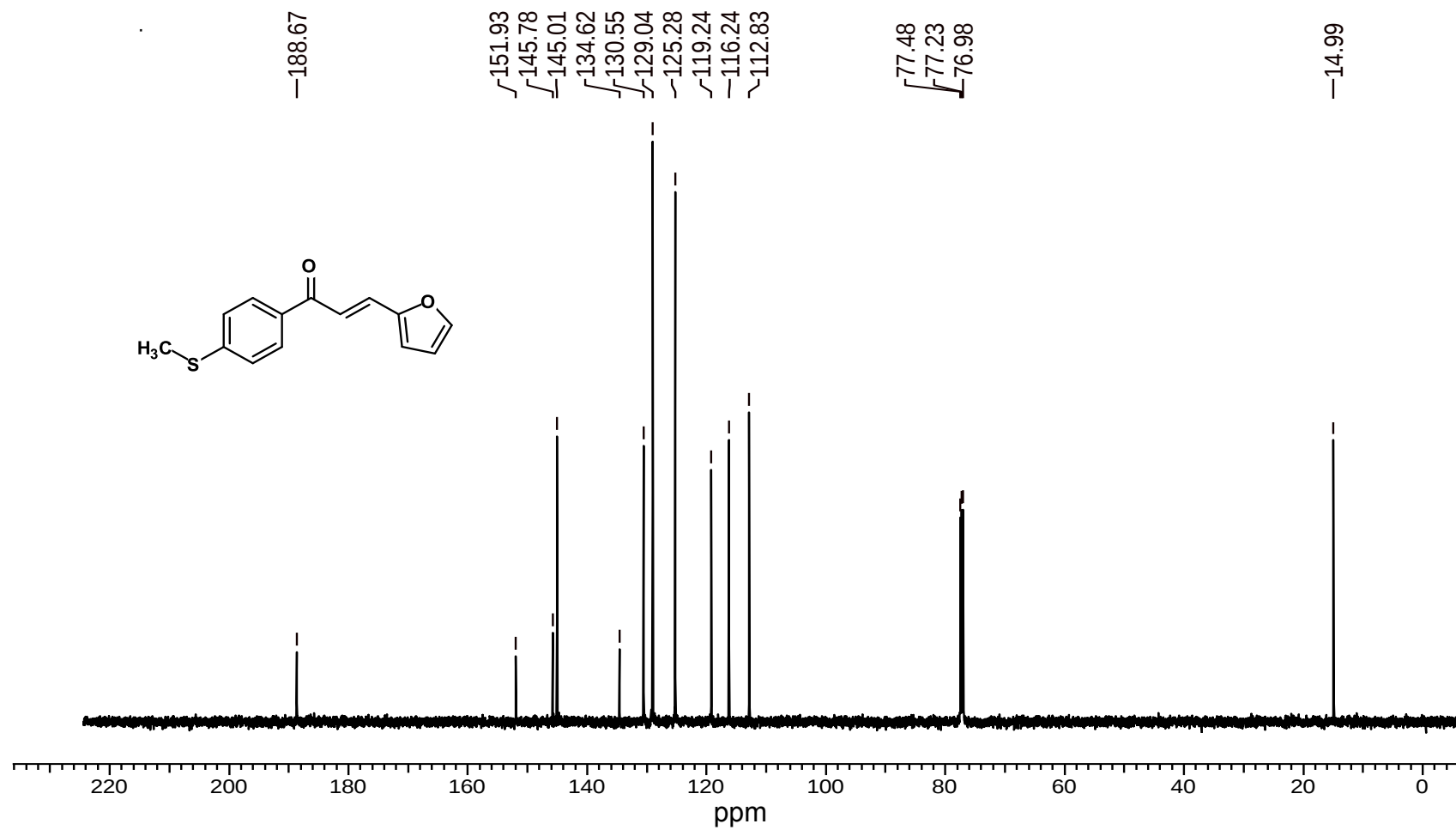
Anexo 31 - Espectro de IV (2E)-3-(4-metoxifenil)-1-(4-bifenil)prop-2-em-1-ona (LabMol70), (71) KBr



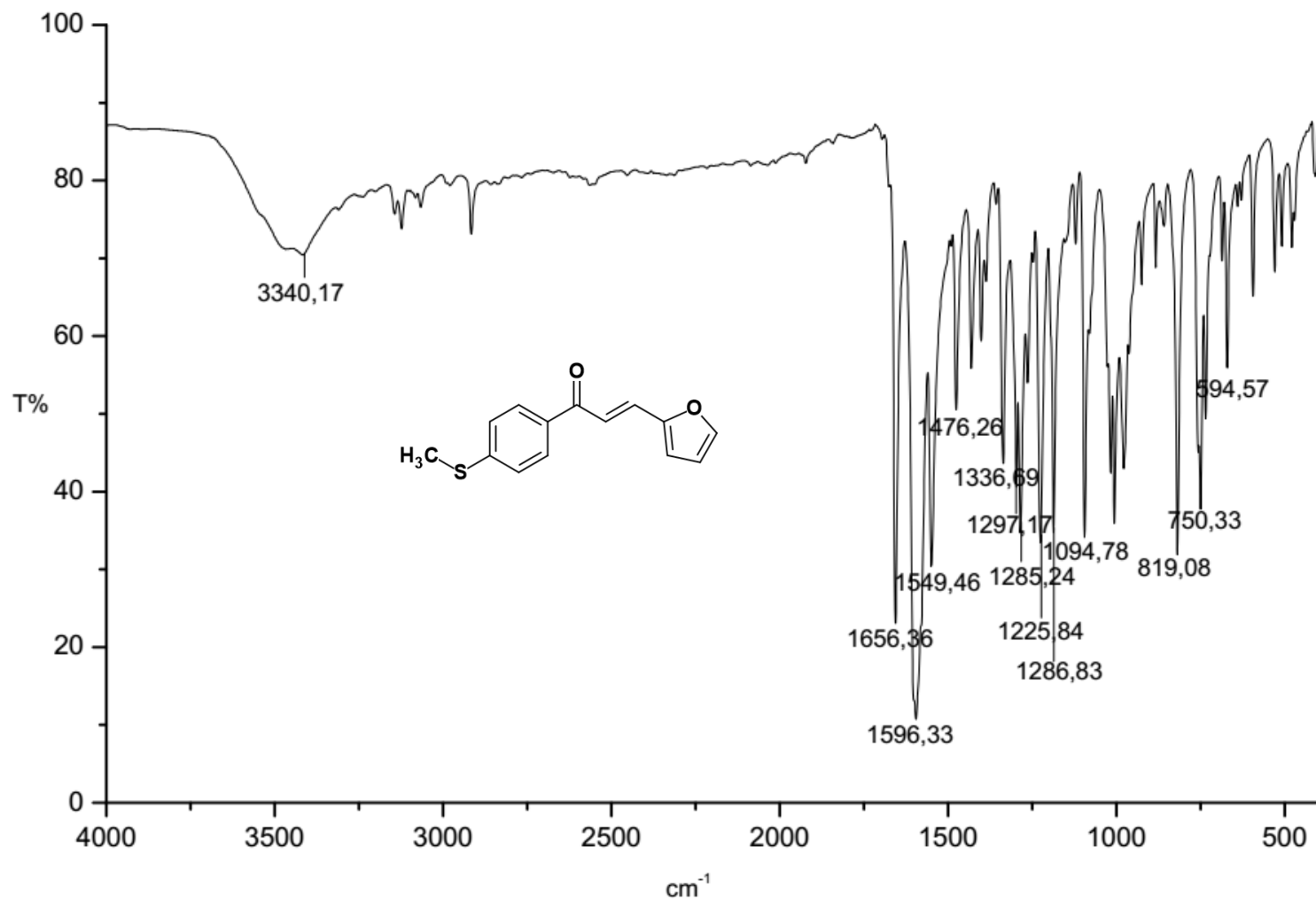
Anexo 32 - Espectro de massas e cromatograma do (2E)-3-(4-metoxifenil)-1-(4-bifenil)prop-2-em-1-ona (**LabMol70**) (**71**).



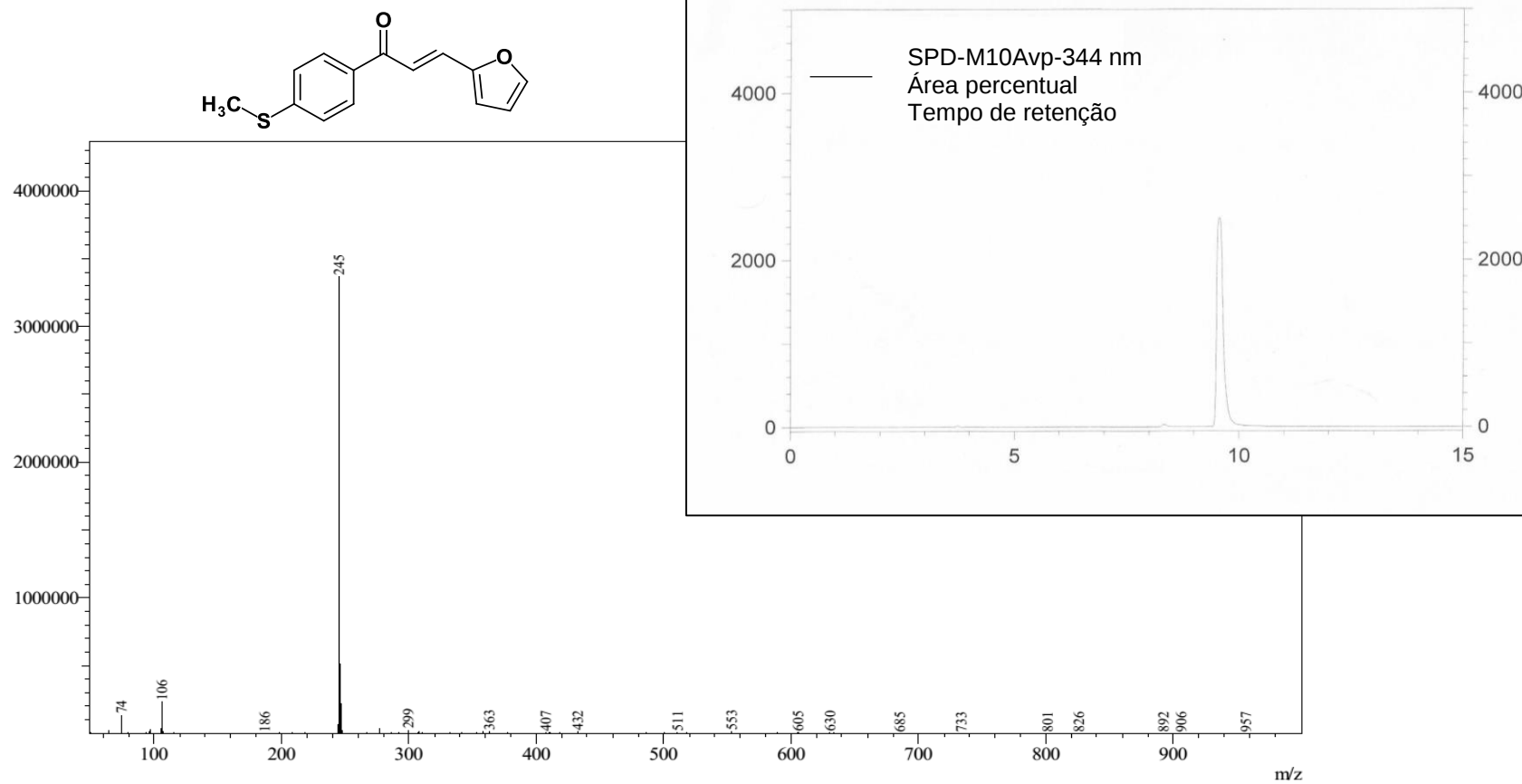
Anexo 33 - Espectro de RMN ¹H (2E)-3-(furan-2-il)-1-[4-(metilsulfonyl)fenil]prop-2-en-1-ona (**LabMol71**) (**72**), 400 MHz, CDCl₃



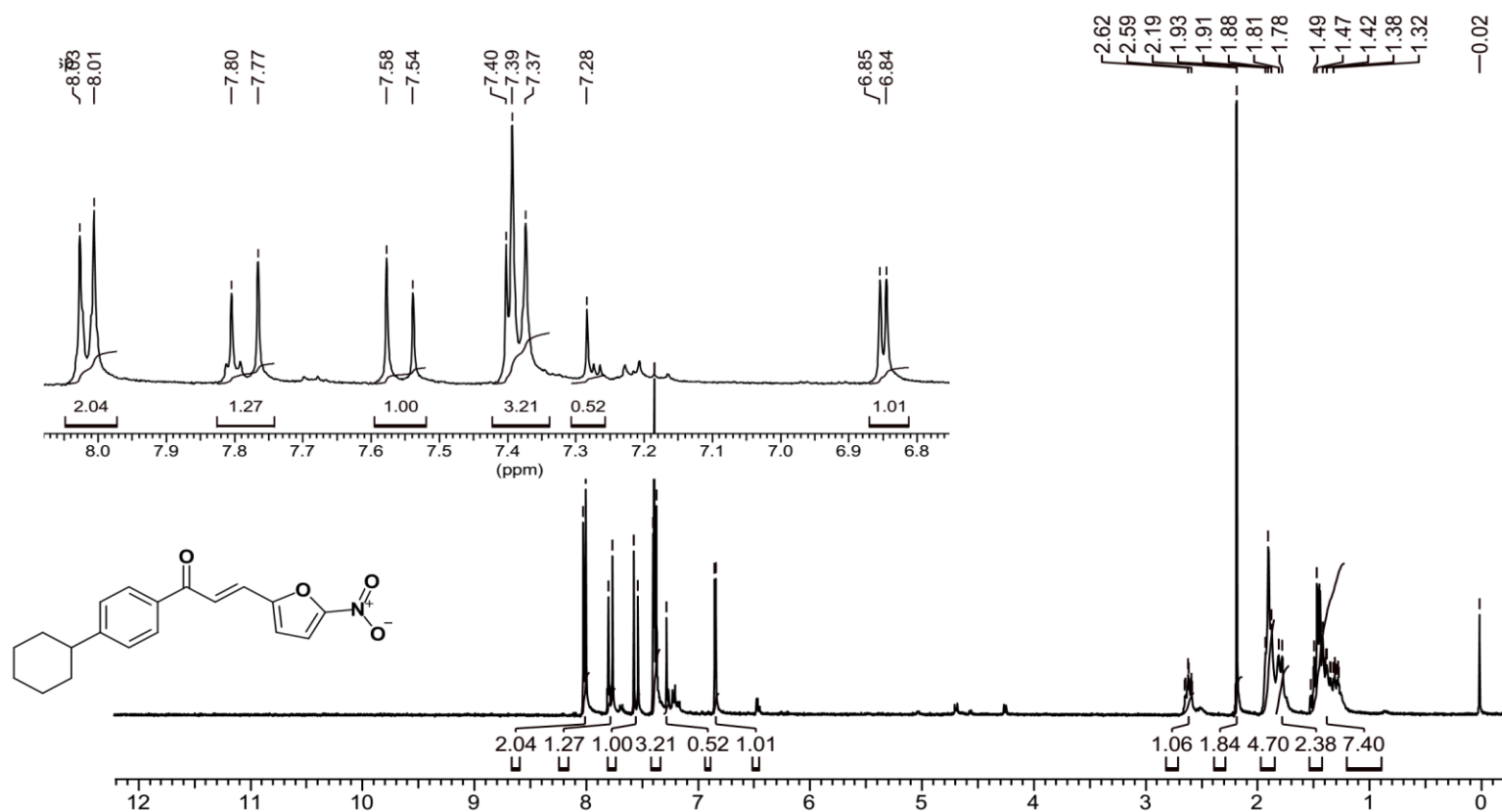
Anexo 34 - Espectro de ¹³C (2E)-3-(furan-2-il)-1-[4-(metilsulfonyl)fenil]prop-2-en-1-ona (**LabMol71**) (**72**), 400 MHz, CDCl₃



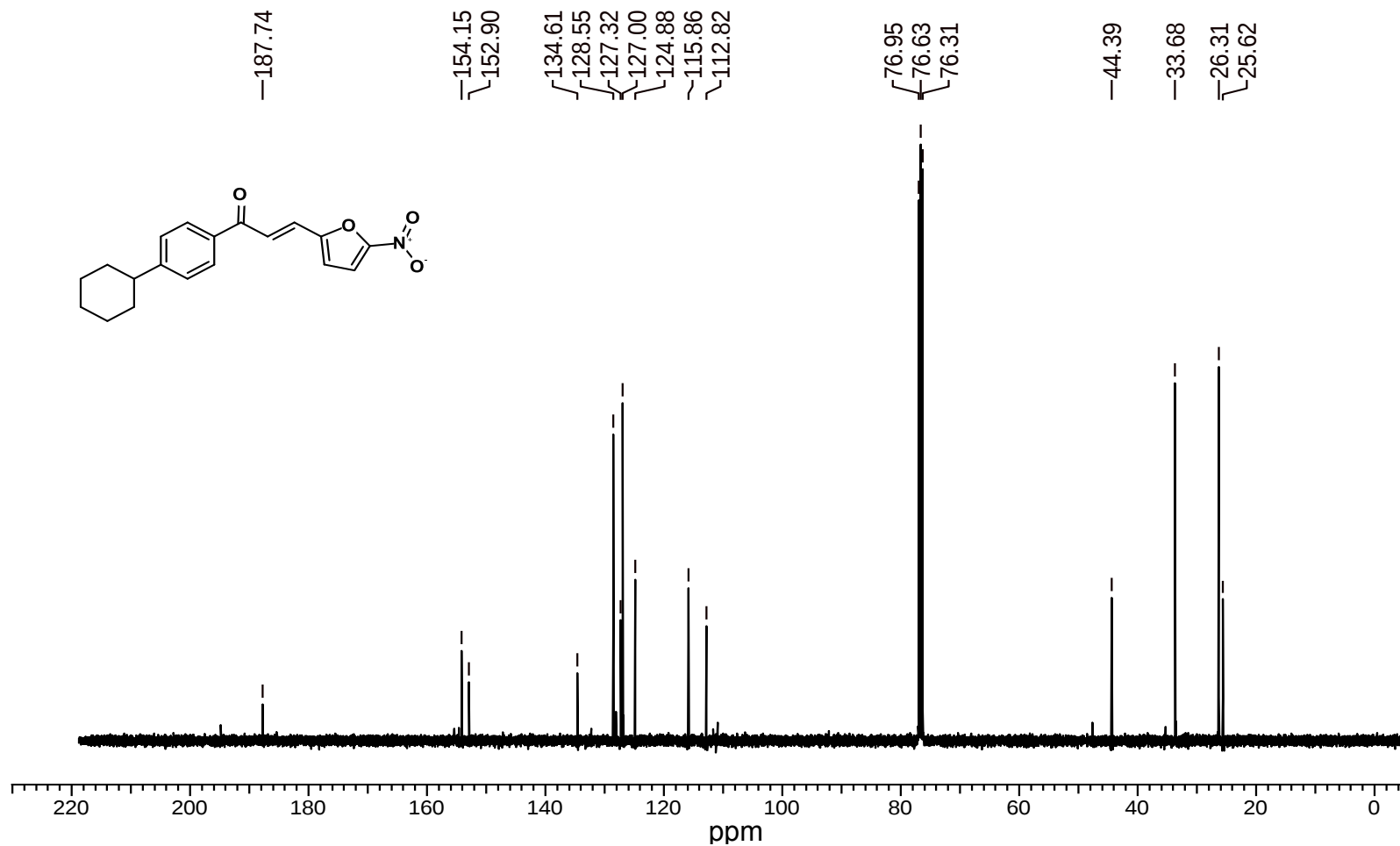
Anexo 35 - Espectro de IV (2E)-3-(furan-2-il)-1-[4-(metilsulfonil)fenil]prop-2-en-1-ona (**LabMol71**) (72), KBr.



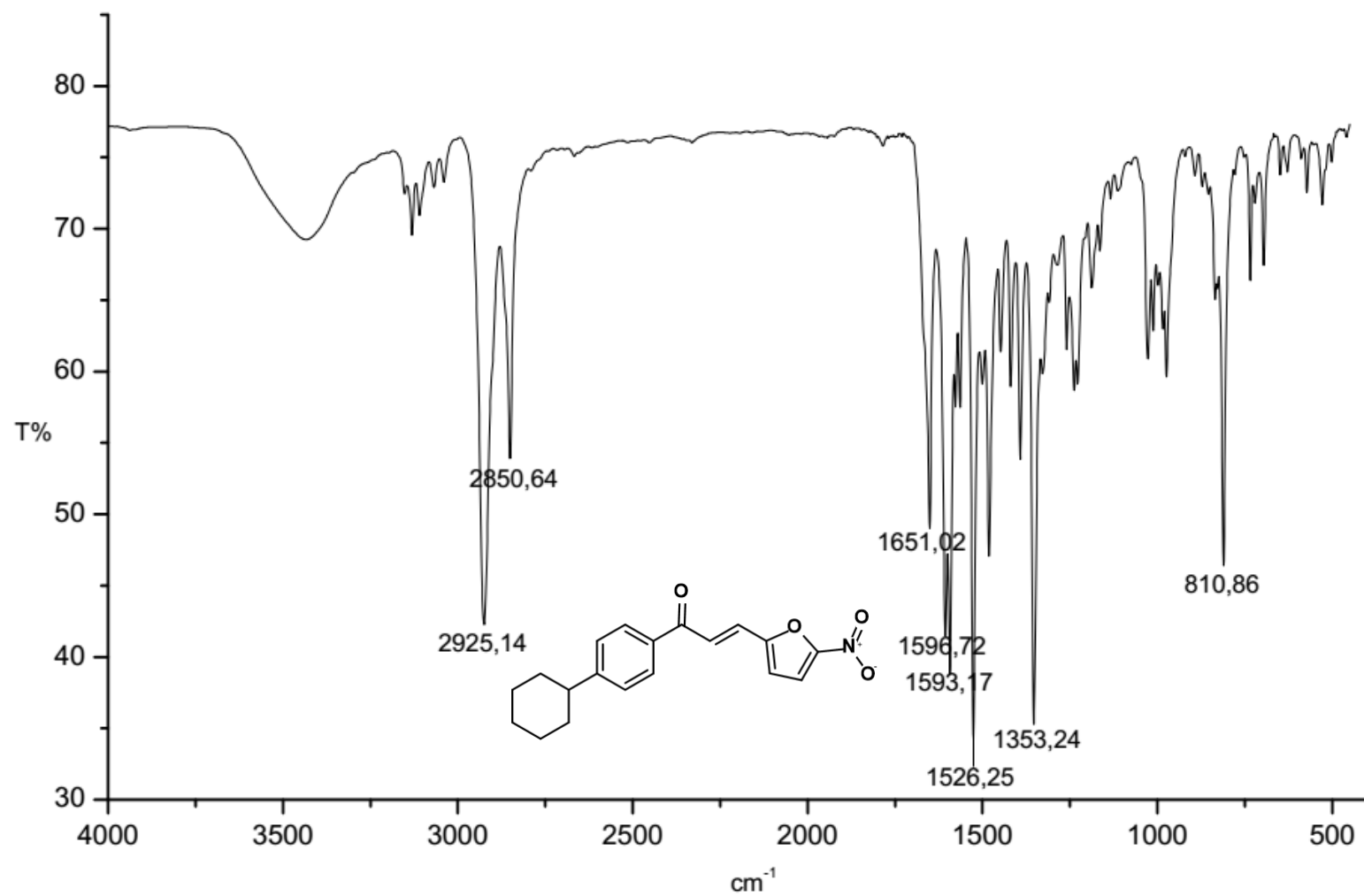
Anexo 36 - Espectro de massas e cromatograma (2E)-3-(furan-2-il)-1-[4-(metilsulfonyl)fenil]prop-2-en-1-ona (**LabMol71**) (**72**).



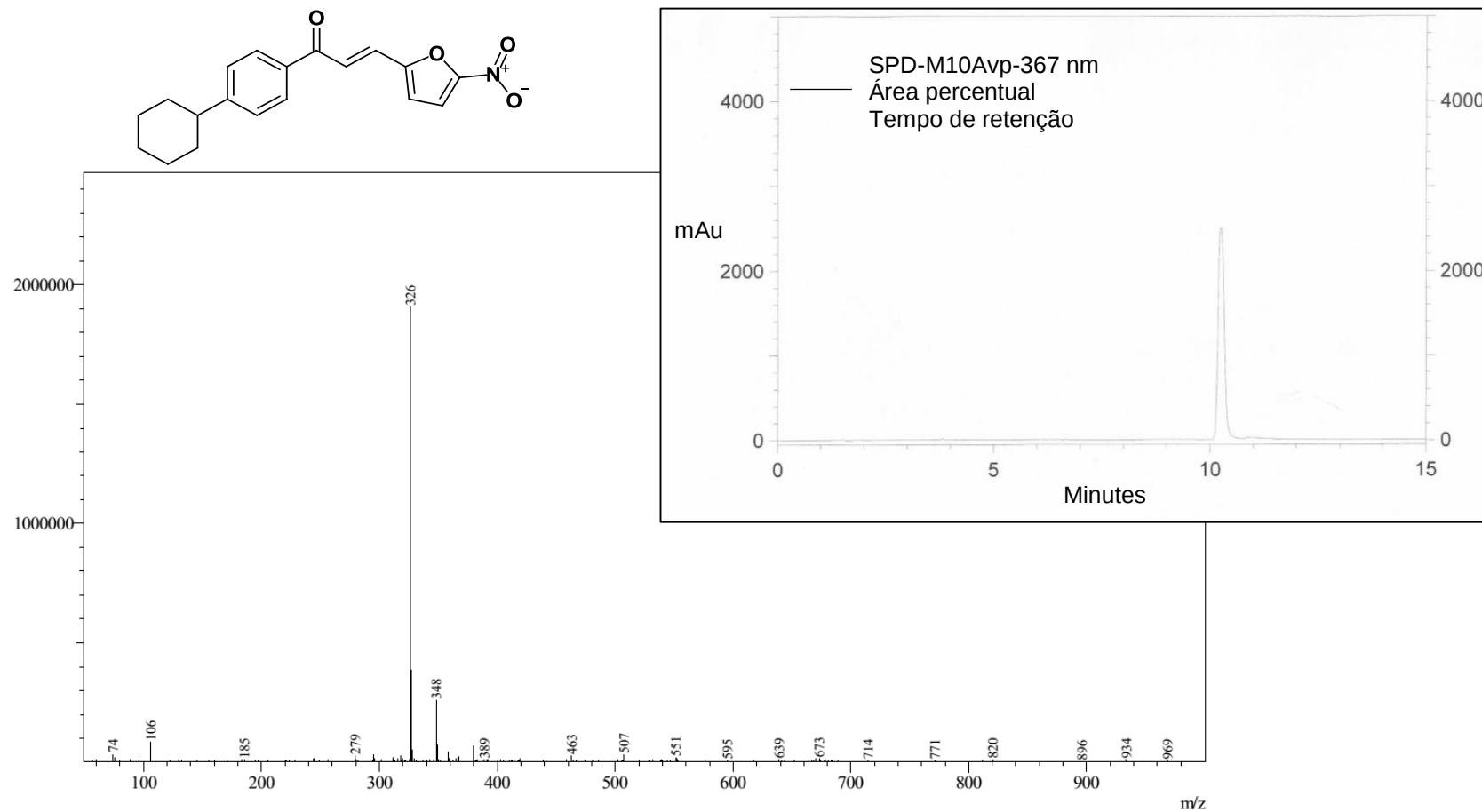
Anexo 37 - Espectro de RMN ¹H (2E)-1-(4-ciclohexilfenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol72**) (**73**), 400 MHz, CDCl₃



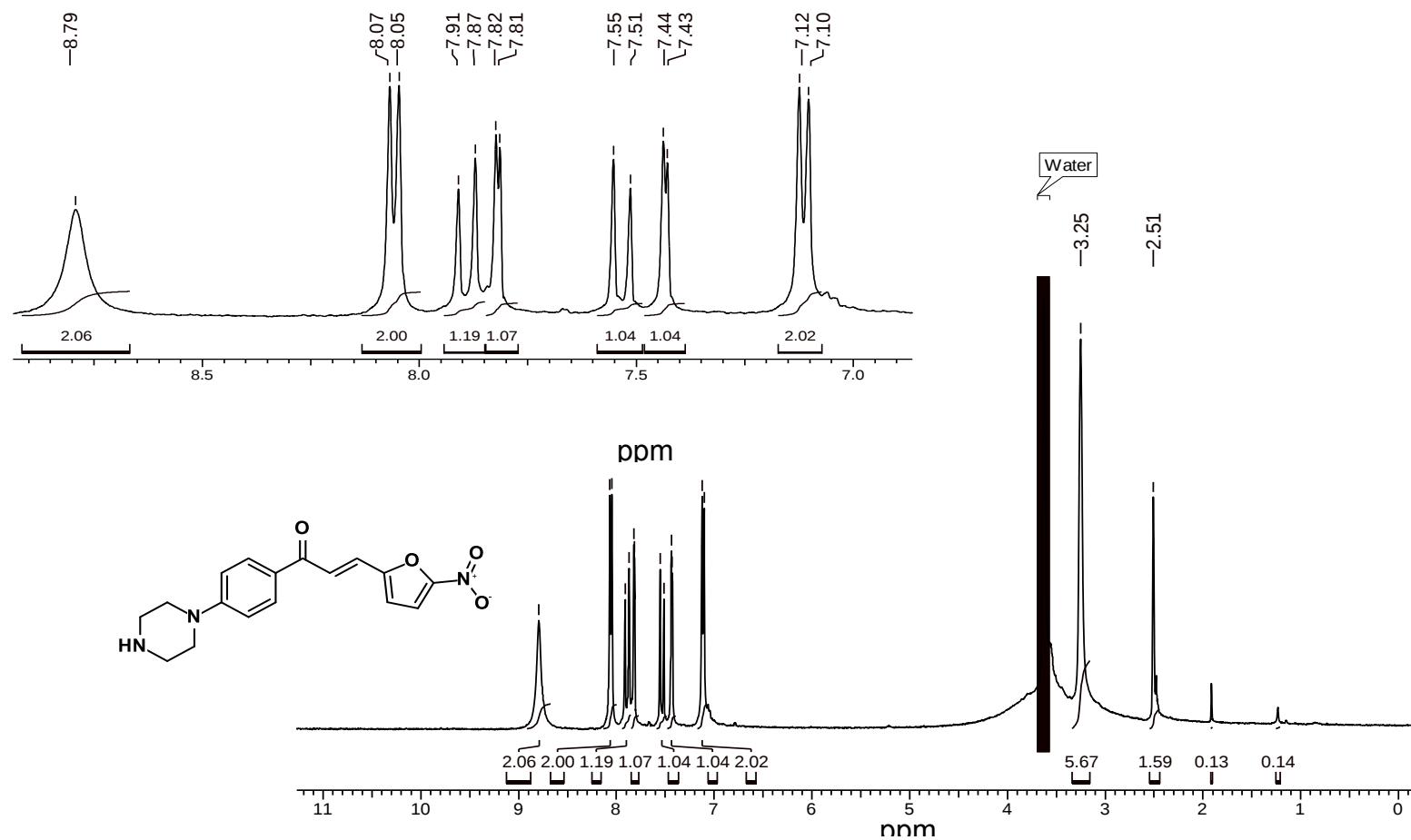
Anexo 38 - Espectro de RMN ¹³C (2E)-1-(4-ciclohexilfenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol72**), (**73**), 400 MHz, CDCl₃



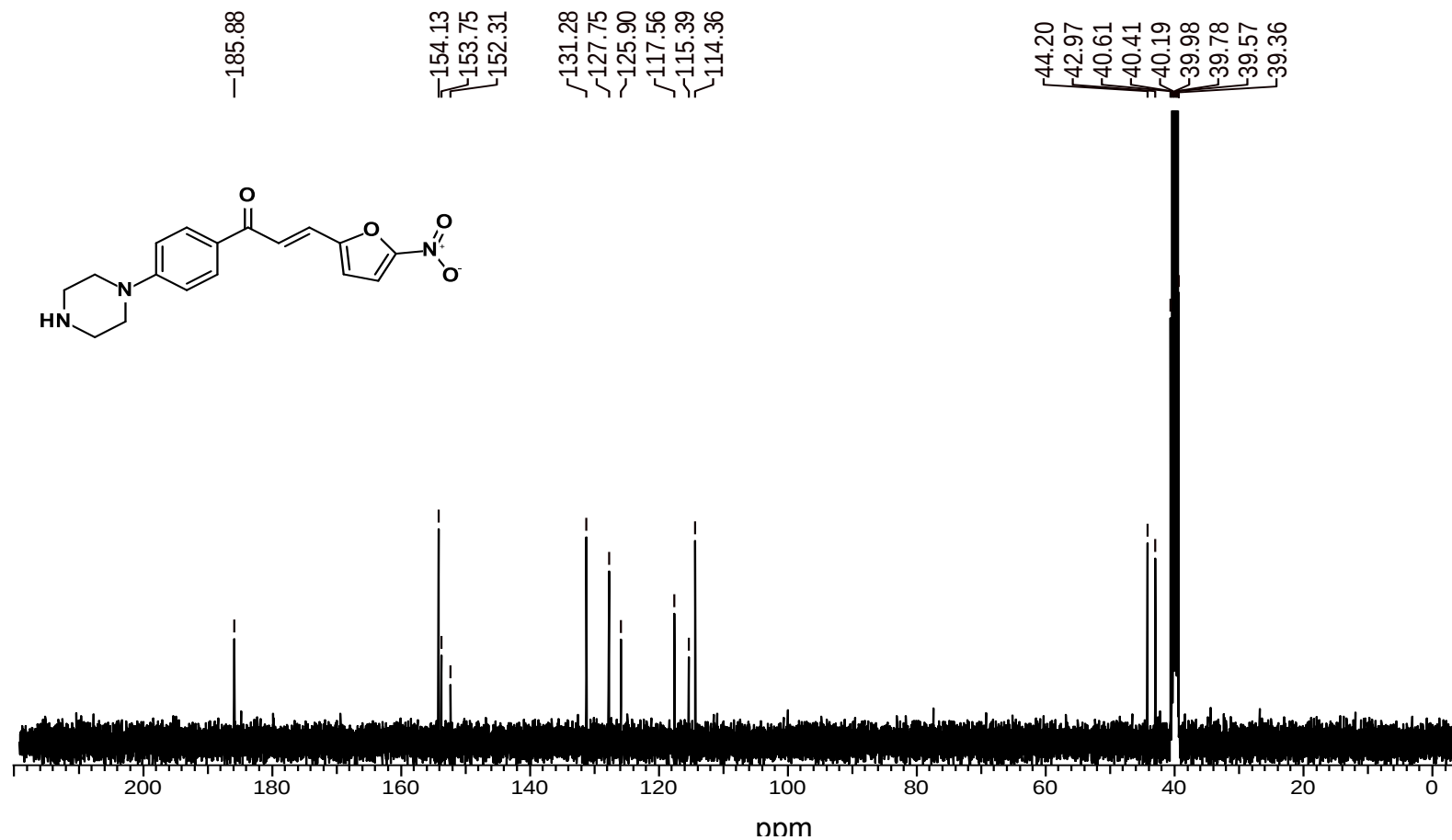
Anexo 39 - Espectro de IV (2E)-1-(4-ciclohexilfenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol72), (73), KBr



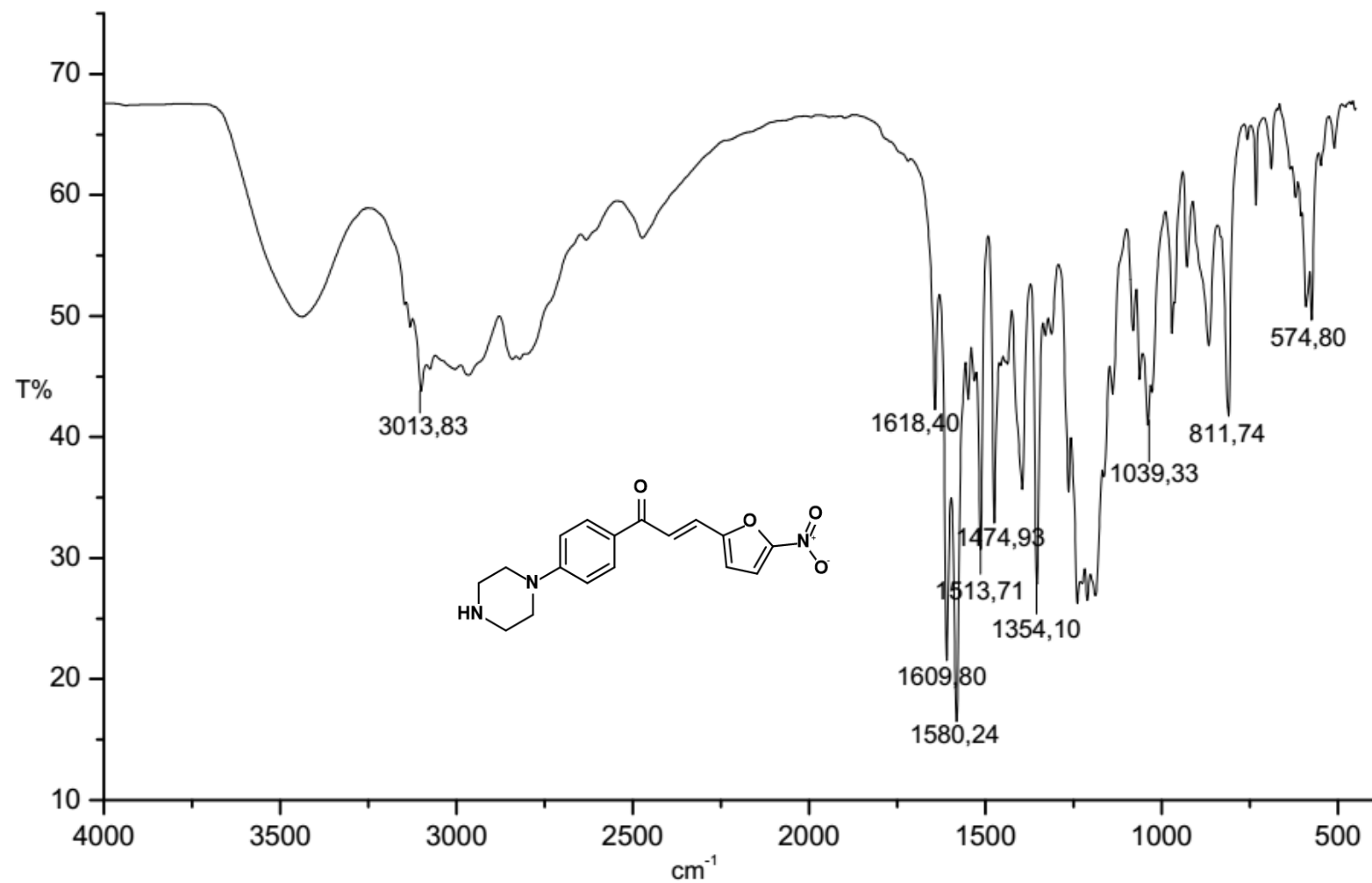
Anexo 40 - Espectro de Massas e cromatograma (2*E*)-1-(4-ciclohexilfenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol72**), (**73**).



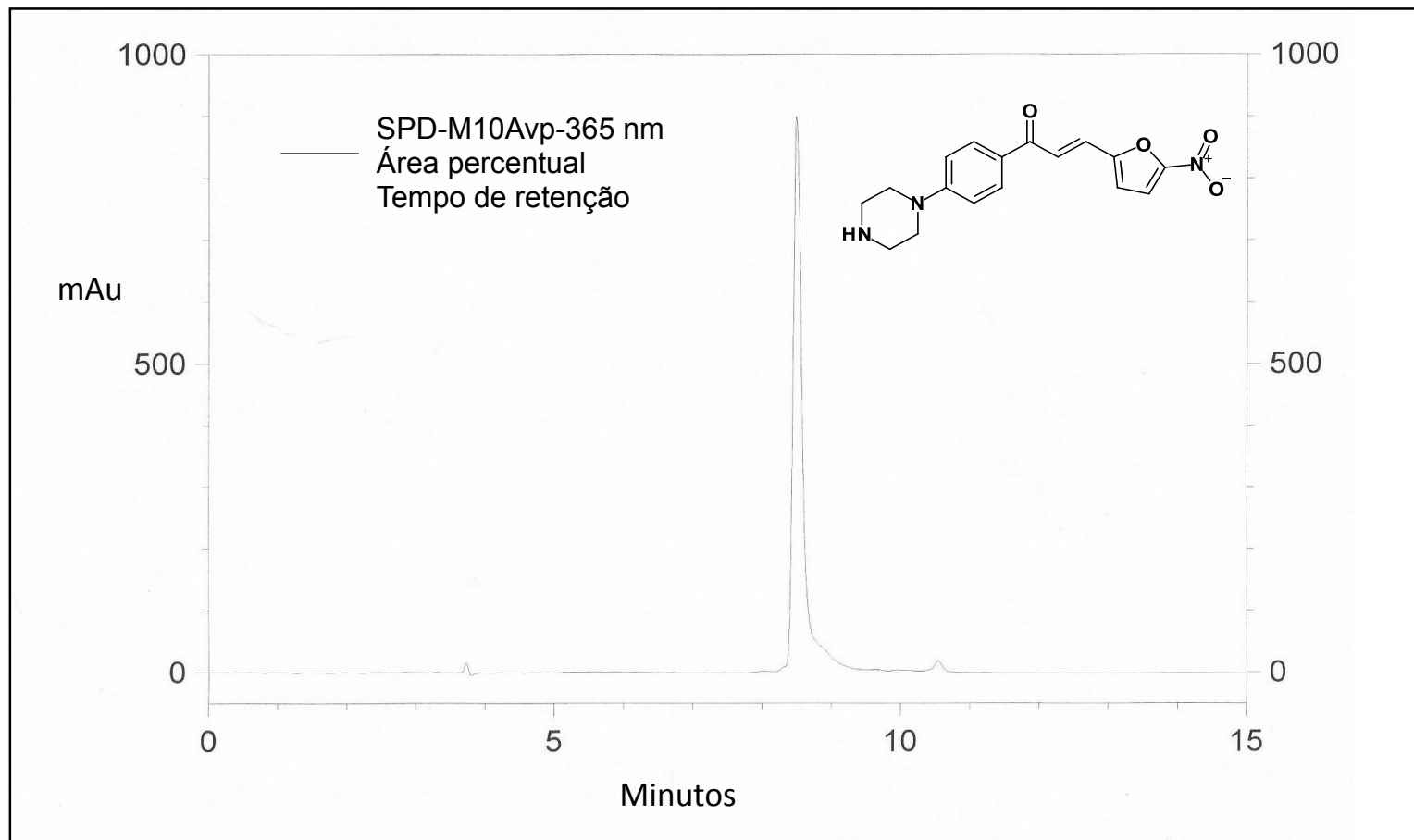
Anexo 41 - Espectro de RMN ¹H (2*E*)-3-(5-nitrofuran-2-il)-1-[4-(piperazin-1-il)fenil]prop-2-en-1-ona (**LabMol73**), (**74**), 400 MHz, DMSO *d*₆



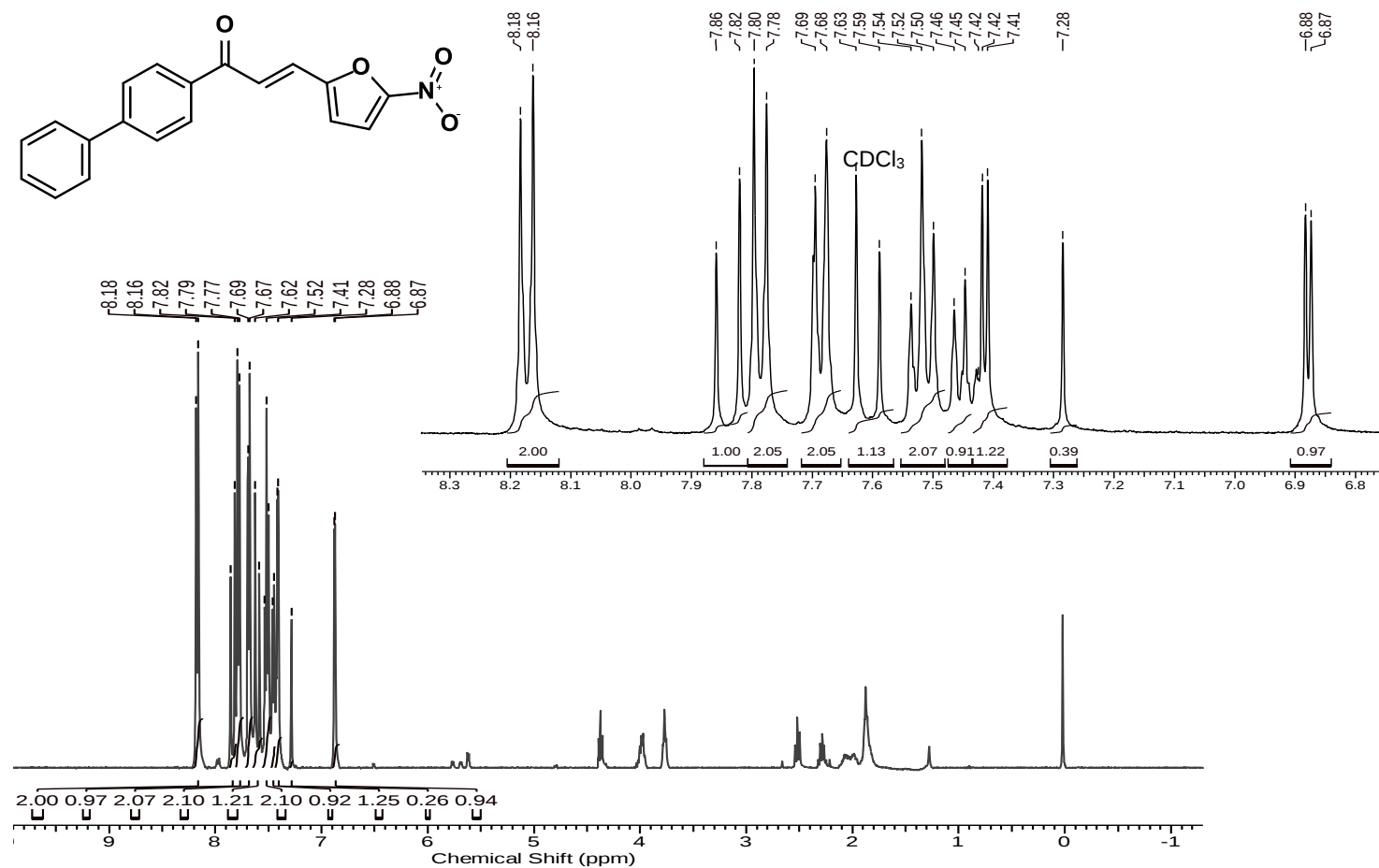
Anexo 42 - Espectro ¹³C (2E)-3-(5-nitrofuran-2-il)-1-[4-(piperazin-1-il)fenil]prop-2-en-1-ona (**LabMol73**), (**74**) 400 MHz, DMSO *d*₆



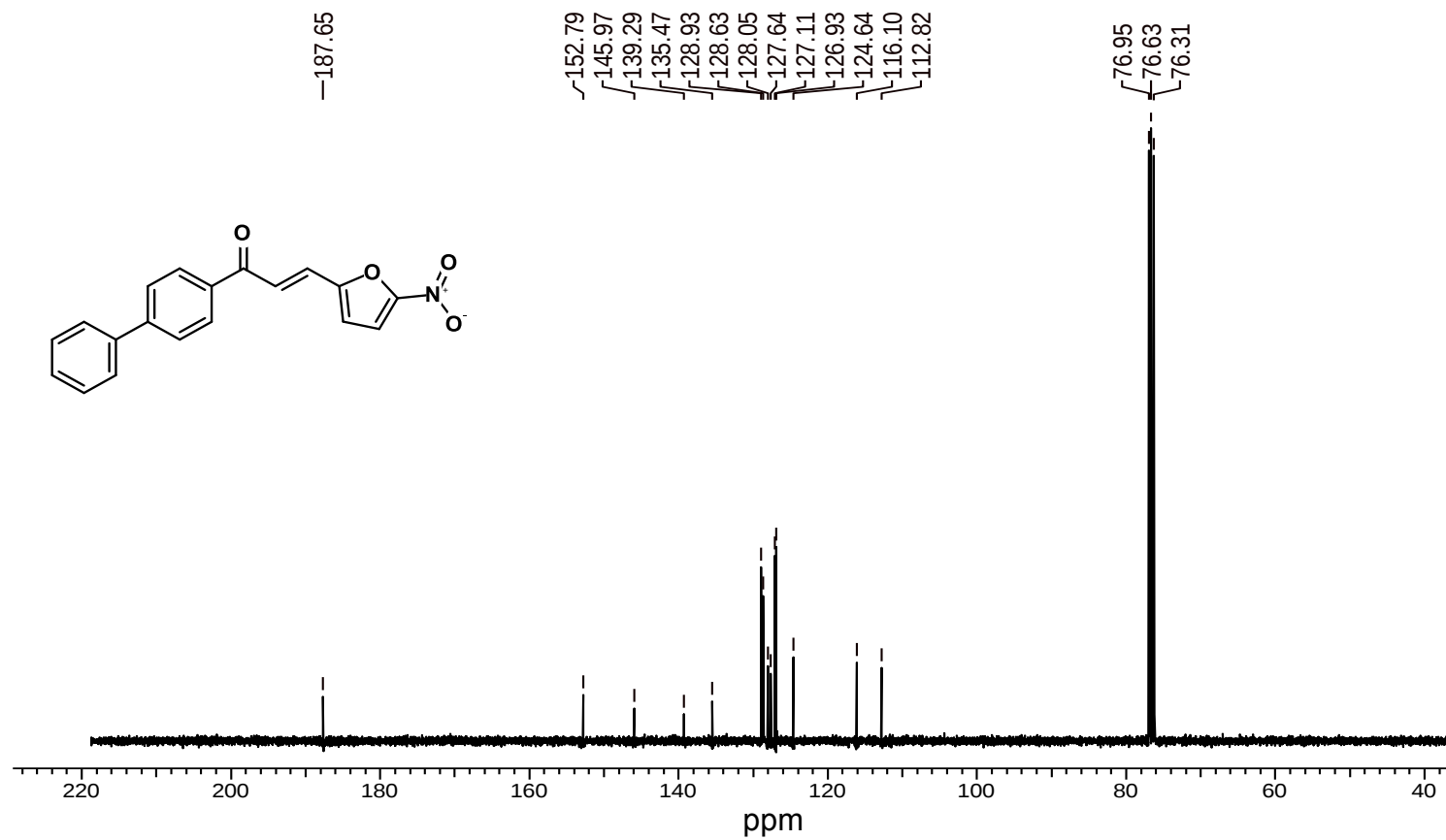
Anexo 43 - Espectro de IV (2E)-3-(5-nitrofuran-2-il)-1-[4-(piperazin-1-il)fenil]prop-2-en-1-ona (**LabMol73**), (**74**), KBr.



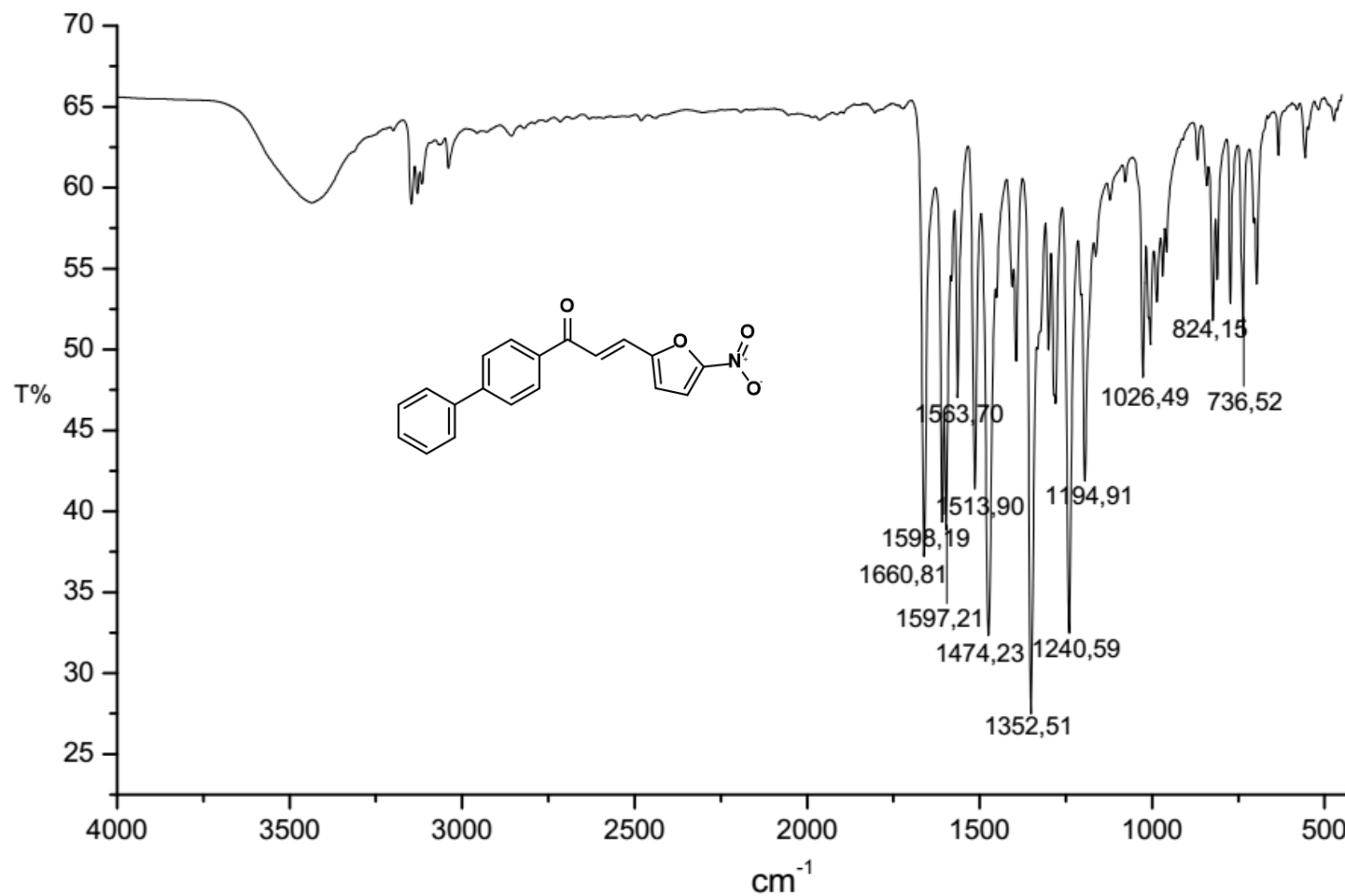
Anexo 44 – Cromatograma (2E)-3-(5-nitrofuran-2-il)-1-[4-(piperazin-1-il)fenil]prop-2-en-1-ona (**LabMol73**), (**74**).



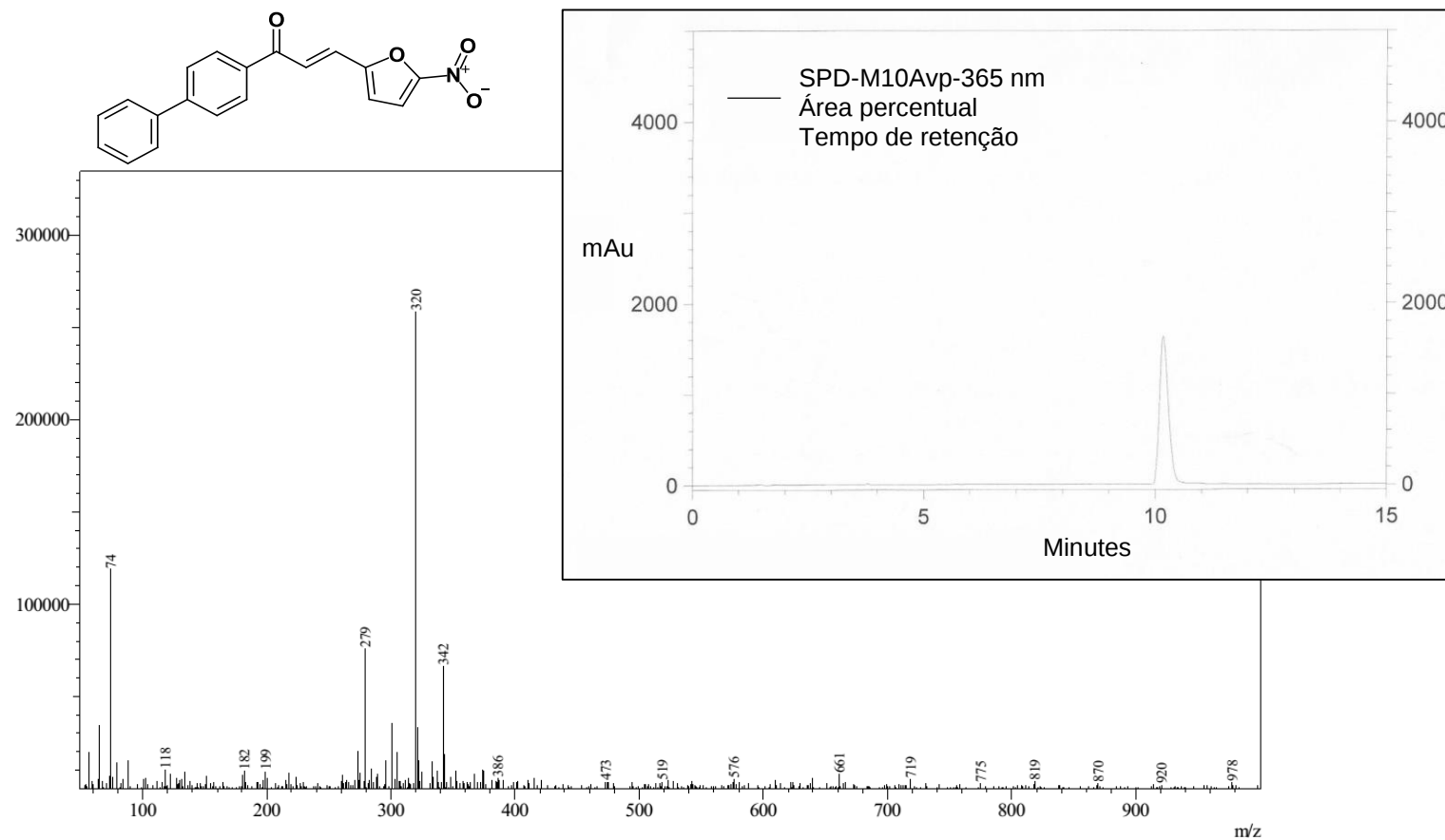
Anexo 45 – Espectro de RMN ¹H (2E)-3-(5-nitrofuran-2-il)-1-[4-bifenil]prop-2-en-1-ona (**LabMol74**), (**75**), 400 MHz, CDCl₃



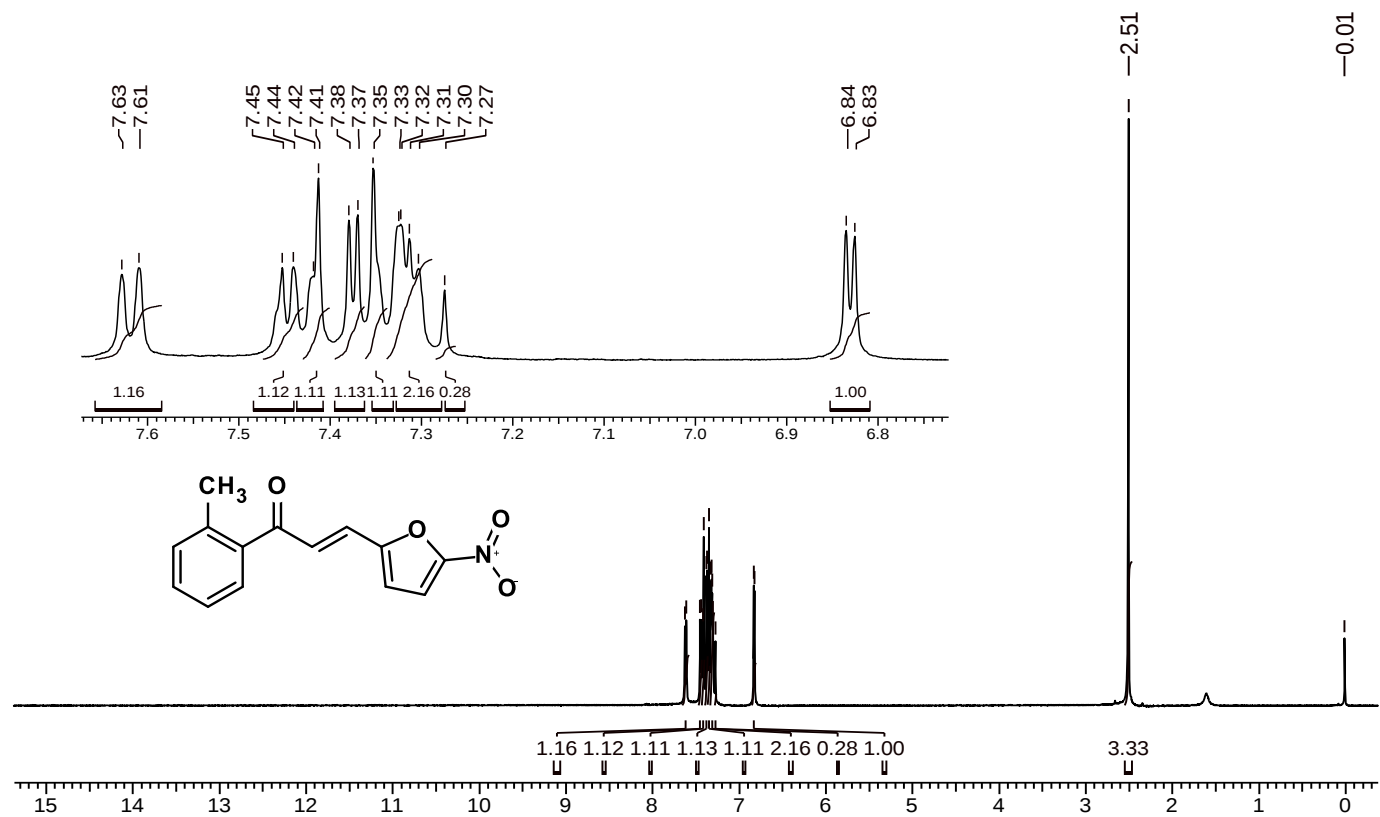
Anexo 46 - Espectro de ¹³C (2E)-3-(5-nitrofuran-2-il)-1-[4-bifenil]prop-2-en-1-ona (**LabMol74**), (**75**) 400 MHz, CDCl₃



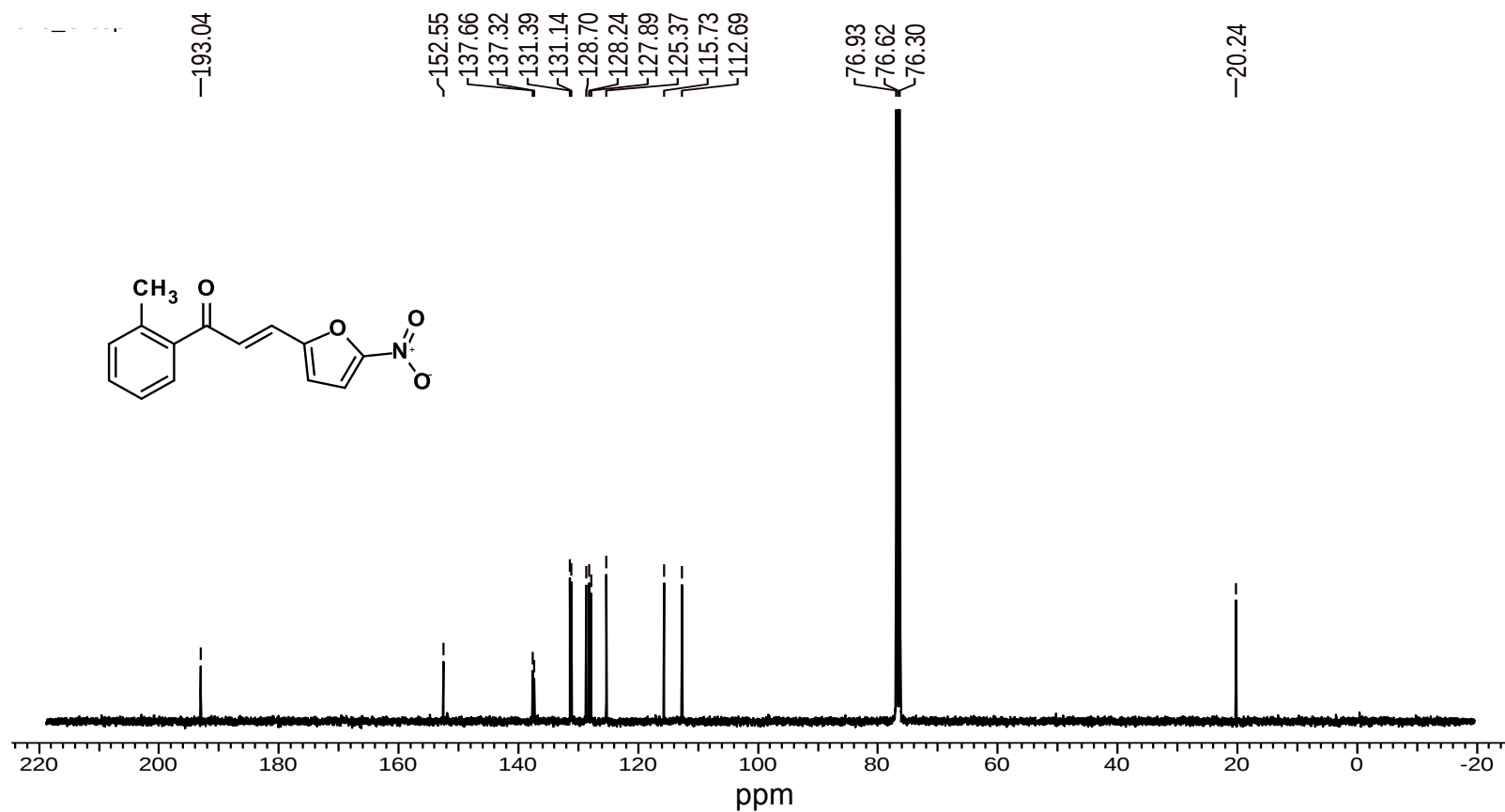
Anexo 47 - Espectro de IV (2E)-3-(5-nitrofuran-2-il)-1-[4-bifenil]prop-2-en-1-ona (**LabMol74**), (**75**), KBr.



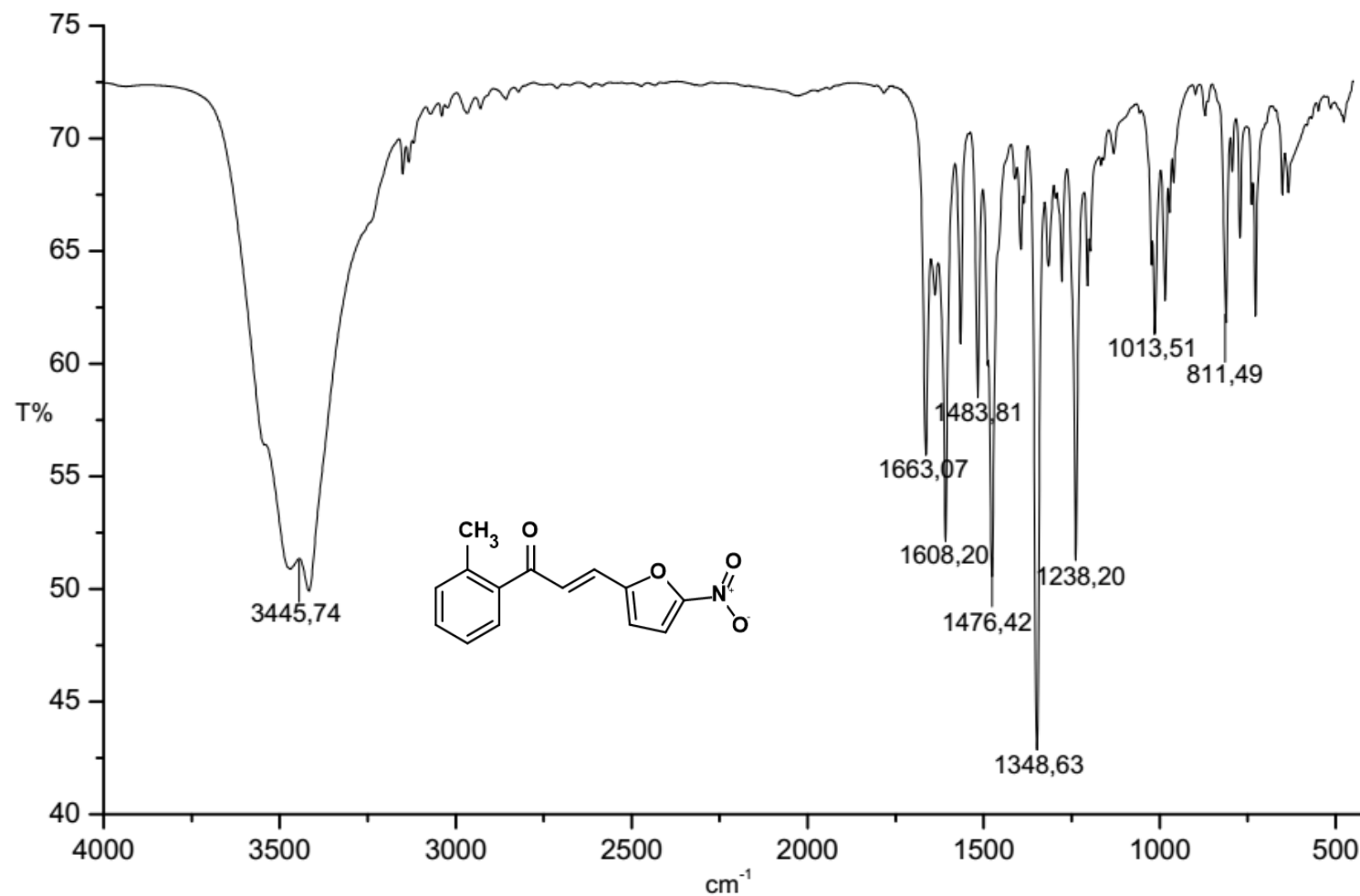
Anexo 48 - Espectro de massas e cromatograma (2E)-3-(5-nitrofuran-2-il)-1-[4-bifenil]prop-2-en-1-ona (LabMol74), (75)



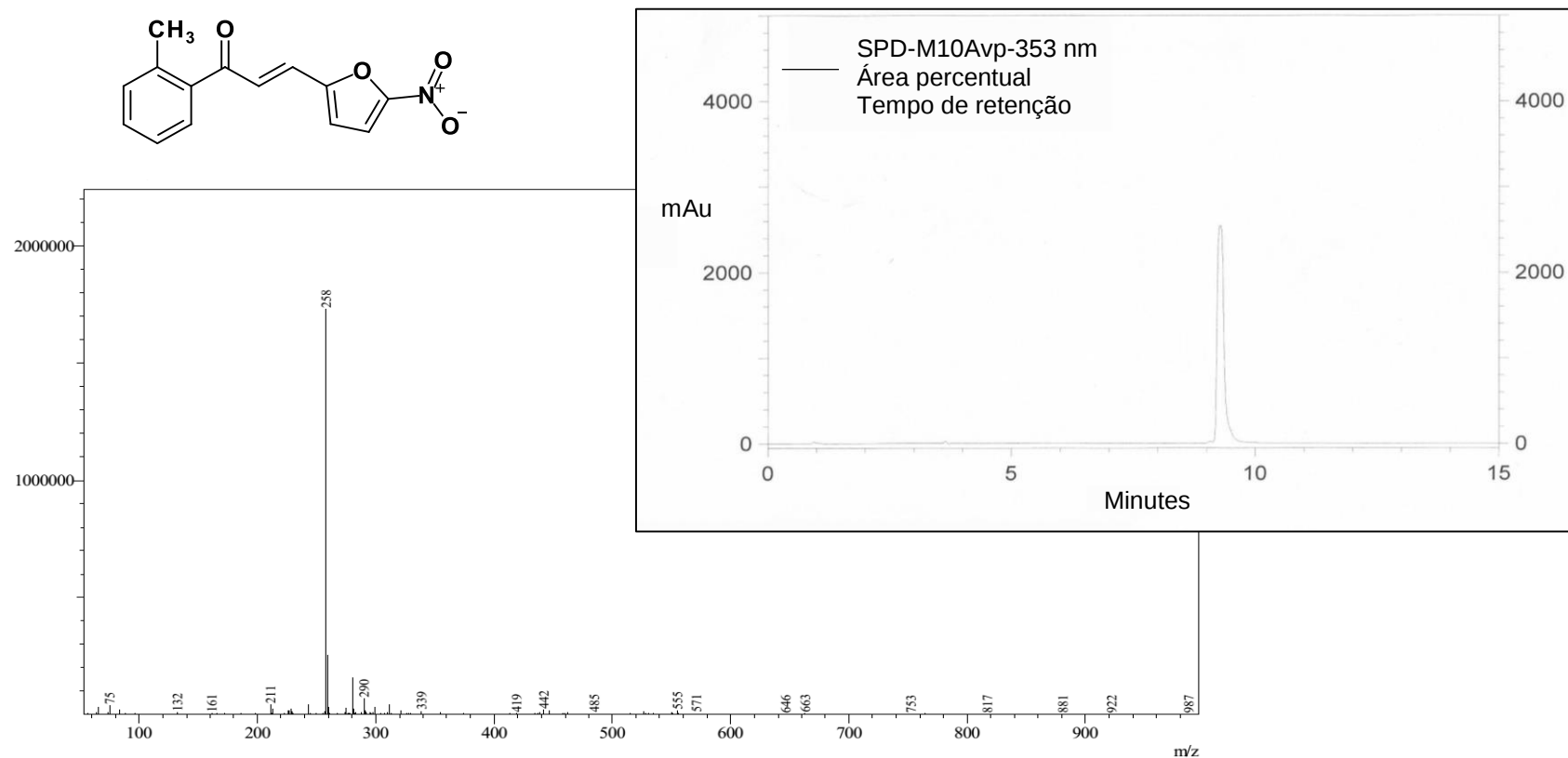
Anexo 49 - Espectro de RMN ^1H (2E)-1-(2-metilfenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol75), (76) 400 MHz, CDCl_3



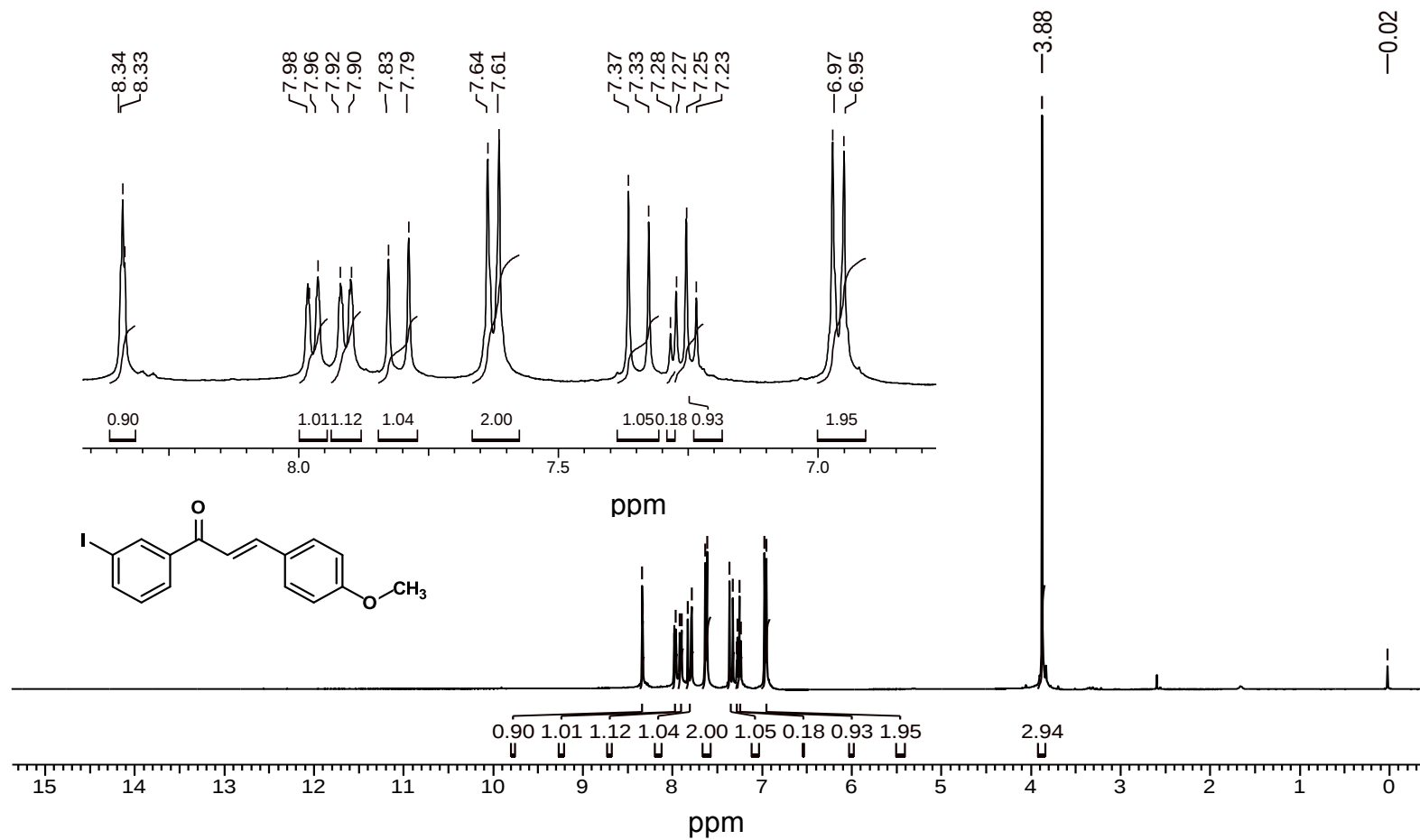
Anexo 50 - Espectro de RMN ¹³C (2E)-1-(2-metilfenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol75**), (**76**), 400 MHz, CDCl₃



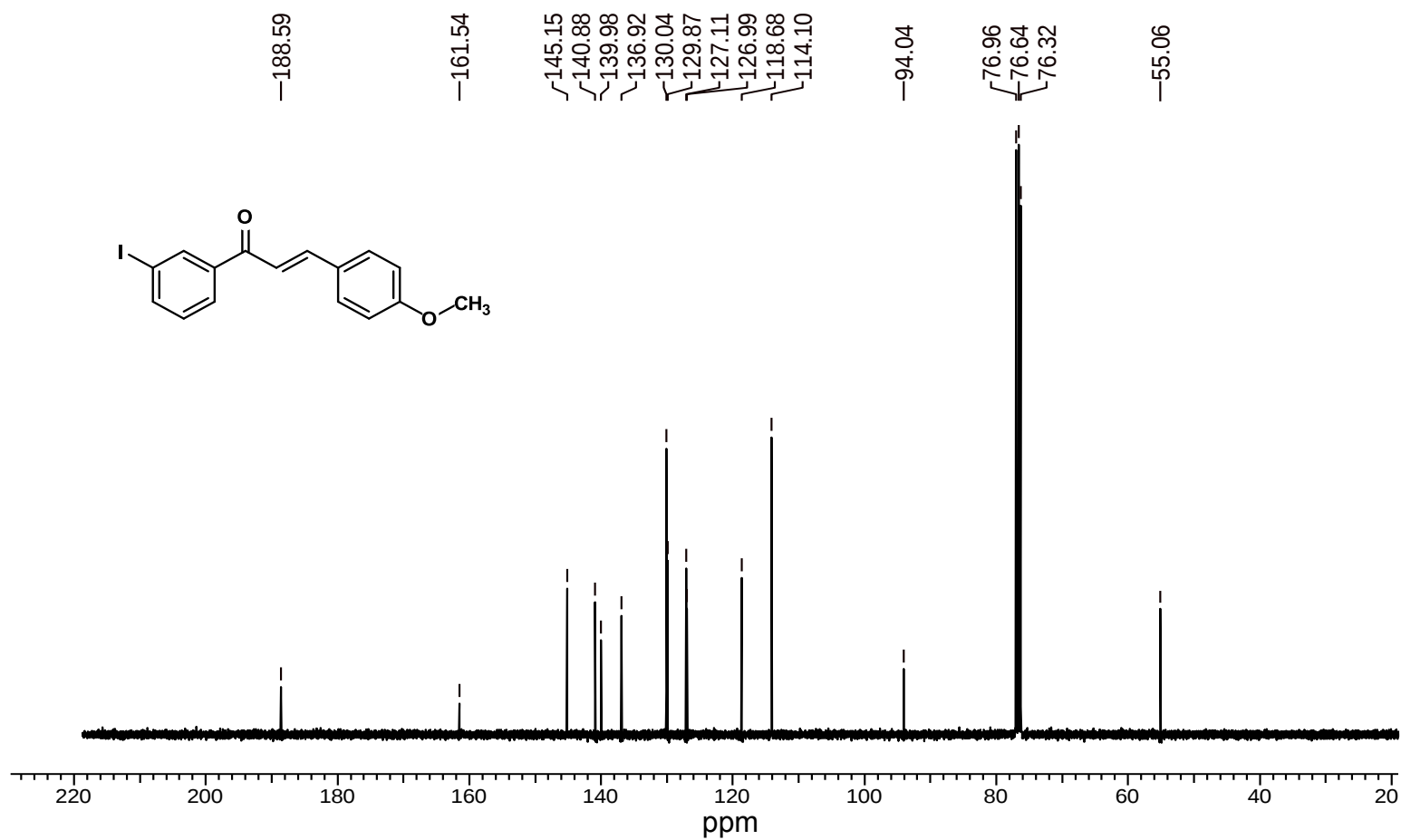
Anexo 51 - Espectro de IV (2E)-1-(2-metilfenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol75**), (**76**), KBr.



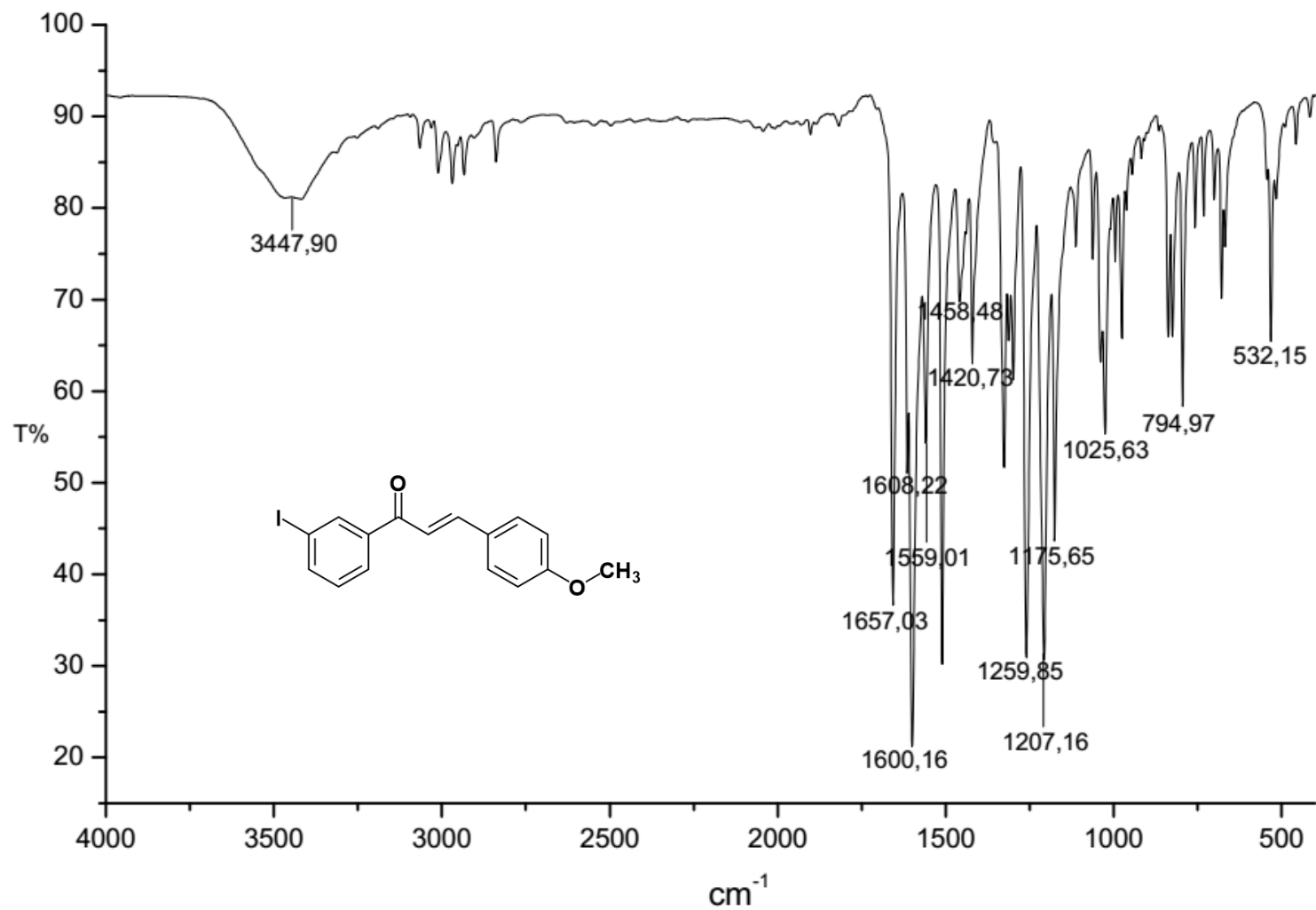
Anexo 52 - Espectro de massas e cromatograma (2E)-1-(2-metilfenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol75**) (**76**).



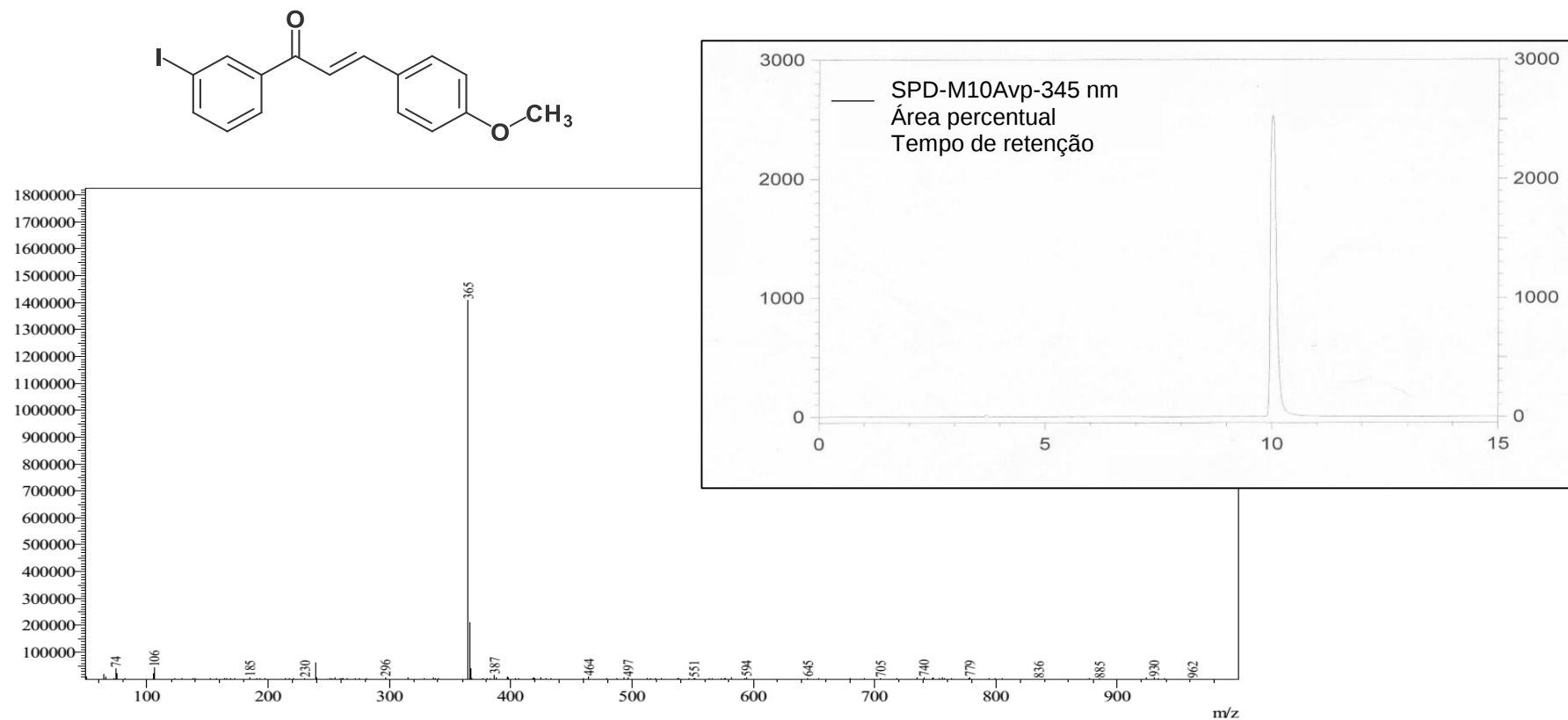
Anexo 53 - Espectro de RMN ^1H (2E)-1-(3-iodofenil)-3-(4-metoxifenil)prop-2-en-1-ona (**LabMol76**), (**77**), 400 MHz, CDCl_3



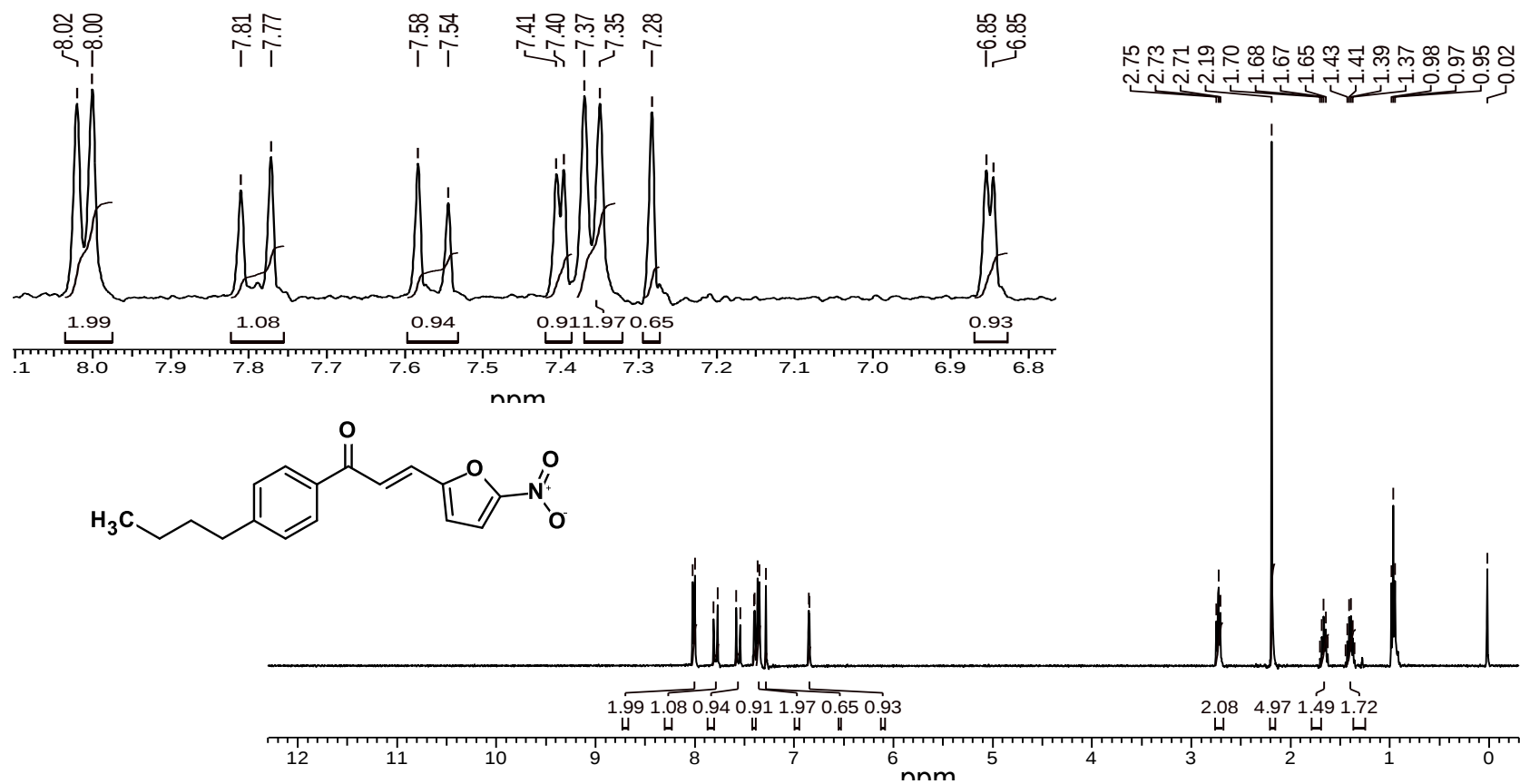
Anexo 54 - Espectro de RMN ¹³C (2E)-1-(3-iodofenil)-3-(4-metoxifenil)prop-2-en-1-ona (**LabMol76**), (**77**), 400 MHz, CDCl₃



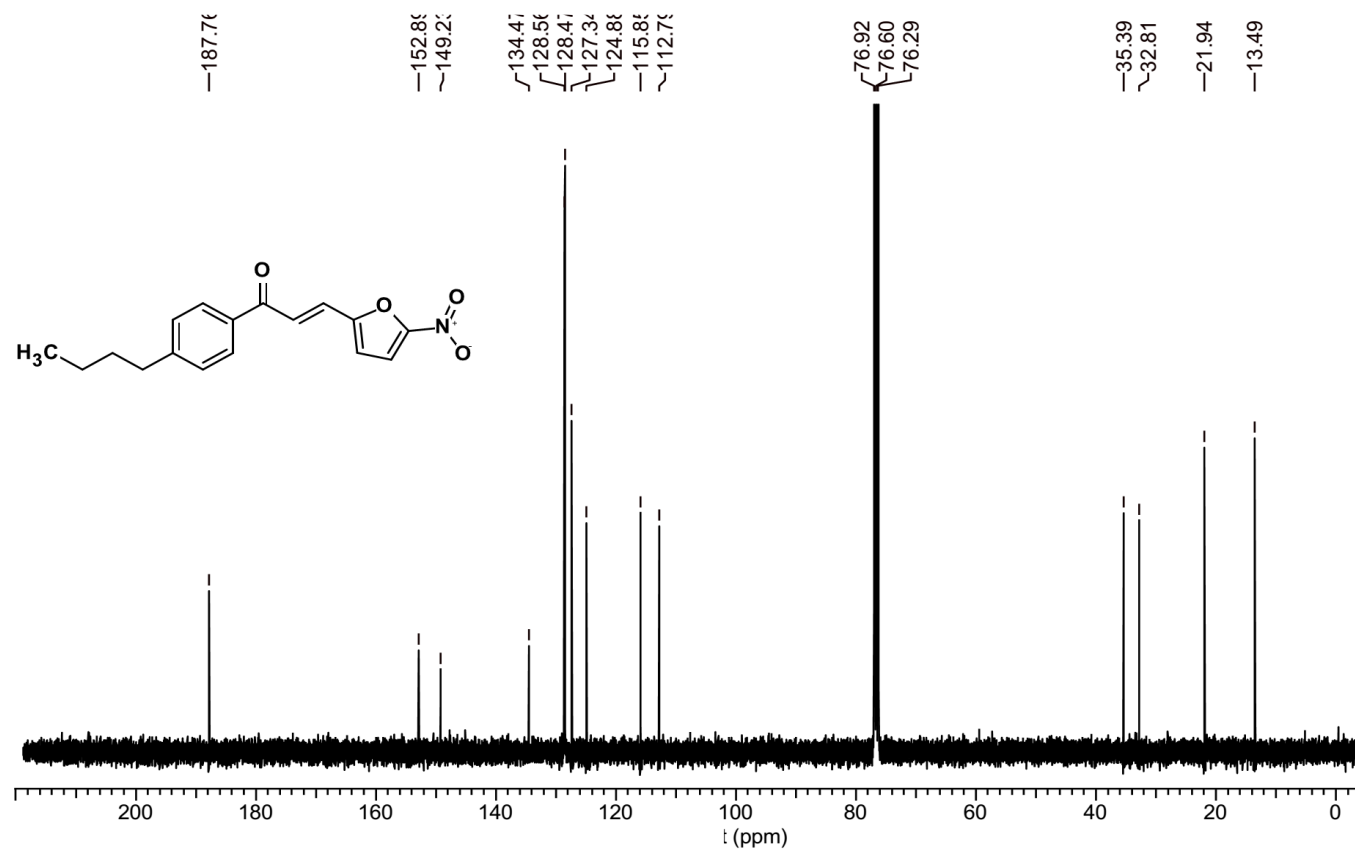
Anexo 55 - Espectro de IV (2E)-1-(3-iodofenil)-3-(4-metoxifenil)prop-2-en-1-ona (**LabMol76**), (77) KBr.



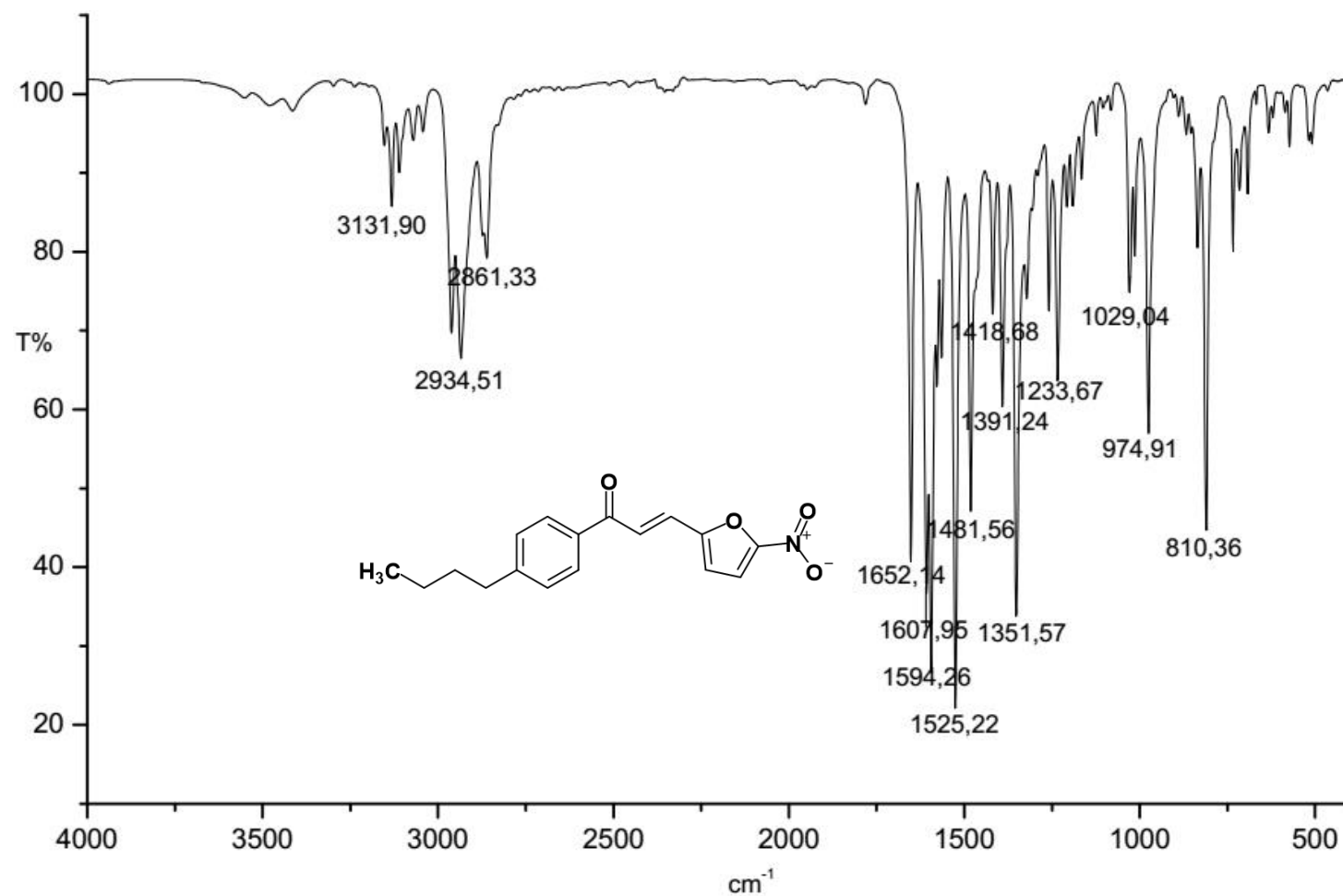
Anexo 56 - Espectro de massas e cromatograma (2E)-1-(3-iodofenil)-3-(4-metoxifenil)prop-2-en-1-ona (**LabMol76**), (**77**), 400 MHz, CDCl₃



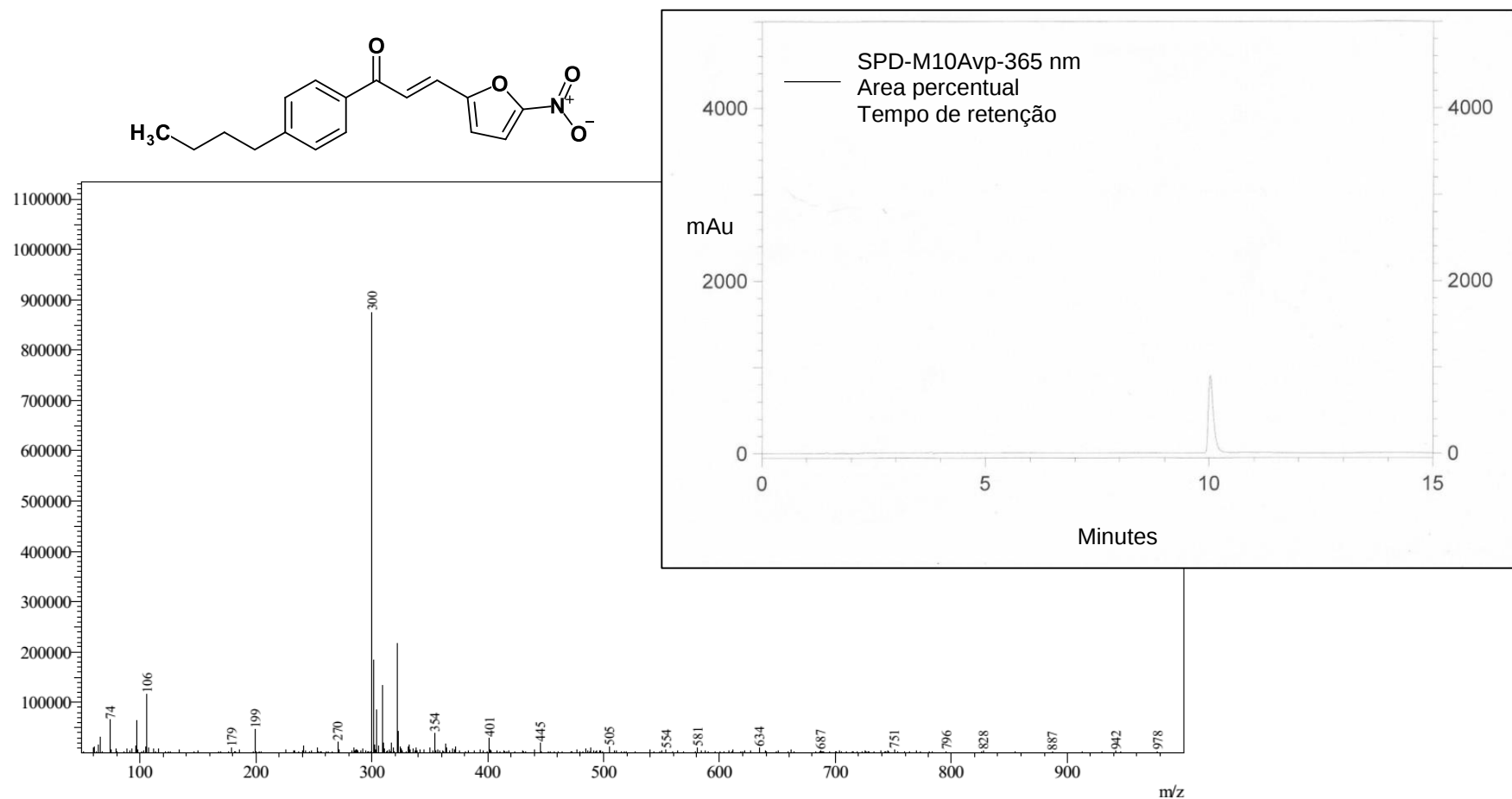
Anexo 57 - Espectro de RMN ¹H (2E)-1-(4-butilfenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol77**), (**78**), 400 MHz, CDCl₃



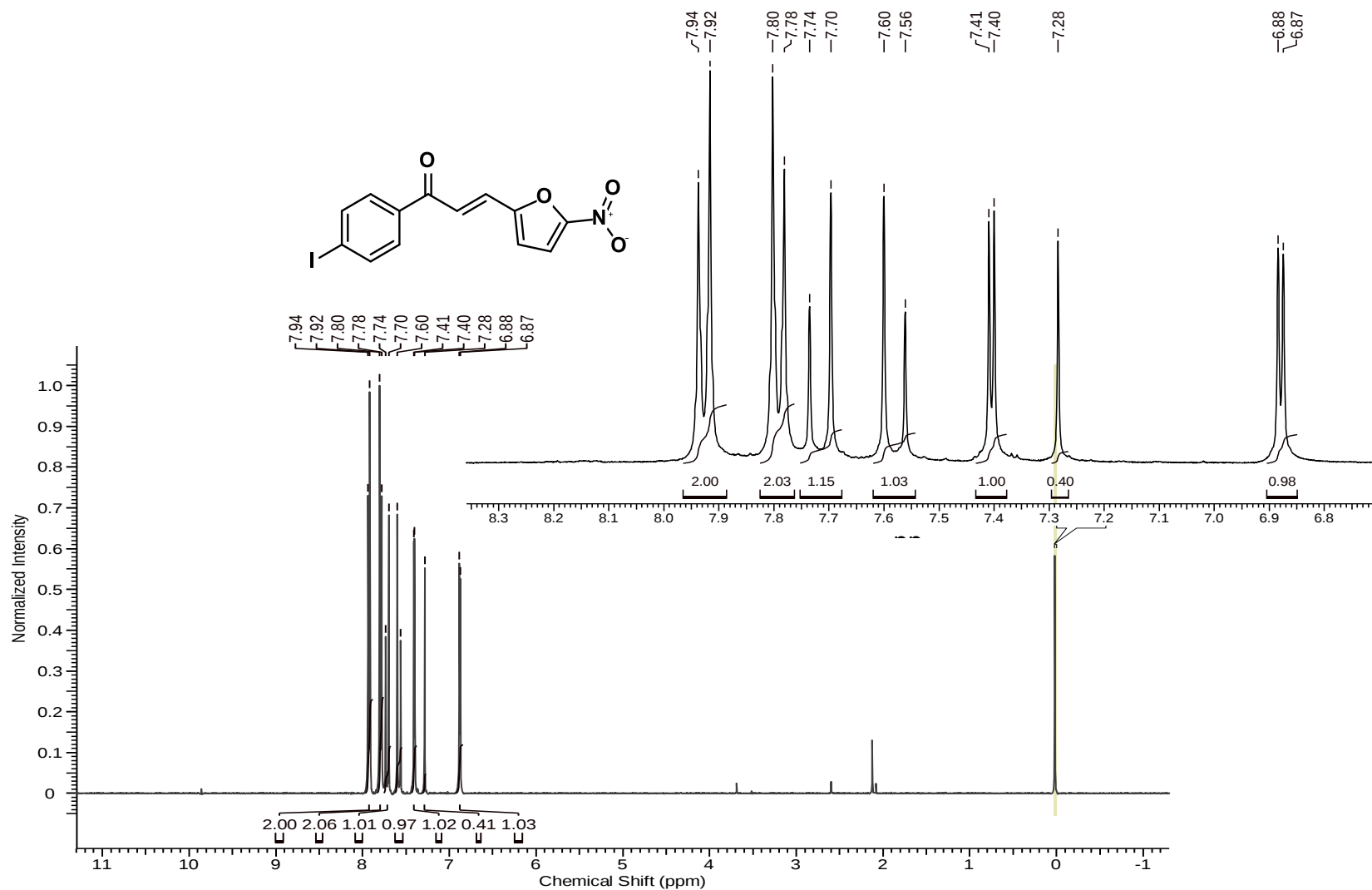
Anexo 58 – Espectro de RMN ¹³C (2E)-1-(4-butilfenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol77**), (**78**), 400 MHz, CDCl₃



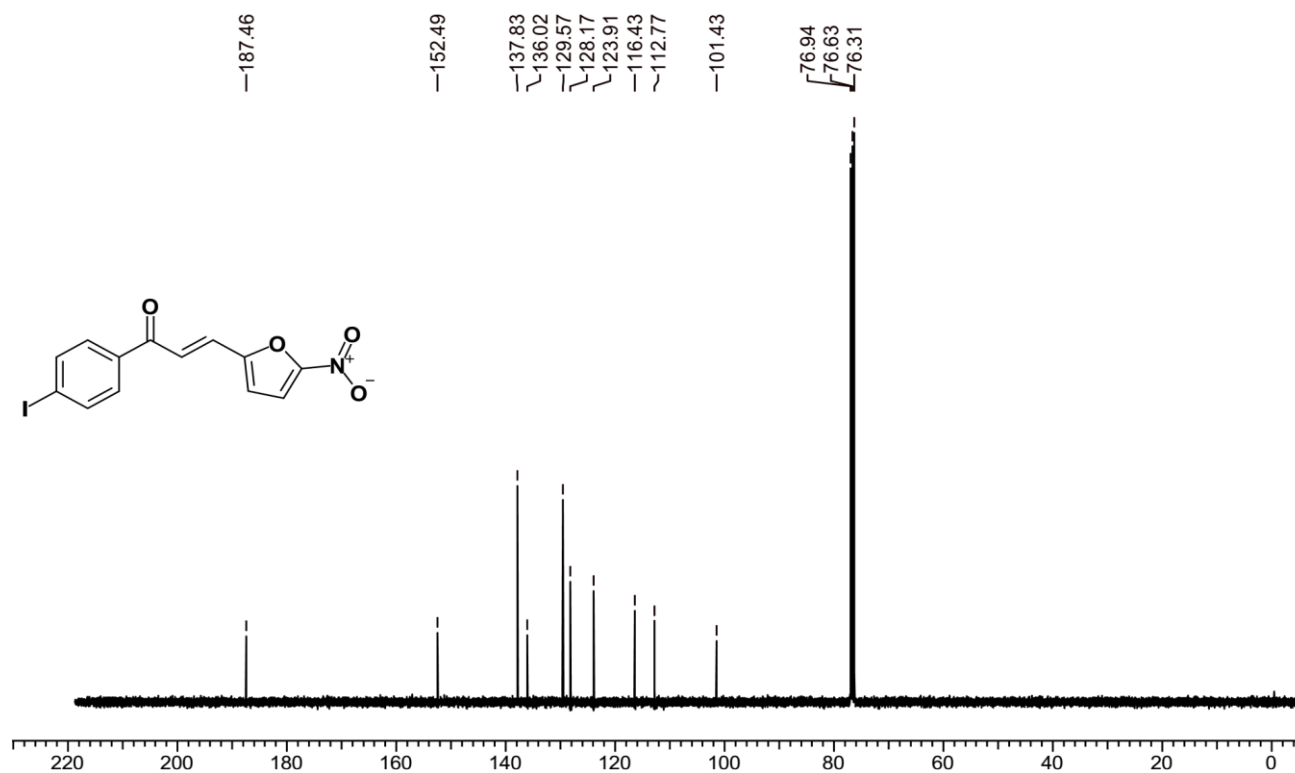
Anexo 59 - Espectro de IV (2E)-1-(4-butilfenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol77**), (**78**), KBr.



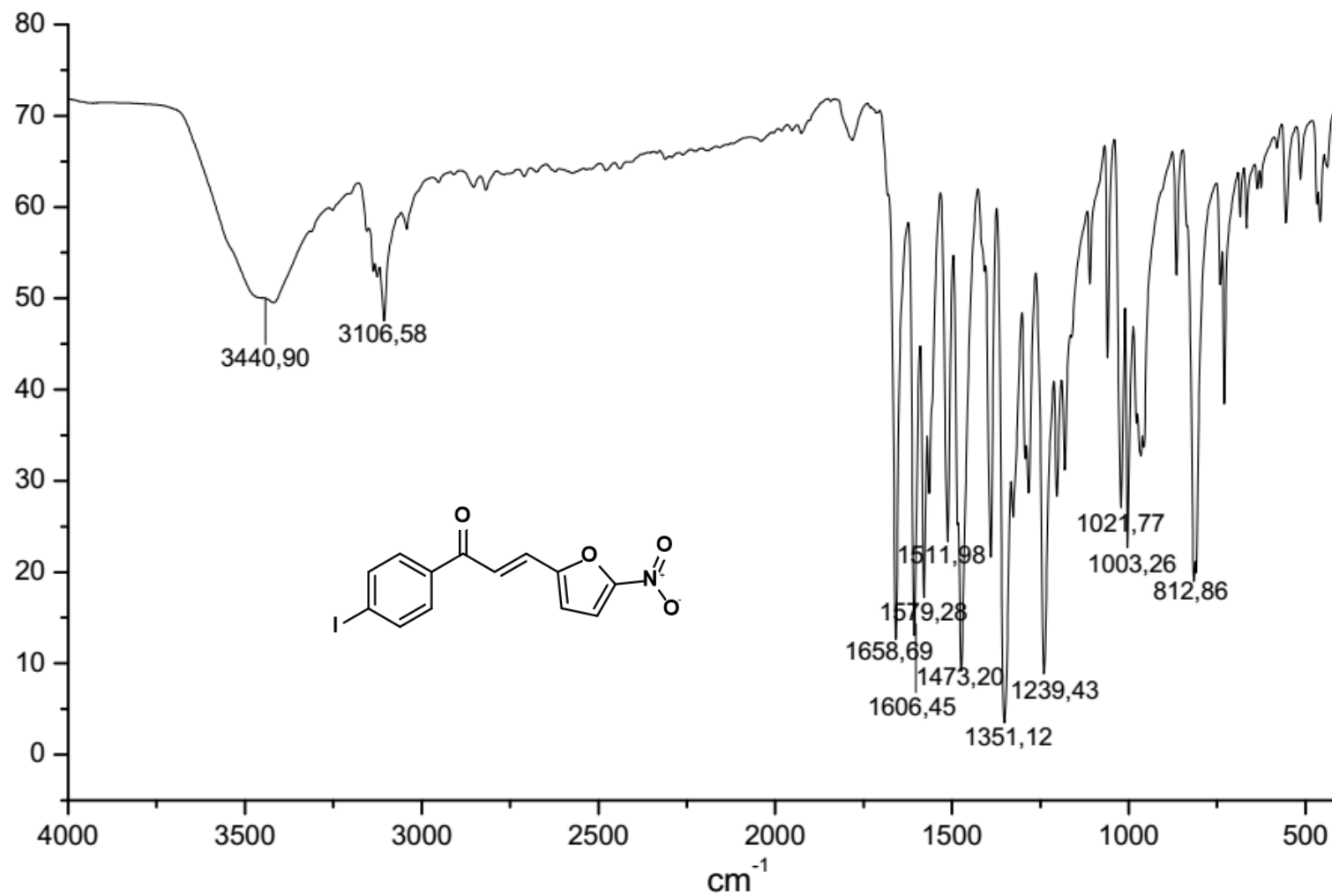
Anexo 60 - Espectro de massas e cromatograma (2E)-1-(4-butilfenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol77**), (**78**).



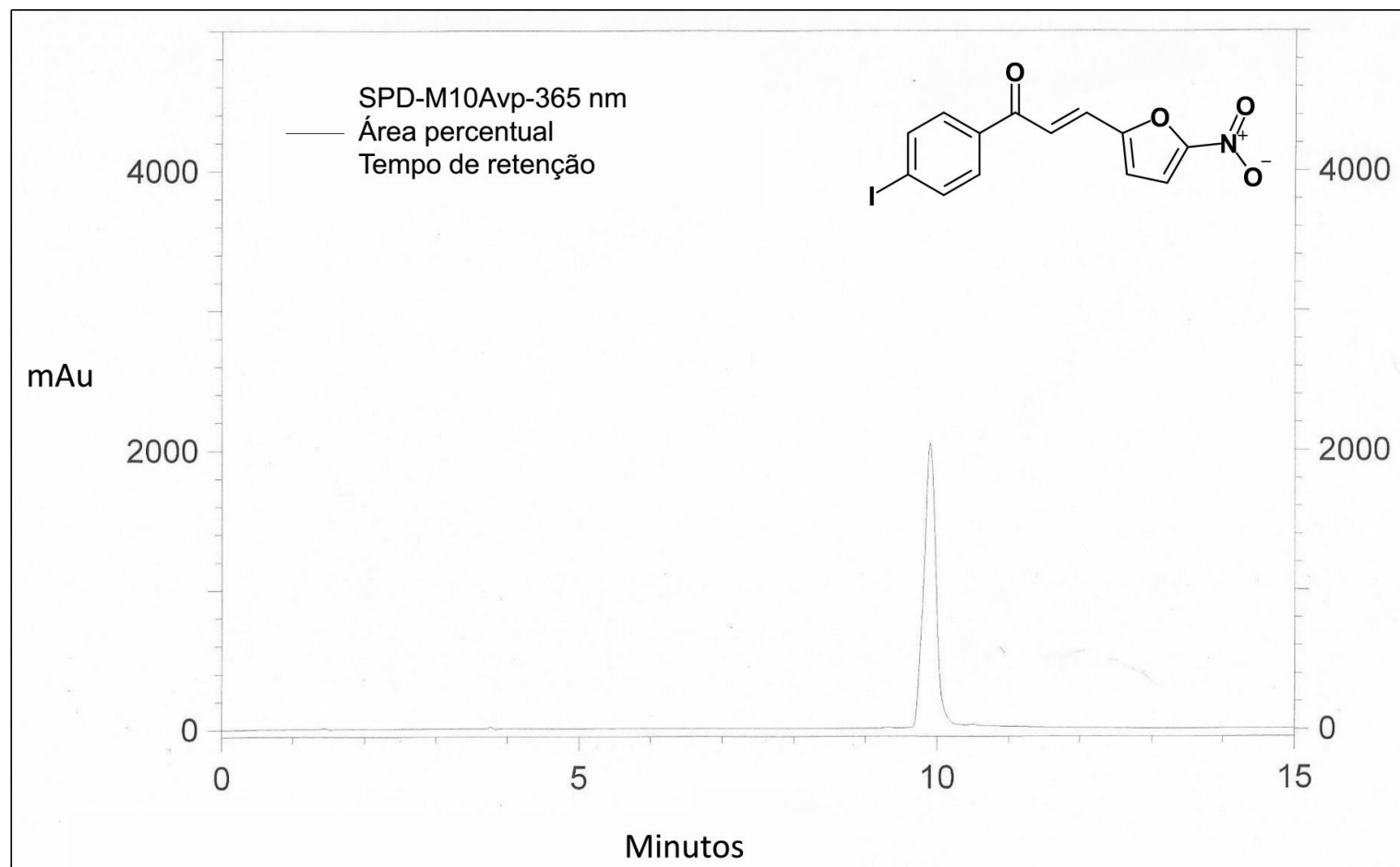
Anexo 61 - Espectro de RMN ¹H (2E)-1-(4-iodofenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol78**), (**79**), 400 MHz, CDCl₃.



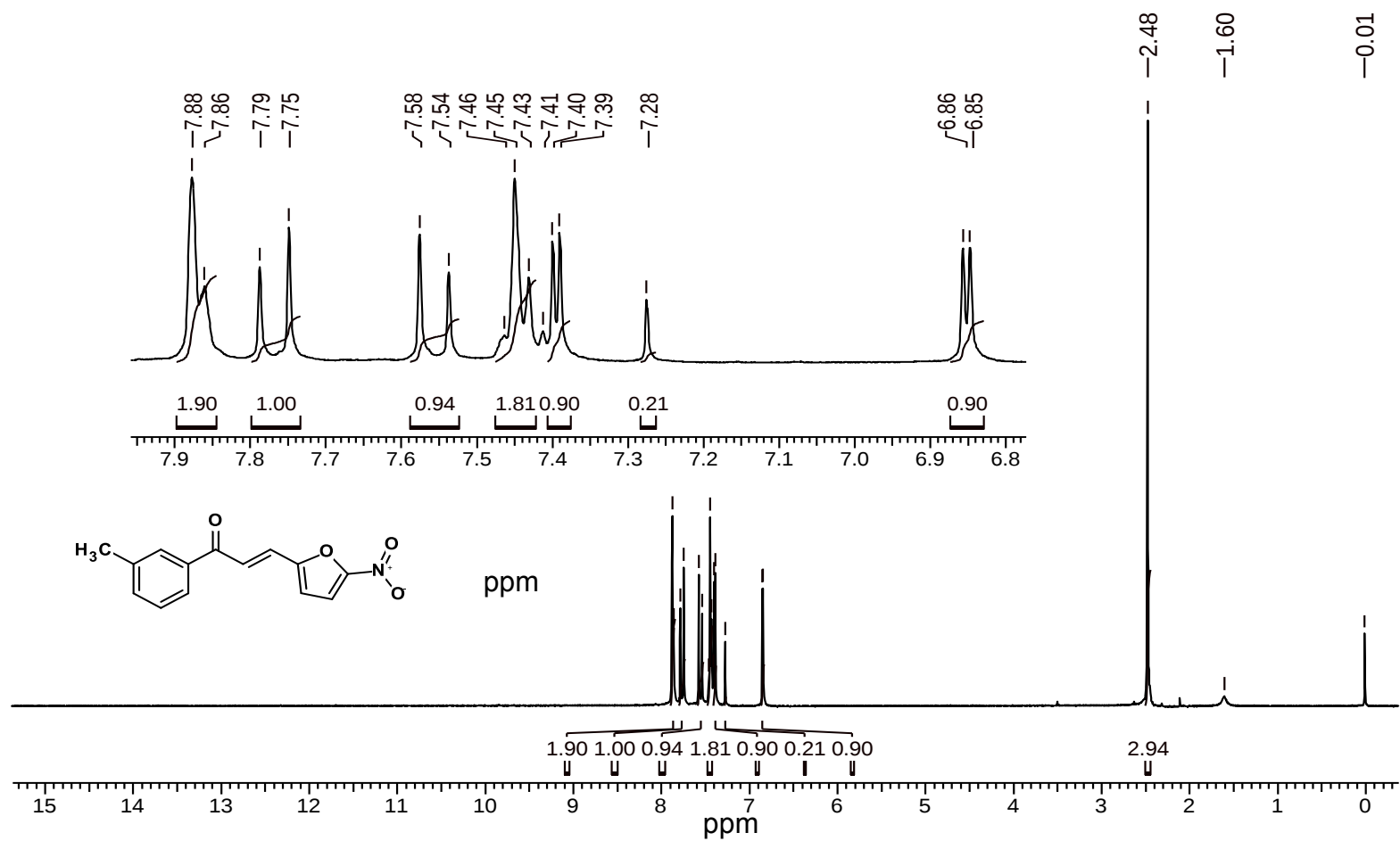
Anexo 62 - Espectro de RMN ¹³C (2E)-1-(4-iodofenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol78**), (**79**), 400 MHz, CDCl₃.



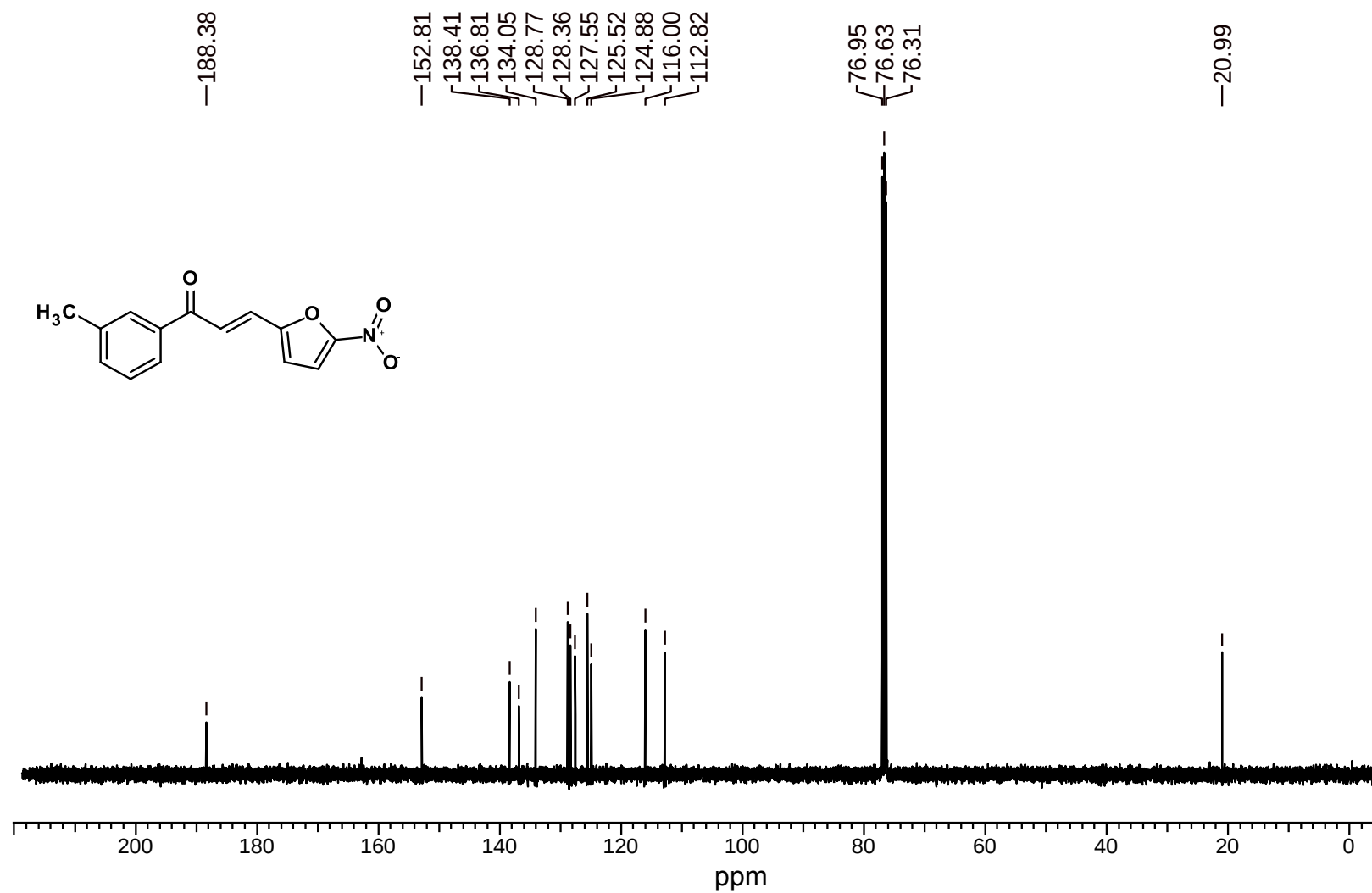
Anexo 63 - Espectro de IV (2E)-1-(4-iodofenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol78**), (79) KBr.



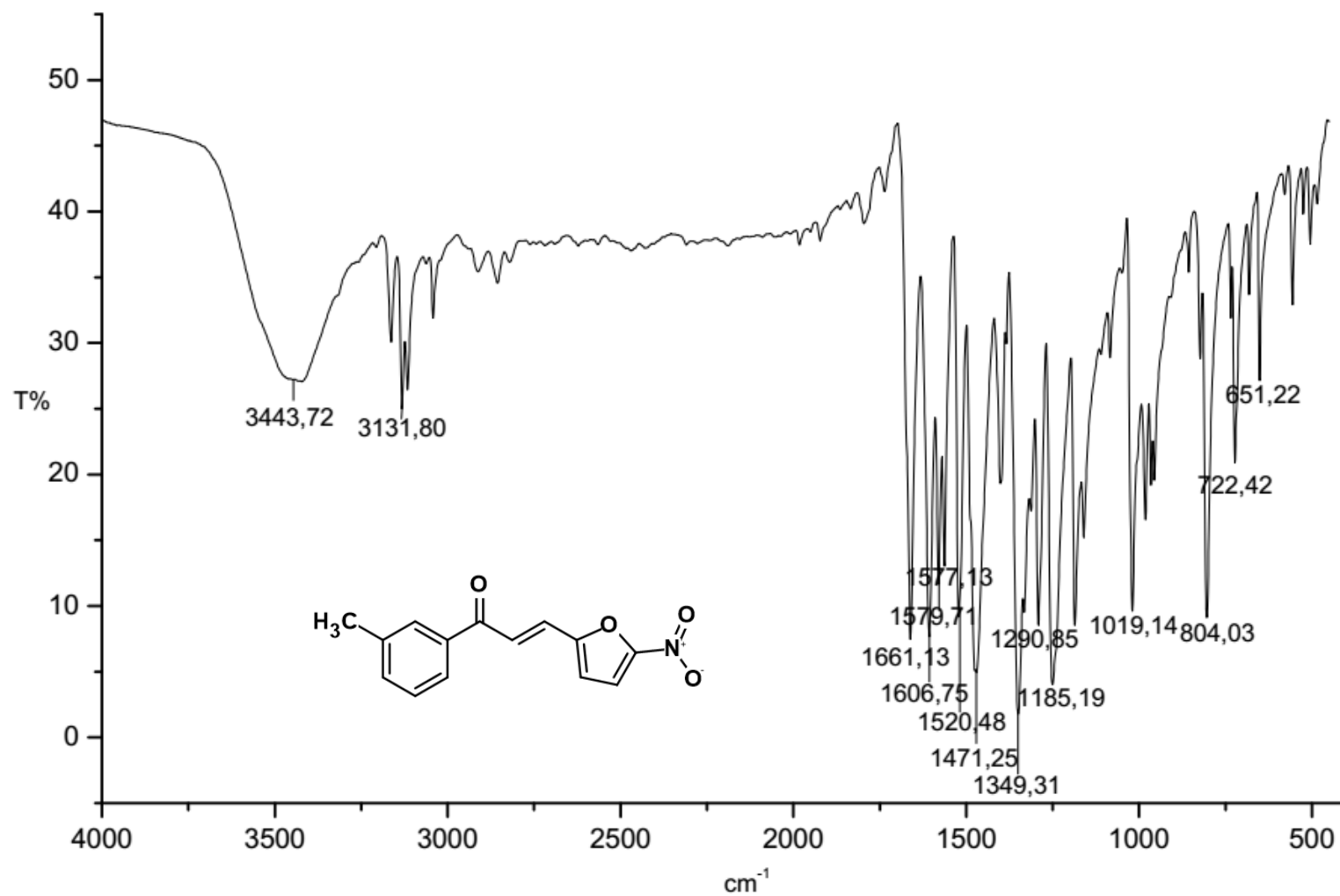
Anexo 64 – Cromatograma (2E)-1-(4-iodofenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol78**), (**79**) 400 MHz, CDCl₃.



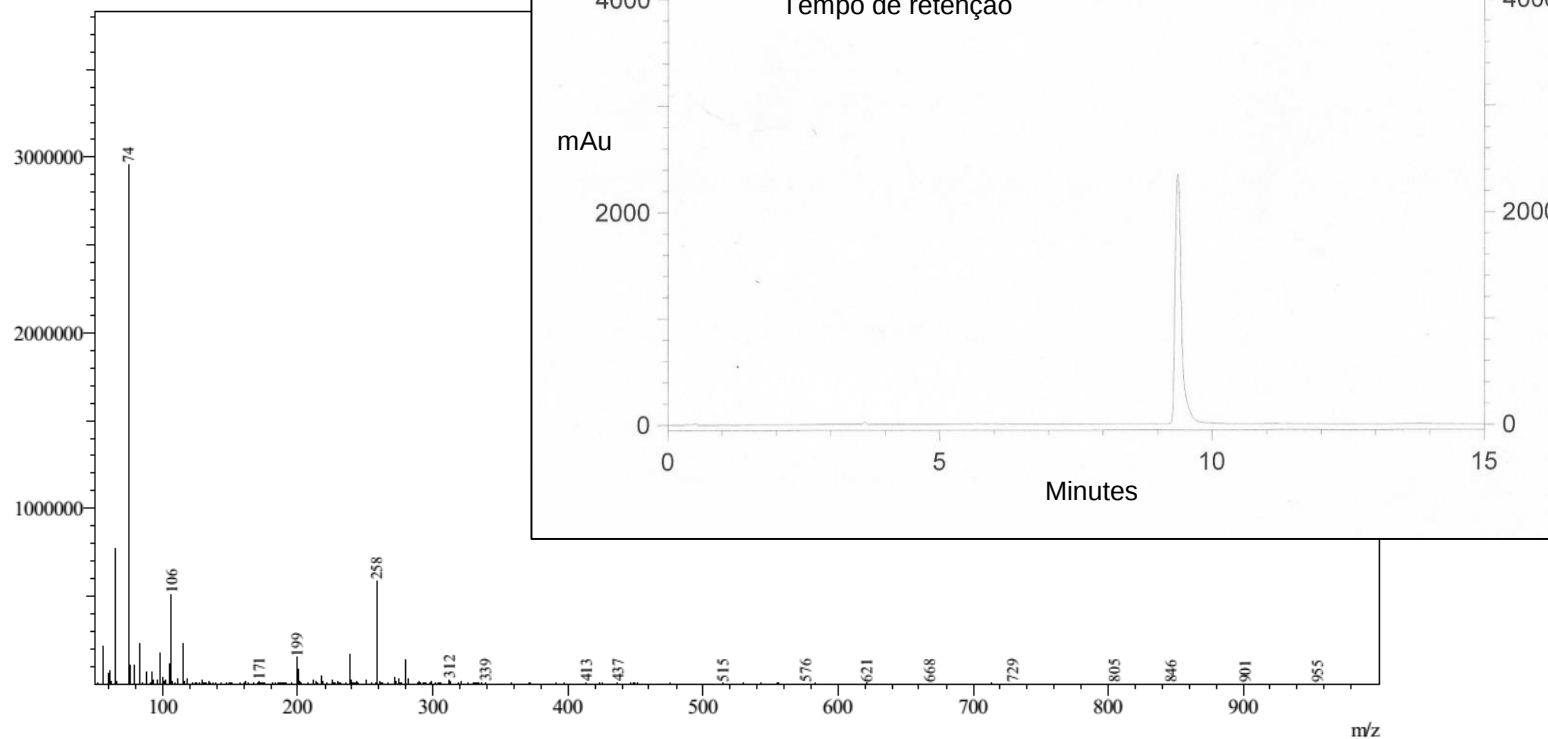
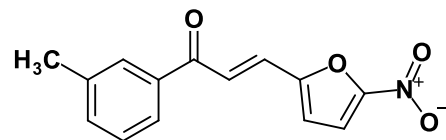
Anexo 65 - Espectro de RMN ¹H (2*E*)-1-(3-metilfenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol79**), (**80**) 400 MHz, CDCl₃



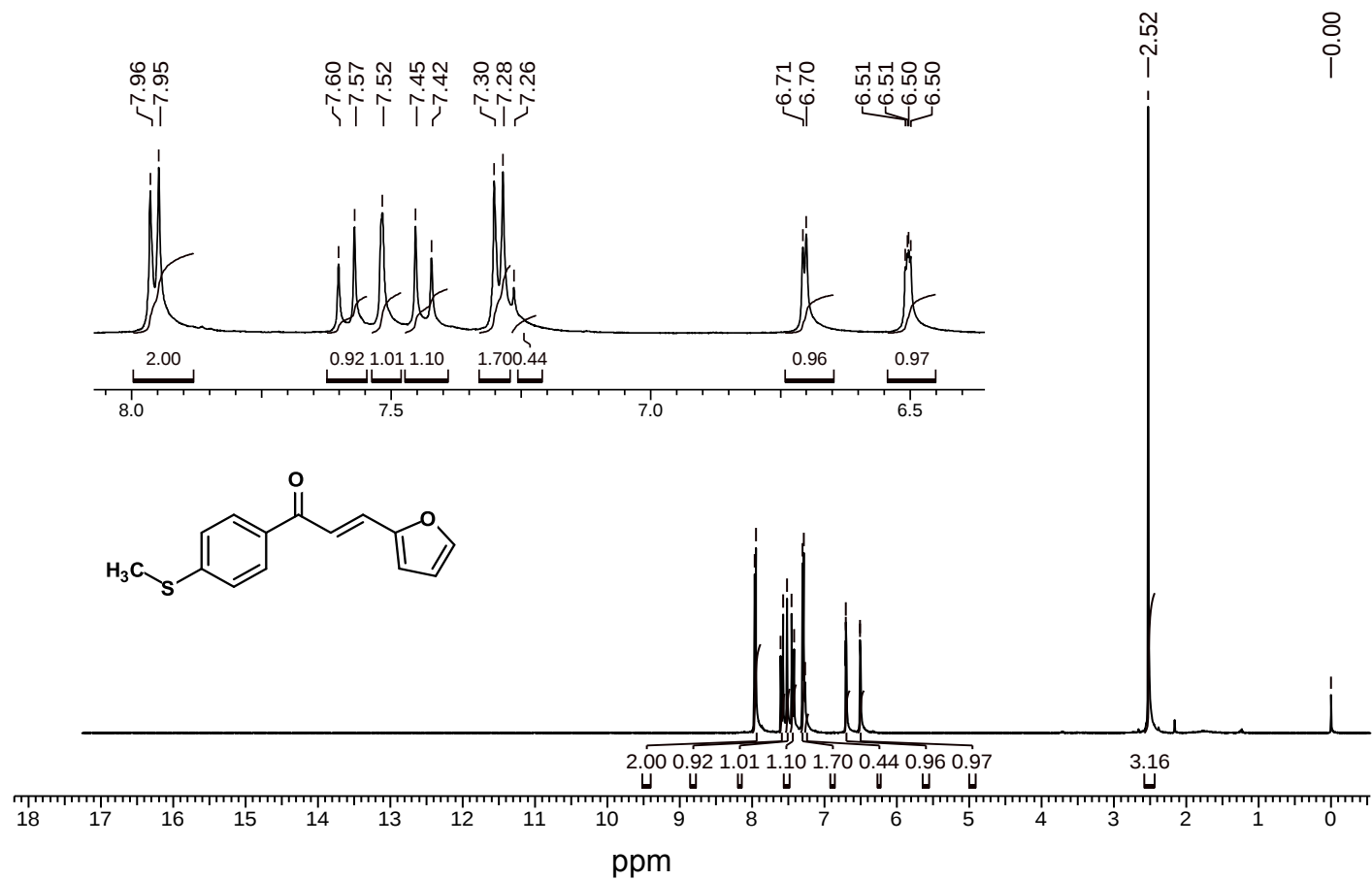
Anexo 66 - Espectro de RMN ¹³C (2E)-1-(3-metilfenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol79**), (**80**), 400 MHz, CDCl₃



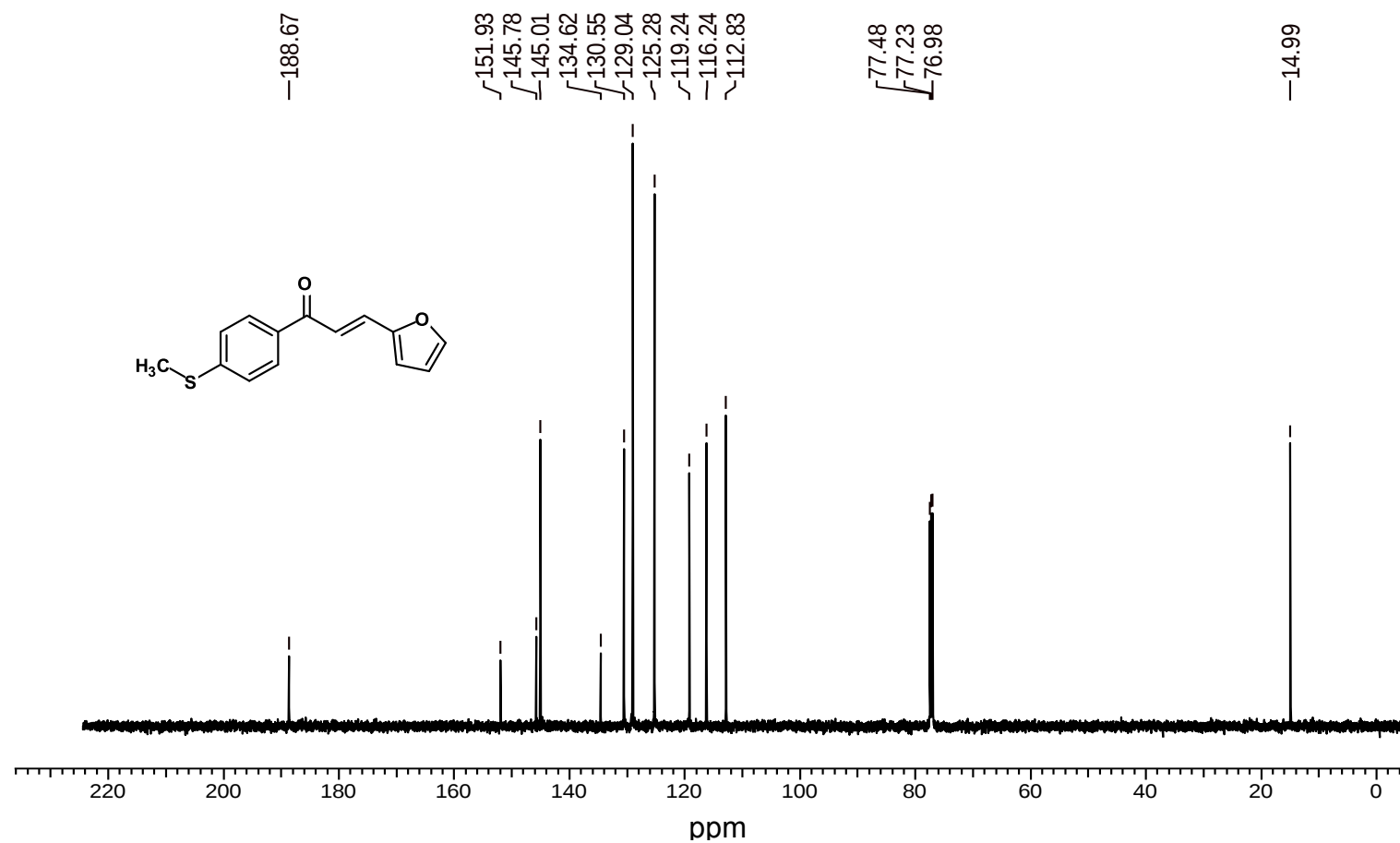
Anexo 67 - Espectro de IV (2E)-1-(3-metilfenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol79), (80), KBr.



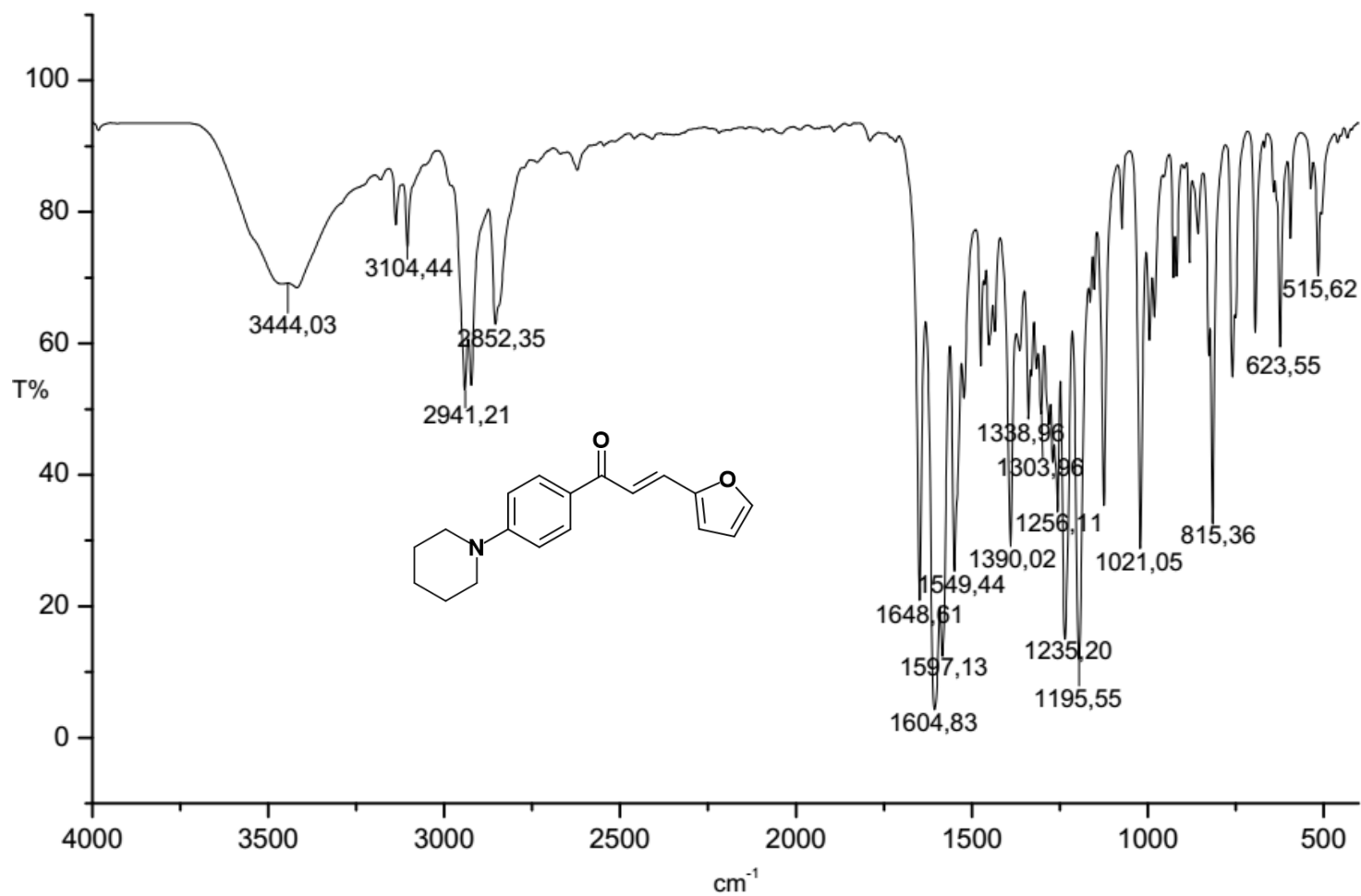
Anexo 68 - Espectro de massas e cromatograma (2E)-1-(3-metilfenil)-3-(5-nitrofurano-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol79**), (**80**).



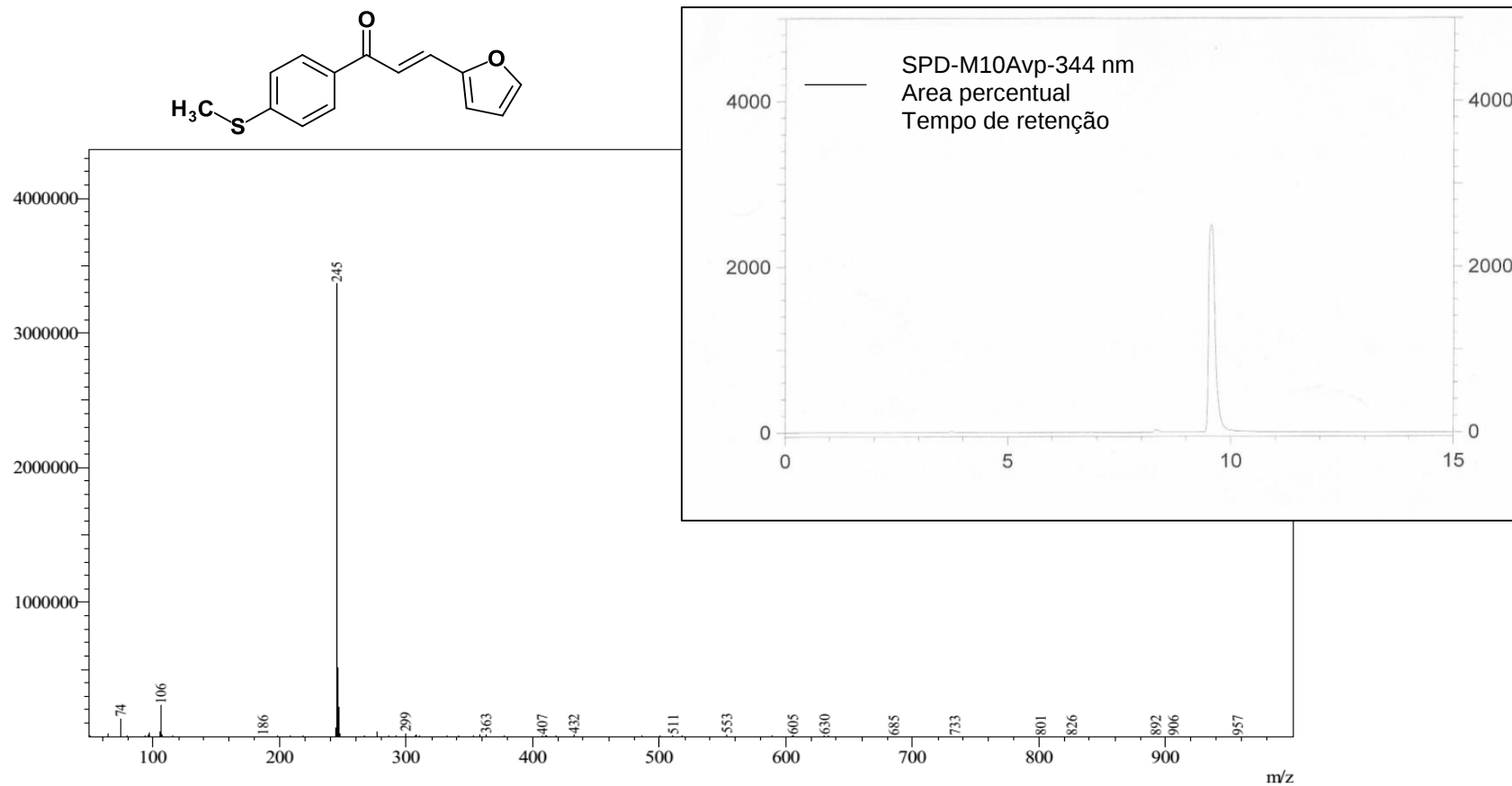
Anexo 69 - Espectro de RMN ¹H (2E)-3-(furan-2-il)-1-[4-(piperidin-1-il)fenil]prop-2-en-1-ona (**LabMol80**), (**81**) 400 MHz, CDCl₃.



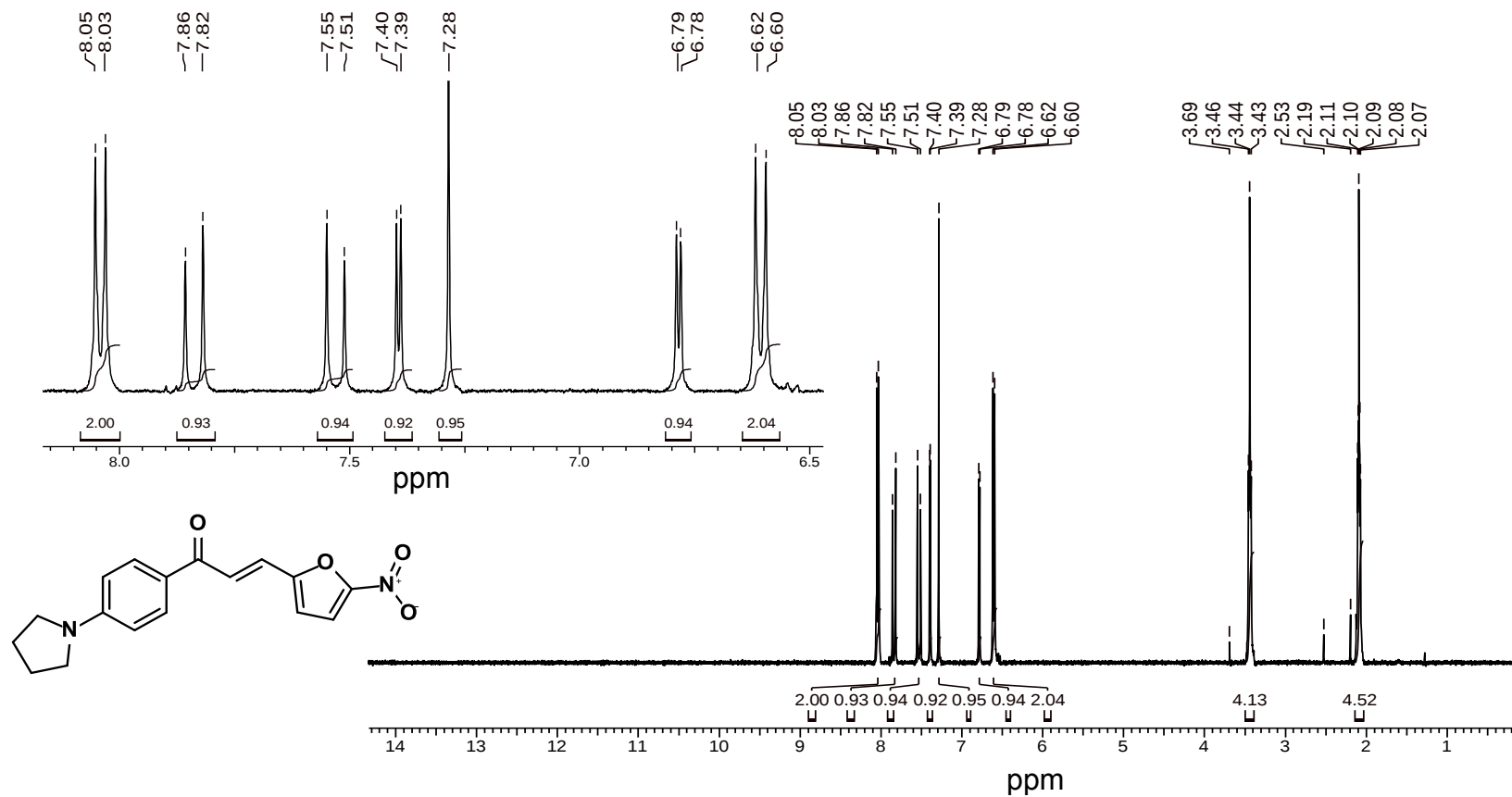
Anexo 70 - Espectro de RMN ¹³C (2E)-3-(furan-2-il)-1-[4-(piperidin-1-il)fenil]prop-2-en-1-ona (**LabMol80**), (**81**), 400 MHz, CDCl₃.



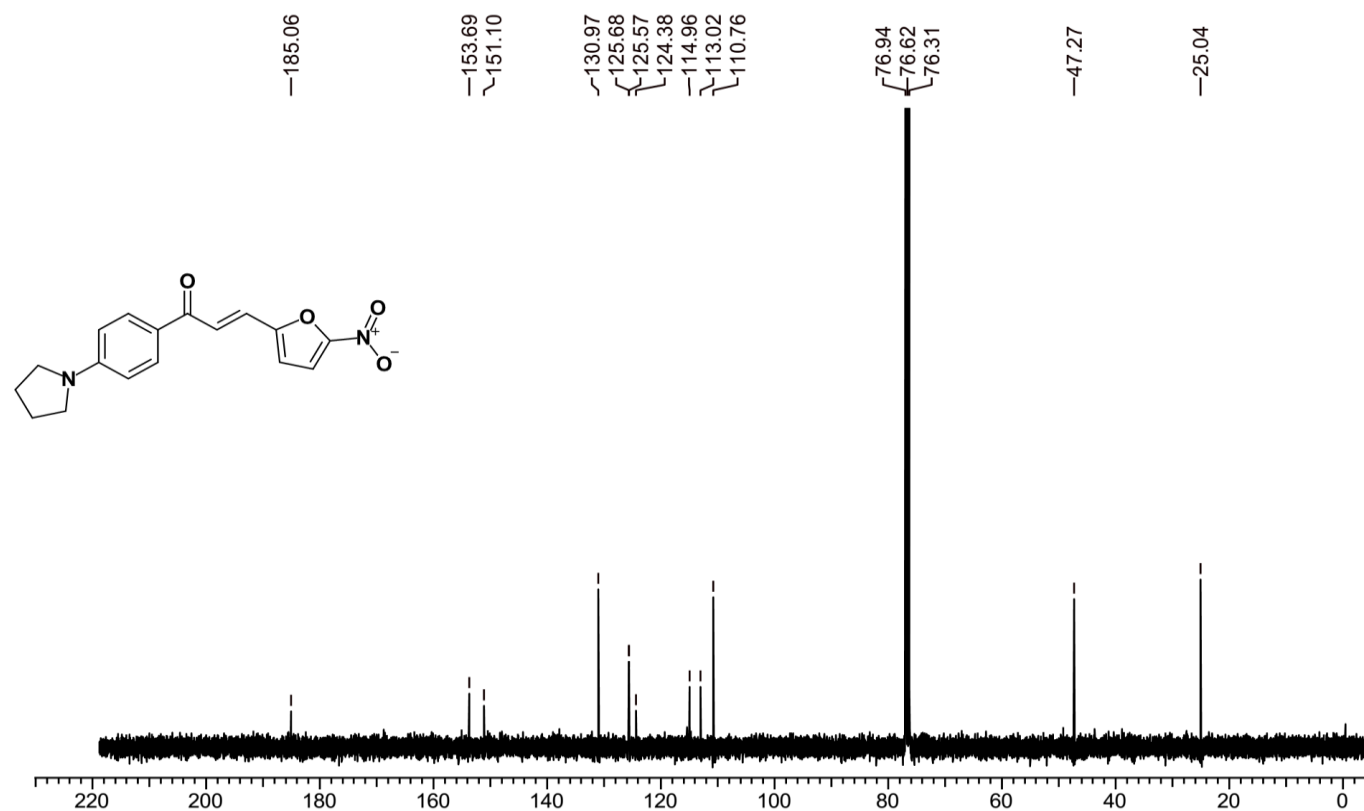
Anexo 71 - Espectro de IV (2E)-3-(furan-2-yl)-1-[4-(piperidin-1-yl)fenil]prop-2-en-1-ona (**LabMol80**), (**81**) KBr.



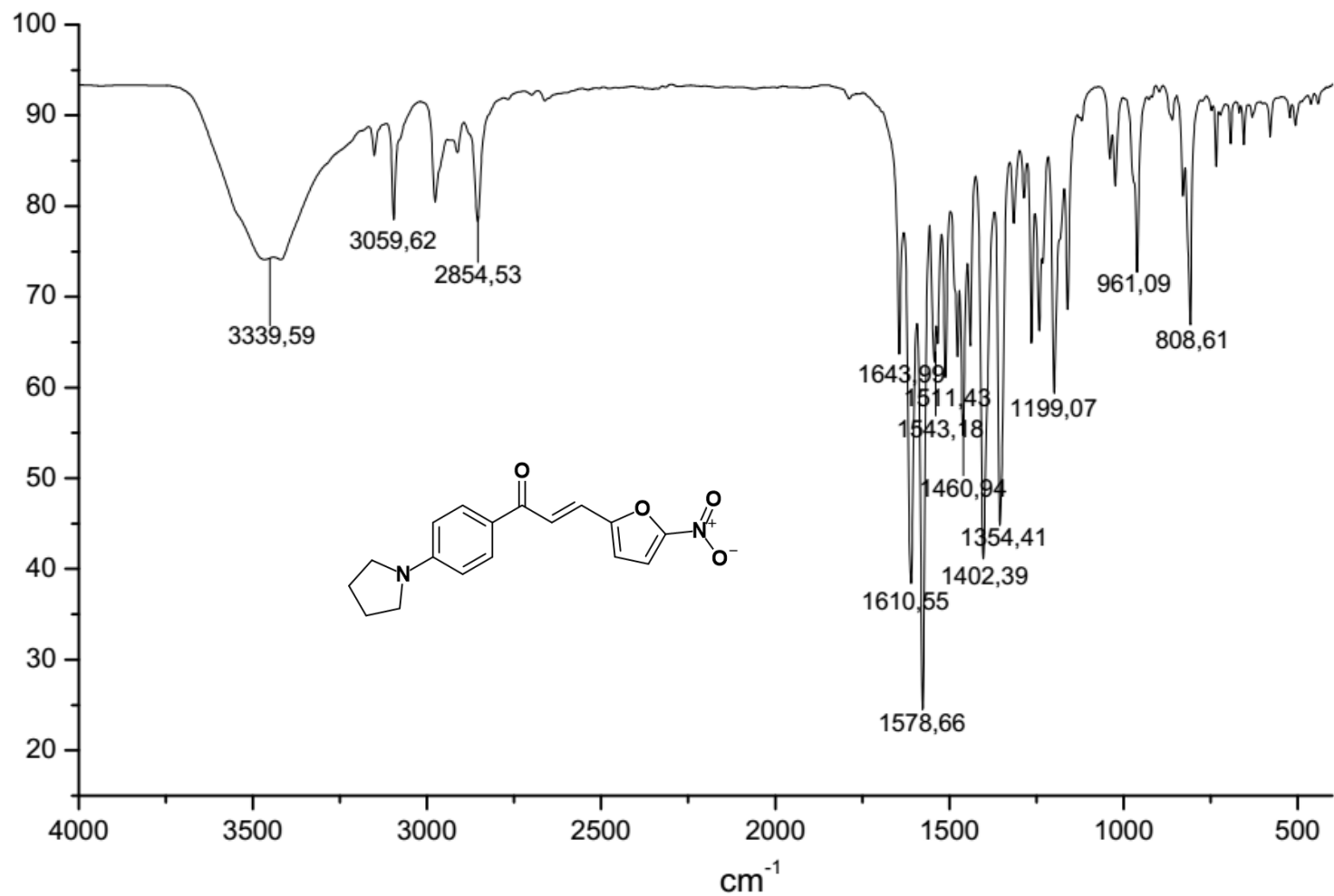
Anexo 72 - Espectro de massas e cromatograma (2E)-3-(furan-2-il)-1-[4-(piperidin-1-il)fenil]prop-2-en-1-ona (**LabMol80**) (**81**).



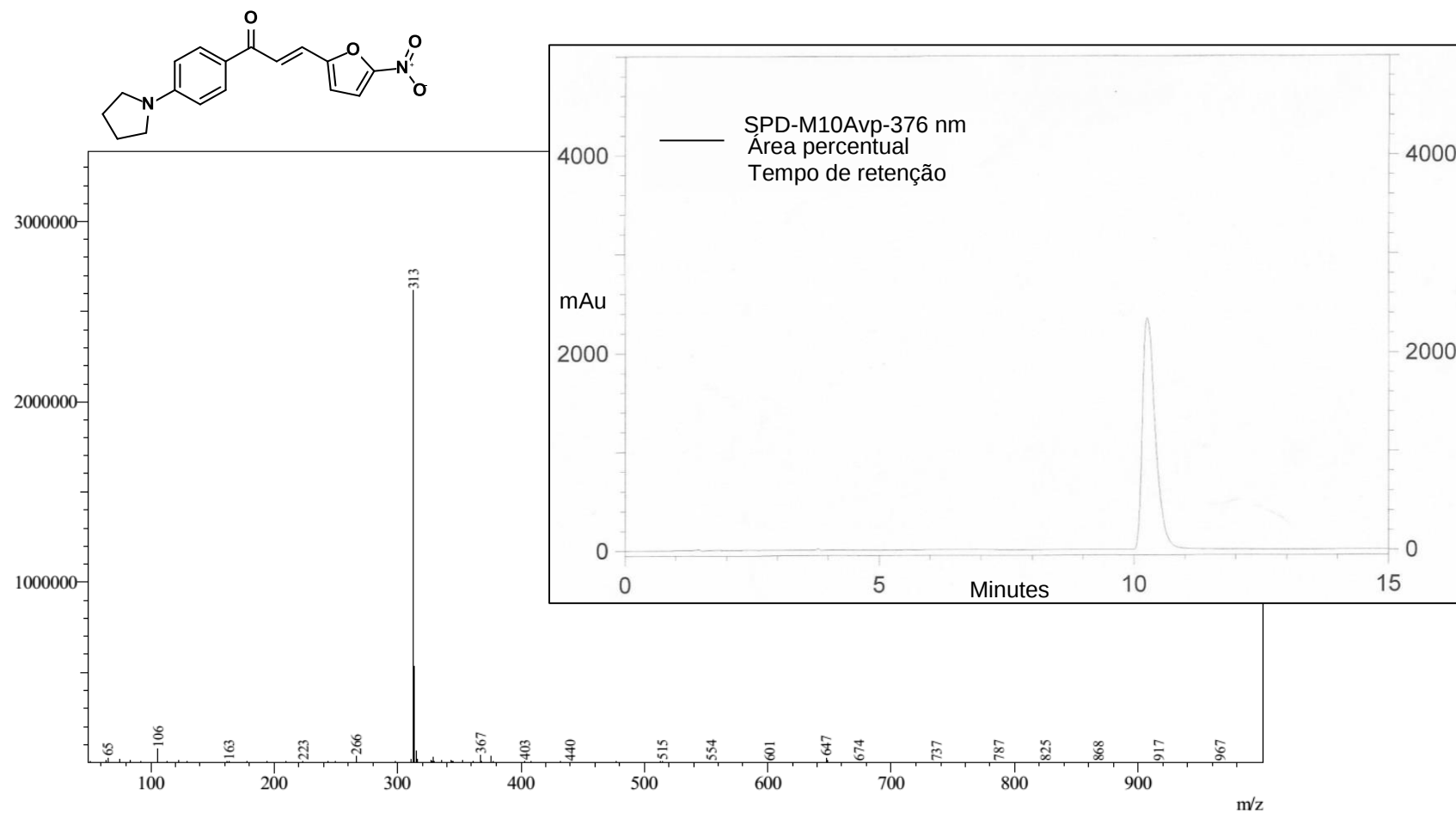
Anexo 73 - Espectro de RMN ¹H (2*E*)-3-(5-nitrofuran-2-il)-1-[4-(pirrolidin-1-il)fenil]prop-2-en-1-ona (**LabMol81**), (**82**) 400 MHz, CDCl₃.



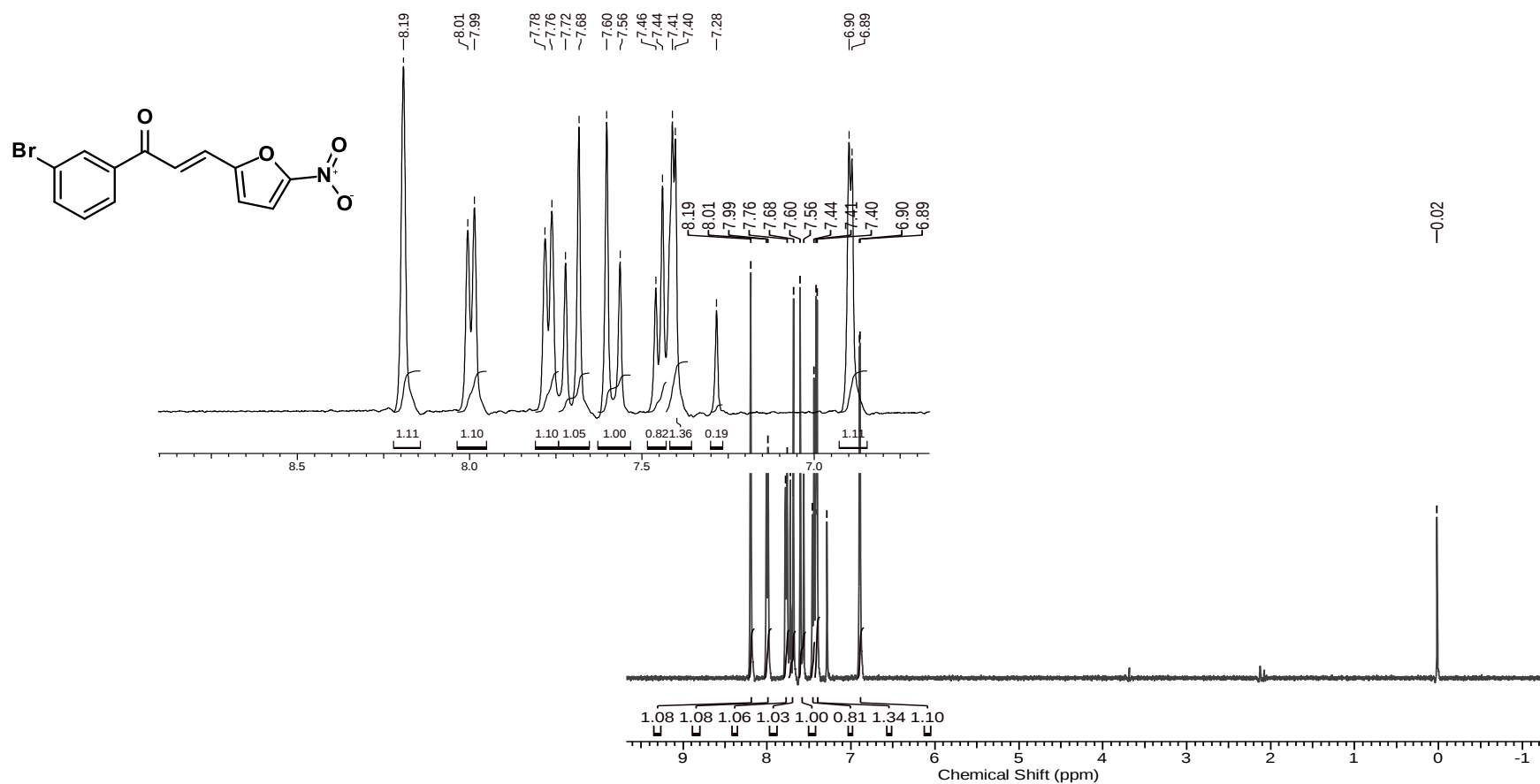
Anexo 74 - Espectro de ¹³C (2E)-3-(5-nitrofuran-2-il)-1-[4-(pirrolidin-1-il)fenil]prop-2-en-1-ona (**LabMol81**), (**82**) 400 MHz, CDCl₃.



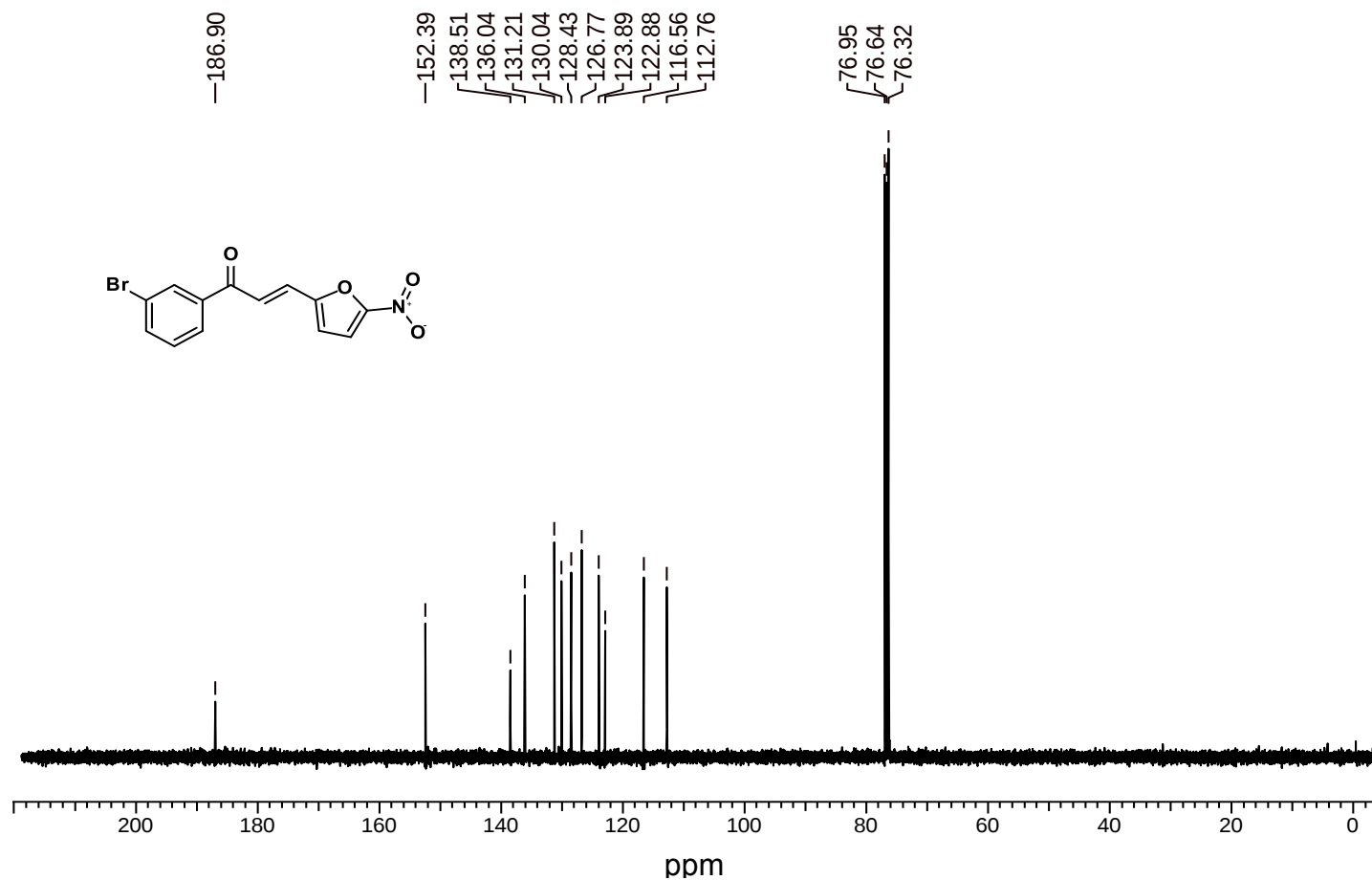
Anexo 75 - Espectro de IV (2E)-3-(5-nitrofuran-2-il)-1-[4-(pirrolidin-1-il)fenil]prop-2-en-1-ona (LabMol81), (82), KBr.



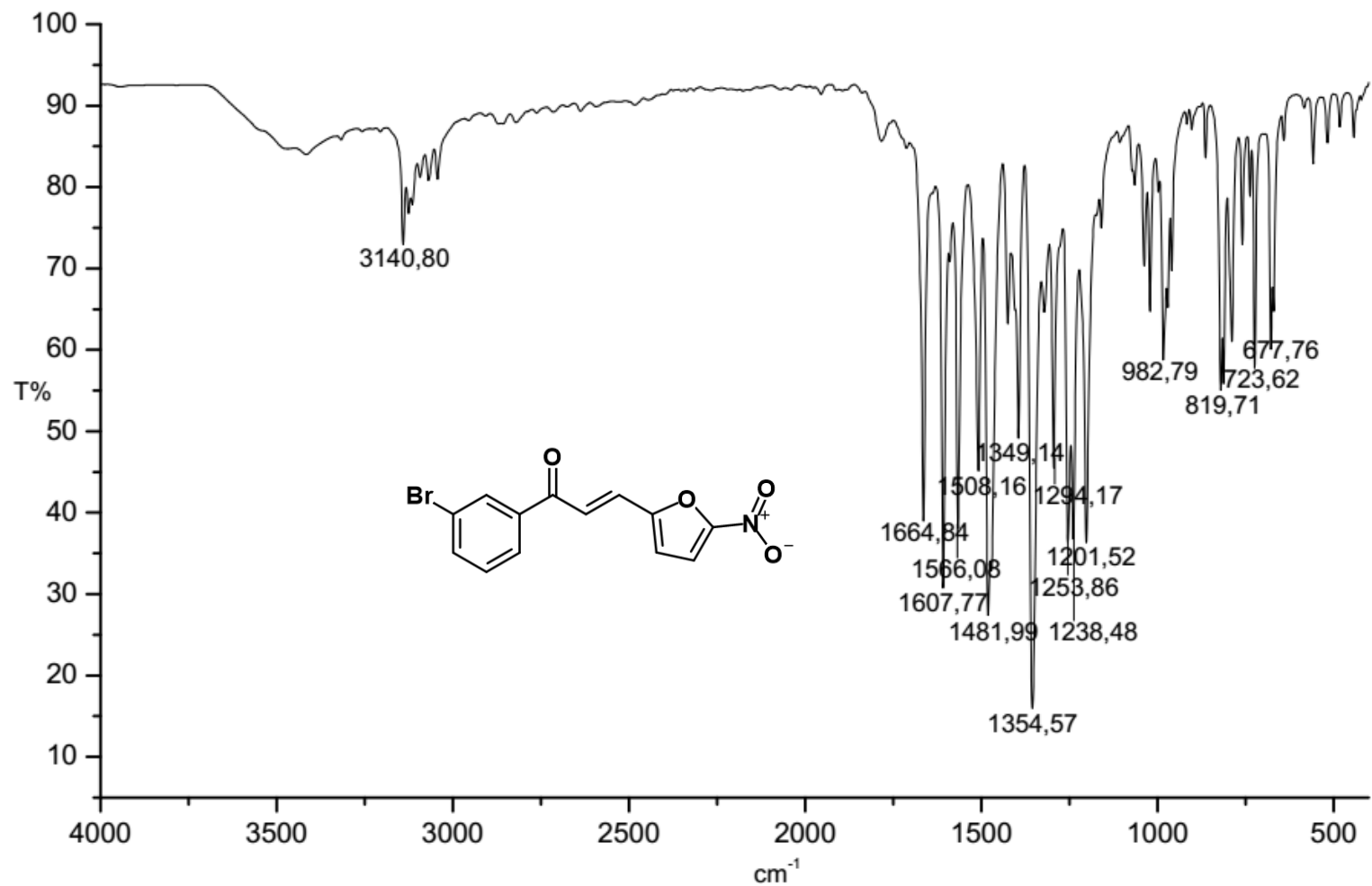
Anexo 76 - Espectro de massas e cromatograma (2E)-3-(5-nitrofuran-2-il)-1-[4-(pirrolidin-1-il)fenil]prop-2-en-1-ona (**LabMol81**), (**82**) 400 MHz, CDCl₃.



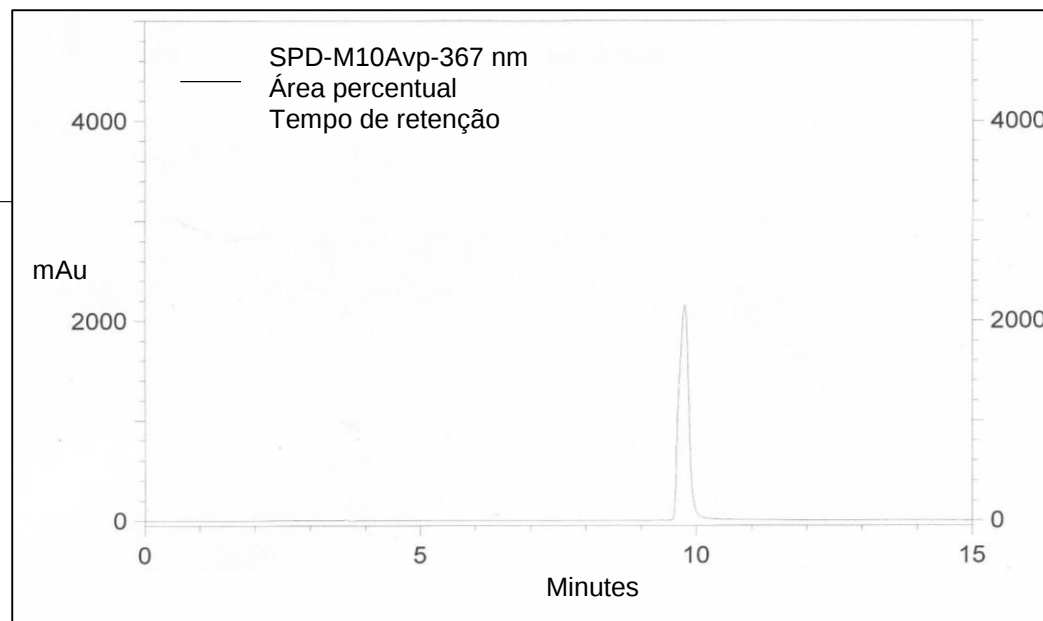
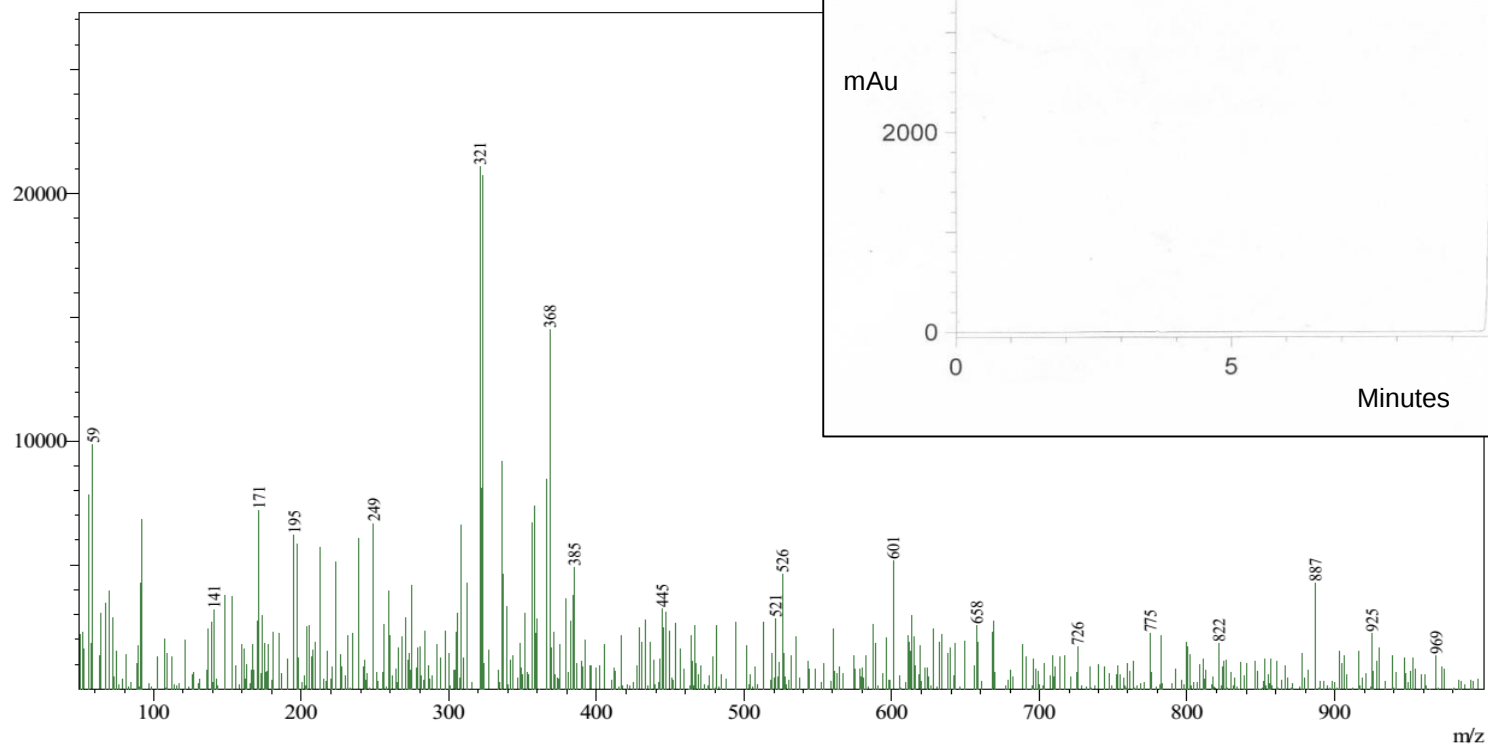
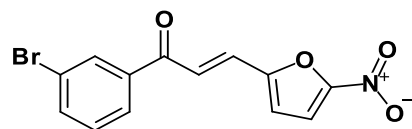
Anexo 77 – Espectro de RMN ¹H (2E)-1-(3-bromofenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-em-1-ona (LabMol82), (83) 400 MHz, CDCl₃



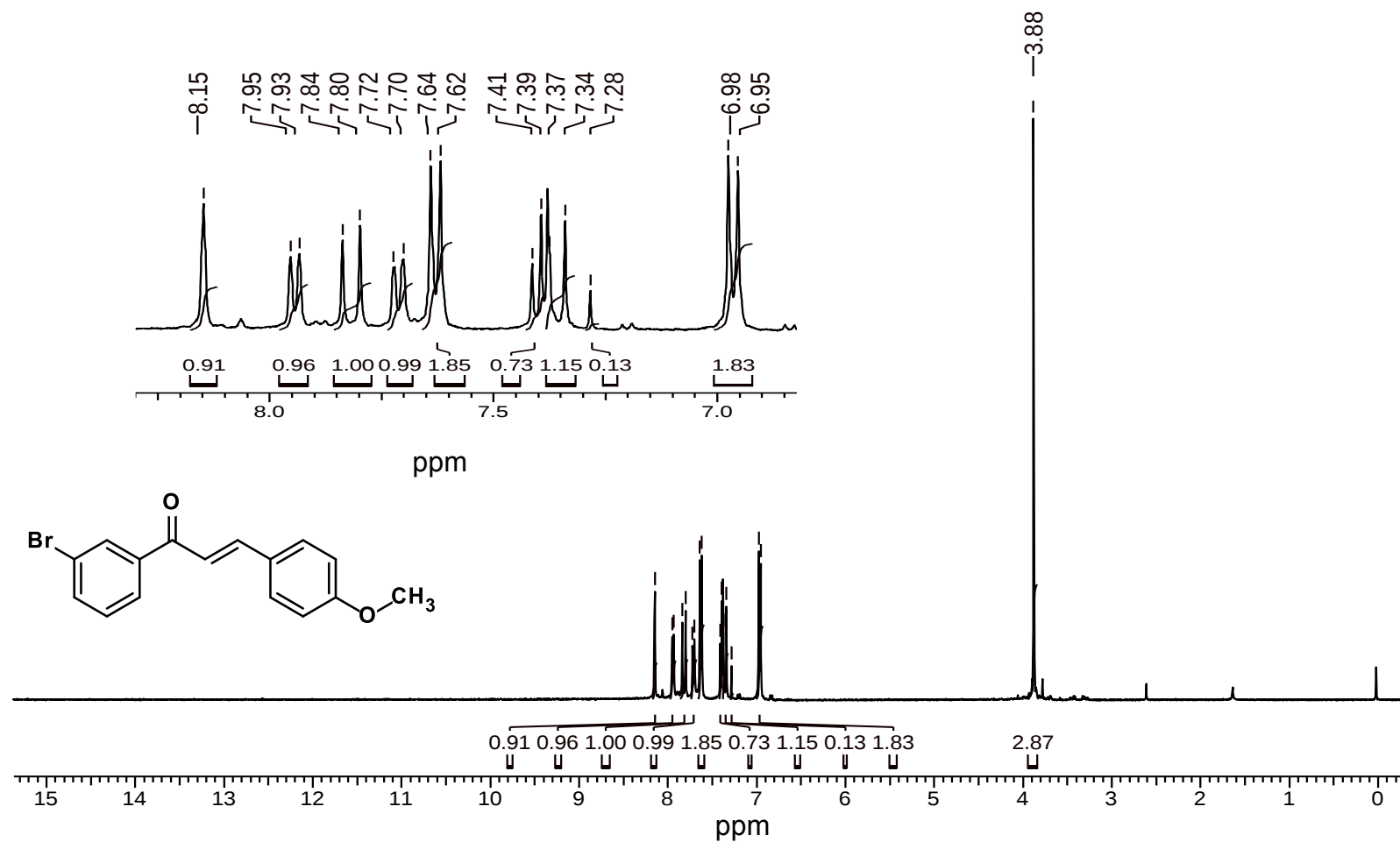
Anexo 78 - Espectro de RMN ¹³C (2E)-1-(3-bromofenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-em-1-ona (LabMol82), (83) 400 MHz, CDCl₃



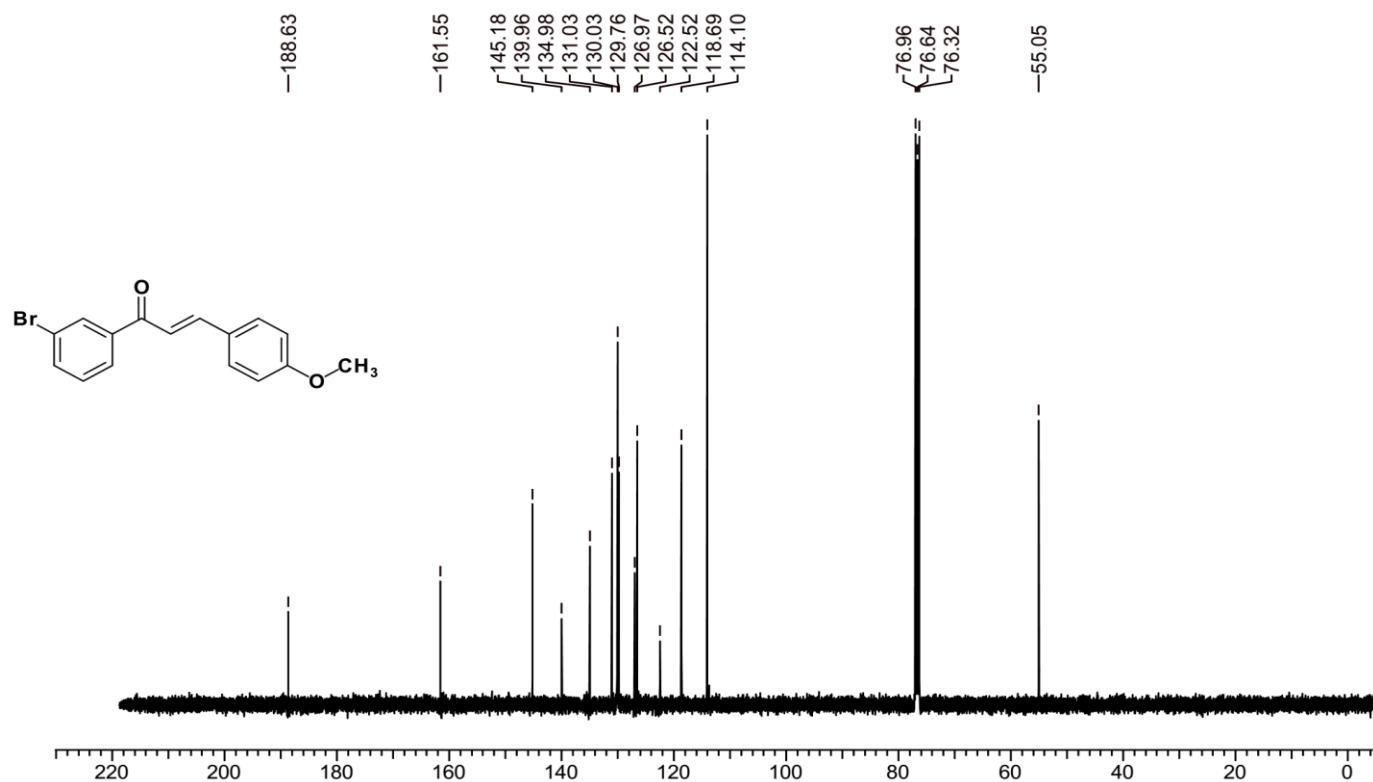
Anexo 79 - Espectro de IV (2E)-1-(3-bromofenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-em-1-ona (LabMol82), (83) KBr



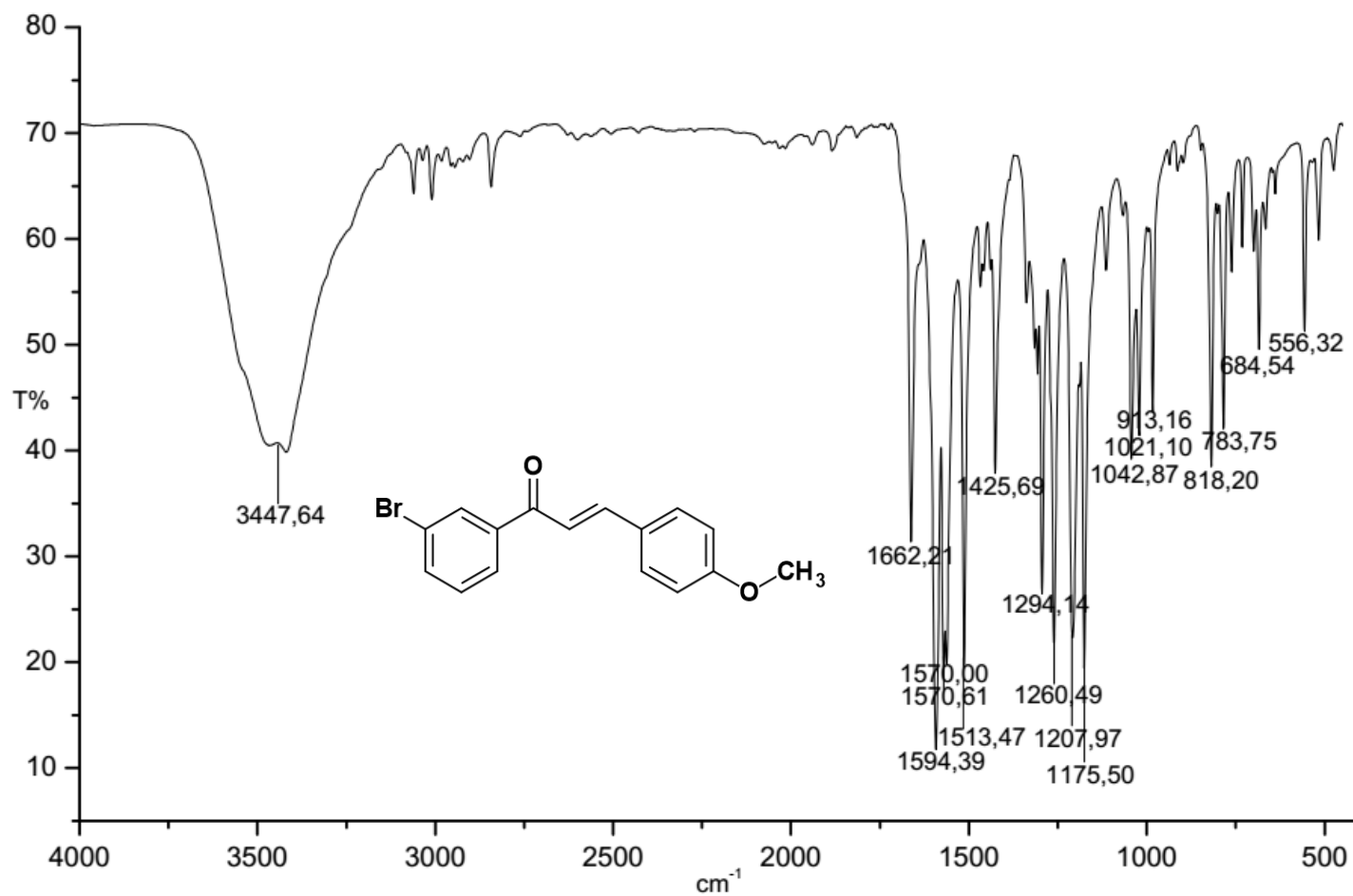
Anexo 80 - Espectro de massas e cromatograma (2E)-1-(3-bromofenil)-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-em-1-ona (**LabMol82**), (**83**).



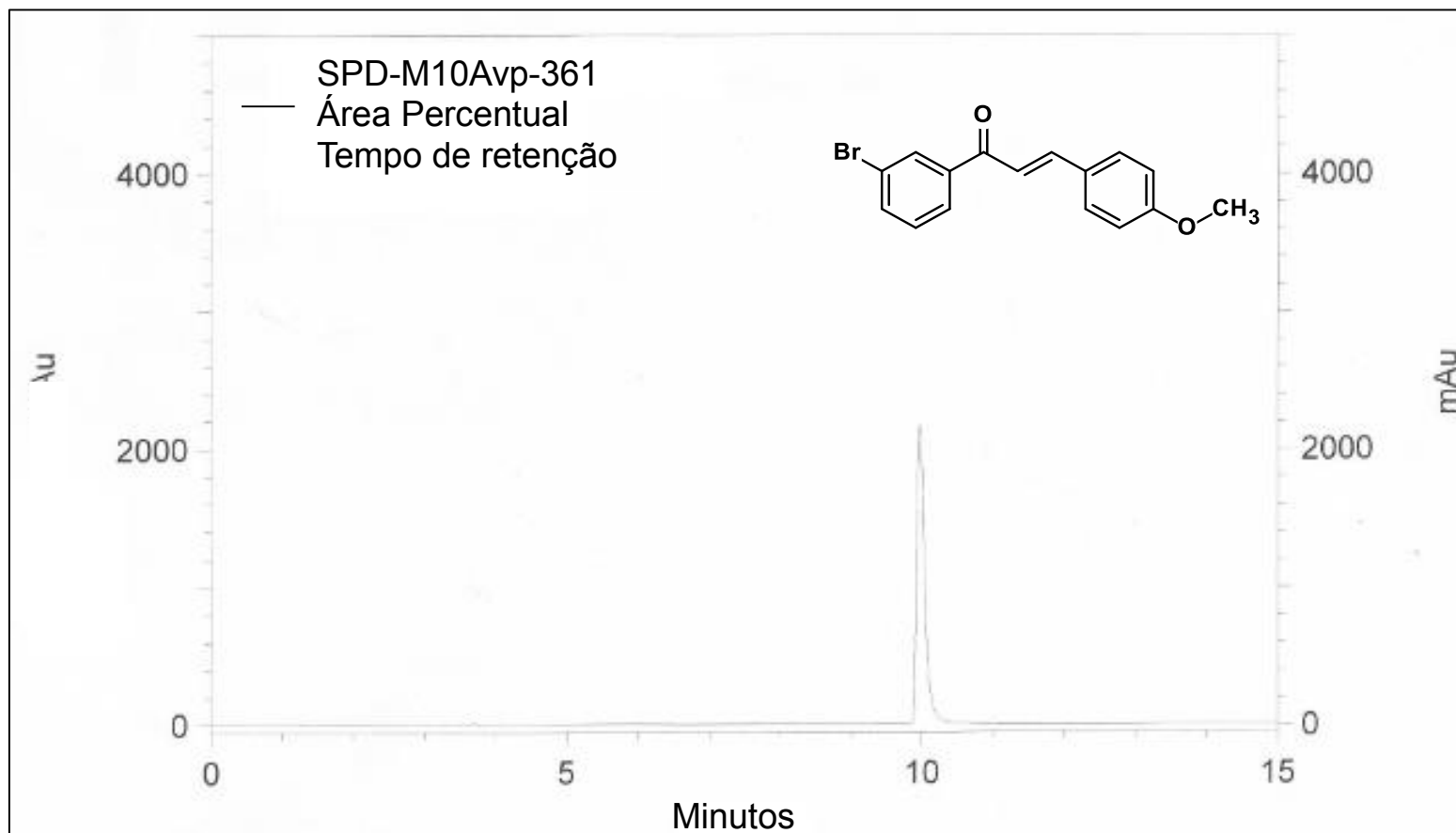
Anexo 81 - Espectro de RMN 1H (E)-1-(3-bromofenil)-3-(4-metoxifenil)prop-2-em-1-ona (LabMol83), (84) 400 MHz, CDCl₃



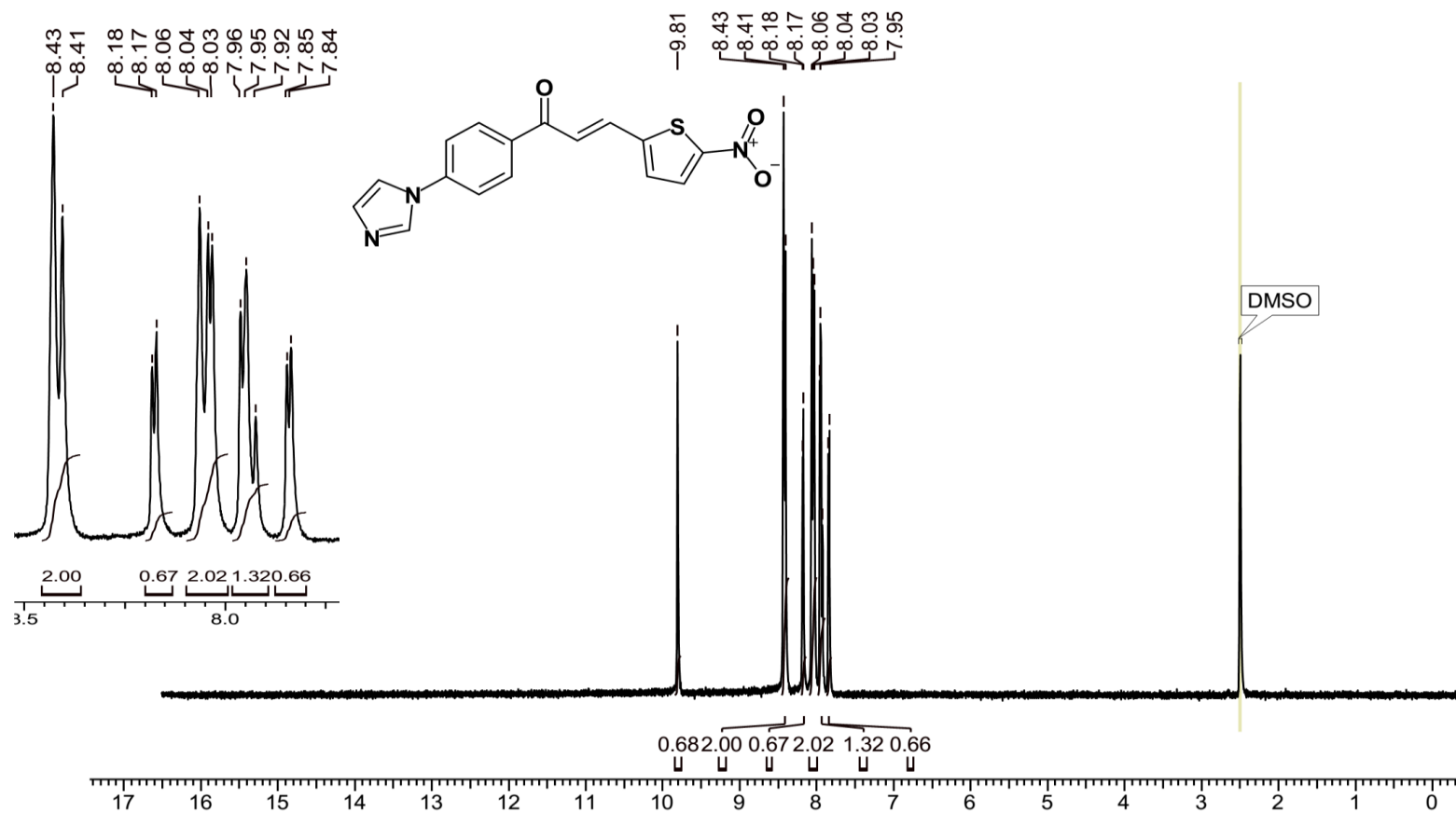
Anexo 82 - Espectro de RMN ¹³C (2E)-1-(3-bromofenil)-3-(4-metoxifenil)prop-2-em-1-ona (**LabMol83**), (**84**) 400 MHz, CDCl₃



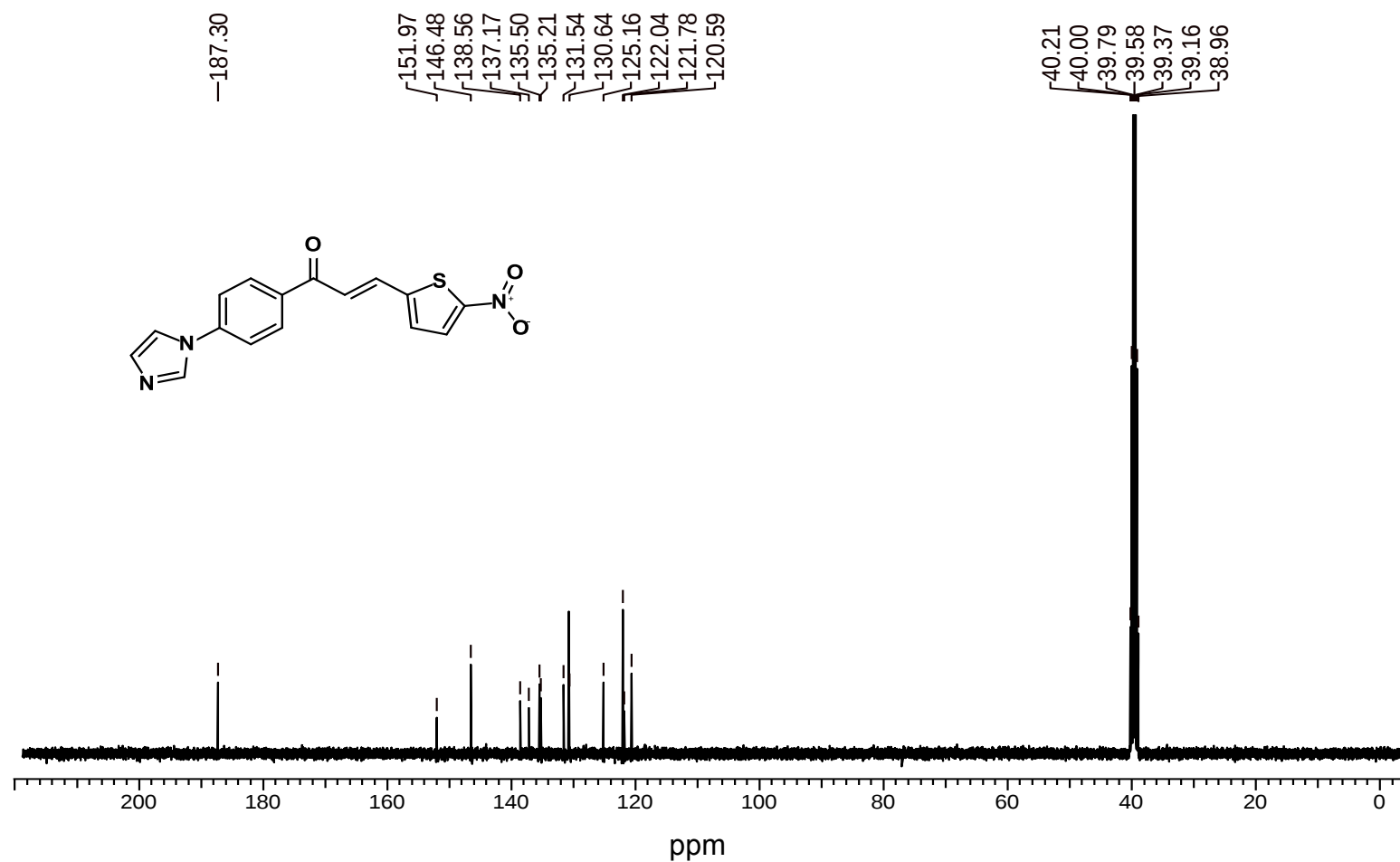
Anexo 83 - Espectro de IV (2E)-1-(3-bromofenil)-3-(4-metoxifenil)prop-2-em-1-ona (LabMol83), (84) KBr.



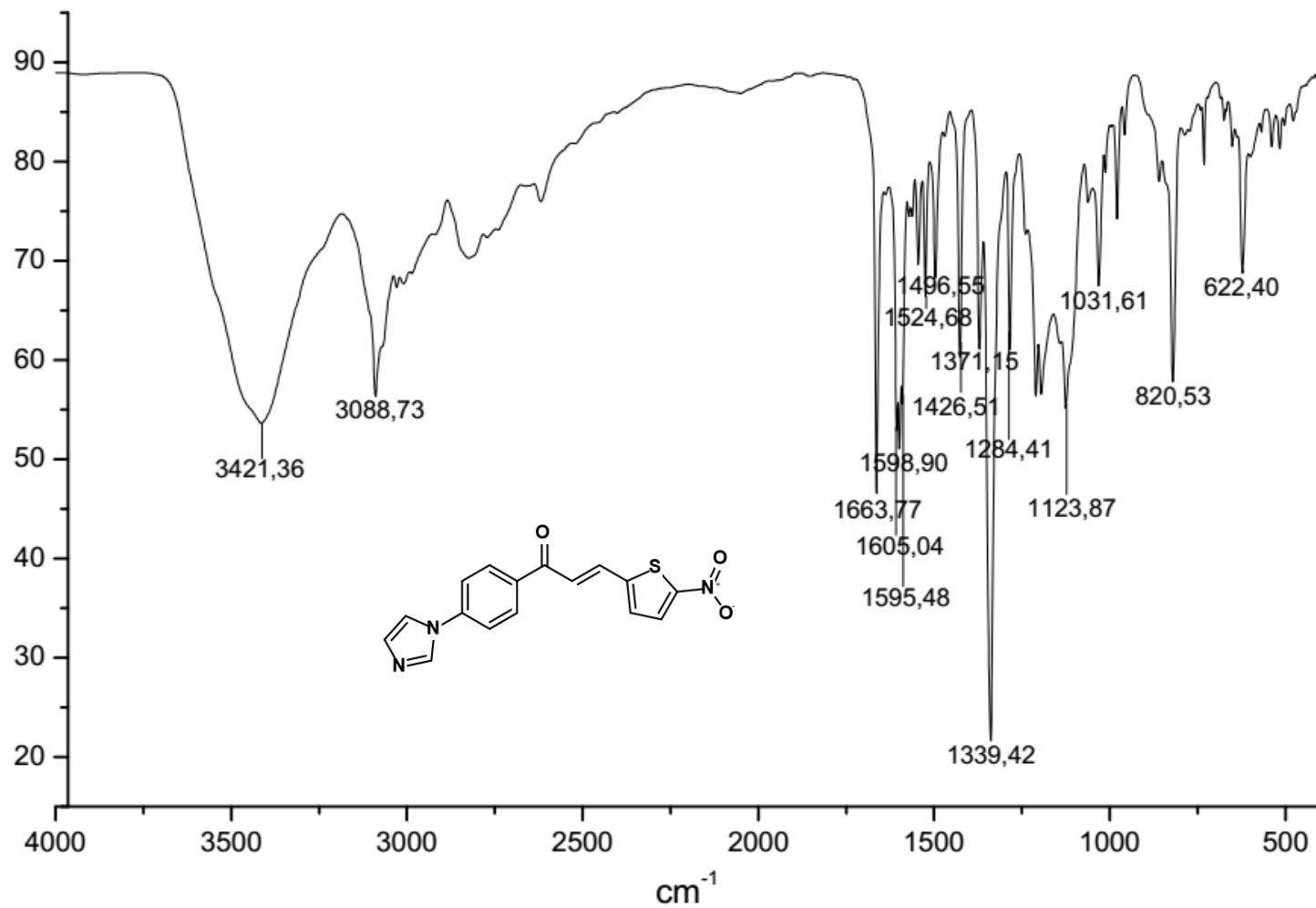
Anexo 84 – Cromatograma (2E)-1-(3-bromofenil)-3-(4-metoxifenil)prop-2-em-1-ona (LabMol83), (84).



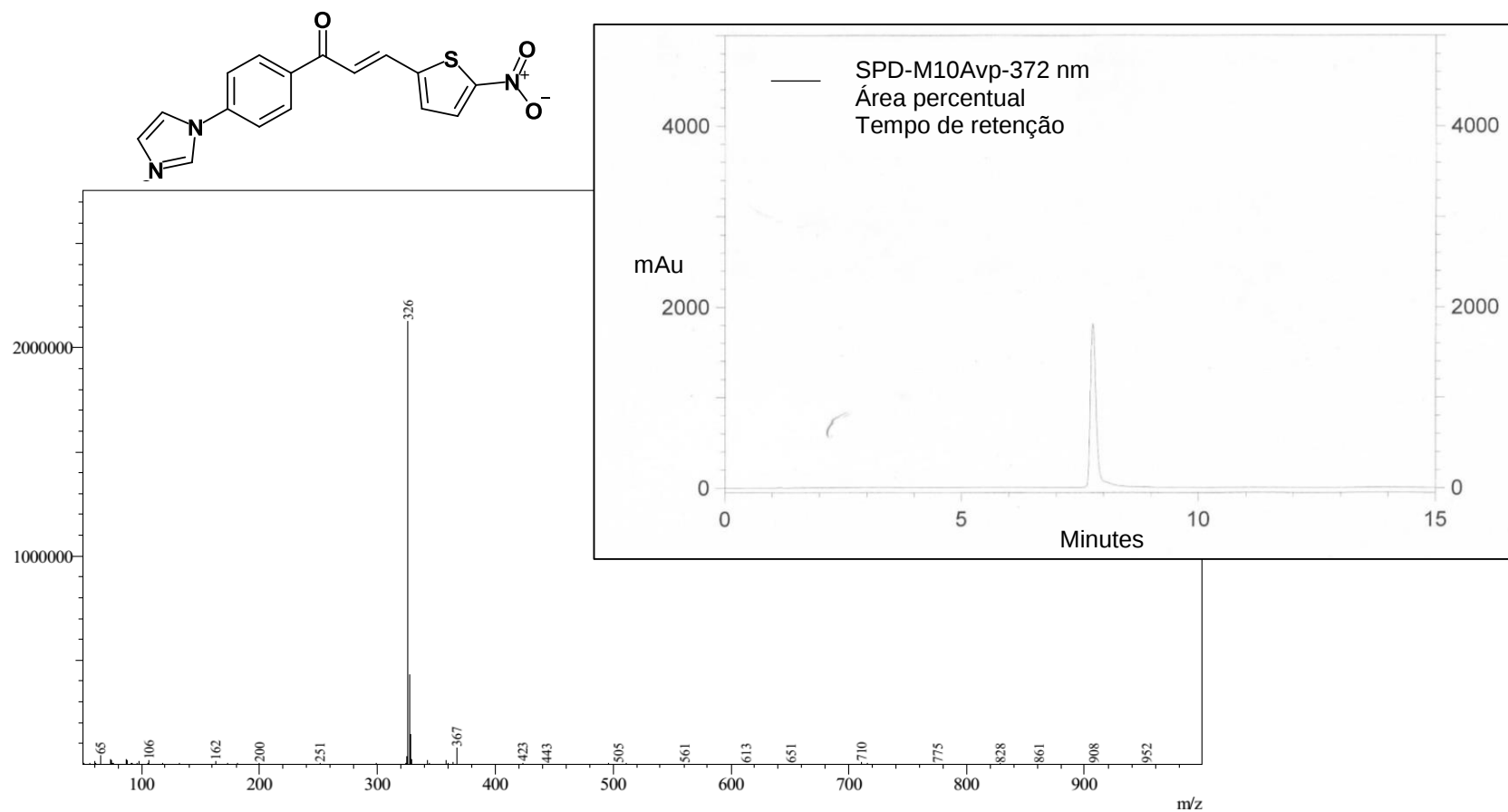
Anexo 85 - Espectro de RMN ¹H (2E)-1-[4-(1H-imidazol-1-il)fenil]-3-(5-nitrotiofen-2-il)prop-2-em-1-ona (LabMol84), (85) 400 MHz, DMSO d₆



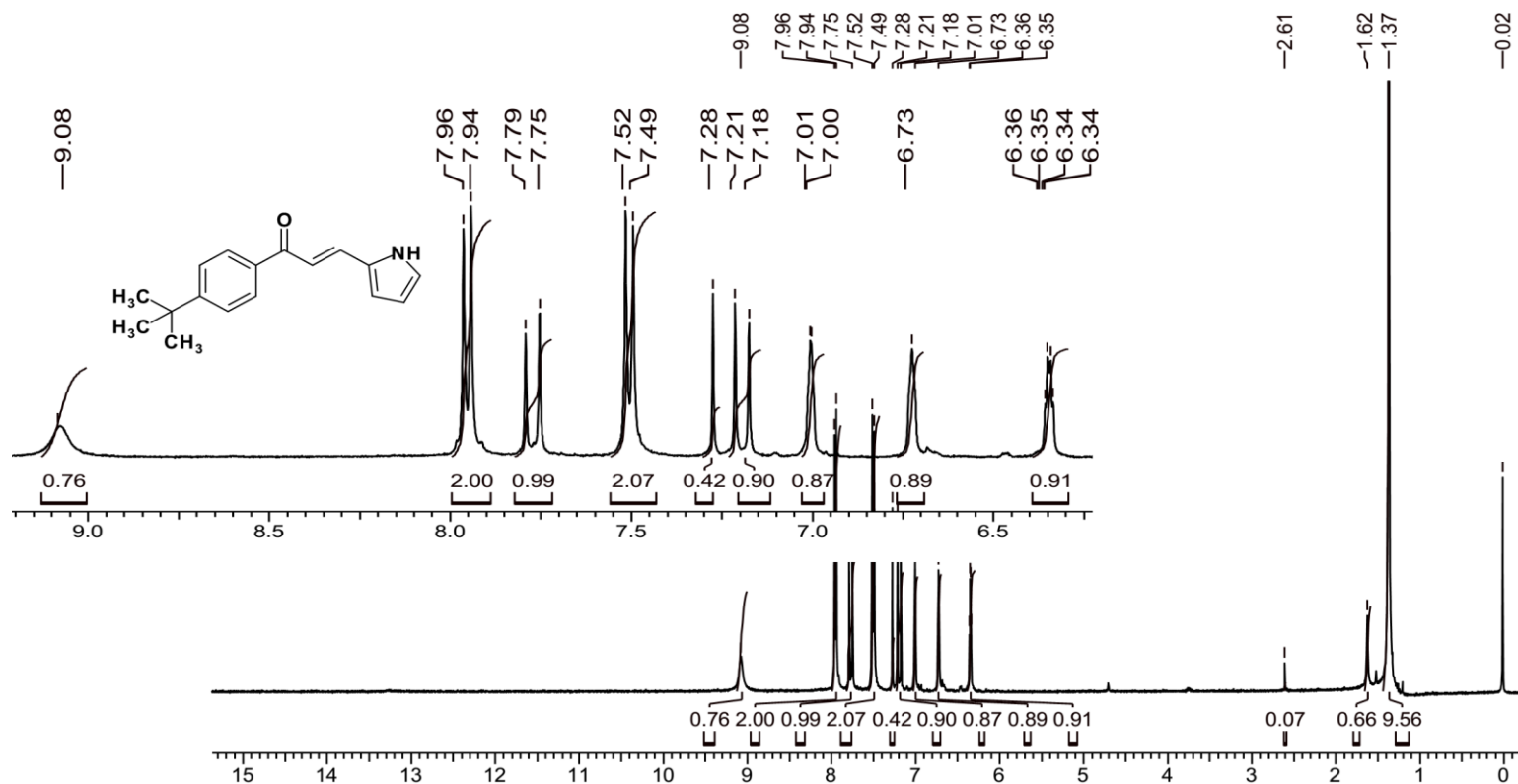
Anexo 86 - Espectro de RMN ¹³C (2E)-1-[4-(1H-imidazol-1-il)fenil]-3-(5-nitrotiofen-2-il)prop-2-em-1-ona (LabMol84), (85) 400 MHz, DMSO d₆



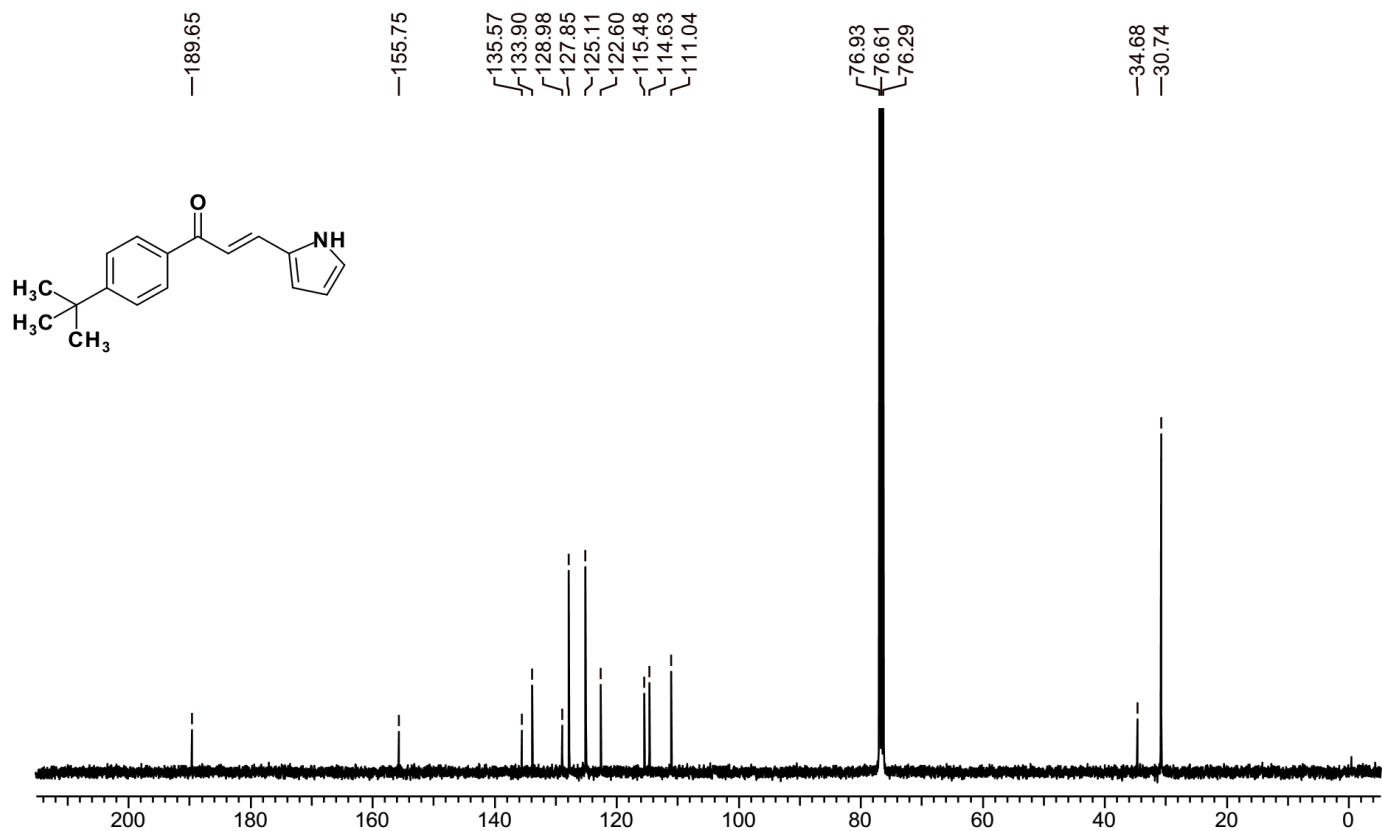
Anexo 87 - Espectro de IV (2E)-1-[4-(1H-imidazol-1-yl)fenil]-3-(5-nitrotiofen-2-il)prop-2-em-1-ona (LabMol84), (85) KBr.



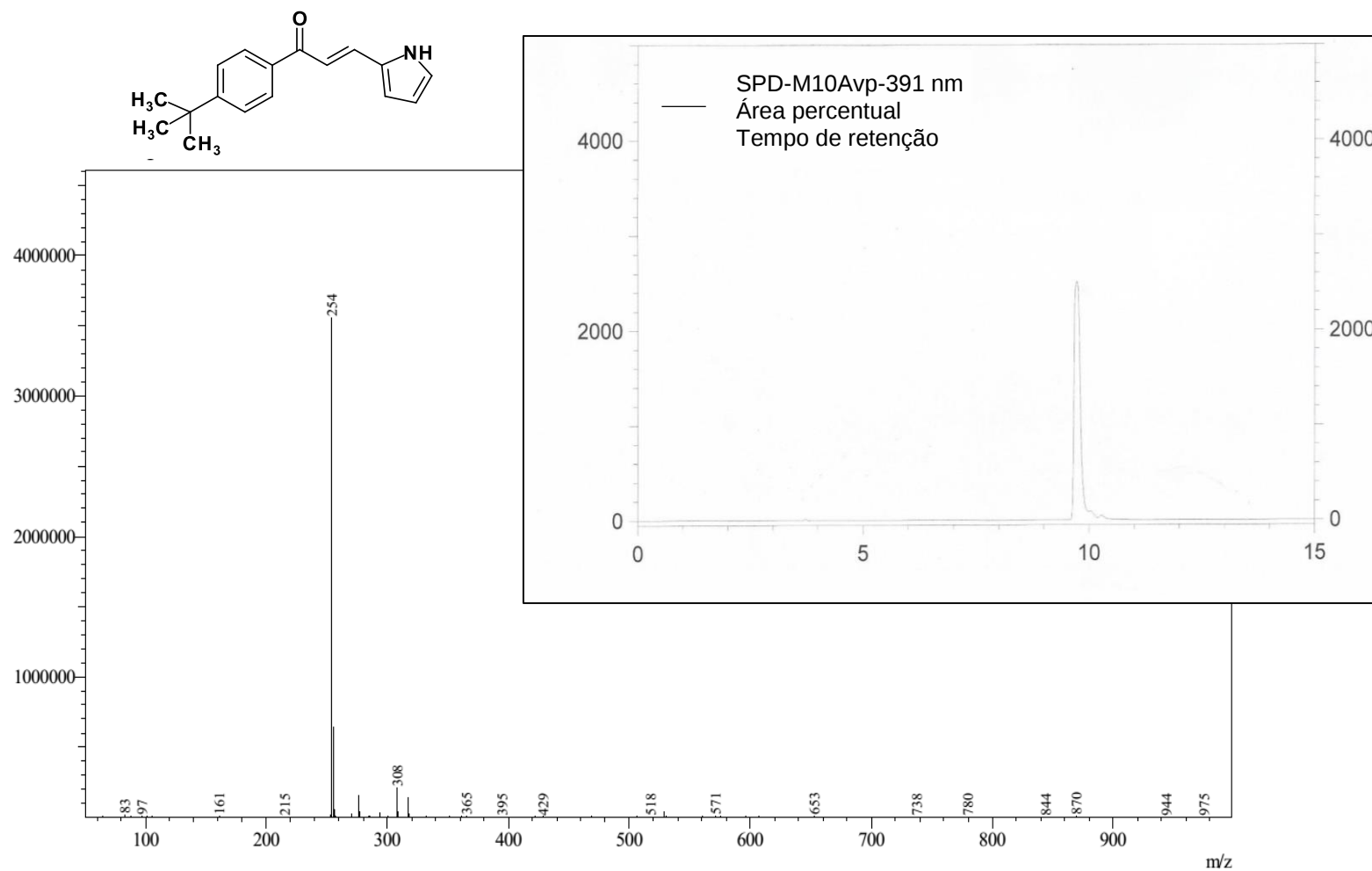
Anexo 88 - Espectro de massas e cromatograma (2E)-1-[4-(1H-imidazol-1-il)fenil]-3-(5-nitrotiofen-2-il)prop-2-em-1-ona (**LabMol84**), (**85**) 400 MHz, DMSO d₆



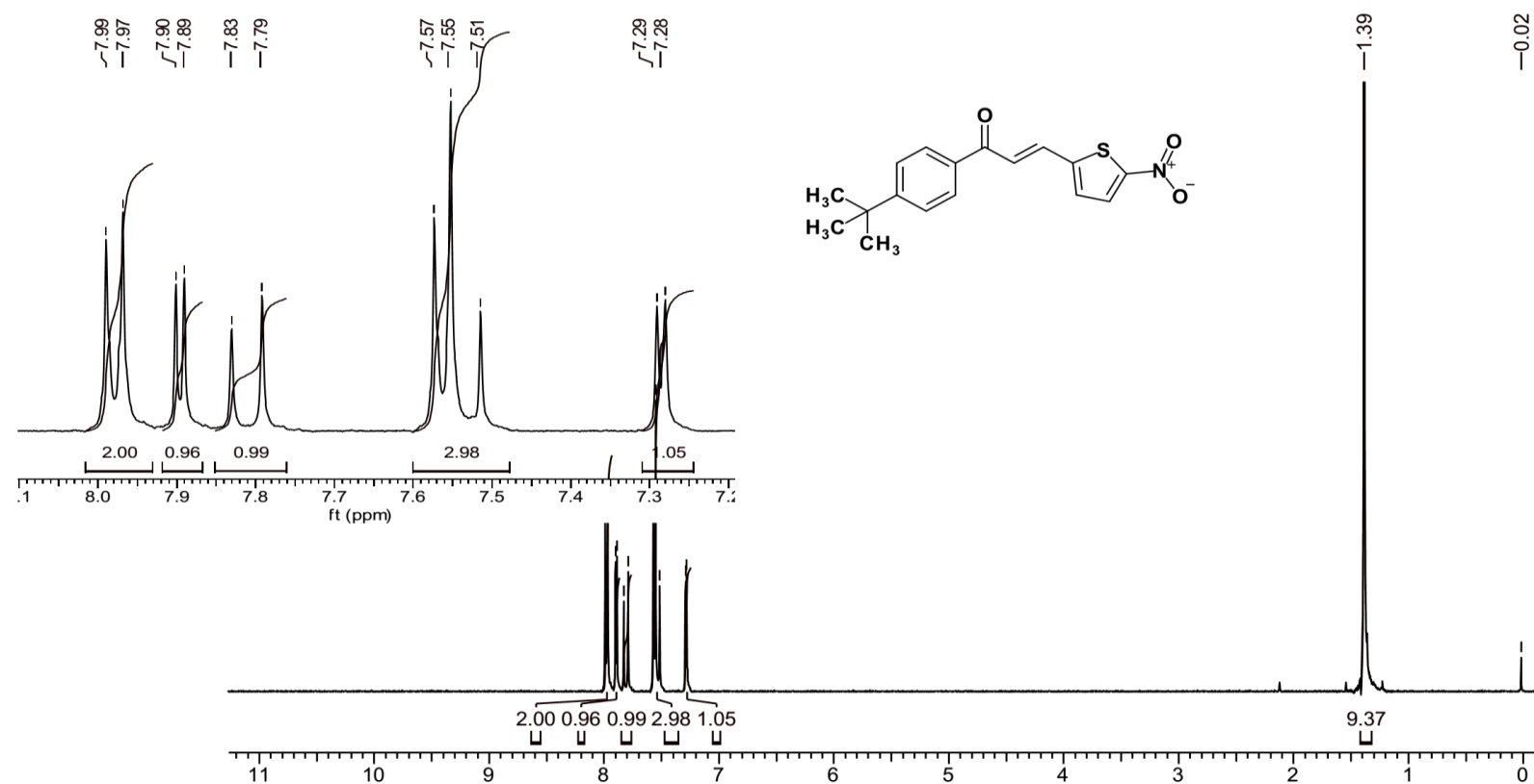
Anexo 89 - Espectro de RMN ¹H (2E)-1-(4-tert-butilfenil)-3-(1H-pirrol-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol85**), (**86**) 400 MHz, CDCl₃.



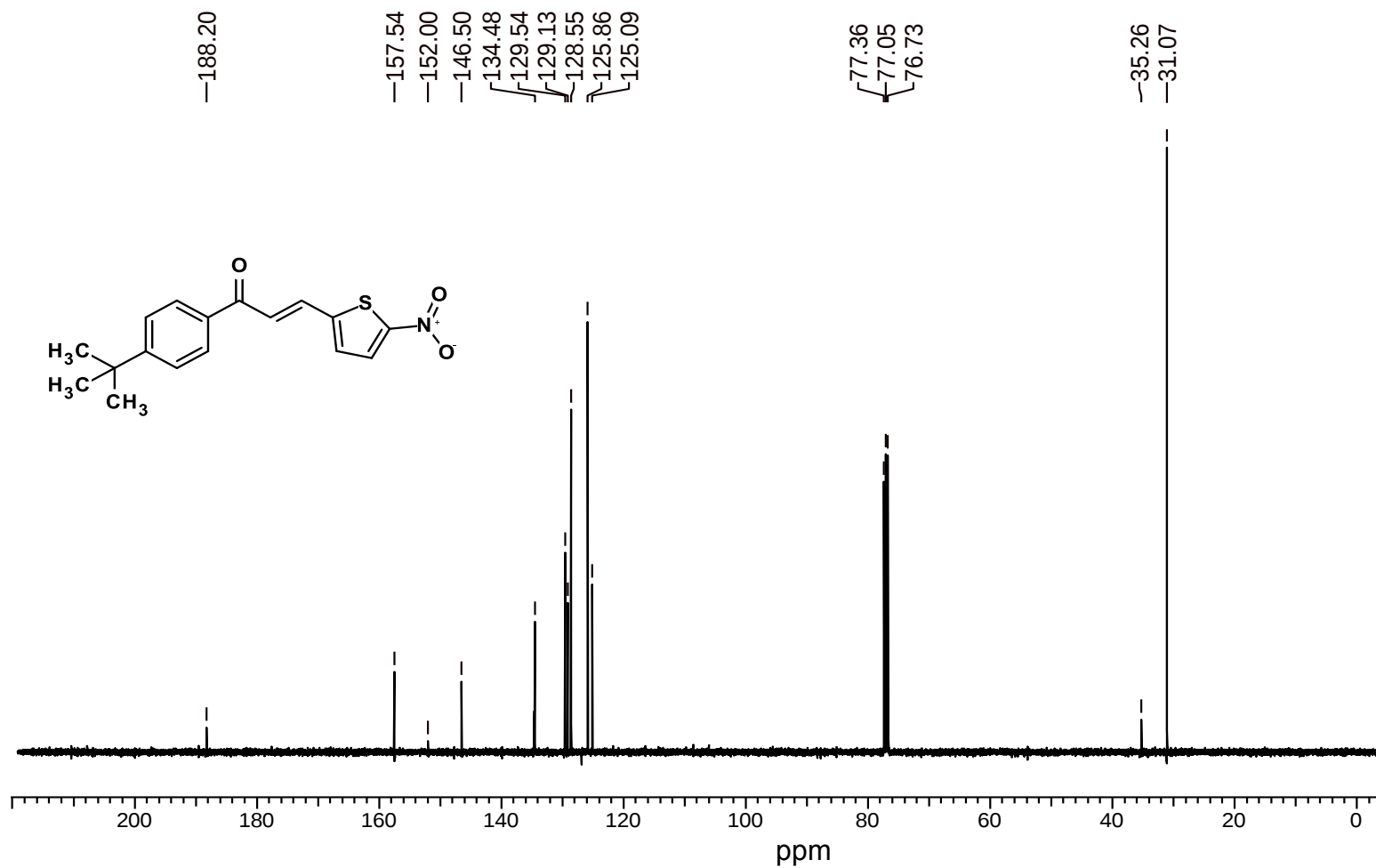
Anexo 90 - Espectro de RMN ¹³C (2E)-1-(4-tert-butilfenil)-3-(1H-pirrol-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol85**), (**86**) 400 MHz, CDCl₃.



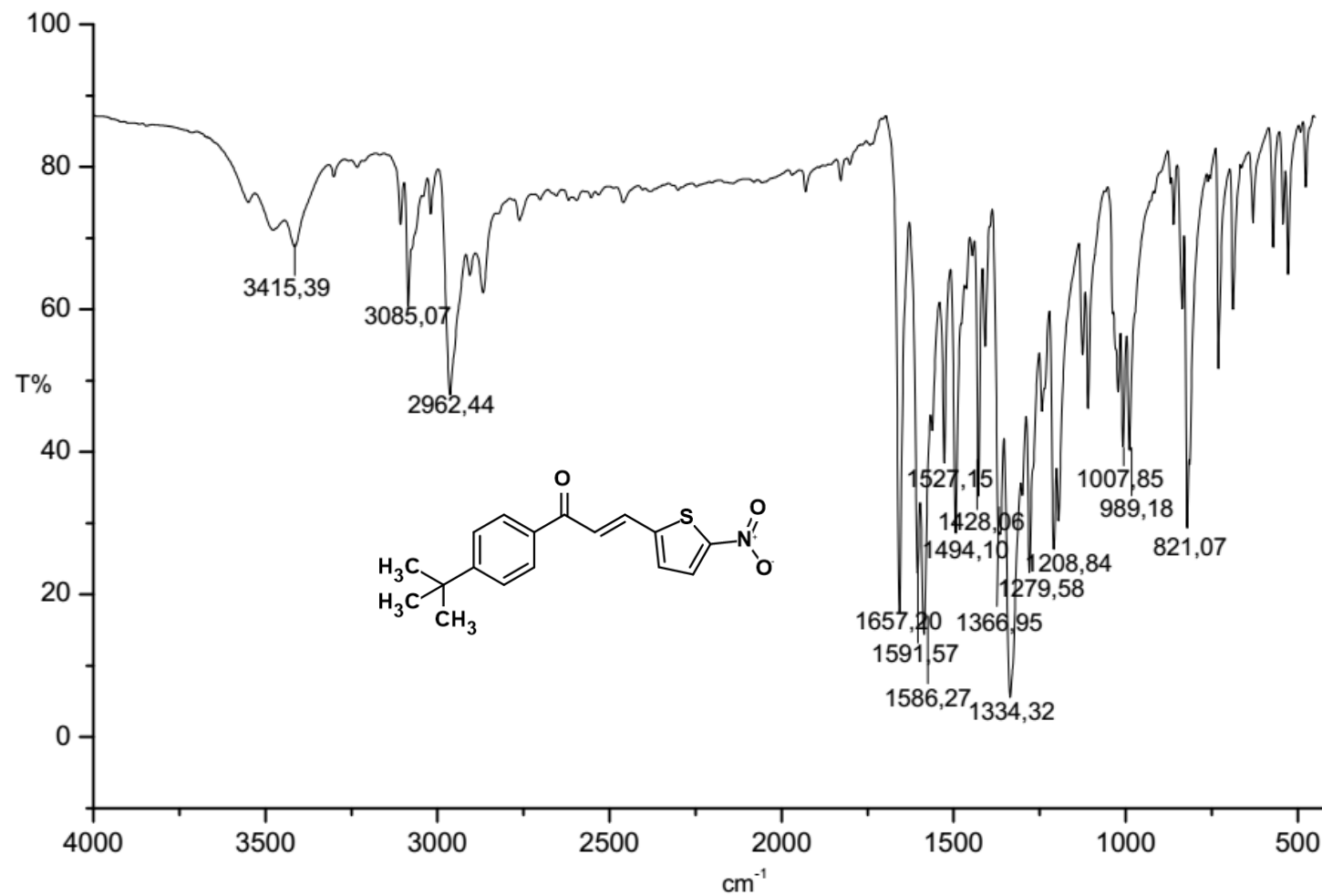
Anexo 91 - Espectro de massas e cromatograma (2E)-1-(4-tert-butilfenil)-3-(1H-pirrol-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol85**), (**86**).



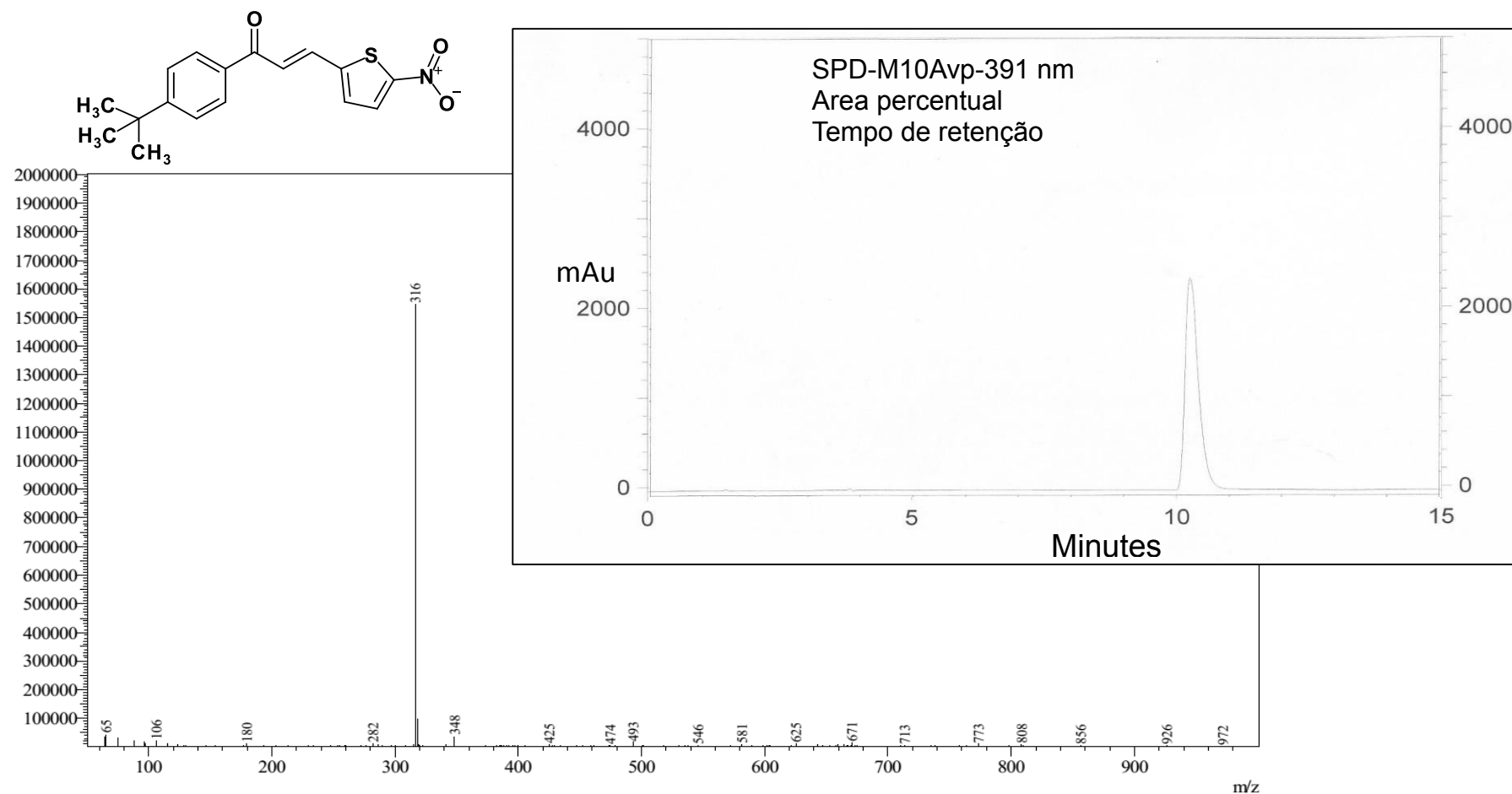
Anexo 92 - Espectro de RMN ¹H (2E)-1-(4-tert-butilfenil)-3-(5-nitrotiofen-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol86**), (**87**) 400 MHz, CDCl₃



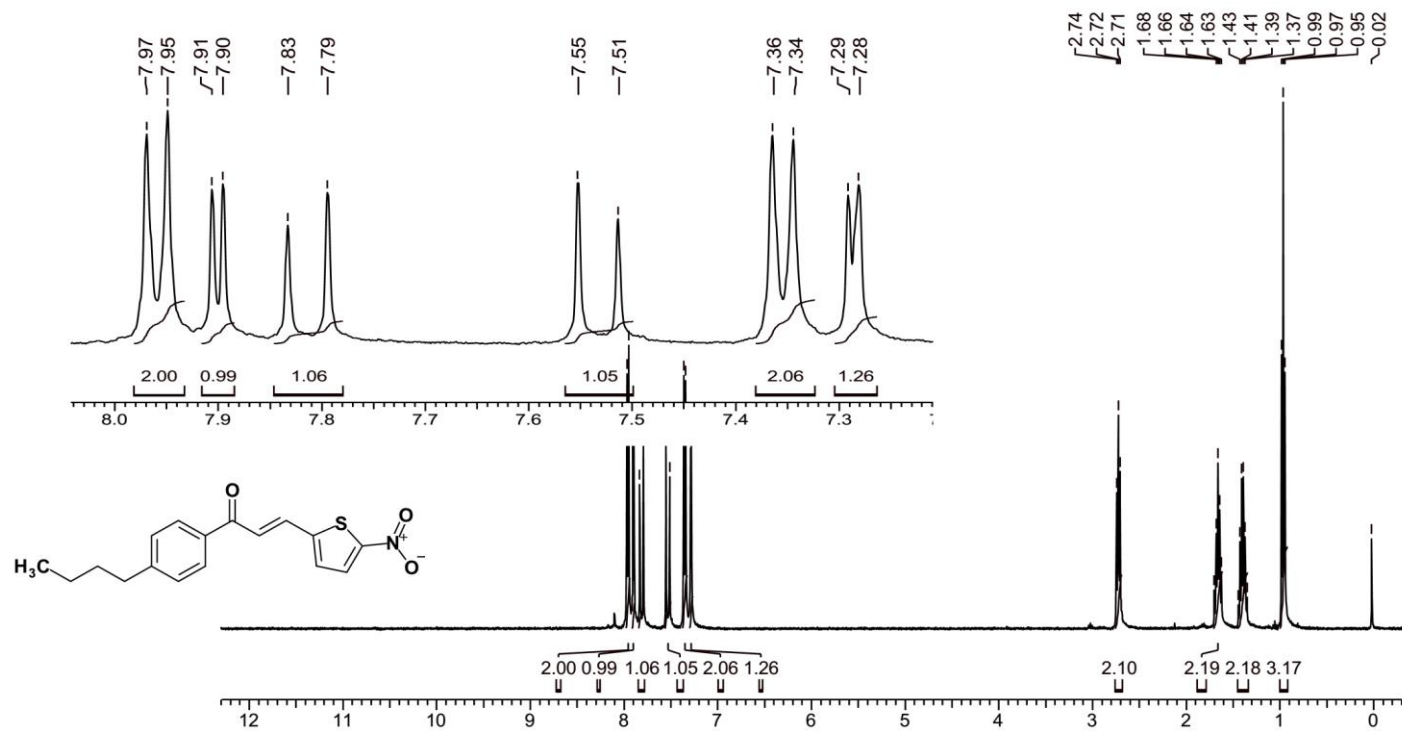
Anexo 93 - Espectro de RMN ¹³C (2E)-1-(4-tert-butilfenil)-3-(5-nitrotiofen-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol86), (87) 400 MHz, CDCl₃



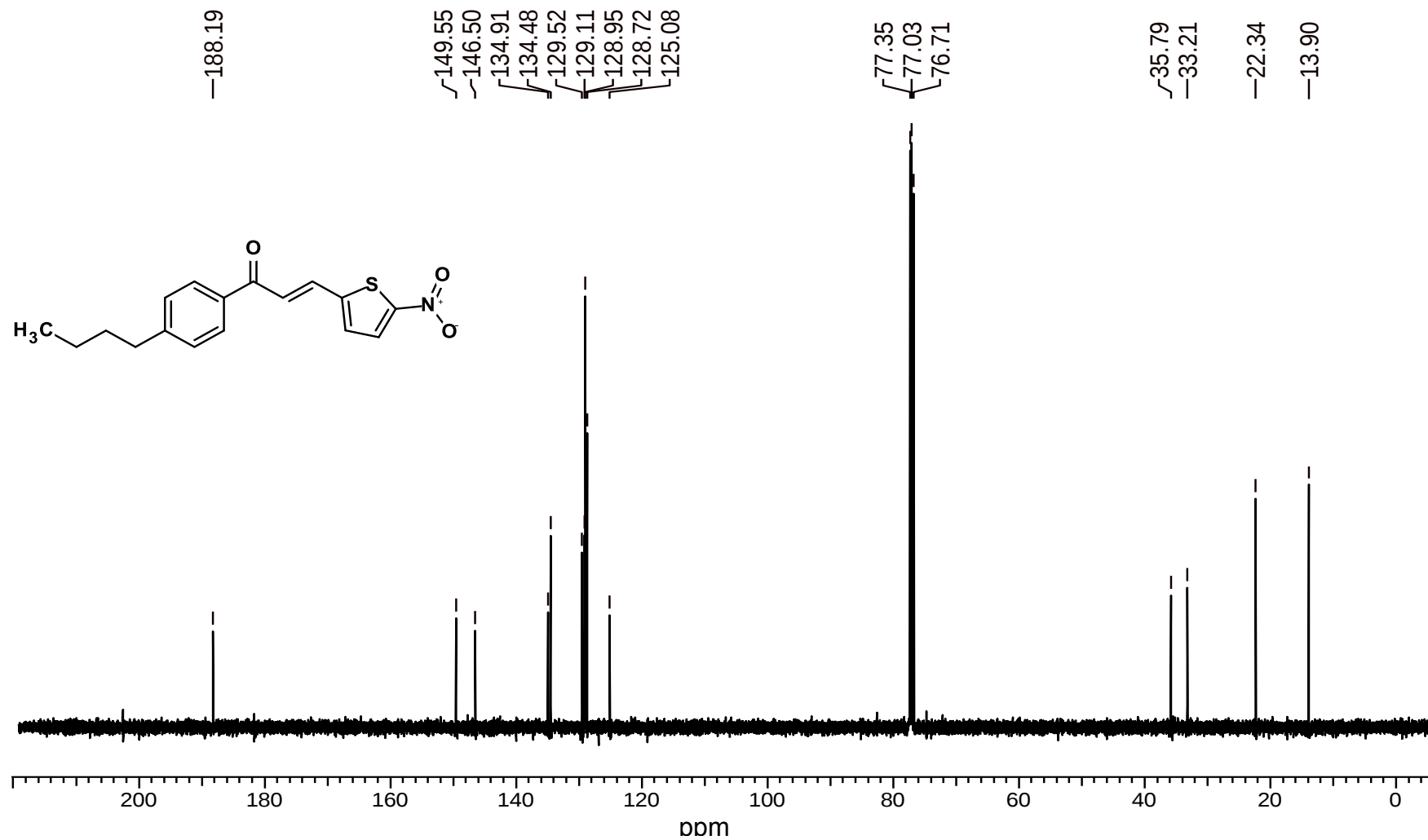
Anexo 94 - Espectro de IV (2E)-1-(4-tert-butilfenil)-3-(5-nitrotiofen-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol86**), (87) KBr.



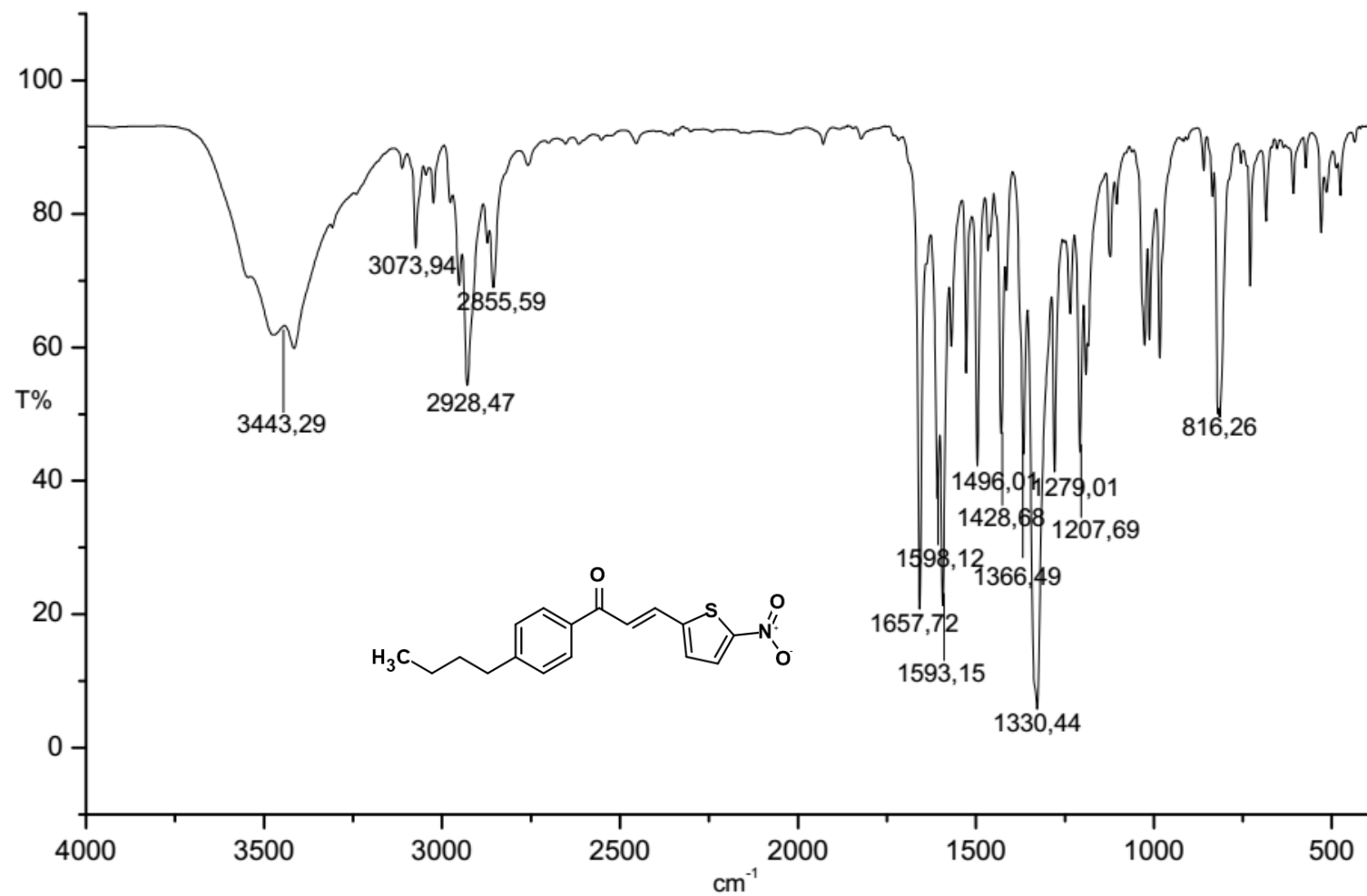
Anexo 95 - Espectro de massas e cromatograma (2E)-1-(4-tert-butilfenil)-3-(5-nitrotiofen-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol86**), (**87**).



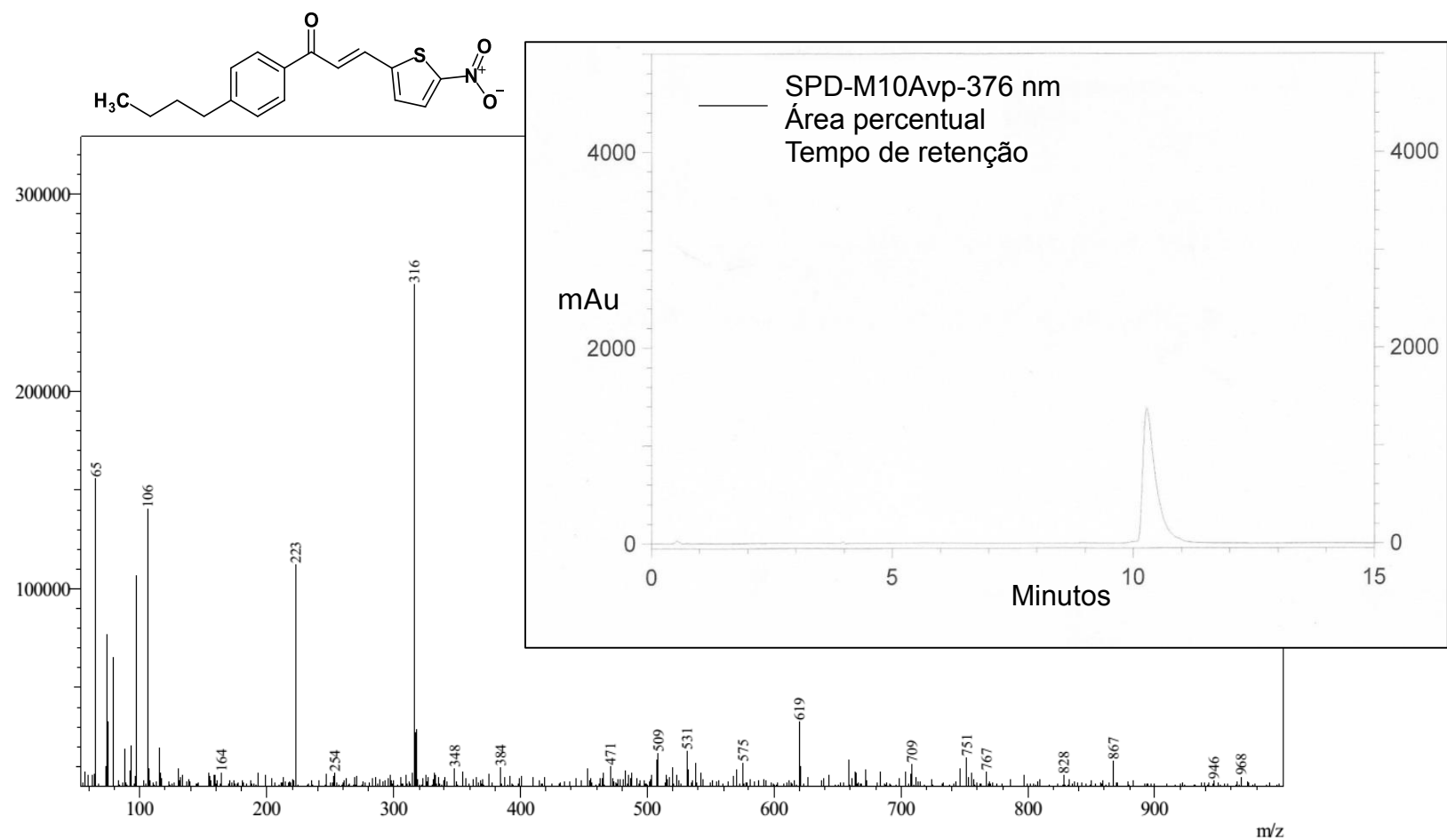
Anexo 96 - Espectro de RMN ^1H (2E)-1-(4-butilfenil)-3-(5-nitrotiofen-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol87**), (**88**), 400 MHz, CDCl_3



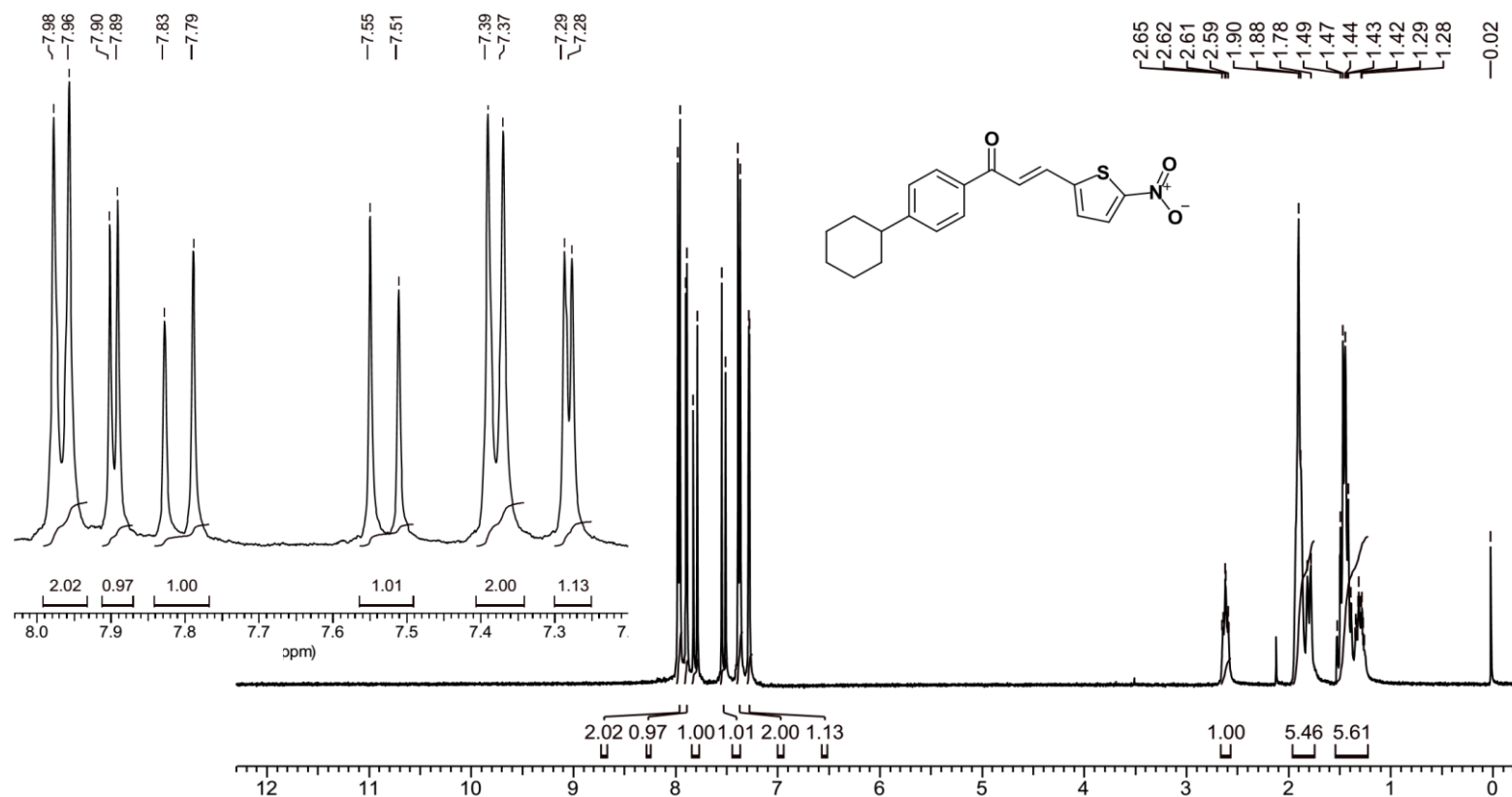
Anexo 97 - Espectro de RMN ¹³C (2E)-1-(4-butilfenil)-3-(5-nitrotiofen-2-il)prop-2-en-1-ona (LabMol87), (88) 400 MHz, CDCl₃



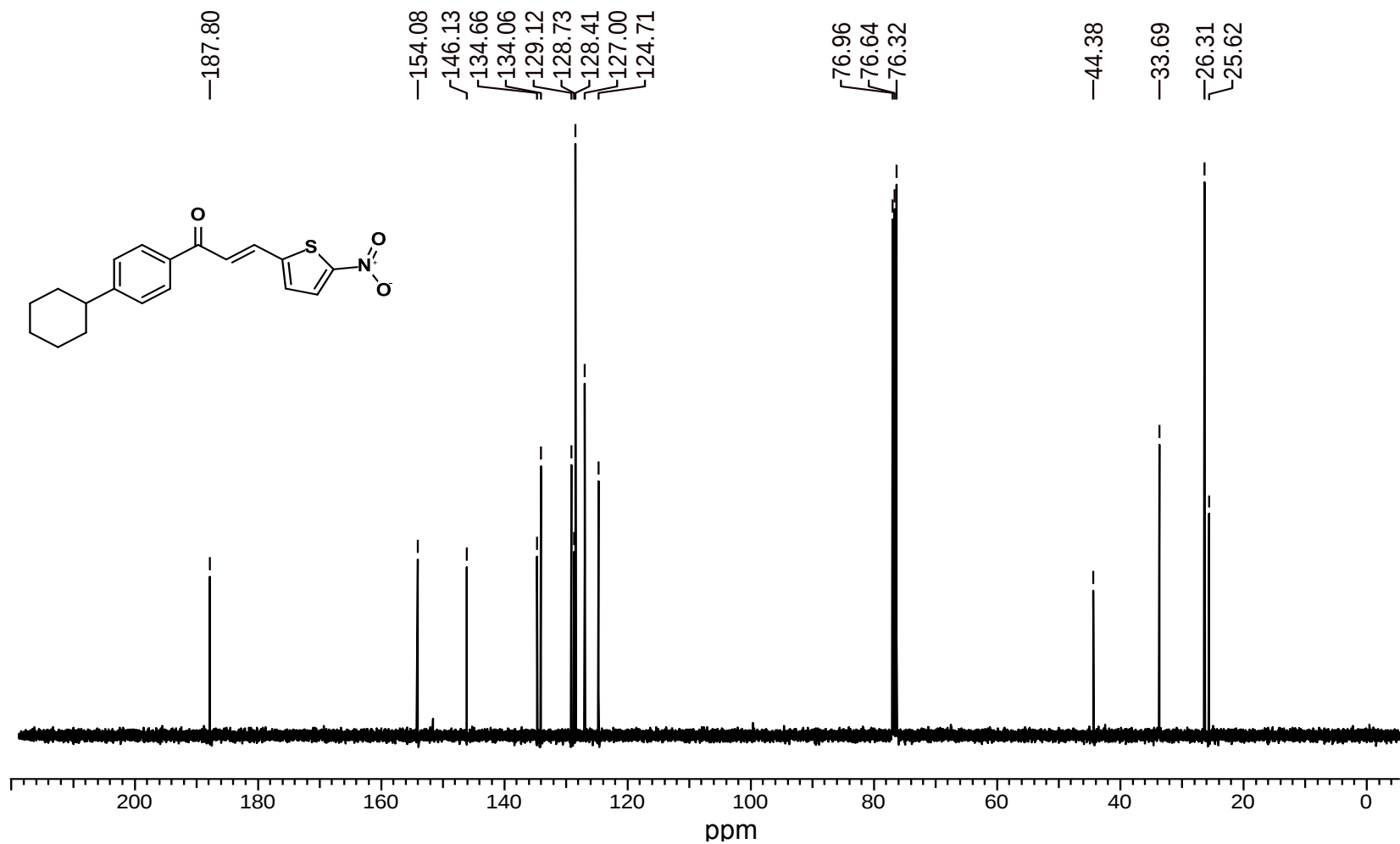
Anexo 98 - Espectro de IV (2E)-1-(4-butilfenil)-3-(5-nitrotiofen-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol87**), (**88**) KBr.



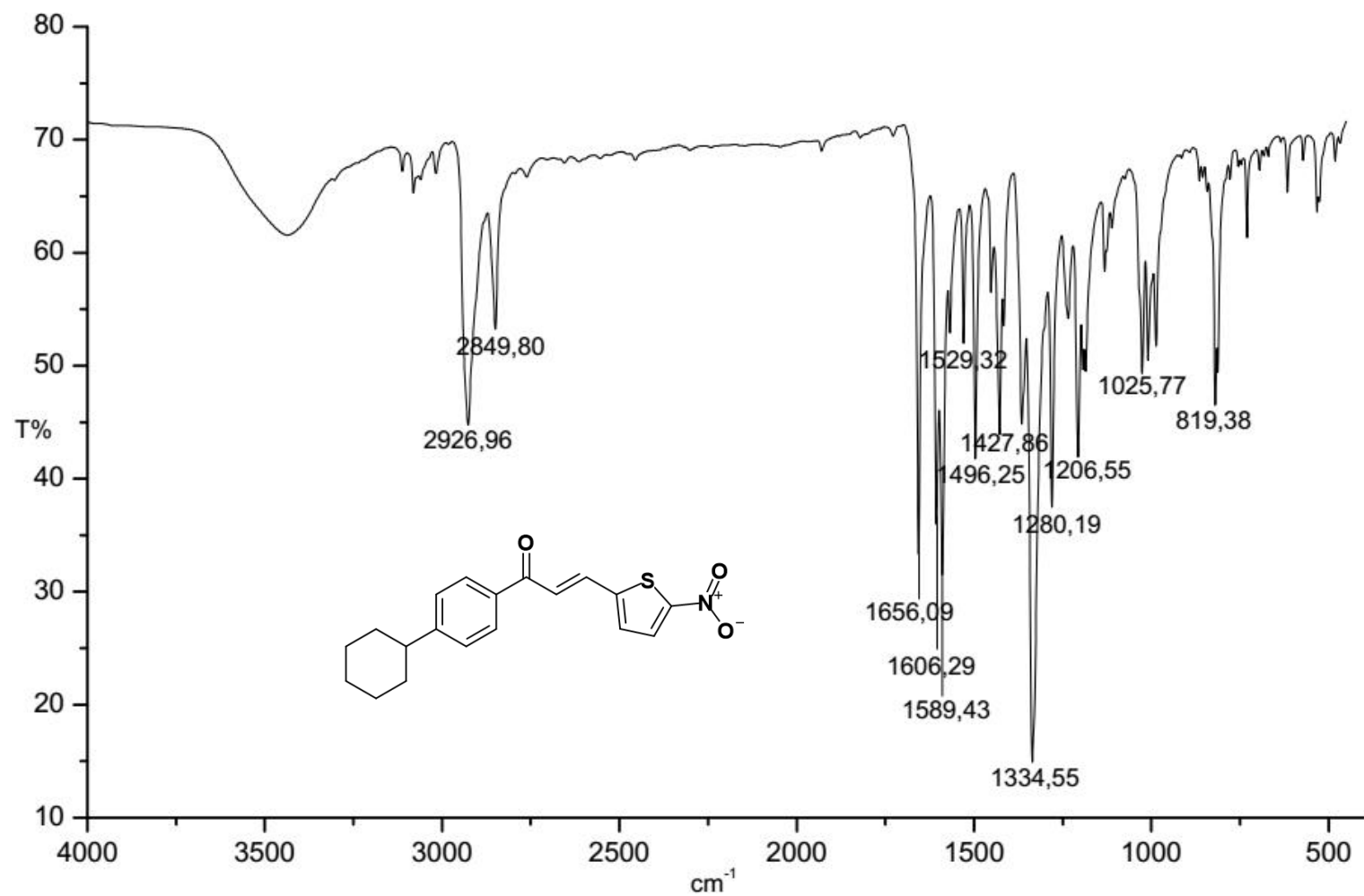
Anexo 99 - Espectro de massas e cromatograma (2E)-1-(4-butilfenil)-3-(5-nitrotiofen-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol87**), (**88**) 400 MHz, CDCl₃



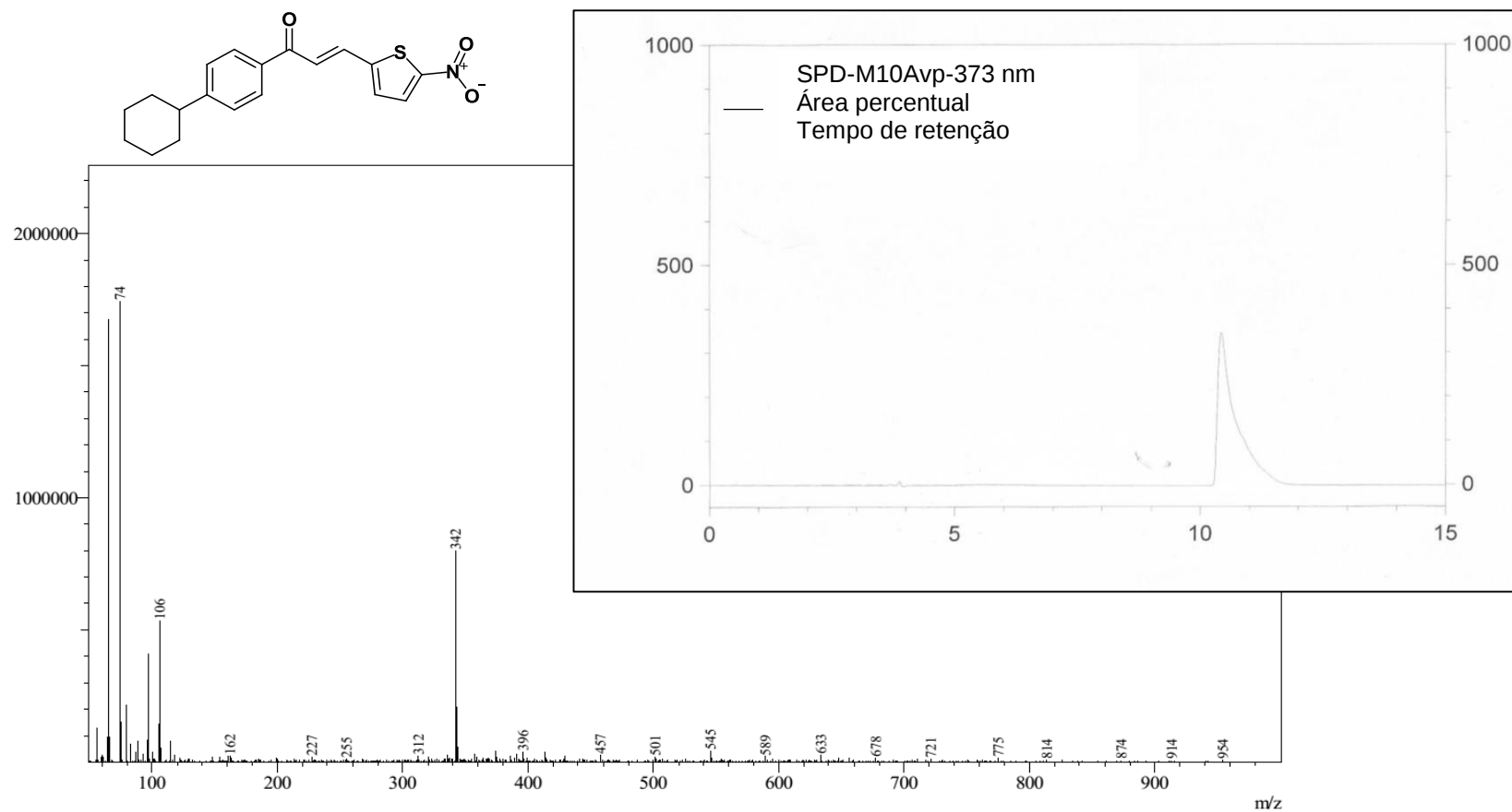
Anexo 100 - Espectro de RMN ¹H (2E)-1-(4-ciclohexilfenil)-3-(5-nitrotiofen-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol88**), (**89**), 400 MHz, CDCl₃.



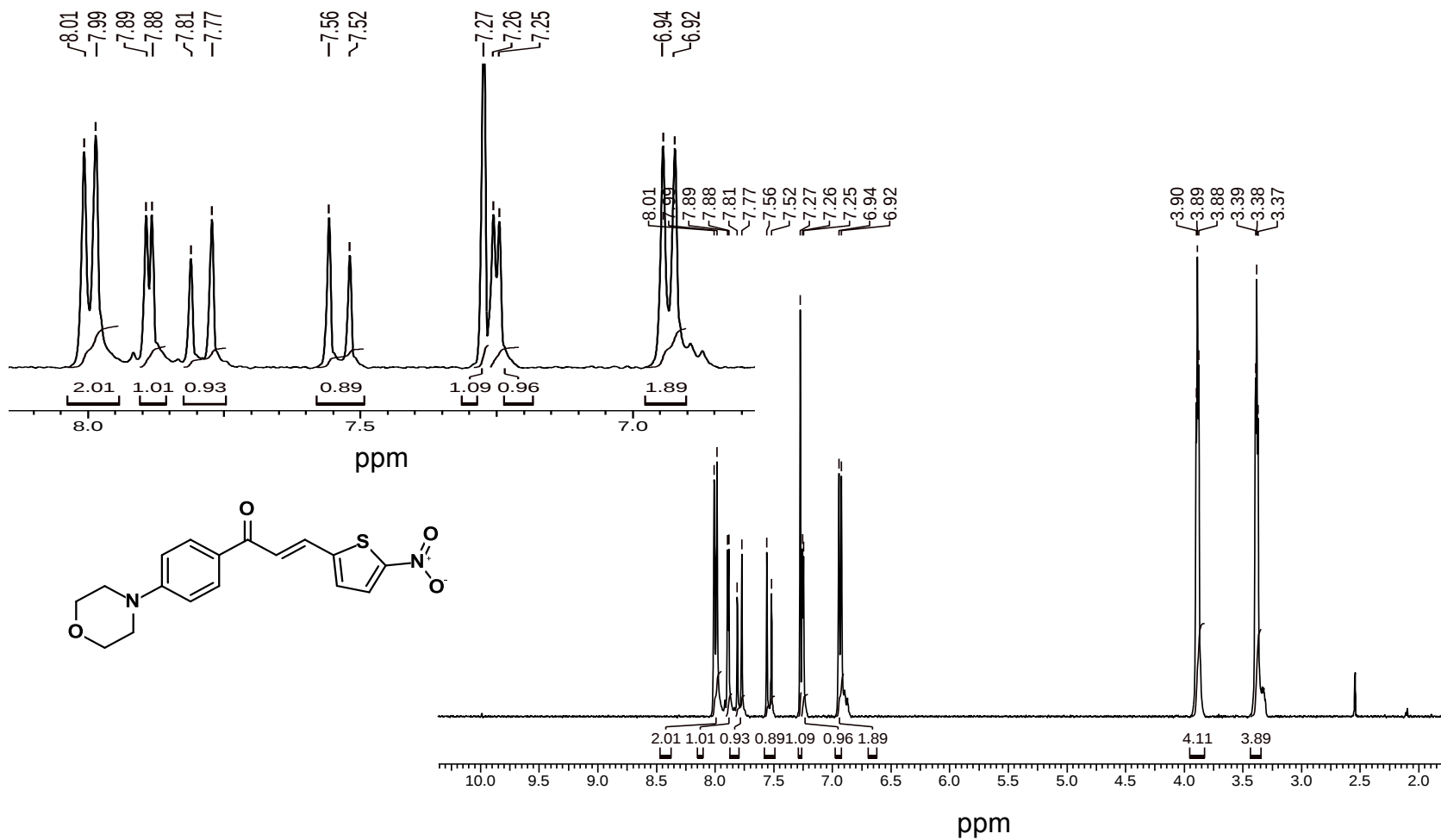
Anexo 101 - Espectro de RMN ^{13}C (2E)-1-(4-ciclohexilfenil)-3-(5-nitrotiofen-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol88**), (**89**) 400 MHz, CDCl_3 .



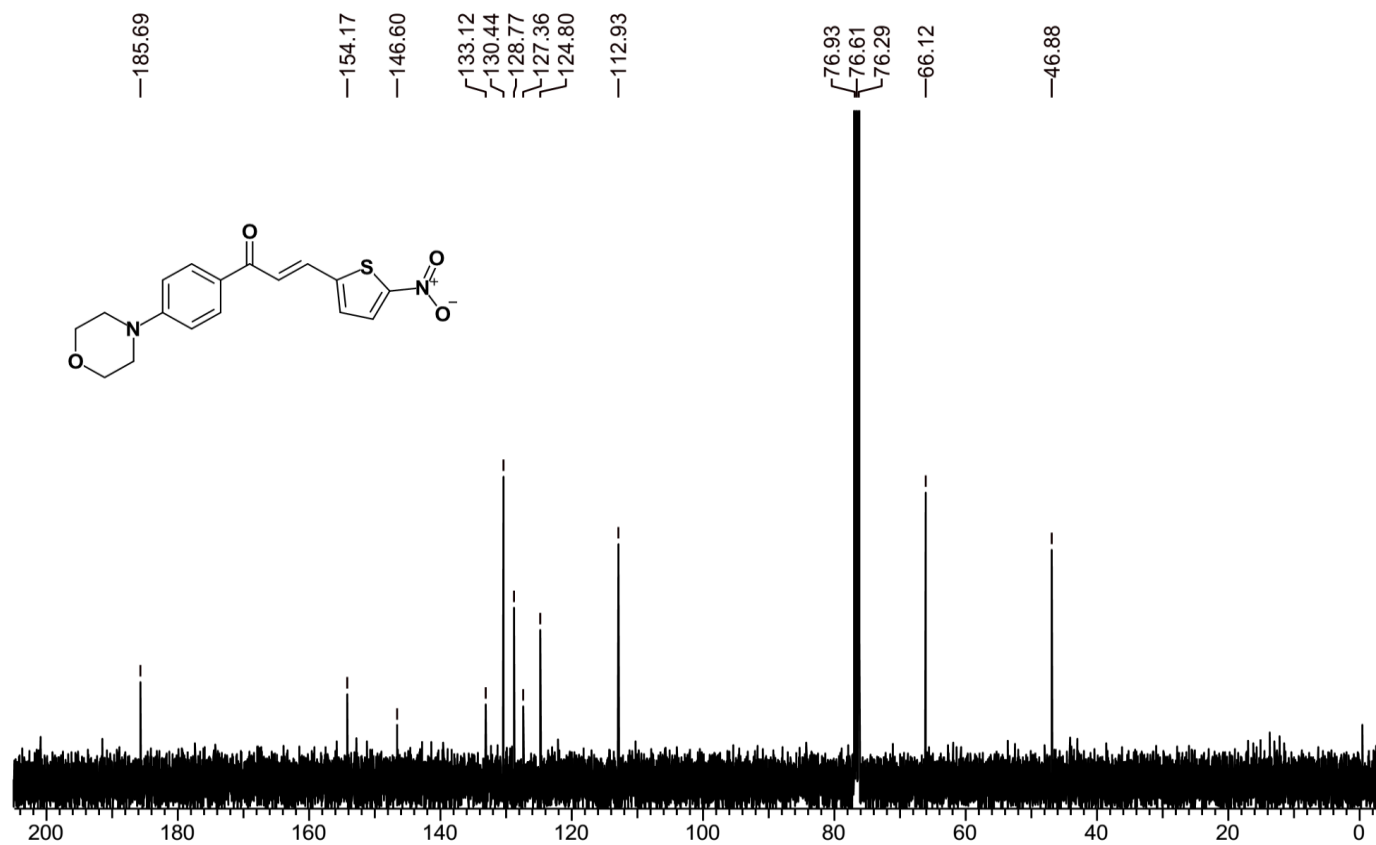
Anexo 102 - Espectro de IV (2E)-1-(4-ciclohexilfenil)-3-(5-nitrotiofen-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol88**), (**89**), KBr..



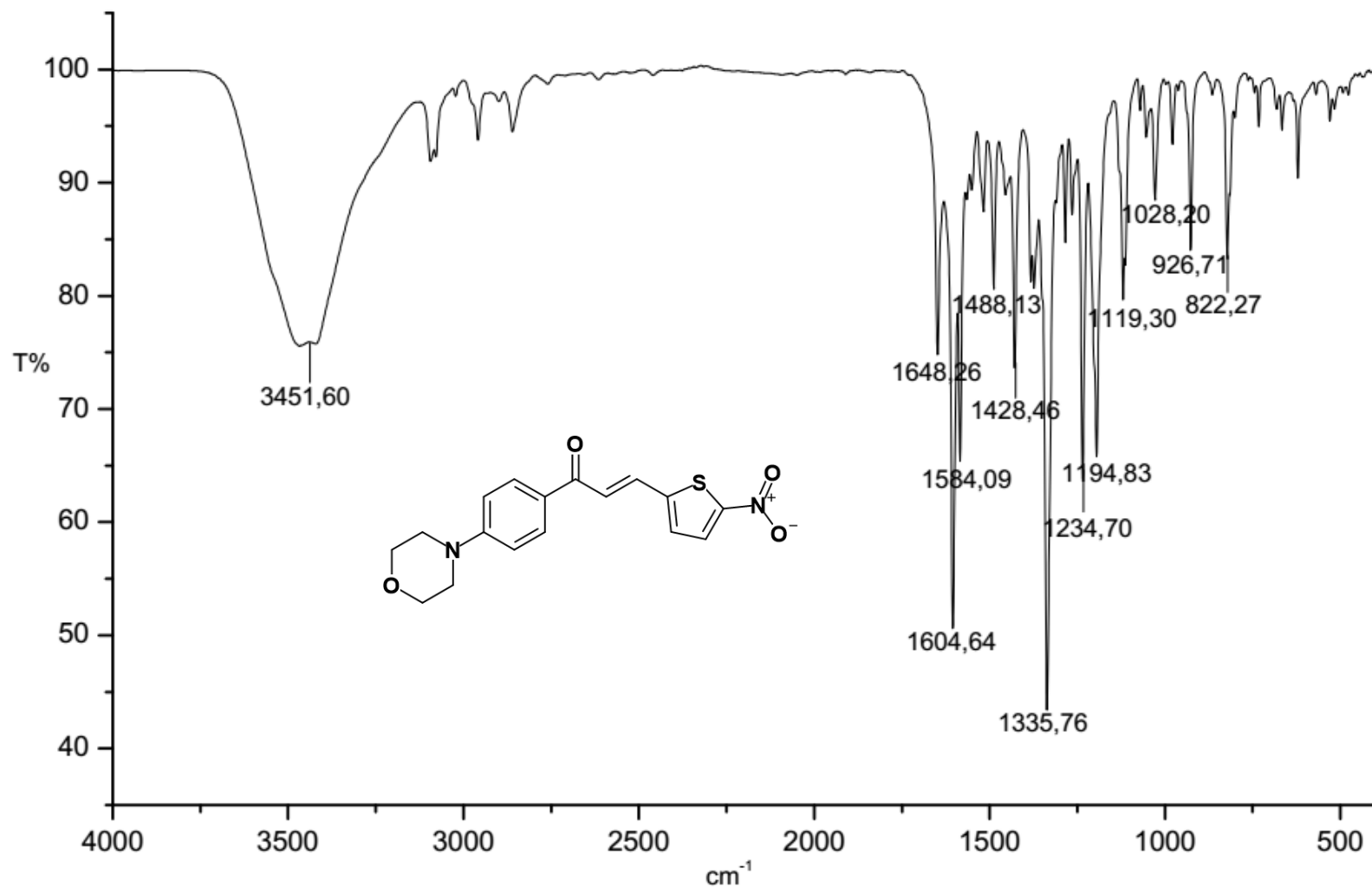
Anexo 103 - Espectro de Massas e cromatograma (2E)-1-(4-ciclohexilfenil)-3-(5-nitrotiofen-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol88**), (**89**).



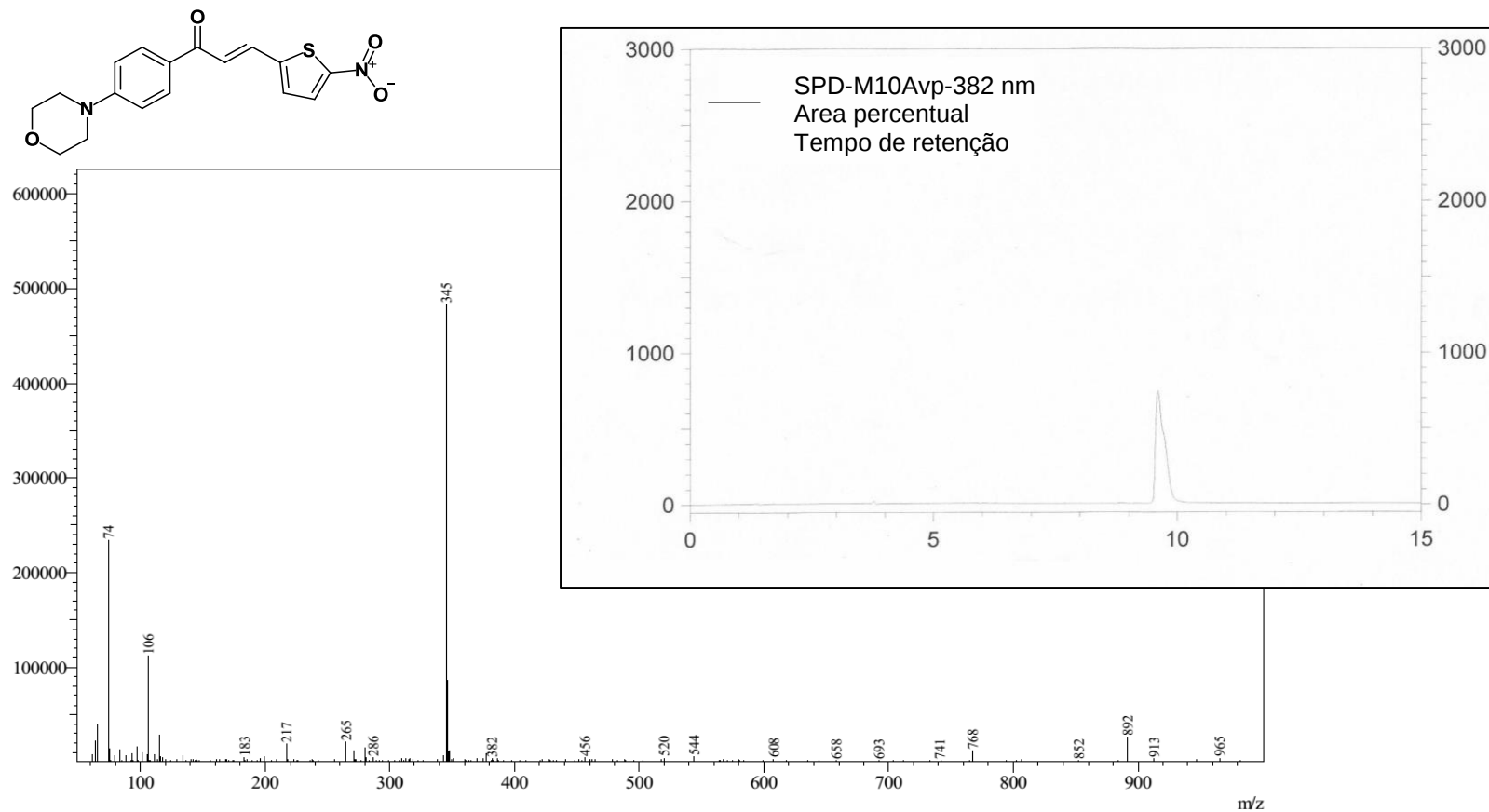
Anexo 104 - Espectro de RMN ^1H (2E)-1-[4-mofolin-4-il]fenil]-3-(nitrotiofen-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol89**), (**90**) 400 MHz, CDCl_3



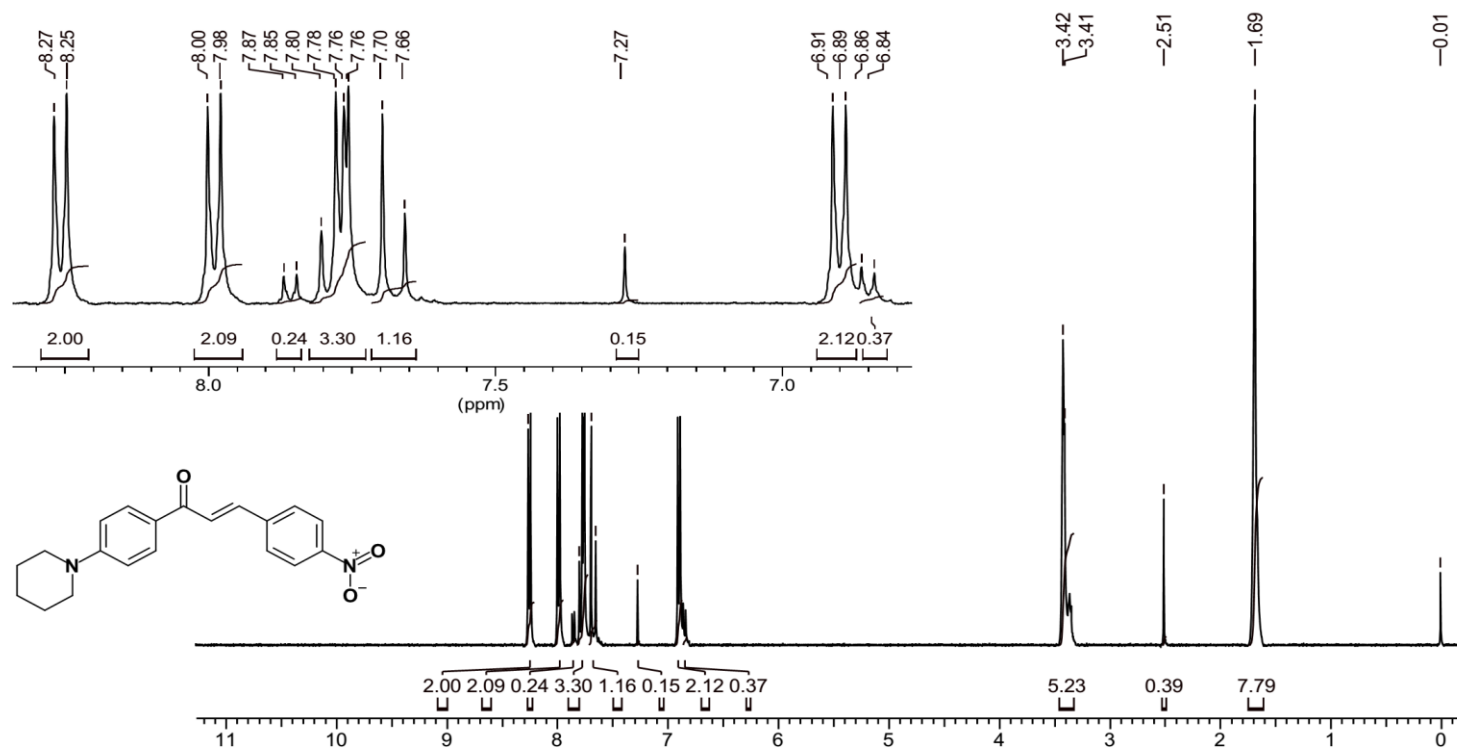
Anexo 105 - Espectro de RMN ¹³C (2E)-1-[4-moplin-4-il]fenil]-3-(nitrotiofen-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol89**), (**90**), 400 MHz, CDCl₃



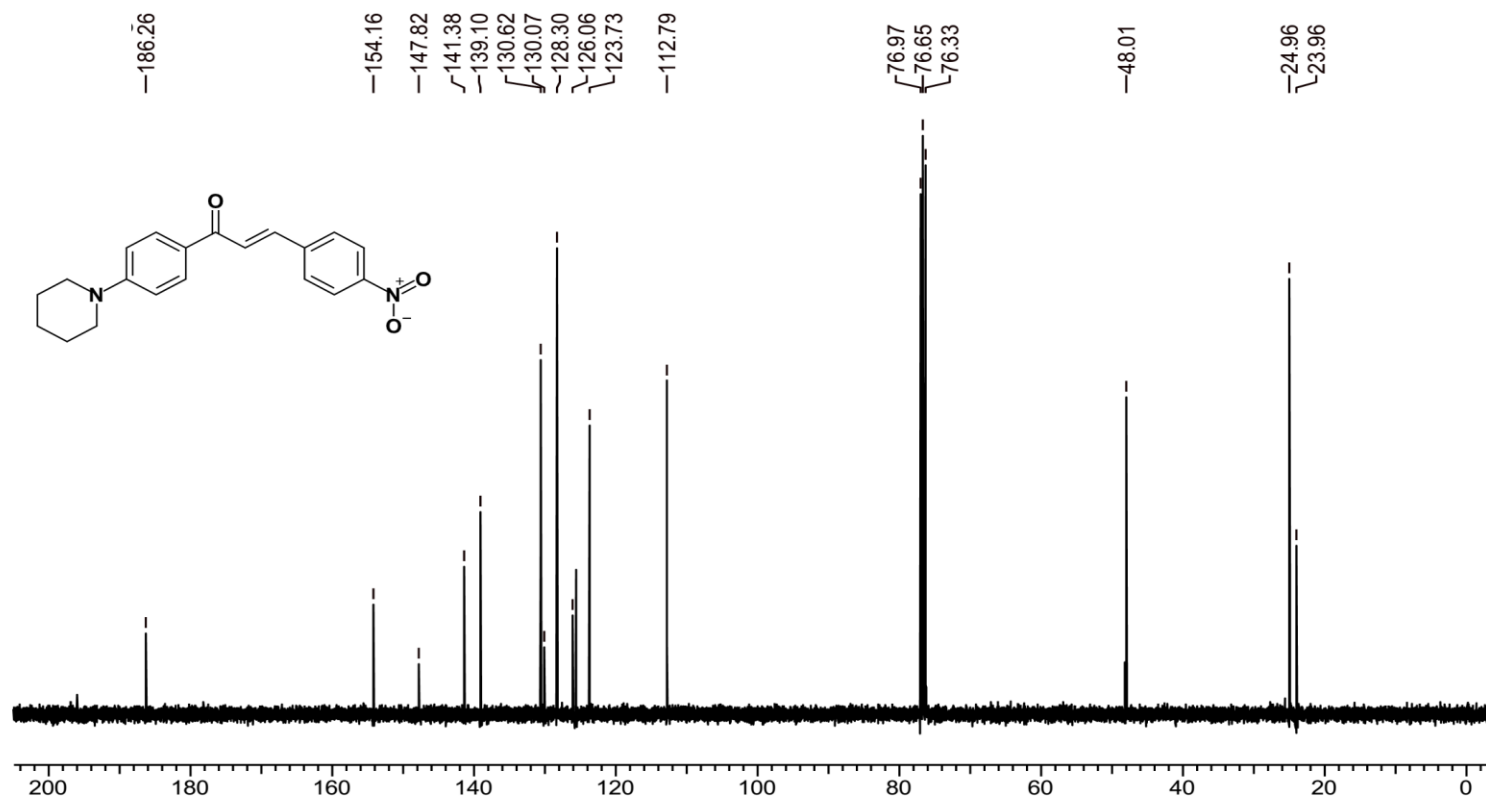
Anexo 106 - Espectro de IV (2E)-1-[4-mopolin-4-il]fenil]-3-(nitrotiofen-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol89**), (**90**), KBr



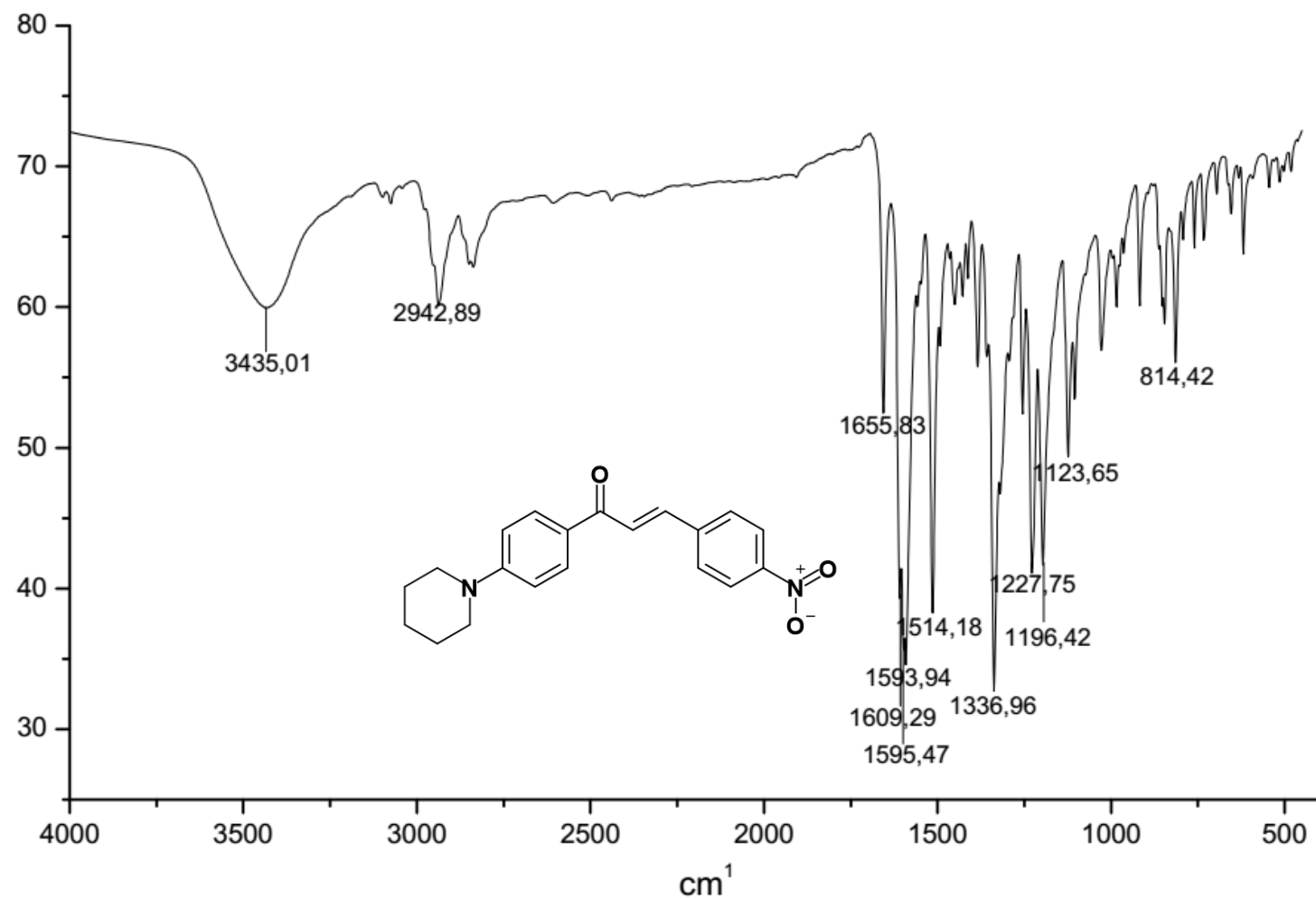
Anexo 107 - Espectro de massas e cromatograma (2*E*)-1-[4-mofolin-4-il]fenil]-3-(nitrotiofen-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol89**), (**90**).



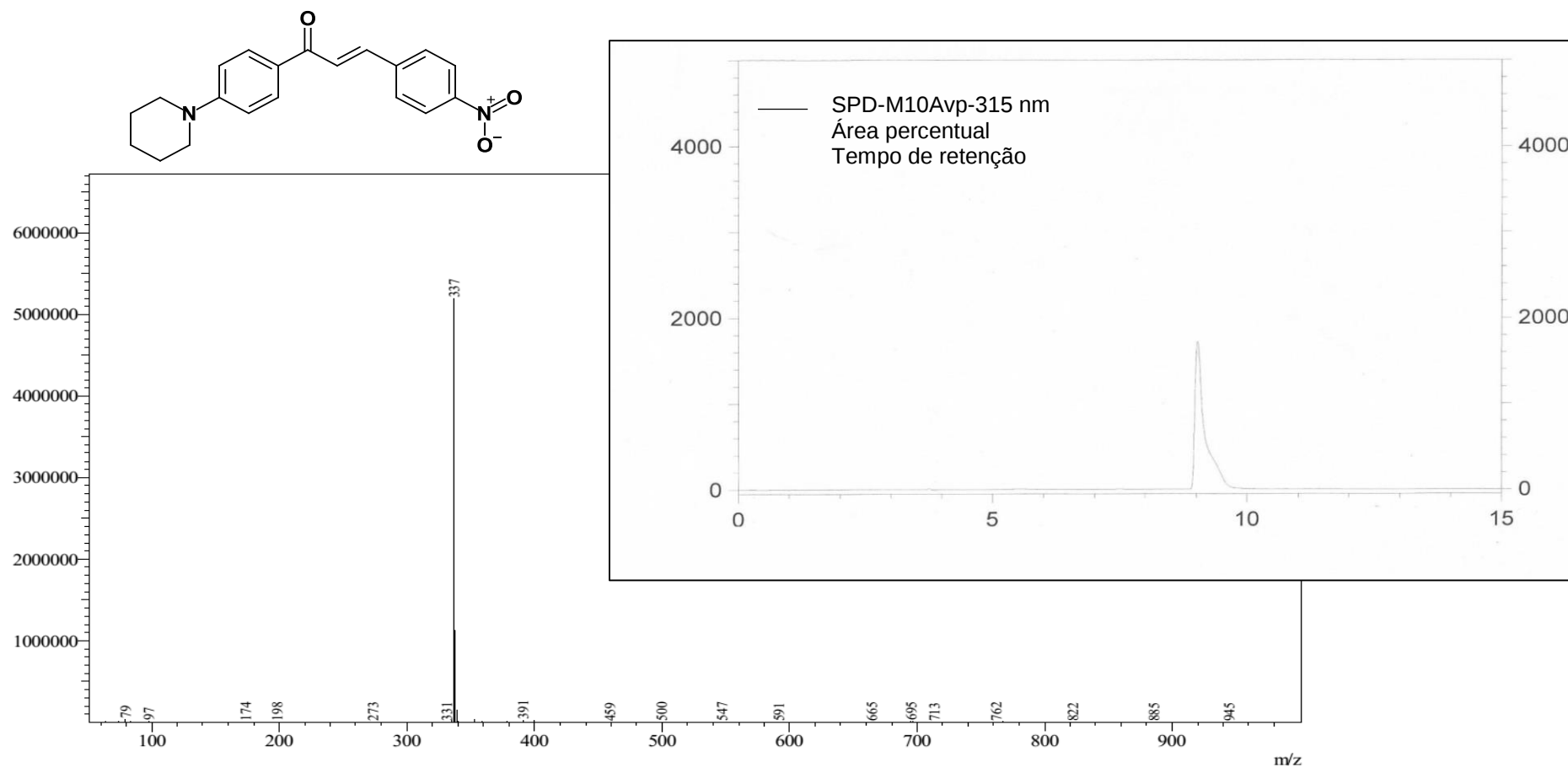
Anexo 108 - Espectro de RMN ^1H $(2E)$ -3-(4-nitrofenil)-1-[4-piperidin-1-il]fenil]prop-2-en-1-ona (**LabMol90**), (**91**) 400 MHz, CDCl_3



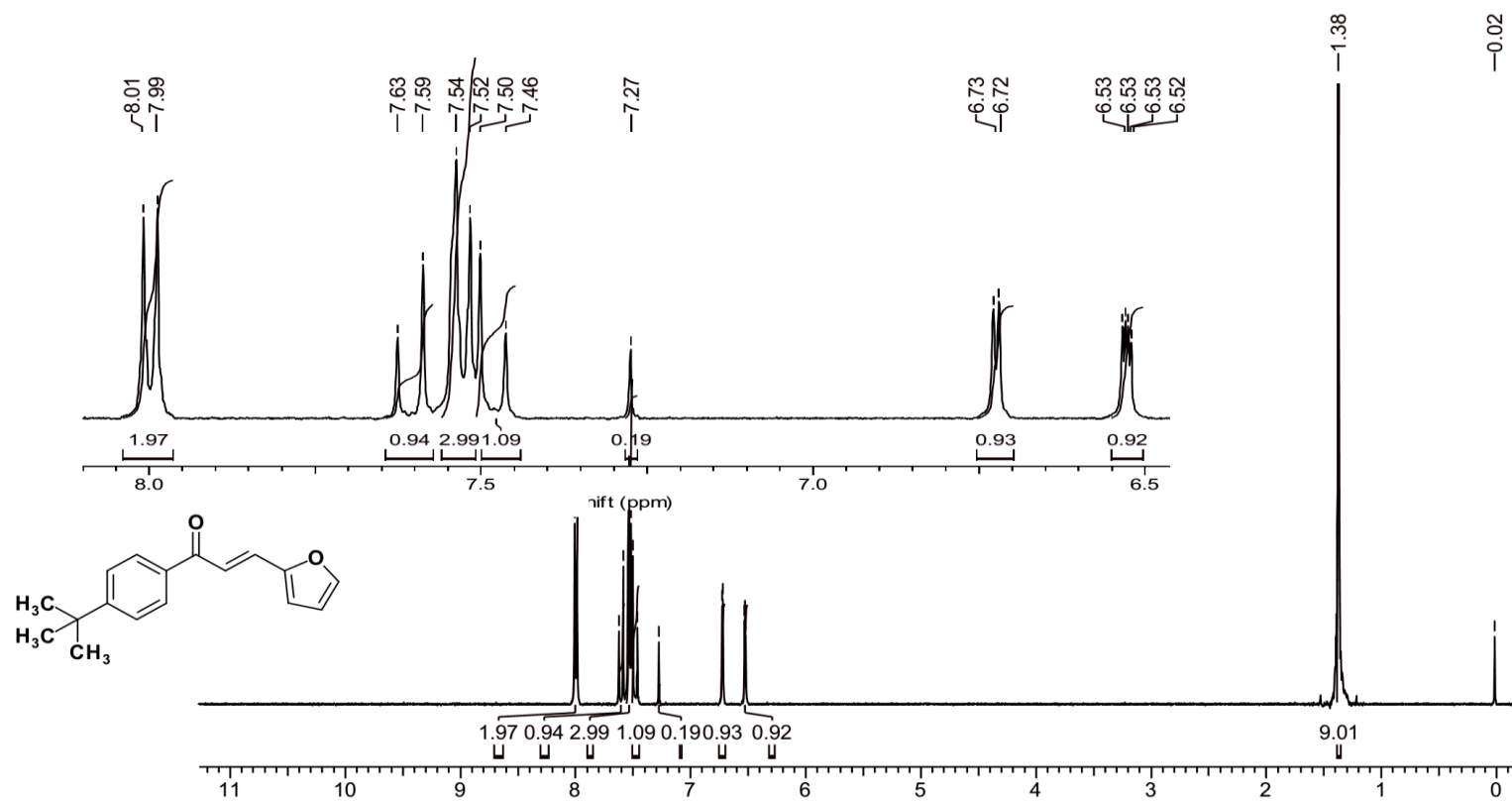
Anexo 109 - Espectro de RMN ¹³C (2E)-3-(4-nitrofenil)-1-[4-piperidin-1-il]fenil]prop-2-en-1-ona (**LabMol90**), (**91**) 400 MHz, CDCl₃



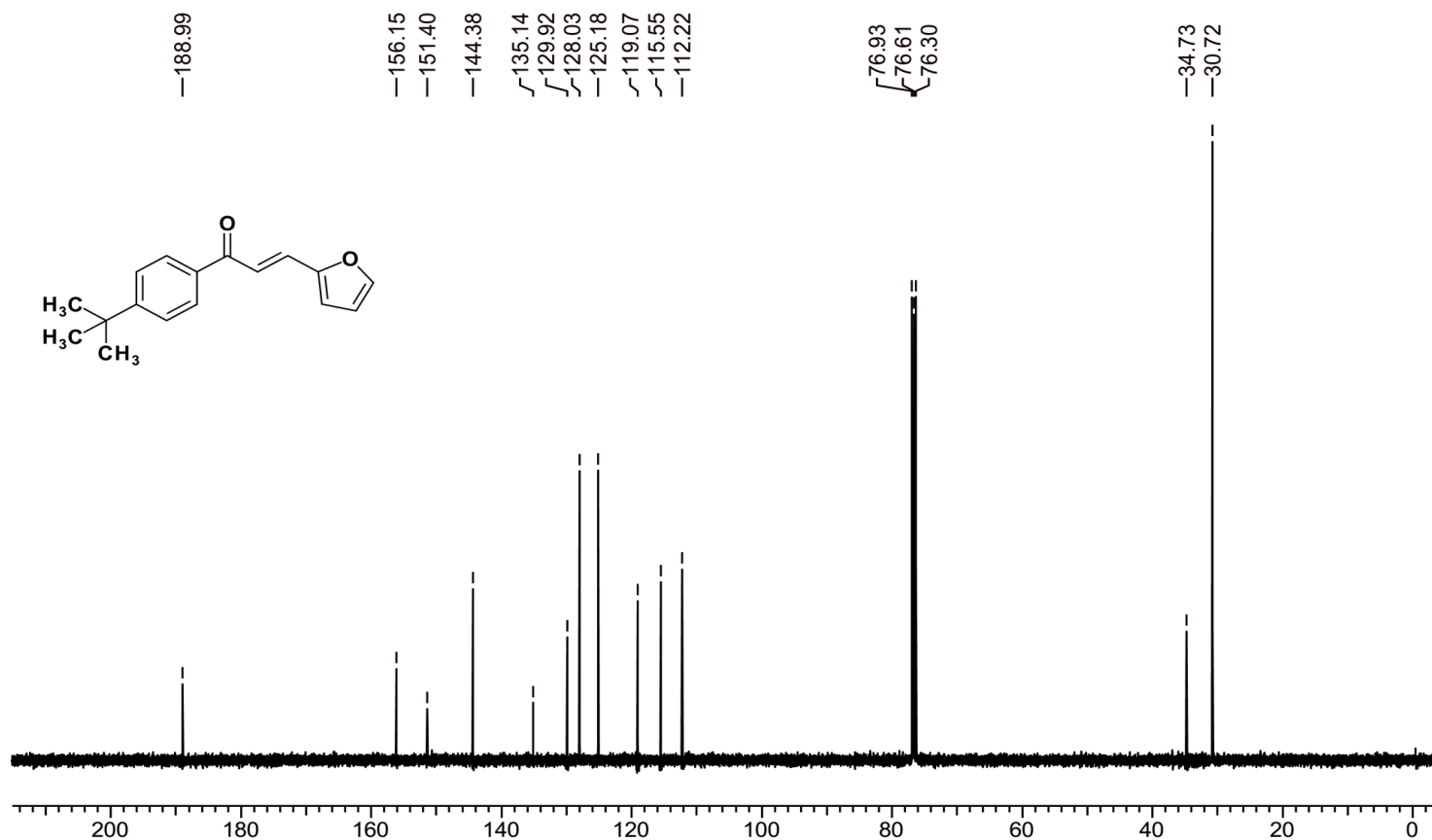
Anexo 110 - Espectro de IV (2E)-3-(4-nitrofenil)-1-[4-piperidin-1-il]fenil]prop-2-en-1-ona (LabMol90), (91) KBr



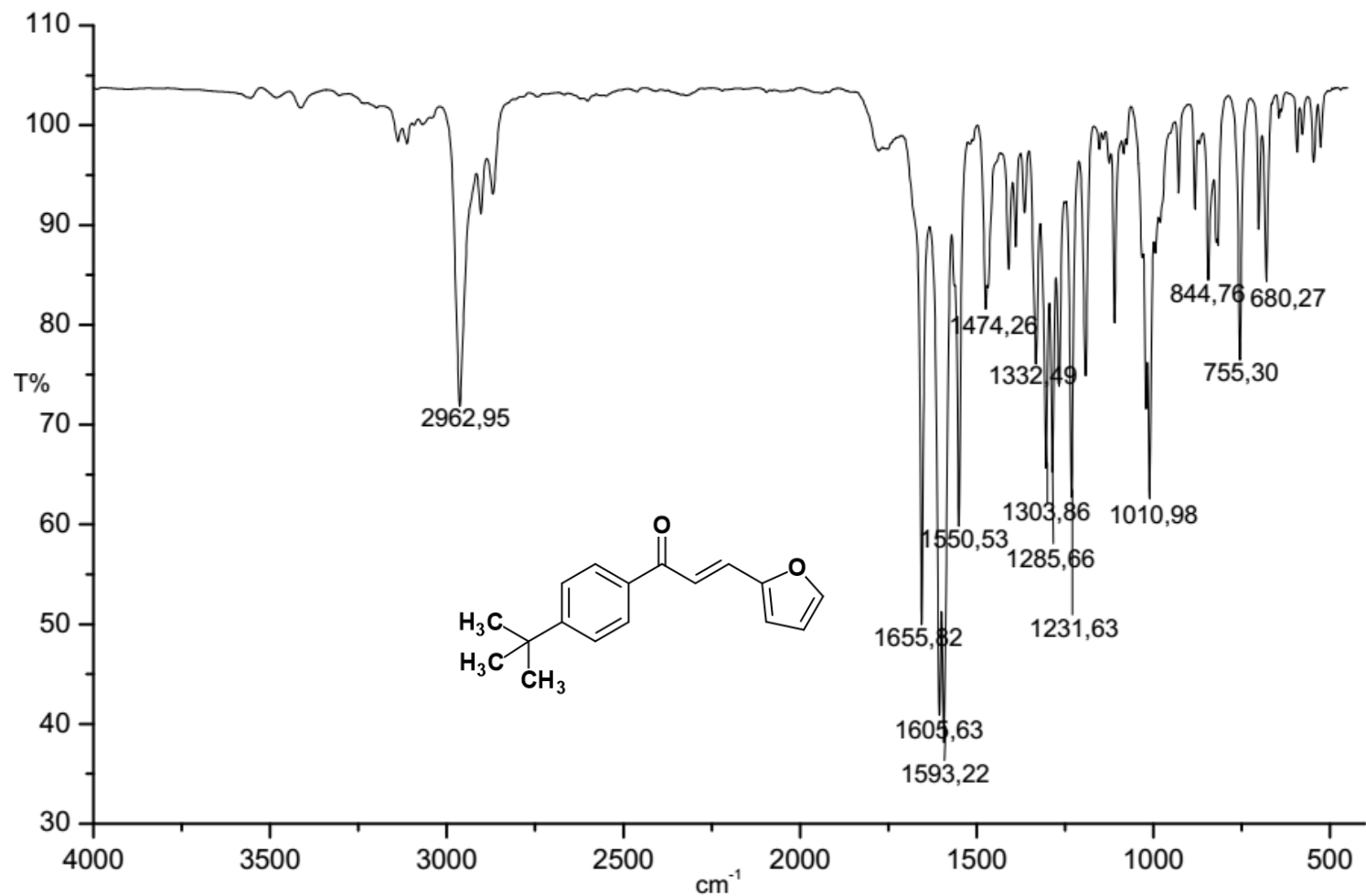
Anexo 111 - Espectro de massas e cromatograma (2E)-3-(4-nitrofenil)-1-[4-piperidin-1-il]fenil]prop-2-en-1-ona (**LabMol90**), (**91**).



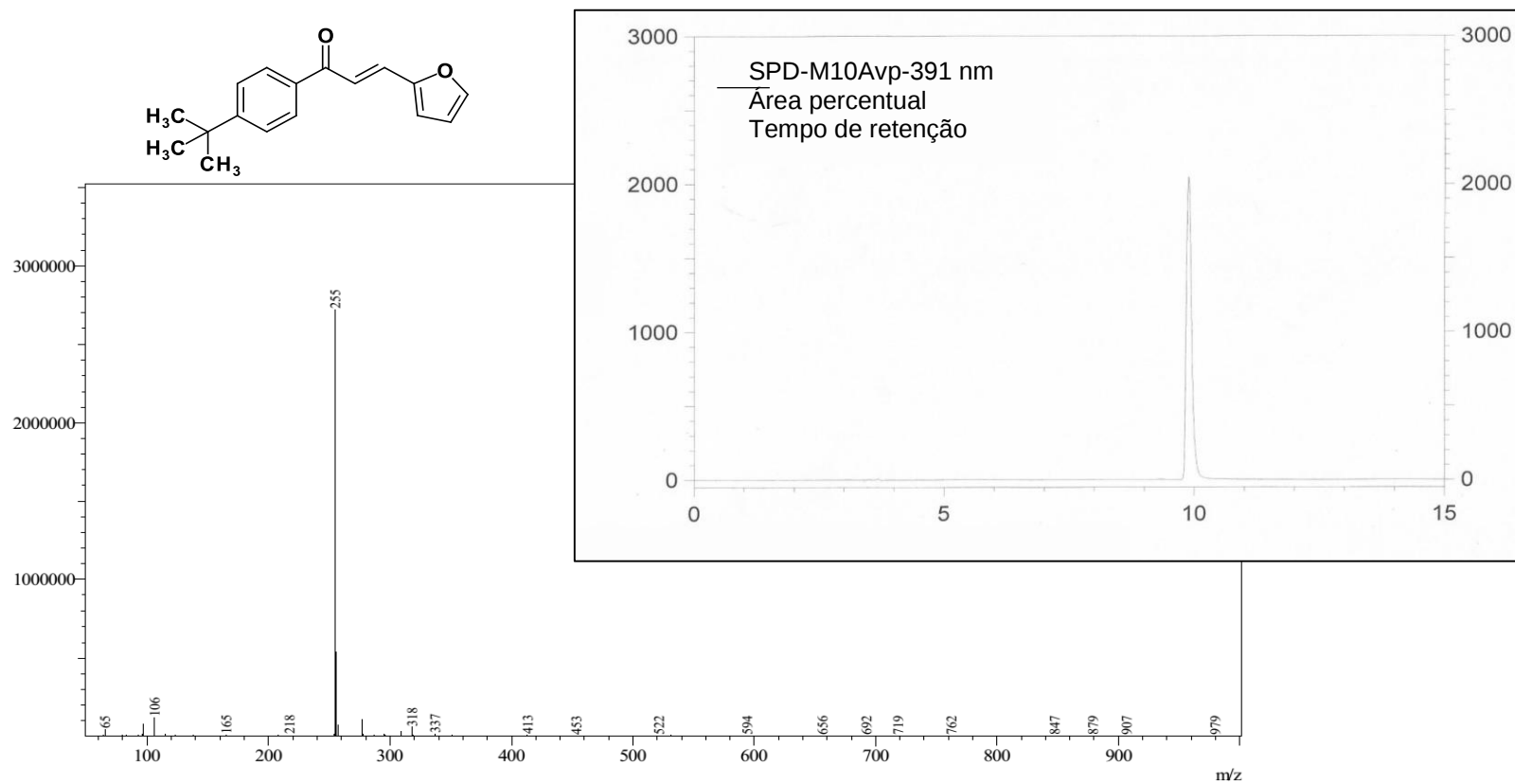
Anexo 112 - Espectro de RMN ¹H (2E)-1-(4-tert-butilfenil)-3-(furan-2-il)prop-2-em-1-ona (**LabMol91**), (**92**) 400 MHz, CDCl₃



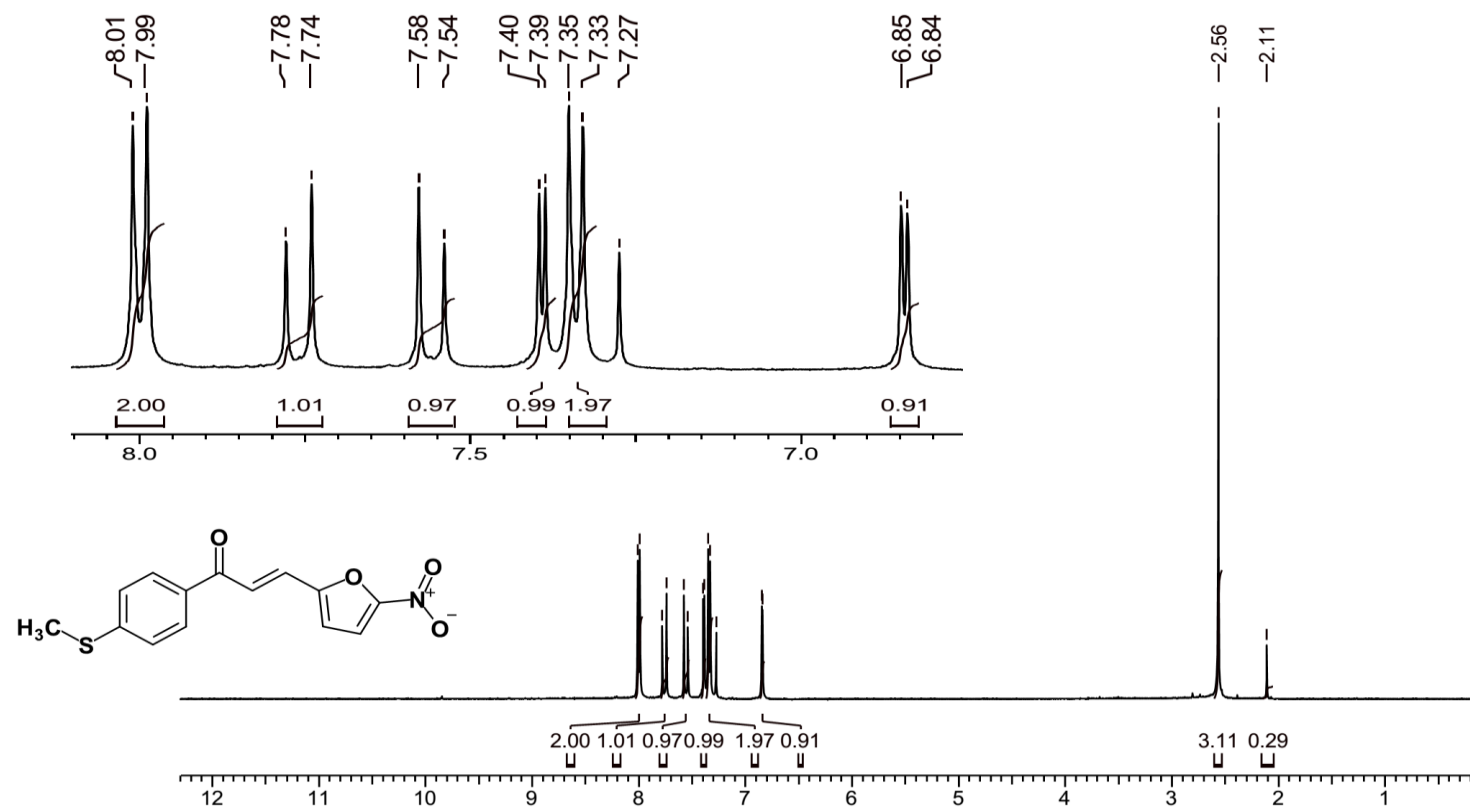
Anexo 113 - Espectro de RMN ¹³C (2E)-1-(4-tert-butilfenil)-3-(furan-2-il)prop-2-em-1-ona (**LabMol91**), (**92**) 400 MHz, CDCl₃



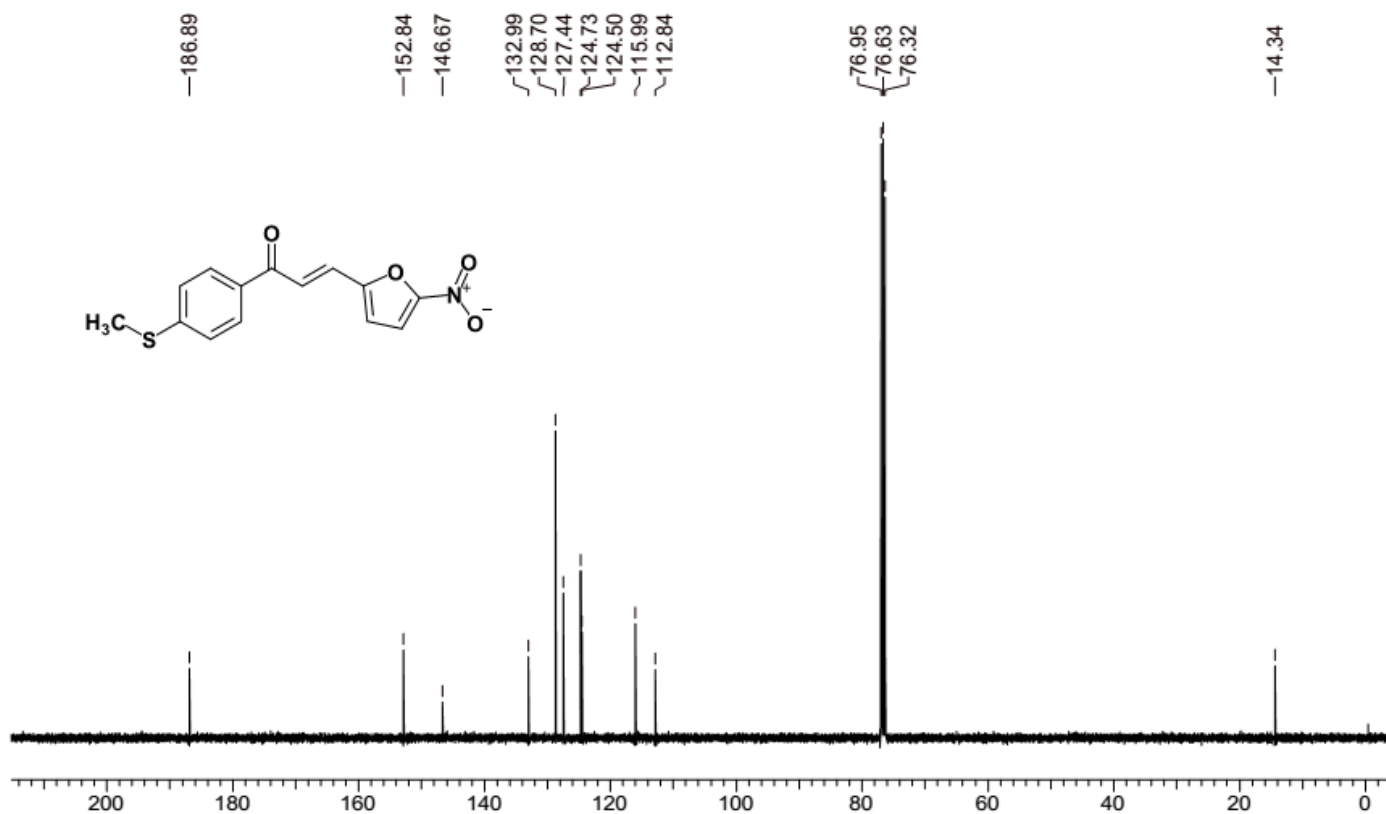
Anexo 114 - Espectro de IV (2E)-1-(4-tert-butilfenil)-3-(furan-2-il)prop-2-em-1-ona (LabMol91), (92) KBr



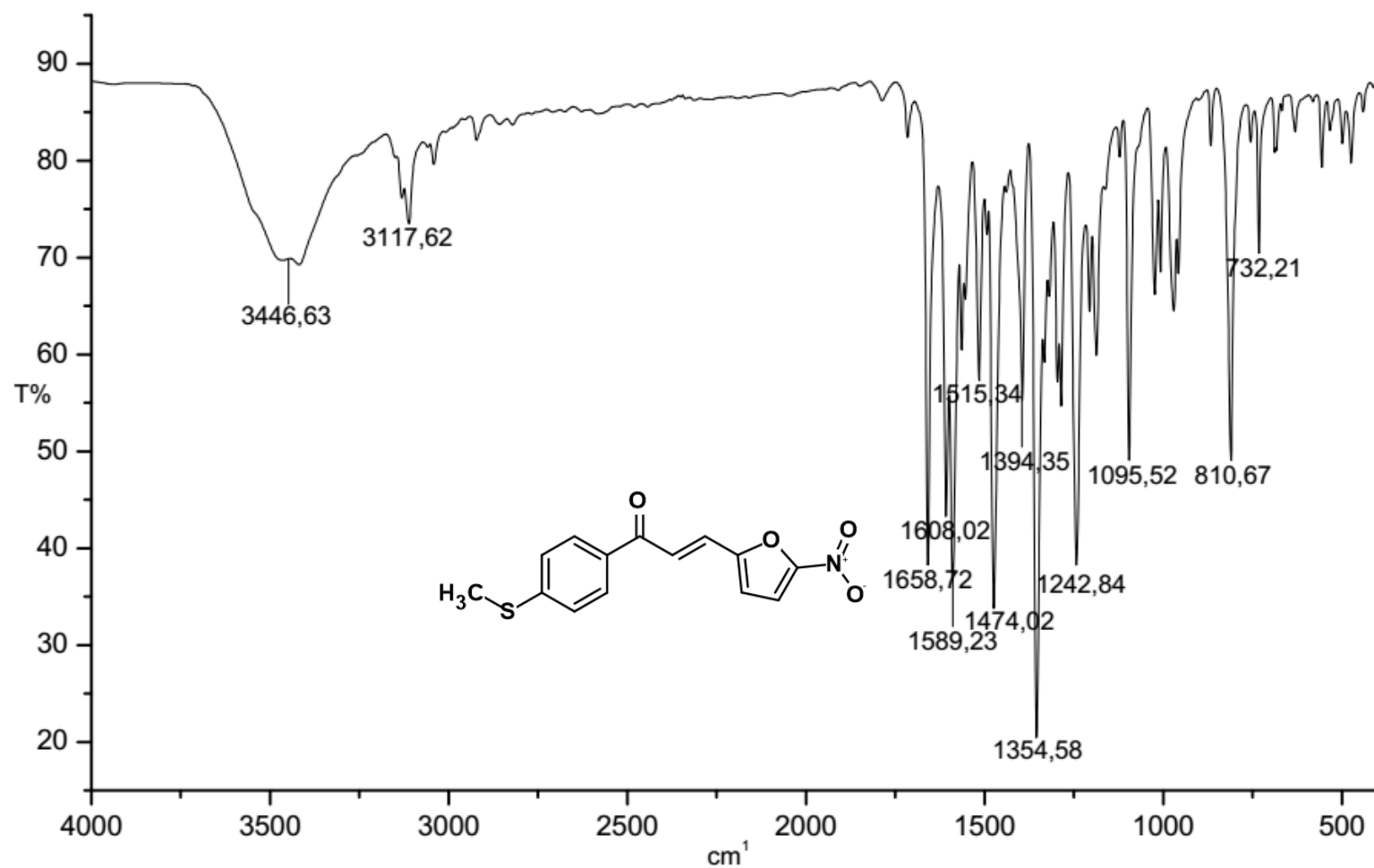
Anexo 115 - Espectro de massas e cromatograma (2*E*)-1-(4-*tert*-butilfenil)-3-(furan-2-il)prop-2-em-1-ona (**LabMol91**), (**92**).



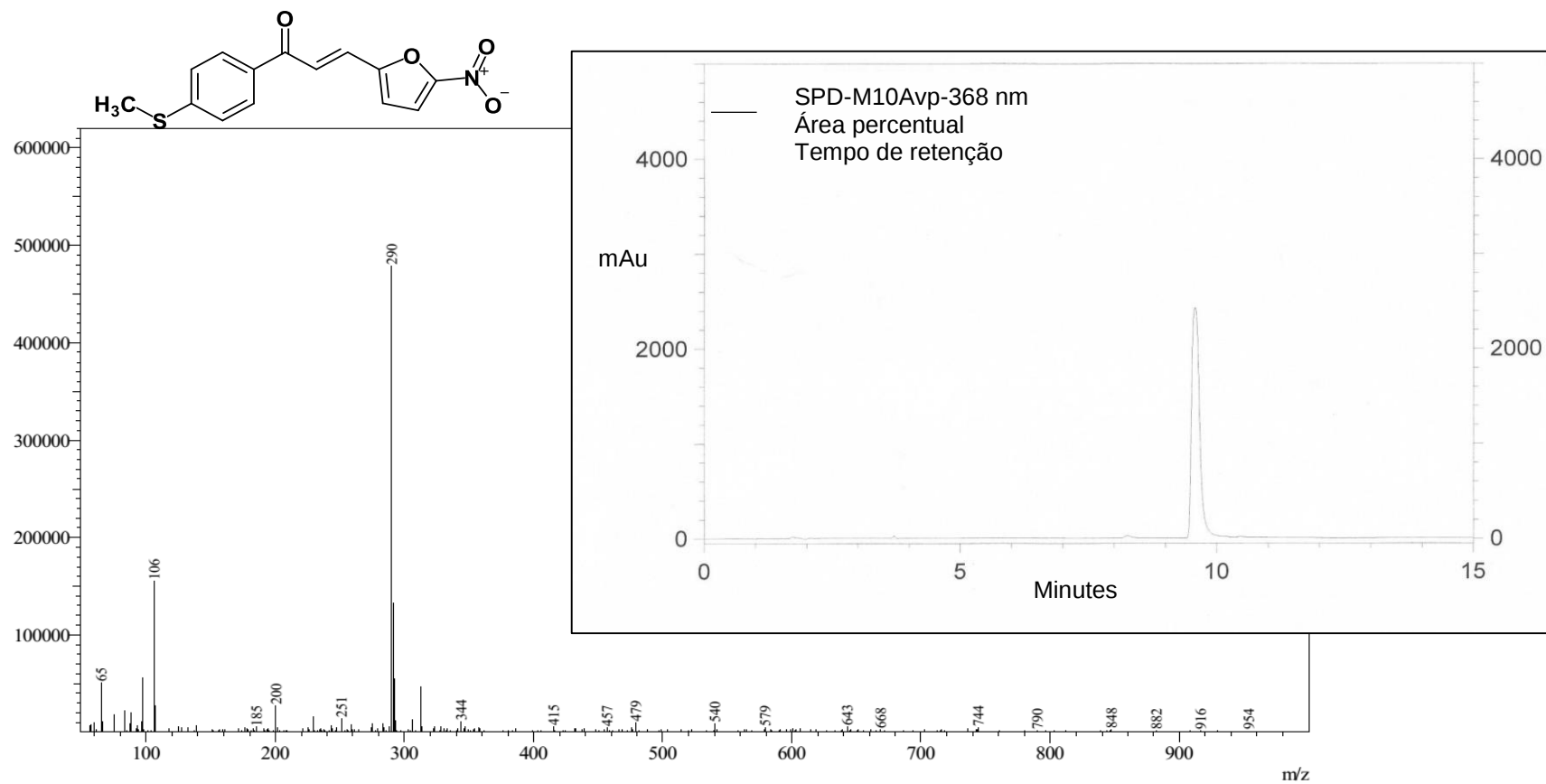
Anexo 116 - Espectro de RMN ¹H (2*E*)-1-[4-(metilsulfonil)fenil]-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-em-1-ona (**LabMol92**), (**93**) 400 MHz, CDCl₃



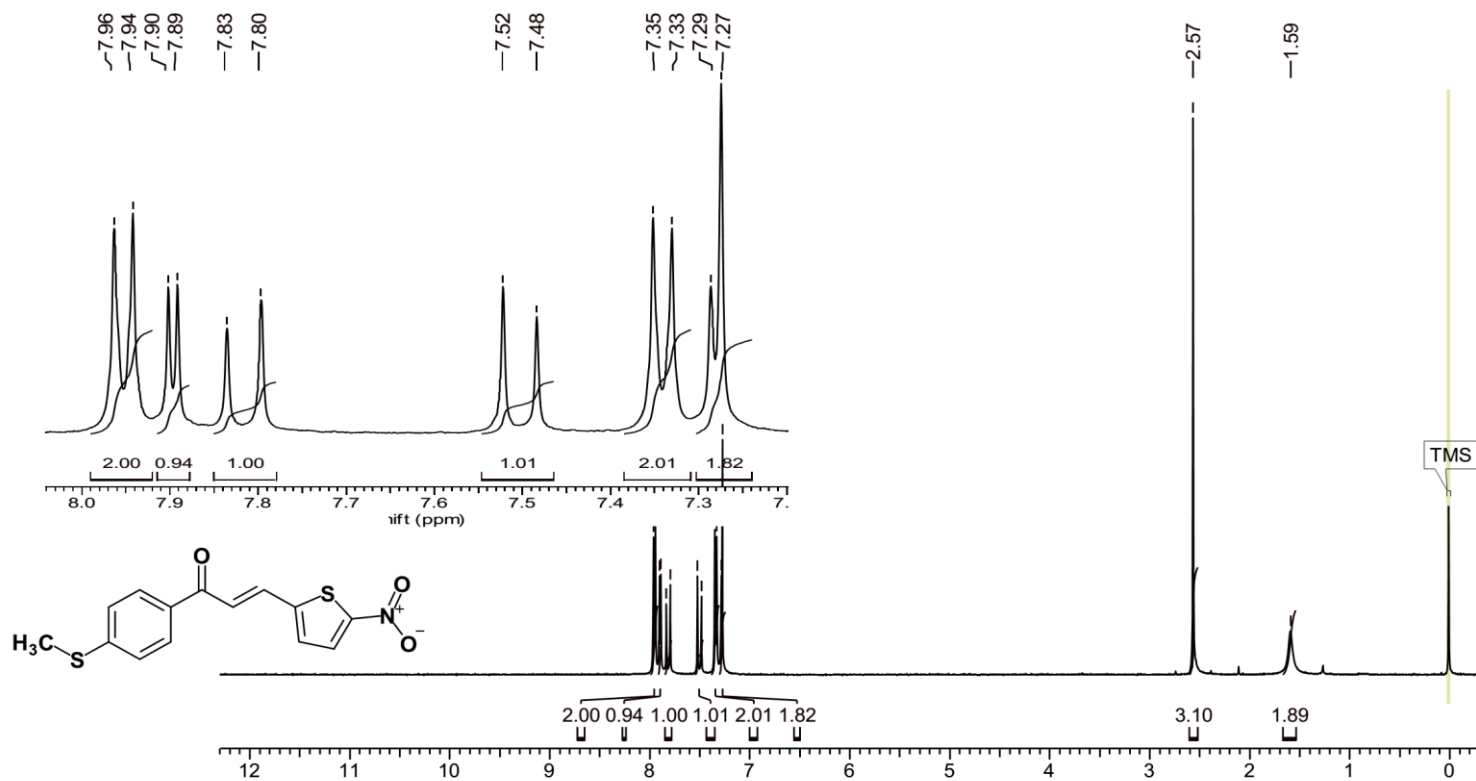
Anexo 117 - Espectro de RMN ¹³C (2E)-1-[4-(metilsulfonil)fenil]-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-em-1-ona (**LabMol92**), (**93**), 400 MHz, CDCl₃



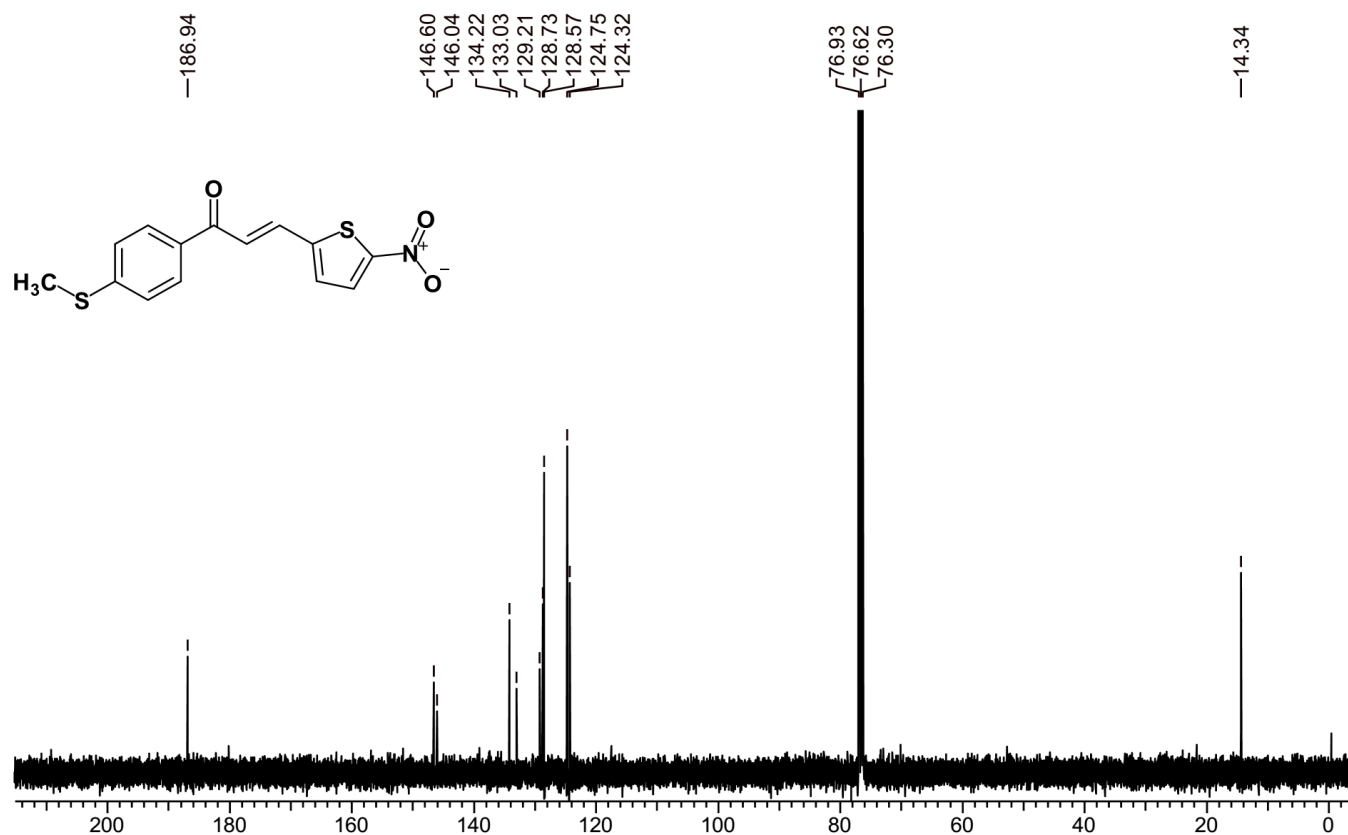
Anexo 118 - Espectro de IV (2E)-1-[4-(metilsulfonyl)fenil]-3-(5-nitrofurano-2-il)prop-2-em-1-ona (**LabMol92**), (**93**) KBr.



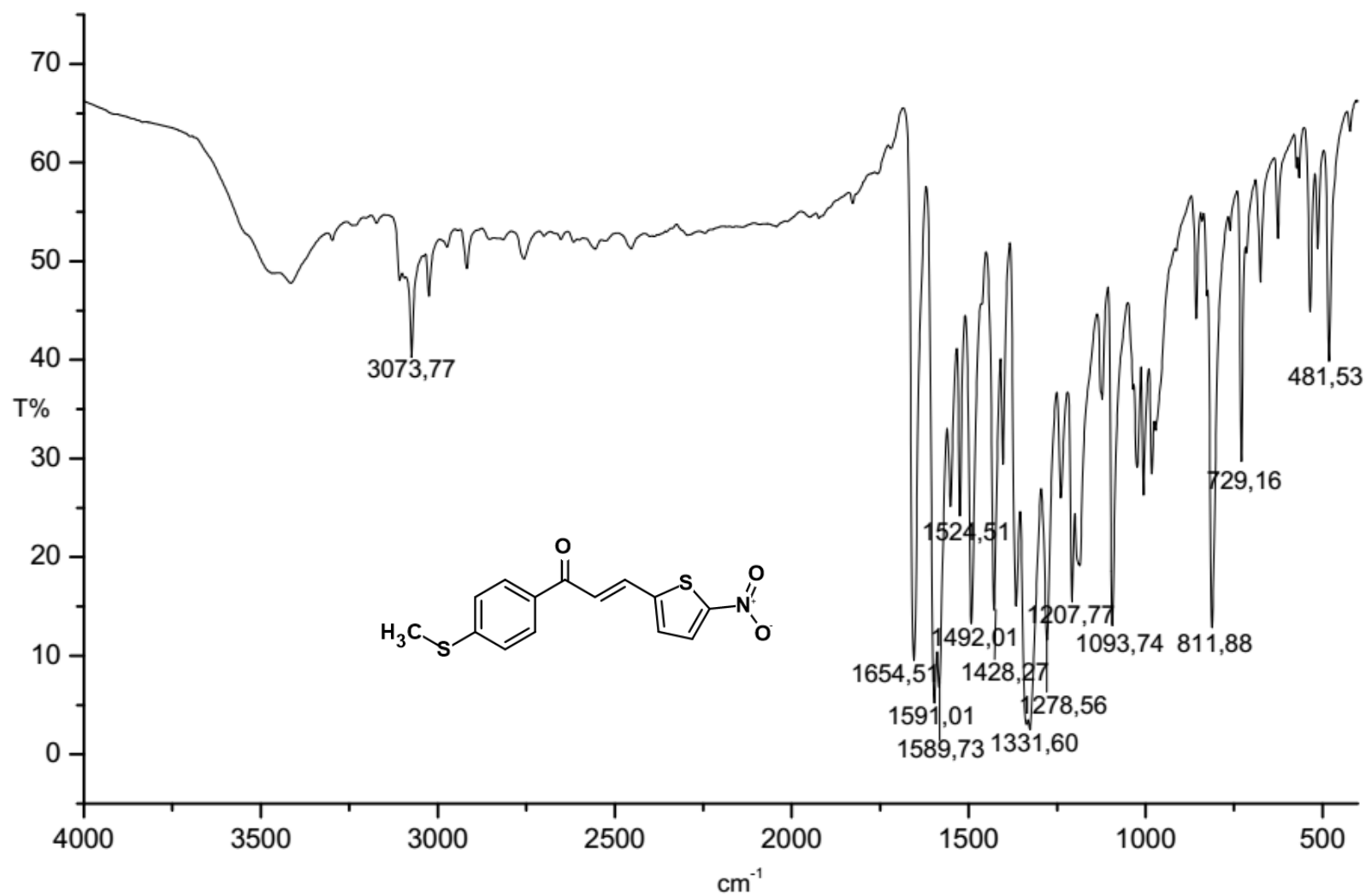
Anexo 119 - Espectro de massas e cromatograma (2E)-1-[4-(metilsulfonyl)fenil]-3-(5-nitrofuran-2-il)prop-2-em-1-ona (**LabMol92**), (**93**).



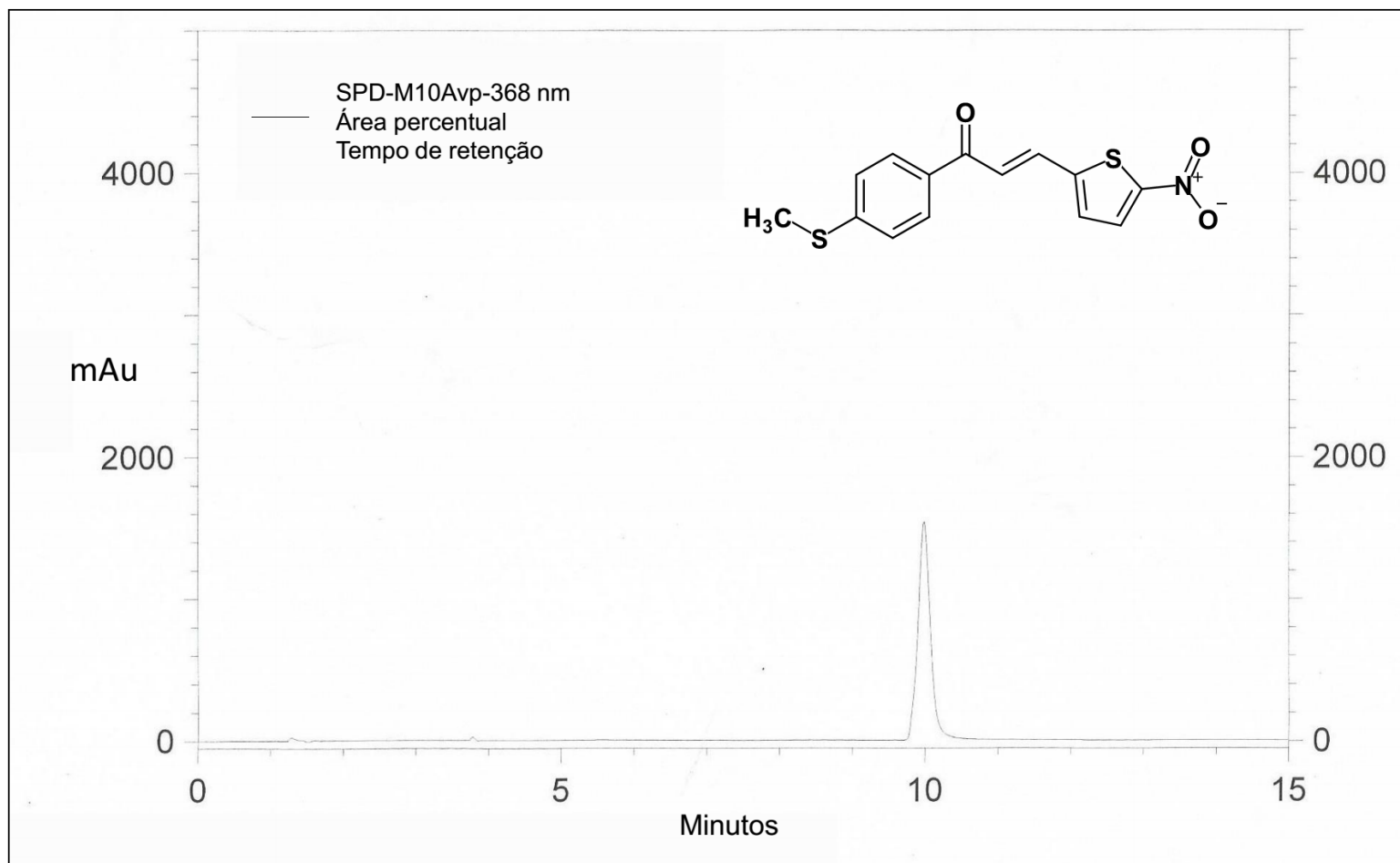
Anexo 120 - Espectro de RMN ¹H (2*E*)-1-[4-(metilsulfonyl)fenil]-3-(5-nitrotiofen-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol93**), (**94**) 400 MHz, CDCl₃



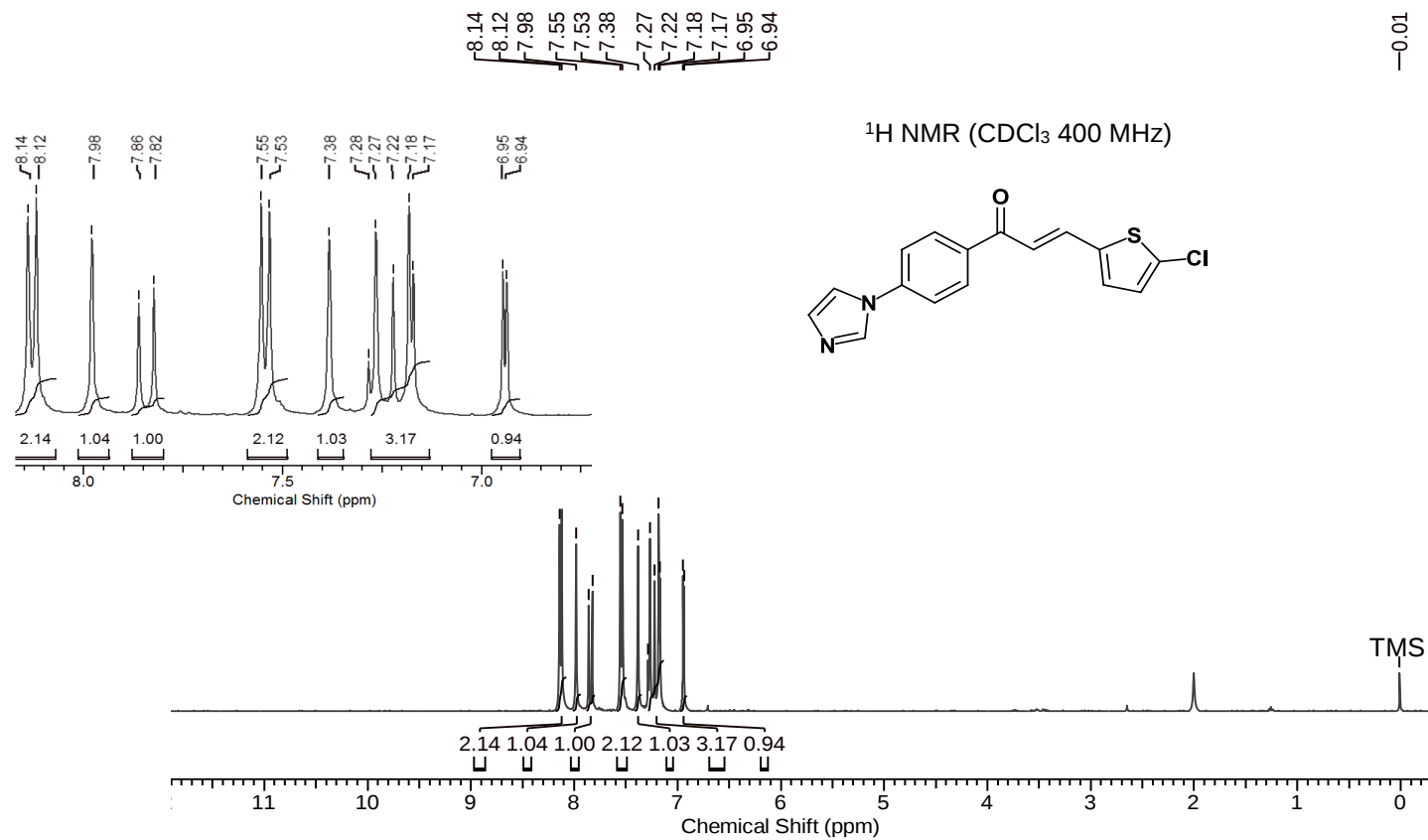
Anexo 121 - Espectro de RMN ¹³C (2E)-1-[4-(metilsulfonyl)fenil]-3-(5-nitrotiofen-2-il)prop-2-em-1-ona (**LabMol93**), (**94**) 400 MHz, CDCl₃



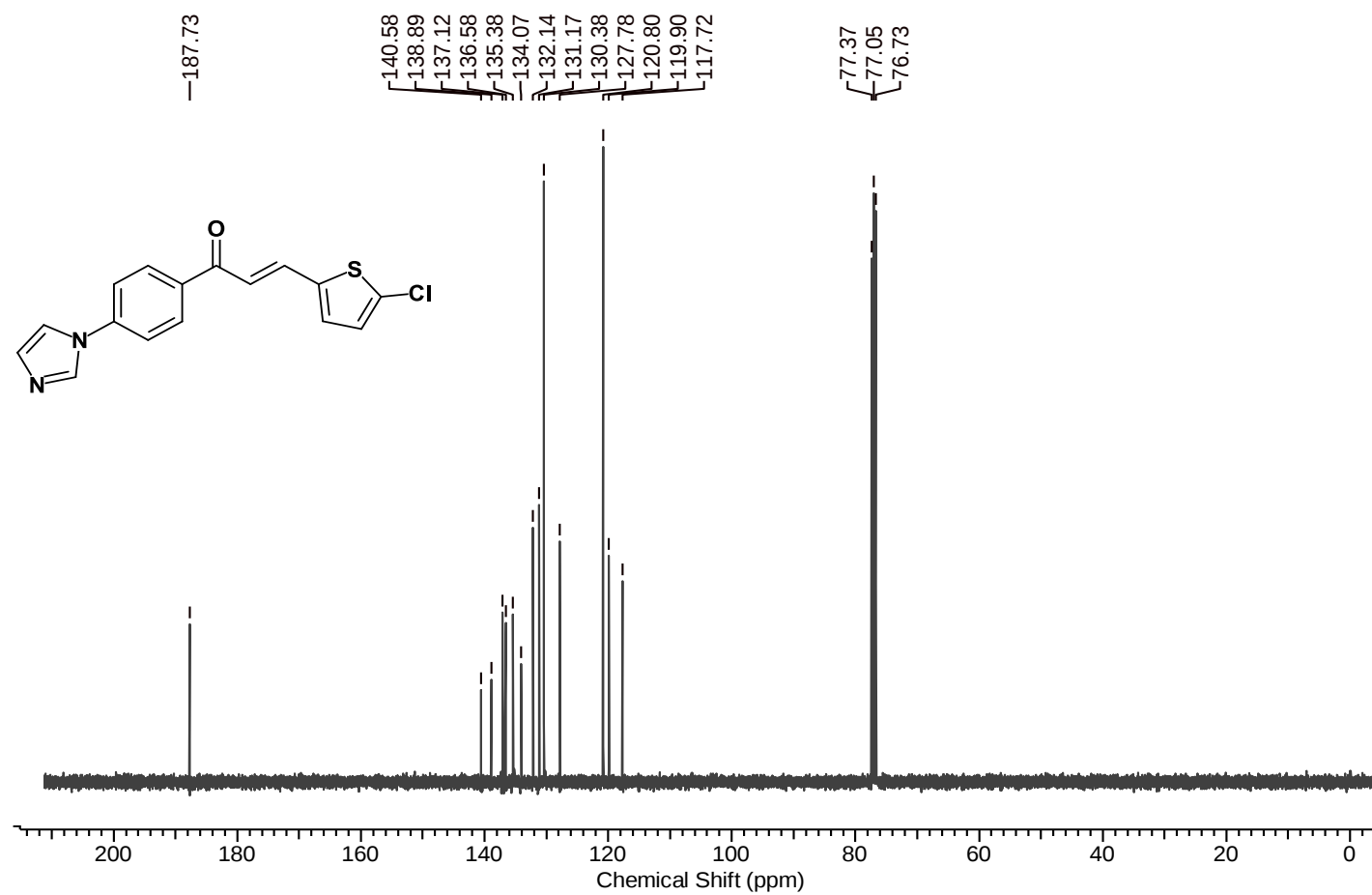
Anexo 122 - Espectro de IV (2E)-1-[4-(metilsulfonyl)fenil]-3-(5-nitrotiofen-2-il)prop-2-em-1-ona (LabMol93), (94) KBr



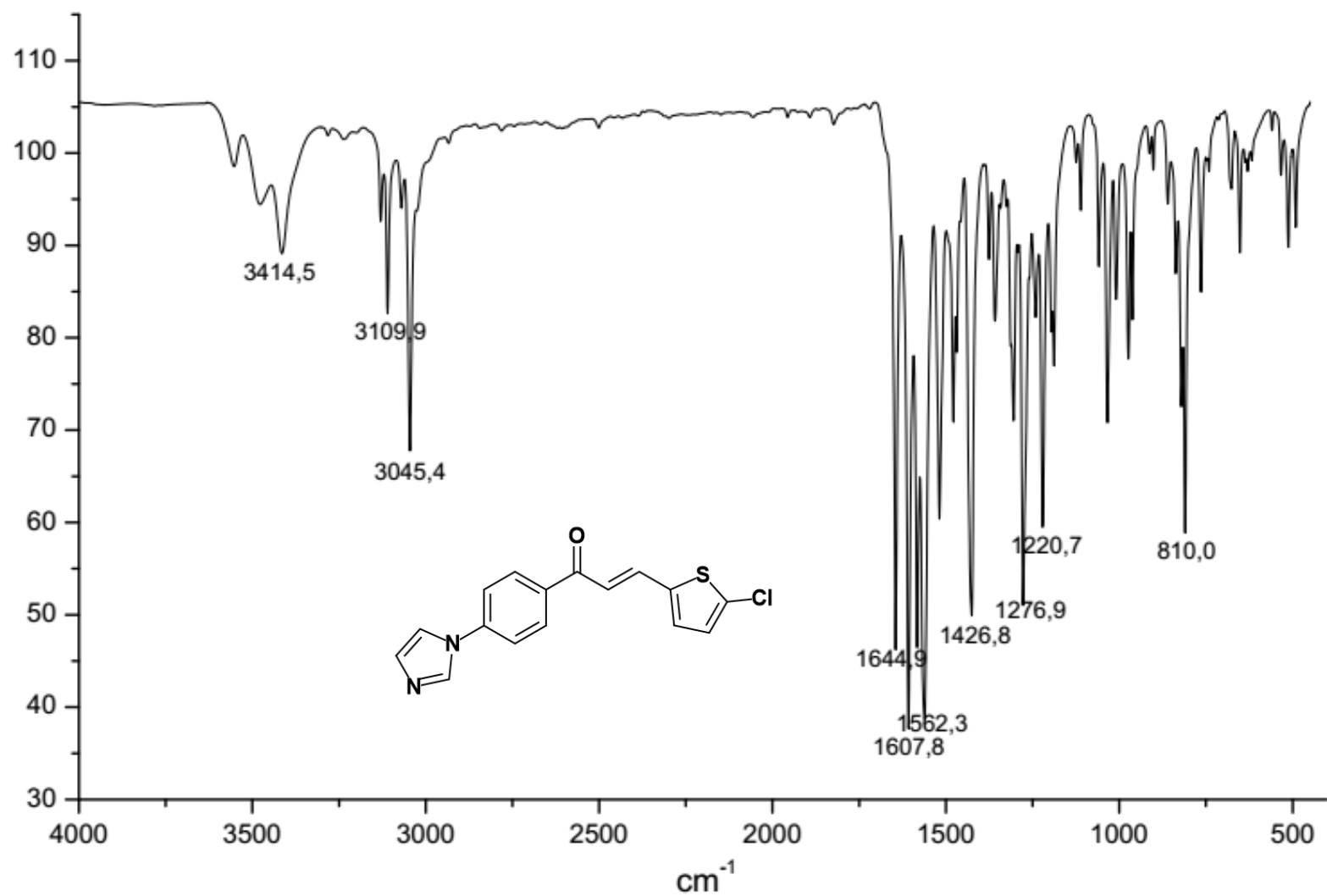
Anexo 123 - Cromatograma da (2E)-1-[4-(metilsulfonyl)fenil]-3-(5-nitrotiofen-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol93**), (**94**).



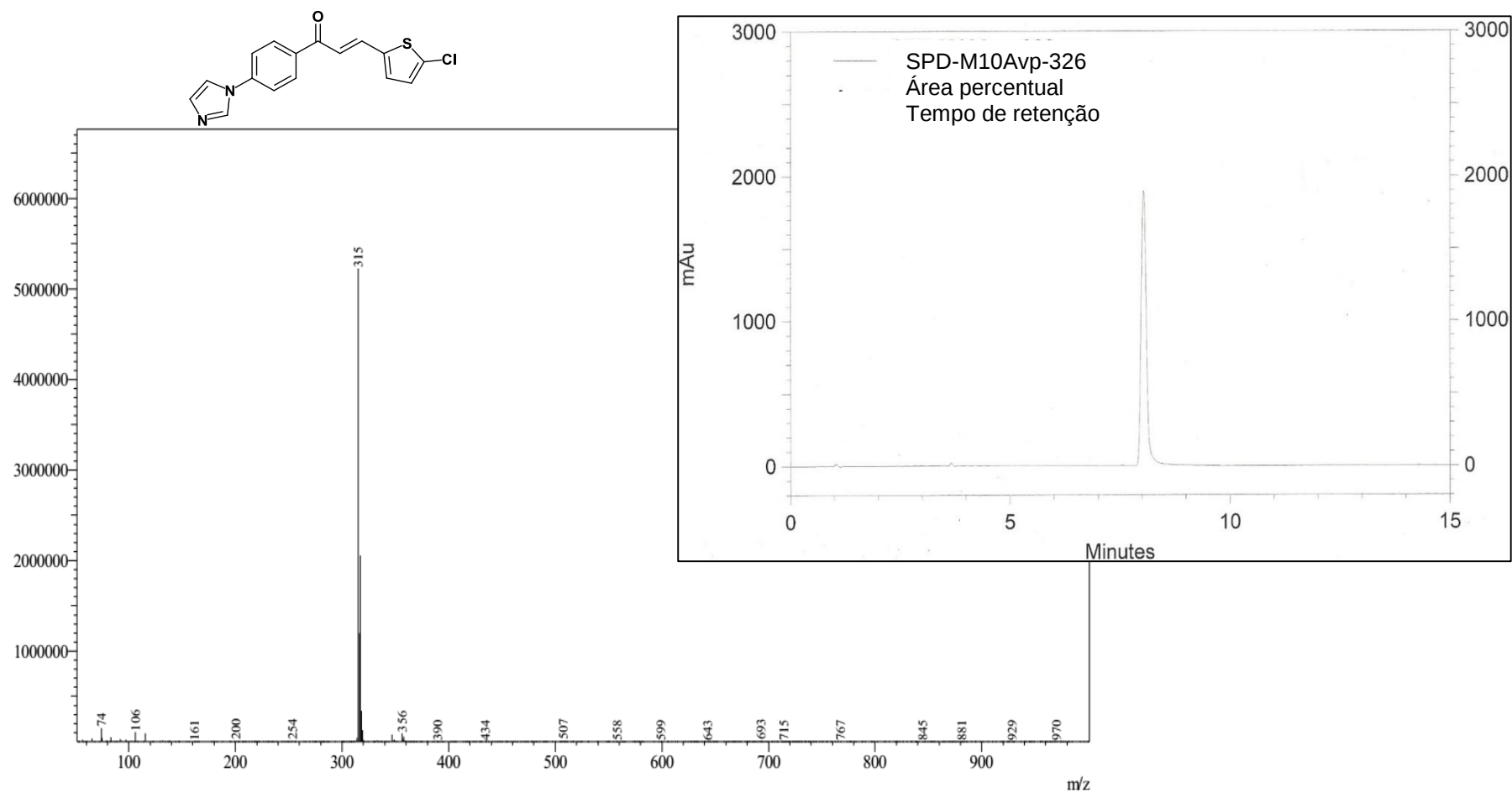
Anexo 124 - Espectro de RMN ¹H (2E)-3-(clorotiofen-2-il)-1-[4-(1H-imidazol-1-il)fenil]prop-2-em-1-ona (**LabMol94**), (**95**), 400 MHz, CDCl₃.



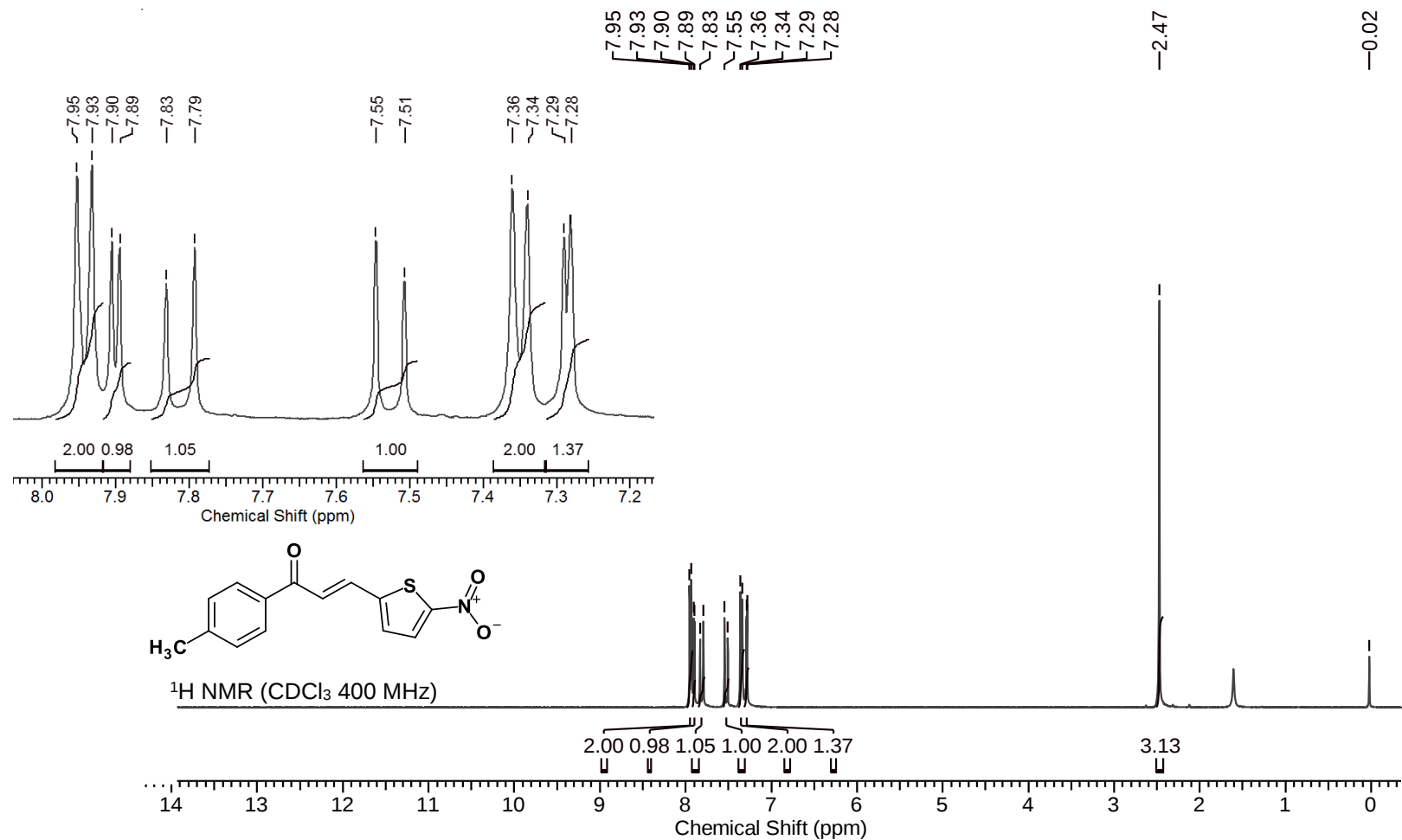
Anexo 125 - Espectro de RMN ¹³C (2E)-3-(clorotiofen-2-il)-1-[4-(1H-imidazol-1-il)fenil]prop-2-em-1-ona (**LabMol94**), (**95**) 400 MHz, CDCl₃.



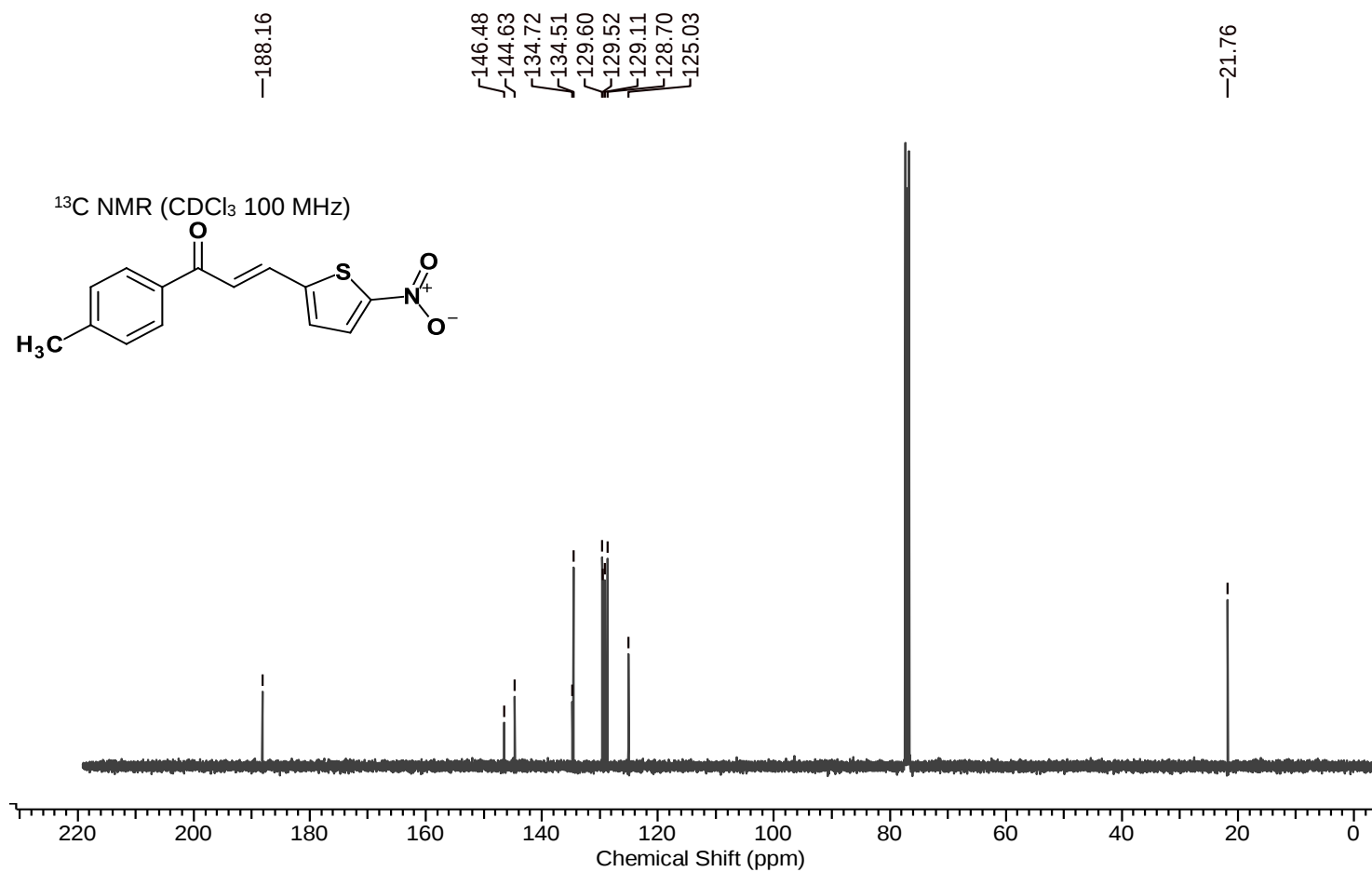
Anexo 126 - Espectro de IV (2E)-3-(clorotiofen-2-il)-1-[4-(1H-imidazol-1-il)fenil]prop-2-em-1-ona (LabMol94), (95), KBr.



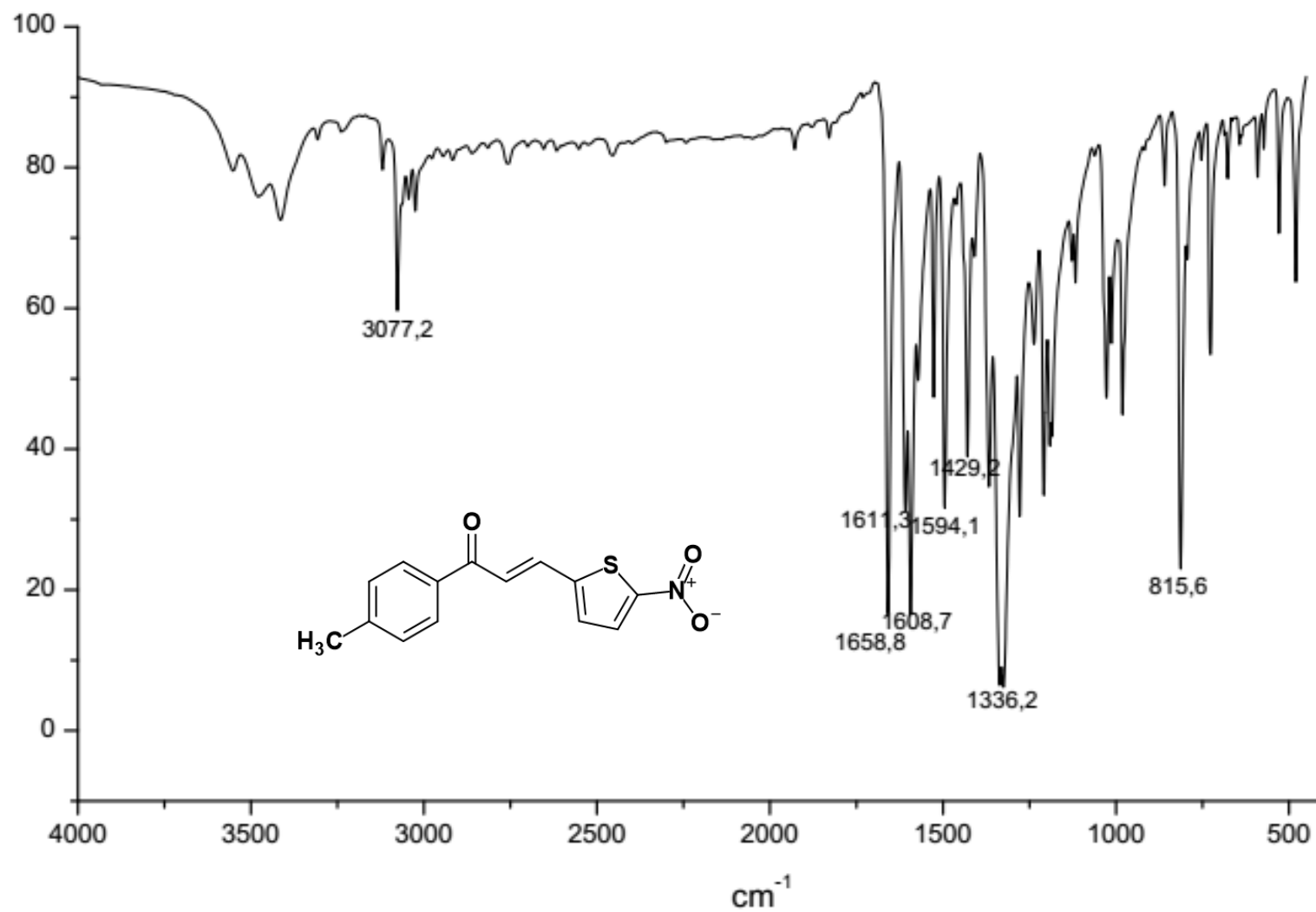
Anexo 127 - Espectro de massas e cromatograma (2E)-3-(clorotiofen-2-il)-1-[4-(1H-imidazol-1-il)fenil]prop-2-em-1-ona (LabMol94), (95).



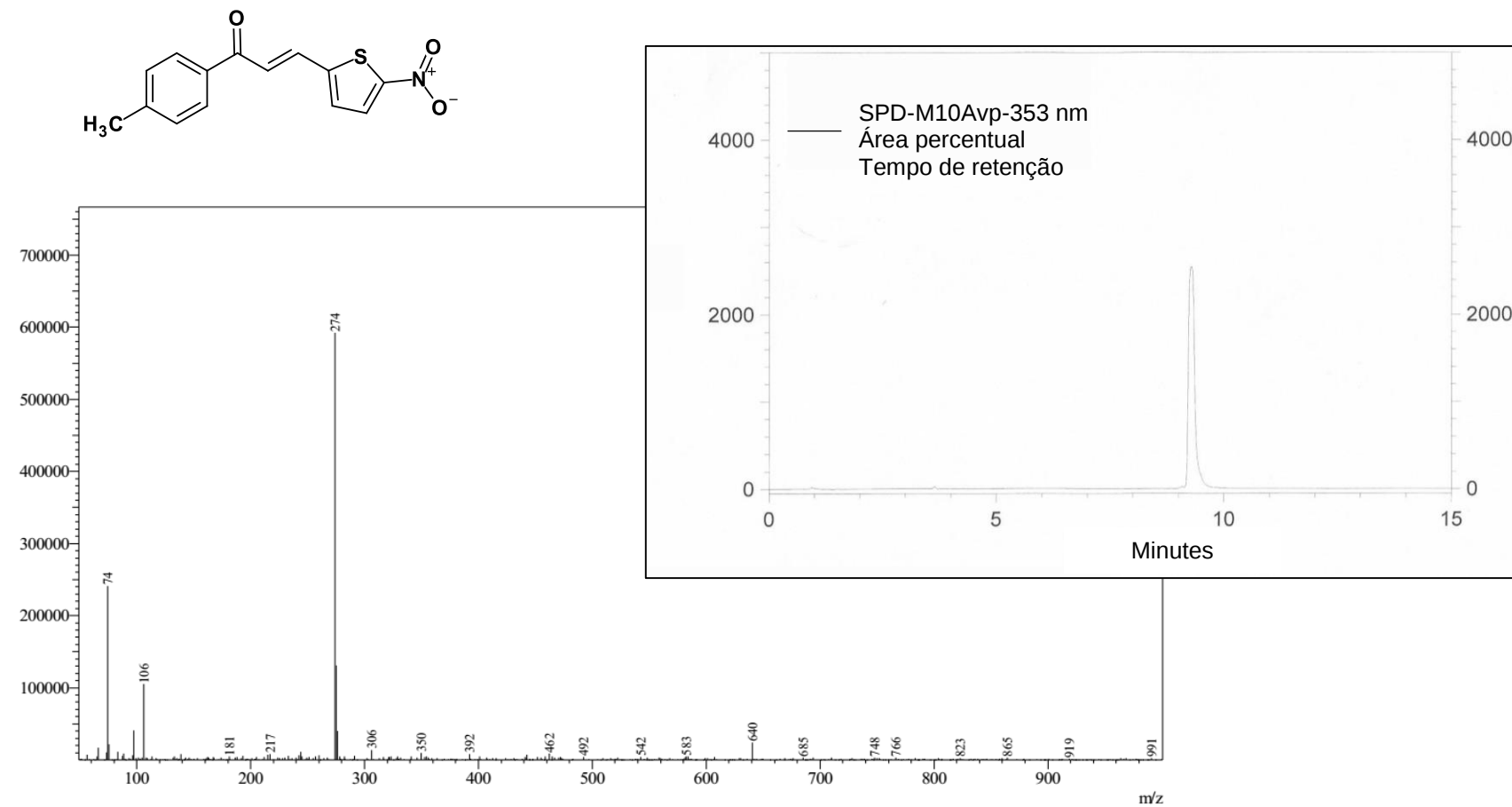
Anexo 128 - Espectro de RMN ¹H (2E)-1-(4-metilfenil)-3-(5-nitrotiofen-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol95**), (**96**) 400 MHz, CDCl₃



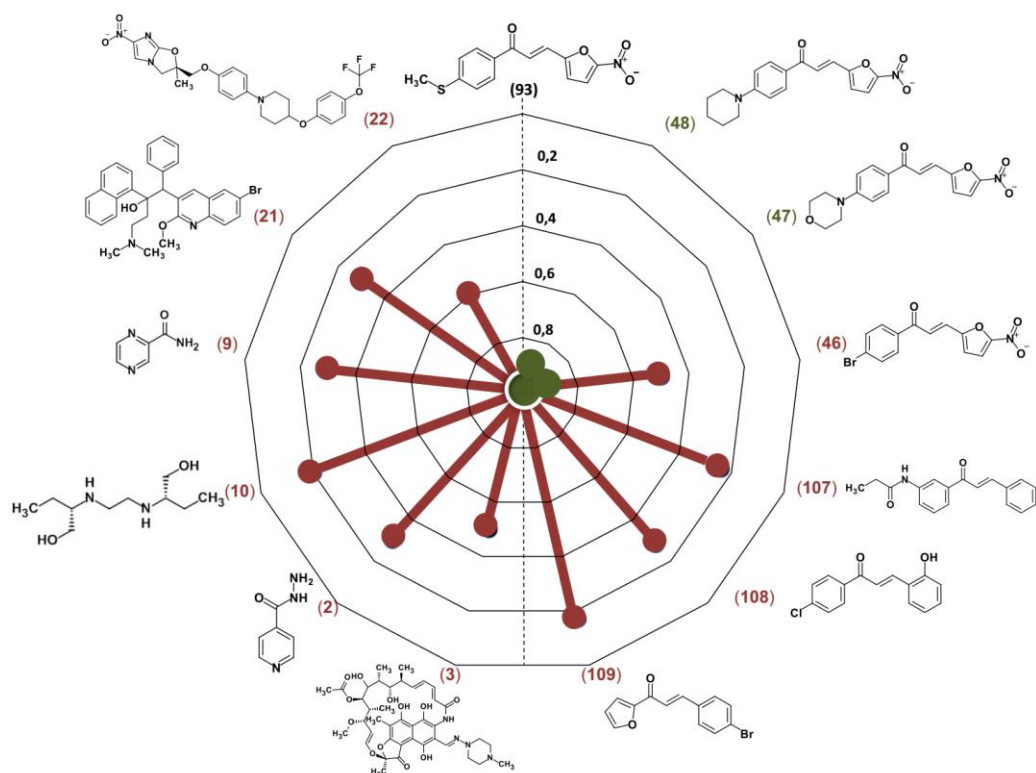
Anexo 129 - Espectro de RMN ¹³C (2E)-1-(4-metilfenil)-3-(5-nitrotiofen-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol95**), (**96**), 400 MHz, CDCl₃.



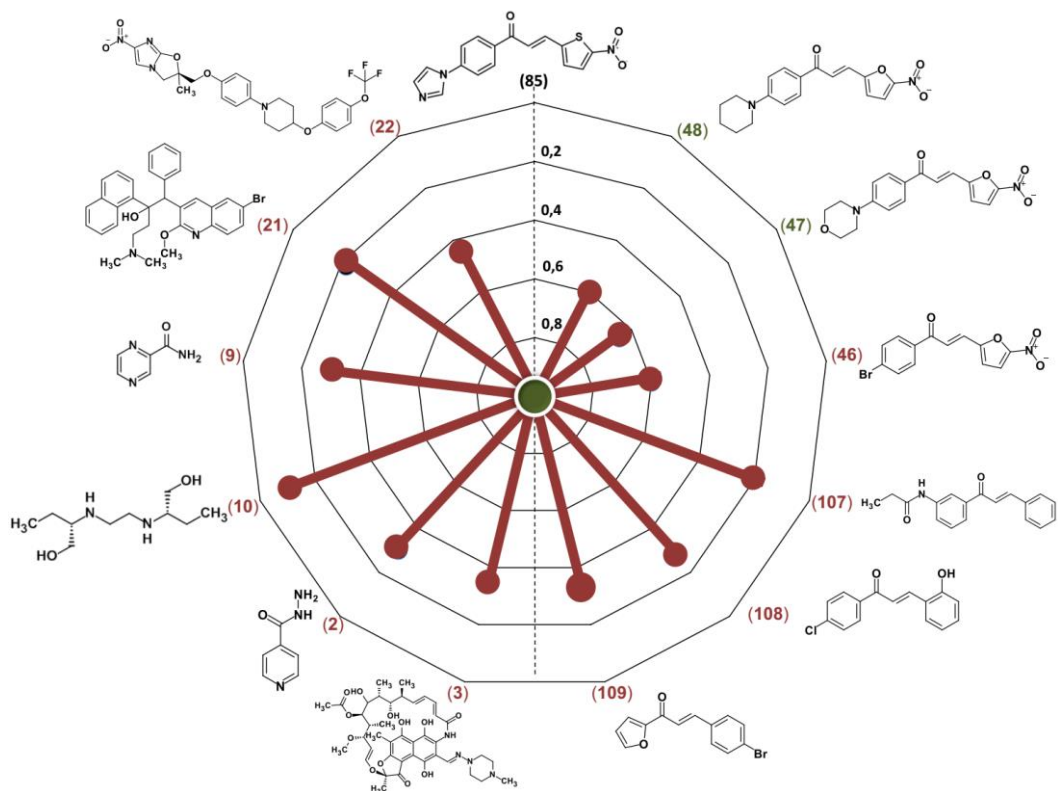
Anexo 130 - Espectro de IV (2E)-1-(4-metilfenil)-3-(5-nitrotiofen-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol95**), (**96**), KBr.



Anexo 131 - Espectro de massas e cromatograma (2E)-1-(4-metilfenil)-3-(5-nitrotiofen-2-il)prop-2-en-1-ona (**LabMol95**), (**96**) 400 MHz, CDCl₃.



Anexo 132 - Mapa radial de similaridade do *hit* (93) em comparação aos compostos ativos, inativos do conjunto de dados, fármacos de primeira escolha e fármacos usados em cepas resistentes.



Anexo 133 - Mapa radial de similaridade do *hit* (85) em comparação aos compostos ativos, inativos do conjunto de dados, fármacos de primeira escolha e fármacos usados em cepas resistentes.

Anexo 134 – Resultado da análise de predição dos compostos como bloqueadores da hERG no servidor pred-hERG e no filtro de PAINS desenvolvidos no LabMol.

Código	hERG	PAINS
(46)	Não bloqueador	Negativo
(47)	Não bloqueador	Negativo
(48)	Não bloqueador	Negativo
(67)	Não bloqueador	Negativo
(68)	Não bloqueador	Negativo
(69)	Não bloqueador	Negativo
(70)	Não bloqueador	Negativo
(71)	Não bloqueador	Negativo
(72)	Não bloqueador	Negativo
(73)	Não bloqueador	Negativo
(74)	Não bloqueador	Negativo
(75)	Não bloqueador	Negativo
(76)	Não bloqueador	Negativo
(77)	Não bloqueador	Negativo
(78)	Não bloqueador	Negativo
(79)	Não bloqueador	Negativo
(80)	Não bloqueador	Negativo
(81)	Não bloqueador	Negativo
(82)	Não bloqueador	Negativo
(83)	Não bloqueador	Negativo
(84)	Não bloqueador	Negativo
(85)	Não bloqueador	Negativo
(86)	Não bloqueador	Negativo
(87)	Não bloqueador	Negativo
(88)	Não bloqueador	Negativo
(89)	Não bloqueador	Negativo
(90)	Não bloqueador	Negativo
(91)	Não bloqueador	Negativo
(92)	Não bloqueador	Negativo
(93)	Não bloqueador	Negativo
(94)	Não bloqueador	Negativo
(95)	Não bloqueador	Negativo
(96)	Não bloqueador	Negativo

Anexo 135 – Resultado da análise de predição de metabolismo em modelos de QSAR desenvolvidos no LabMol.

[illegible]