

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Síntese e avaliação da ação antifúngica de chalconas e seus derivados  
fenetil-imino-chalconas e chalconas tiosemicarbazonas**

**WILLIAM QUEIROZ FELIPPE**

**2023**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DE  
CHALCONAS E SEUS DERIVADOS FENETIL-IMINO-  
CHALCONAS E CHALCONAS TIOSSEMICARBAZONAS**

**WILLIAM QUEIROZ FELIPPE**

*Sob Orientação da Professora  
Dr.ª Aurea Echevarria*

*Coorientação das Professoras  
Dr.ª Águida Aparecida de Oliveira  
Dr.ª Gisela Lara da Costa*

Dissertação submetida como  
requisito parcial para obtenção do  
grau de **Mestre em Química**, no  
Programa de Pós-Graduação em  
Química, Área de Concentração em  
Química.

Seropédica, RJ  
Julho de 2023

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F315s *Felippe, William Queiroz, 09/12/1994-  
Síntese e avaliação da ação antifúngica de chalconas  
e seus derivados fenetil-imino-chalconas e chalconas  
tiossemicarbazonas / William Queiroz Felippe. - Rio  
de Janeiro - RJ, 2023.  
134 f.: il.*

Orientadora: Aurea Echevarria Aznar Neves Lima.  
Coorientadora: Águida Aparecida de Oliveira.  
Coorientadora: Gisela Lara da Costa.  
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em  
Química, 2023.

1. Química. 2. Química Orgânica. 3. Química Medicinal.  
4. Microbiologia. 5. Micologia. I. Echevarria Aznar  
Neves Lima, Aurea, 1950-, orient. II. Aparecida de  
Oliveira, Águida, -, coorient. III. Lara da Costa,  
Gisela, -, coorient. IV Universidade Federal Rural do  
Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Química. V.  
Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**WILLIAM QUEIROZ FELIPPE**

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de concentração Química.

**DISSERTAÇÃO APROVADA EM 03/08/2023**

Aurea Echevarria Aznar Neves Lima. Dr<sup>a</sup>.UFRRJ  
(Orientadora)

Andressa Esteves de Souza dos Santos Dr<sup>a</sup>. UFRRJ

Jacqueline Santos Cruz. Dr<sup>a</sup>. IME

---

Emitido em 2023

**TERMO N° 884/2023 - PPGQ (12.28.01.00.00.00.60)**

**(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)**

*(Assinado digitalmente em 04/08/2023 09:35 )*  
ANDRESSA ESTEVES DE SOUZA DOS SANTOS  
*PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR*  
*DQO (11.39.00.23)*  
*Matrícula: ####513#4*

*(Assinado digitalmente em 04/08/2023 14:44 )*  
AUREA ECHEVARRIA AZNAR NEVES LIMA  
*PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR*  
*DQO (11.39.00.23)*  
*Matrícula: ####71#9*

*(Assinado digitalmente em 04/08/2023 09:16 )*  
JACQUELINE SANTOS CRUZ  
*ASSINANTE EXTERNO*  
*CPF: ####.###.107-##*

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/documentos/> informando seu número: **884**, ano: **2023**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **04/08/2023** e o código de verificação: **317f974298**

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ana e Marcelo, muito obrigado por todo carinho, apoio e esforços investidos na minha educação. Apesar de todos os percalços, me fortaleceram e foram muito importantes para mim. Amo vocês mais que tudo nesse mundo!

Aos meus irmãos, João Pedro e Marcelo Victor. Obrigado pela irmandade, amizade e apoio.

Às minhas orientadoras Águida Aparecida de Oliveira, Ana Paula Pereira da Silva, Aurea Echevarria e Gisela Lara da Costa, pelas experiências, motivações, parceria e carinho ao longo de todo o tempo que estiveram comigo. Vocês me inspiram a ser, não só um pesquisador e profissional melhor, como principalmente uma pessoa melhor. Têm sido essenciais na minha trajetória.

Ao Núcleo de Síntese e Química Medicinal (NUSQUIMED), representado pelos meus amigos e companheiros de trabalho: Ana Clara, Felipe, Gabriela, Geicy, Heidykel, Igor e Mariana. Se tornaram uma segunda família para mim e sem vocês este trabalho jamais teria sido concluído.

Aos meus amigos do Laboratório de Estresse Oxidativo em Microrganismos (LEOM): Aline, Cristiano, Danniel, Jéssica, João, Nathalia, Rodrigo e Tamires. Por todos nossos momentos de cumplicidade e descontração permitindo que o meu mestrado fosse executado com muita leveza.

Aos meus grandes amigos que estiveram presentes ao longo da minha trajetória na Rural desde a graduação até aqui: Afonso, Átila, Gabriel, Letícia, Luiz Felipe, Marcos Vinicius e Talyson. Vocês são os melhores companheiros que poderia ter durante a graduação e que mesmo com o aumento da distância se mantiveram presentes agora na pós-graduação. Compartilhamos inúmeros desafios sempre com espírito colaborativo e vocês fizeram o ambiente acadêmico se tornar mais leve.

Por fim, mas não menos importante, quero agradecer à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e seu corpo docente, em especial aos docentes do Instituto de Química.

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

FELIPPE, William Queiroz. **Síntese e avaliação da ação antifúngica de chalconas e seus derivados fenetil-imino-chalconas e chalconas tiossemicarbazonas.** 2023. 134 p. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

## RESUMO

Pesquisas no campo da micologia indicam alarmante aumento na frequência de infecções fúngicas oportunistas e dentre elas, observa-se as ações de leveduras e fungos filamentosos que ocasionam vários problemas para os setores agrário, alimentício e da saúde. Chalconas são compostos de aplicações relevantes para a síntese orgânica, uma vez que são substratos que permitem uma grande variedade de modificações estruturais, produzindo novas estruturas com as mais diversas propriedades biológicas. Das oito chalconas precursoras sintetizadas para este trabalho, quatro foram selecionadas devido a avaliação prévia frente às espécies *Aspergillus parasiticus* e *A. carbonarius*, para prosseguir com a síntese dos compostos das classes fenetil-imino-chalconas (**FIC**) e chalcona-tiossemicarbazonas (**CT**). A classe **FIC** foi obtida a partir das respectivas chalconas e 2-fenetilamina em etanol sob irradiação de micro-ondas e, a classe **CT** foi obtida através das chalconas e tiossemicarbazida em etanol sob refluxo. Ambas as classes foram avaliadas quanto as suas capacidades antifúngicas frente a diferentes espécies de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Candida* e *Sporothrix*, além de serem avaliadas quanto a sua capacidade de quelar  $\text{Fe}^{2+}$ , uma vez que esse se apresenta como importante fator biológico para diversos fungos. Os resultados dos ensaios de inibição do crescimento radial frente às cepas de *A. carbonarius* e *A. parasiticus* mostraram melhorias significativas nas atividades de retardo da proliferação fúngica de ambas as classes de derivados em comparação com as chalconas precursoras. As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) dos derivados chalcônicos foram avaliados frente a diferentes cepas fúngicas, apresentando maior capacidade inibitória frente a *C. albicans* para o derivado **FIC-Cl** ( $3,90 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), *C. krusei* para os derivados **CT-H**, **CT-F**, **CT-Cl** e **CT-Br** ( $3,90 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $7,80 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $7,80 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $3,90 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente), *C. tropicalis* para o derivado **FIC-Cl** ( $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), *S. schenckii* para os derivados **FIC-H**, **FIC-F** e **CT-H** ( $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente), *S. brasiliensis* para os derivados **FIC-F** ( $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) **FIC-H**, **FIC-Cl**, **CT-H**, **CT-F**, **CT-Cl** e **CT-Br** ( $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e *Sporothrix spp.* (cepa clínica) para os derivados **FIC-H**, **FIC-F**, **CT-H**, **CT-F**, **CT-Cl** e **CT-Br** ( $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente). A avaliação da atividade quelante indicou os maiores efeitos para os derivados mais ativos frente às espécies de *Candida* (**CT-Br**, **CT-Cl** e **FIC-Cl**) sugerindo a complexação com os íons de  $\text{Fe}^{2+}$ . De maneira geral, os derivados **CT** apresentaram maiores efeitos antiproliferativos e, assim, com os resultados deste trabalho espera-se contribuir com o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos para o controle de fungos.

**Palavras-chave:** Chalconas, fenetil-imino-chalconas, chalconas-tiossemicarbazonas, antifúngicos.

FELIPPE, William Queiroz. **Synthesis and evaluation of the antifungal action of chalcones and their phenethyl-imino-chalcones and thiosemicarbazones chalcones.** 2023. 134 p. Dissertation (Master in Chemistry). Chemistry Institute, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

## ABSTRACT

Research in the field of Mycology indicates an alarming increase in the frequency of opportunistic fungal infections and among them, the actions of yeasts and filamentous fungi that cause various problems for the agrarian, food and healthcare sectors are observed. Chalcones are composed of relevant applications for organic synthesis, since they are substrates that allow a wide variety of structural modifications, producing new structures with the most diverse biological properties. Of the eight precursor chalcones synthesized for this work, four were selected due to previous evaluation against the species *Aspergillus parasiticus* and *A. carbonarius*, to proceed with the synthesis of the compounds of the phenethyl-imino-chalcones (**FIC**) classes and chalcone-thiosemicarbazones (**CT**). The **FIC** class was obtained from the respective chalcones and 2-phenethylamine in ethanol under microwave irradiation and the **CT** class was obtained through chalcones and thiosemicarbazide in ethanol under reflux. Both classes were evaluated for their antifungal capabilities against different species of fungi of the genera *Aspergillus*, *Candida* and *Sporothrix*, and were evaluated for their ability to chelate  $\text{Fe}^{2+}$ , important biological factor for several fungi. The results of radial growth inhibition assays against strains of *A. carbonarius* and *A. parasiticus* showed significant improvements in fungal proliferation retardation activities of both classes of derivatives compared to precursor chalcones. MICs (minimum inhibitory concentration) of chalconic derivatives were evaluated against different fungal strains, presenting greater inhibitory capacity against *C. albicans* for **FIC-Cl** ( $3,90 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), *C. krusei* for **CT-H**, **CT-F**, **CT-Cl** and **CT-Br** ( $3,90 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $7,80 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $7,80 \mu\text{g mL}^{-1}$  and  $3,90 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively), *C. tropicalis* for **FIC-Cl** ( $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), *S. schenckii* for **FIC-H**, **FIC-F**, **CT-H** ( $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$  and  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively), *S. brasiliensis* for **FIC-F** ( $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) **FIC-H**, **FIC-Cl**, **CT-H**, **CT-F**, **CT-Cl** and **CT-Br** ( $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) and *Sporothrix spp.* (clinical strain) for derivatives **FIC-H**, **FIC-F**, **CT-H**, **CT-F**, **CT-Cl** and **CT-Br** ( $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively). The evaluation of chelating activity indicated the greatest effects for the most active derivatives against *Candida* species (**CT-Br**, **CT-Cl** and **FIC-Cl**) suggesting complexation with  $\text{Fe}^{2+}$  ions. In general, the **CT** derivatives presented higher antiproliferative effects and, thus, with the results of this work it is expected to contribute to the development of new antifungal agents for the control of fungi.

**Keywords:** Chalcones, phenethyl-imino-chalcones, chalcones-thiosemicarbazones, antifungal.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estruturas da <i>trans</i> -(2E)1,3-difenil-prop-2-en-1-ona e <i>cis</i> -(2E)1,3-difenil-prop-2-en-1-ona.....	2
<b>Figura 2.</b> Micélio reprodutivo de fungos <i>Aspergillus</i> .....	8
<b>Figura 3.</b> Estrutura química da ocratoxina A.....	9
<b>Figura 4.</b> Estruturas moleculares das principais aflatoxinas.....	9
<b>Figura 5.</b> Representação de blastoconídio de espécies do gênero <i>Candida</i> .....	10
<b>Figura 6.</b> Representações das fases saprofítica (esquerda) e parasítica (direita) da espécie <i>Sporothrix schenckii</i> .....	11
<b>Figura 7.</b> Fotografia de <i>Sporothrix brasiliensis</i> sob ótica de microscópio (400x).....	12
<b>Figura 8.</b> Estruturas moleculares dos antifúngicos Anfotericina B, Cetoconazol e Itraconazol.....	13
<b>Figura 9.</b> Estrutura molecular do antifúngico Posaconazol.....	13
<b>Figura 10.</b> Estruturas moleculares dos antifúngicos voriconazol (esquerda) e terbinafina (direita).....	14
<b>Figura 11.</b> Estruturas moleculares da hinokitiol, tropolona e maltol.....	16
<b>Figura 12.</b> (A) chalconas e (B) derivados di-hidropirazóis.....	17
<b>Figura 13.</b> Compostos <b>138</b> e <b>139</b> : derivados chalconas monohidroxilados; composto <b>207</b> : derivado chalcona e 3-acetiltiofeno diclorado; composto <b>209</b> : derivado 3-acetiltiofeno monoclorado (ELKANZI et al., 2022).....	20
<b>Figura 14.</b> Visão de <i>Aspergillus parasiticus</i> (A) e <i>Aspergillus carbonarius</i> (B) sob a ótica de microscópio (400x).....	28
<b>Figura 15.</b> Organização de microplacas para ensaios de determinação de CIM e suas concentrações em $\mu\text{g mL}^{-1}$ .....	32
<b>Figura 16.</b> Organização de microplacas para ensaios de determinação de CIM e suas concentrações em $\mu\text{g mL}^{-1}$ .....	33
<b>Figura 17.</b> Espectro UV/Vis de EDTA ( $1,60 \times 10^{-3}$ mol $\text{L}^{-1}$ ) e com $\text{FeSO}_4 + \text{EDTA}$ ( $1,60 \times 10^{-3}$ mol $\text{L}^{-1}$ ).....	34
<b>Figura 18.</b> Controle negativo do ensaio de inibição de difusão radial do fungo <i>Aspergillus parasiticus</i> em temperatura média de 29 °C.....	44
<b>Figura 19.</b> Controle negativo do ensaio de inibição de difusão radial do fungo <i>Aspergillus carbonarius</i> em temperatura média de 31,5 °C.....	44

<b>Figura 20.</b> Tratamentos de <i>Aspergillus parasiticus</i> com chalconas precursoras.....	46
<b>Figura 21.</b> Tratamentos de <i>Aspergillus carbonarius</i> com chalconas precursoras.....	47
<b>Figura 22.</b> <i>Aspergillus parasiticus</i> tratado com <b>CH-H</b> a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ( <b>A</b> ), 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ( <b>B</b> ), 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ( <b>C</b> ) e 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ( <b>D</b> ) .....	48
<b>Figura 23.</b> 2-arilideno-3,4-di-hidronaftalen-1-ona ( <b>3a</b> ) e seu valor de concentração mínima inibitória frente à <i>M. gypseum</i> .....	48
<b>Figura 24.</b> <i>Aspergillus parasiticus</i> tratados com <b>CH-F</b> ( <b>A</b> ), <b>CH-Cl</b> ( <b>B</b> ) e <b>CH-Br</b> ( <b>C</b> ) a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ .....	49
<b>Figura 25.</b> Derivados 2-arilideno-3,4-di-hidronaftalen-1-onas .....	49
<b>Figura 26.</b> <i>Aspergillus parasiticus</i> tratados com <b>CH-NO<sub>2</sub></b> ( <b>A</b> ), <b>CH-NMe<sub>2</sub></b> ( <b>B</b> ) e <b>CH-Br</b> ( <b>C</b> ) a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ .....	50
<b>Figura 27.</b> <i>Aspergillus carbonarius</i> tratado com <b>CH-F</b> a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ( <b>A</b> ), 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ( <b>B</b> ), 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ( <b>C</b> ) e 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ( <b>D</b> ) .....	50
<b>Figura 28.</b> Comparativo da atividade inibitória dos tratamentos das chalconas frente aos fungos <i>Aspergillus carbonarius</i> e <i>Aspergillus parasiticus</i> .....	52
<b>Figura 29.</b> Tratamentos de <i>Aspergillus parasiticus</i> com os derivados das chalconas...	53
<b>Figura 30.</b> Tratamentos de <i>Aspergillus carbonarius</i> com os derivados das chalconas .	54
<b>Figura 31.</b> Espectro UV/Vis da substância <b>CT-H</b> .....	60
<b>Figura 32.</b> Espectro UV/Vis da substância <b>CT-F</b> .....	60
<b>Figura 33.</b> Espectro UV/Vis da substância <b>CT-Cl</b> .....	61
<b>Figura 34.</b> Espectro UV/Vis da substância <b>CT-Br</b> .....	62
<b>Figura 35.</b> Espectro UV/Vis da substância <b>FIC-Cl</b> .....	62

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1.</b> Anéis heterocíclicos a partir de chalconas.....	3
<b>Esquema 2.</b> Reação de Claisen-Schmidt: condensação entre benzaldeído e acetofenona.	4
<b>Esquema 3.</b> Mecanismo simplificado da reação de Cannizzaro.....	4
<b>Esquema 4.</b> Reação de Suzuki: condensação entre ácido fenil-borônico e cloreto de cinamoíla ou entre cloreto de benzoíla e ácido fenil-vinil-borônico.....	5
<b>Esquema 5.</b> Reações de Fenton e Haber-Weiss.....	15
<b>Esquema 6.</b> Reação de síntese de chalconas substituídas, sendo R = H, F, Cl, Br, NO <sub>2</sub> , (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> N, CN e CH <sub>3</sub> .....	23
<b>Esquema 7.</b> Reação de síntese de fenetil-imino-chalconas substituídas, sendo R = H, F, Cl e Br .....	25
<b>Esquema 8.</b> Reação de síntese de chalconas tiossemicarbazonas substituídas, sendo R = H, F, Cl e Br.....	26
<b>Esquema 9.</b> Reação de redução de resazurina a resorufina. ....	31
<b>Esquema 10.</b> Mecanismo resumido proposto para obtenção de chalconas substituídas.	36
<b>Esquema 11.</b> Mecanismo resumido proposto para obtenção de fenetil-imino-chalconas substituídas. ....	38
<b>Esquema 12.</b> Mecanismo resumido proposto para obtenção de chalconas tiossemicarbazonas substituídas. ....	40

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Micotoxinas de <i>Aspergillus</i> presentes em produtos vegetais e espécies produtoras associadas .....	8
<b>Tabela 2.</b> Atividades antifúngicas (CIM em $\mu\text{M}$ ) de chalconas (2-16) e di-hidropirazóis (17-31).....	17
<b>Tabela 3.</b> Potencial antimicrobiano de derivados chalconas <b>138, 139, 207 e 209</b> em $\mu\text{g mL}^{-1}$ . .....	20
<b>Tabela 4.</b> Espécies leveduriformes e seus códigos.....	29
<b>Tabela 5.</b> Espécies fúngicas e seus códigos.....	32
<b>Tabela 6.</b> Códigos dos compostos chalconas.....	36
<b>Tabela 7.</b> Rendimentos e pontos de fusão experimentais e encontrados na literatura para as chalconas sintetizadas.....	37
<b>Tabela 8.</b> Principais bandas de absorção ( $\text{cm}^{-1}$ ) observadas nos espectros de infravermelho das chalconas sintetizadas .....	37
<b>Tabela 9.</b> Códigos dos compostos fenetil-imino-chalconas. ....	39
<b>Tabela 10.</b> Rendimentos experimentais e índices de refração das fenetil-imino-chalconas sintetizadas. ....	39
<b>Tabela 11.</b> Códigos dos compostos chalconas-tiossemicarbazonas. ....	40
<b>Tabela 12.</b> Rendimentos e pontos de fusão (P.F.) experimentais e encontrados na literatura das chalconas tiossemicarbazonas sintetizadas. ....	41
<b>Tabela 13.</b> Propriedades físico-químicas das chalconas.....	42
<b>Tabela 14.</b> Propriedades físico-químicas das fenetil-imino-chalconas. ....	42
<b>Tabela 15.</b> Propriedades físico-químicas das chalconas-tiossemicarbazonas. ....	42
<b>Tabela 16.</b> Comparação dos resultados percentuais dos experimentos de inibição do crescimento radial das chalconas precursoras (CH) e seus respectivos derivados (CT e FIC) halogenados e não substituídos frente à cepa de <i>Aspergillus parasiticus</i> . ....	55
<b>Tabela 17.</b> Comparação dos resultados percentuais dos experimentos de inibição do crescimento radial das chalconas precursoras (CH) e seus respectivos derivados (CT e FIC) halogenados e não substituídos frente à cepa de <i>Aspergillus carbonarius</i> .....	56
<b>Tabela 18.</b> Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) dos derivados das chalconas (FIC e CT) avaliados em bioensaio frente a <i>Candida spp.</i> colorimétrico em microplaca em $\mu\text{g mL}^{-1}$ . .....	57

**Tabela 19.** Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) dos compostos derivados de chalconas (FIC e CT) frente aos fungos *Sporothrix spp.* em  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ..... 58

**Tabela 20.** Concentrações das amostras dos derivados utilizadas no ensaio de avaliação do efeito quelante e suas respectivas capacidades quelantes frente a íons  $\text{Fe}^{2+}$  ..... 59

## LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

ATCC – do inglês *American Type Culture Collection* (Coleção Americana de Tipos de Cultura)

CFP – Coleção de Fungos Patogênicos

CDC – do inglês *Center for Disease Control and Prevention* (Centro de Controle e Prevenção de Doenças)

CH – Chalcona

CH-H – (1E,2E)-3-fenil-1-fenilprop-2-en-1-ona

CH-Br – (1E,2E)-3-(4-bromo-fenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona

CH-Cl – (1E,2E)-3-(4-cloro-fenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona

CH-CN – (1E,2E)-3-(4-ciano-fenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona

CH-F – (1E,2E)-3-(4-flúor-fenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona

CH-Me – (1E,2E)-3-(4-metil-fenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona

CH-NMe<sub>2</sub> – (1E,2E)-3-(4-N,N-dimetil-amino-fenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona

CH-NO<sub>2</sub> – (1E,2E)-3-(4-nitro-fenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI – do inglês *Clinical and Laboratory Standards Institute* (Instituto de Padronização Clínica e Laboratorial)

CNA – *Candida* não-albicans

CT – Chalcona-tiossemicarbazona

CT-H – (2Z,2E)-2-[(2E)-1,3-difenilprop-2-en-1-ilídeno]hidrazina-1-carbotioamida

CT-Br – (2Z,2E)-2-[(2E)-3-(4-bromo-fenil)-1-fenilprop-2-en-1-ilídeno]hidrazina-1-carbotioamida

CT-Cl – (2Z,2E)-2-[(2E)-3-(4-cloro-fenil)-1-fenilprop-2-en-1-ilídeno]hidrazina-1-carbotioamida

CT-F – (2Z,2E)-2-[(2E)-3-(4-flúor-fenil)-1-fenilprop-2-en-1-ilídeno]hidrazina-1-carbotioamida

DMSO – Dimetilsulfóxido

EDTA – Ácido etilenodiaminotetraacético

ERO – Espécie Reativa de Oxigênio

EUCAST – Comitê Europeu de Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana

FIC – Fenetil-imino-chalcona

FIC-H – (1Z,2E)-1,3-difenil-N-(2-feniletil)prop-2-en-1-imina

FIC-Br – (1Z,2E)-3-(4-bromo-fenil)-1-fenil-N-(2-fenil-etil)prop-2-en-1-imina  
FIC-Cl – (1Z,2E)-3-(4-cloro-fenil)-1-fenil-N-(2-fenil-etil)prop-2-en-1-imina  
FIC-F – (1Z,2E)-3-(4-flúor-fenil)-1-fenil-N-(2-fenil-etil)prop-2-en-1-imina  
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz  
INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
IOC – Instituto Oswaldo Cruz  
IUPAC – “International Union of Pure and Applied Chemistry”  
IV – Infravermelho  
MEA – Meio de Cultura Ágar-Extrato de Malte  
MOPS – Ácido 3-morfolinopropano 1-sulfônico  
OMS – Organização Mundial da Saúde  
OTA – Ocratoxina A  
RMN <sup>1</sup>H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio  
RMN <sup>13</sup>C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13  
RPMI 1640 – “Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium”  
SAD – Sabouraud Dextrose-Água  
SisGen – Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado  
UFC – Unidades Formadoras de Colônias  
UV – Ultravioleta  
VCE – Valores de Corte Epidemiológicos

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	1
<b>1.1</b>	<b>Chalconas e Derivados</b>	2
1.1.1	Relevância das chalconas e seus derivados	2
1.1.2	Métodos de obtenção de chalconas	3
<b>1.2</b>	<b>Fungos</b>	5
1.2.1	O gênero <i>Aspergillus</i>	7
1.2.2	O gênero <i>Candida</i>	10
1.2.3	O gênero <i>Sporothrix</i>	11
<b>1.3</b>	<b>Ferro Dependência de Espécies Fúngicas</b>	15
<b>1.4</b>	<b>Chalconas e Derivados com Atividades Antifúngicas</b>	16
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	21
2.1	Objetivo Geral	21
2.2	Objetivos Específicos	21
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	22
<b>3.1</b>	<b>Equipamentos</b>	22
3.1.1	Equipamentos utilizados para a síntese e caracterização das chalconas, chalconas-tiossemicarbazonas e imino-chalconas	22
3.1.2	Equipamentos e programas utilizados para os ensaios de avaliação biológica e efeito quelante	22
<b>3.2</b>	<b>Reagentes</b>	22
3.2.1	Reagentes e solventes utilizados nas sínteses	22
3.2.2	Reagentes e solventes utilizados nos ensaios biológicos	23
<b>3.3</b>	<b>Síntese das Chalconas Precursoras</b>	23
<b>3.4</b>	<b>Síntese das fenetil-imino-chalconas</b>	24
<b>3.5</b>	<b>Síntese das chalconas tiossemicarbazonas</b>	26
<b>3.6</b>	<b>Avaliação da Atividade Antifúngica das Chalconas e seus Derivados</b>	28
3.6.1	Inibição <i>in vitro</i> do crescimento radial de fungos do gênero <i>Aspergillus</i>	28
3.6.2	Ensaio de microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	29
<b>3.7</b>	<b>Avaliação da Atividade Quelante dos Derivados Mais Ativos</b>	34
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	35
<b>4.1</b>	<b>Síntese das Chalconas</b>	35
<b>4.2</b>	<b>Síntese das fenetil-imino-chalconas</b>	37
<b>4.3</b>	<b>Síntese das chalconas-tiossemicarbazonas</b>	39
<b>4.4</b>	<b>Regra de Lipinski Aplicada aos Compostos Chalconas e Derivados</b>	41
<b>4.5</b>	<b>Ensaios Biológicos</b>	43

4.5.1	Ensaios <i>in vitro</i> de inibição do crescimento radial dos fungos .....	43
4.5.2	Bioensaio em Microplaca pelo Método Colorimétrico de Determinação da Concentração Inibitória Mínima .....	56
<b>4.6</b>	<b>Ensaio de Avaliação do Efeito Quelante .....</b>	<b>58</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>64</b>
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	66
	ANEXOS .....	71

## 1 INTRODUÇÃO

A pesquisa por moléculas que possuam determinadas propriedades biológicas vem se apresentando cada dia mais recorrente seja visando o setor farmacológico, agrário ou industrial. Para isso, muitas vezes essas pesquisas vêm se utilizando de estruturas moleculares já conhecidas que servem de base para novas aplicações ou novos derivados com atividades biológicas.

Deste modo, as chalconas são compostos de aplicações relevantes para a síntese orgânica, uma vez que são substratos que apresentam a capacidade de sofrerem uma grande variedade de modificações estruturais, produzindo novas estruturas com as mais diversas propriedades. Neste trabalho, elas se apresentam como estruturas moleculares primárias a serem utilizadas na síntese de outras duas classes de compostos: as fenetil-imino-chalconas e as chalconas-tiossemicarbazonas.

Na área de química medicinal, é possível encontrar diversos relatos de funções biológicas atribuídas às chalconas e seus derivados tais como: antioxidante (SANTOS e SILVA, 2020), anti-inflamatória (RASHID *et al.*, 2019), antibacteriana (XU *et al.*, 2019), antifúngica (NGUYEN *et al.*, 2021), antitumoral (OYANG *et al.*; SHUKLA *et al.*, 2021) entre tantas outras.

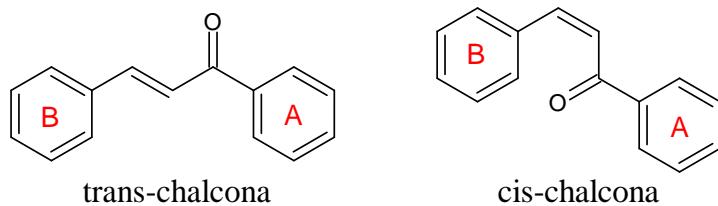
O desenvolvimento de pesquisas no campo da micologia mostra um alarmante aumento na frequência de infecções fúngicas oportunistas e dentre elas, observa-se as ações de leveduras e fungos filamentosos que ocasionam vários problemas para o setor agrário, principalmente no que se refere ao armazenamento de produtos agrícolas e que também podem ocasionar adversidades sanitárias (KAMLE *et al.*, 2022, MUNKVOLD *et al.*, 2019). Além disso, infecções fúngicas são cada vez mais reconhecidas como uma ameaça mundial à saúde humana, sendo as espécies do gênero *Candida* predominantes nas causas de infecções fúngicas nosocomiais (SPALLONE & SCHWARTZ, 2021; DU *et al.*, 2020).

Sendo assim, para este trabalho foram sintetizadas três séries de compostos que foram avaliadas quanto às suas possíveis capacidades antifúngicas frente a diferentes espécies de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Candida* e *Sporothrix*.

## 1.1 Chalconas e Derivados

Pertencentes à família dos flavonoides, as chalconas (ou 1,3-diaril-2-propen-1-onas) compõem uma classe de produtos naturais que são encontrados em diversas partes de diferentes plantas como nas raízes, caule, folhas, frutos e sementes (RUDRAPAL *et al.*, 2021).

De modo geral, as chalconas são cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas contendo um grupo ceto-etylênico reativo, considerado o cromóforo responsável pela coloração dos compostos chalcônicos a depender da presença de outros subgrupos auxocromos. Somado a isso, apresentam um anel aromático ligado à carbonila (anel A) e outro ligado ao carbono da ligação dupla (anel B) (Figura 1). Sendo assim, esse sistema conjugado presente nas chalconas apresenta a capacidade de conferir diferentes cores a depender dos substituintes ligados aos anéis aromáticos.



**Figura 1.** Estruturas da *trans*-(2E)1,3-difenil-prop-2-en-1-ona e *cis*-(2E)1,3-difenil-prop-2-en-1-ona.

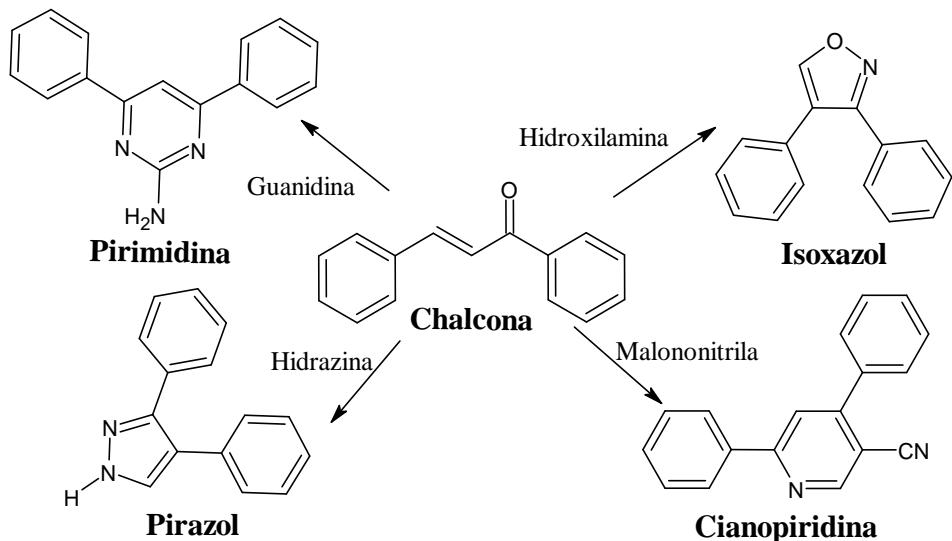
Esses compostos são encontrados em duas formas isoméricas (*trans* e *cis*), sendo a forma *trans* termodinamicamente mais estável e, por consequência, a configuração predominante (CONSTANTINESCU & LUNGU, 2021).

### 1.1.1 Relevância das chalconas e seus derivados

Por apresentarem esse sistema carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado conjugado por ligações duplas com deslocalização absoluta de elétrons, pode-se observar um potencial redox relativamente baixo e uma maior chance de sofrer reações de transferência de elétrons, o que, possivelmente, favorece suas atividades biológicas já relatadas na literatura (GAONKAR & VIGNESH, 2017).

Mesmo após um século desde sua descoberta, a classe das chalconas continua sendo alvo recorrente para pesquisadores em razão de suas diversas aplicações em síntese orgânica, devido à capacidade de serem compostos projetados como precursores para a

obtenção de diferentes anéis heterocíclicos via reações de ciclização, como exemplificado no Esquema 1 (GAONKAR, 2017).



**Esquema 1.** Anéis heterocíclicos a partir de chalconas.

FONTE: Adaptado de GAONKAR, 2017.

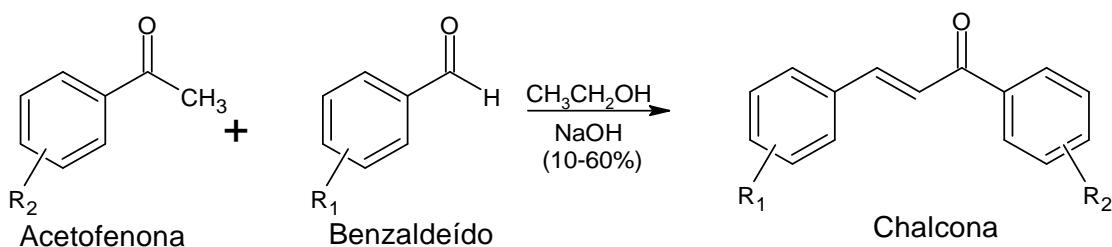
Na área da química medicinal são encontrados diferentes relatos de atividades biológicas referentes às chalconas, como por exemplo: atividade antioxidante (SANTOS e SILVA, 2020), anti-inflamatória (RASHID *et al.*, 2019), antibacteriana (XU *et al.*, 2019), antifúngica (NGUYEN *et al.*, 2021), antitumoral (OYANG *et al.*; SHUKLA *et al.*, 2021), antileishmania (De MELLO, 2018) entre outras. Essa variedade de potenciais atribuições terapêuticas para a classe das chalconas nos permite caracterizá-las como uma classe de compostos privilegiados.

### 1.1.2 Métodos de obtenção de chalconas

Hoje são conhecidas diversas metodologias que podem ser aplicadas para obter chalconas sintéticas, como por exemplo a reação de condensação aldólica, conhecida como reação de Claisen-Schmidt, e a reação entre o ácido fenil borônico com cloreto de cinamoíla, conhecida como reação de Suzuki (GAONKAR & VIGNESH, 2017; JASIM *et al.*, 2021).

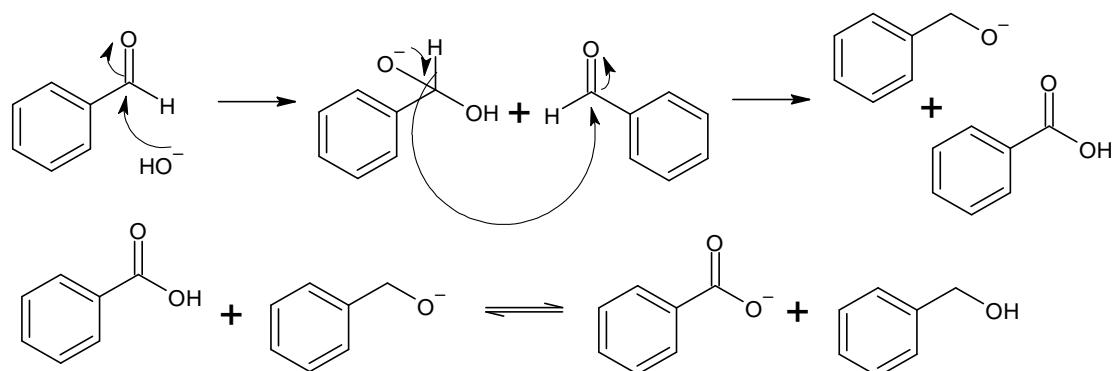
Na síntese via condensação de Claisen-Schmidt, a reação ocorre em quantidades equimolares de acetofenona substituída e, por exemplo, benzaldeído substituído em

etanol, como solvente, na presença de base à concentração entre 10 e 60% como agente de condensação (Esquema 2) (JASIM *et al.*, 2021).



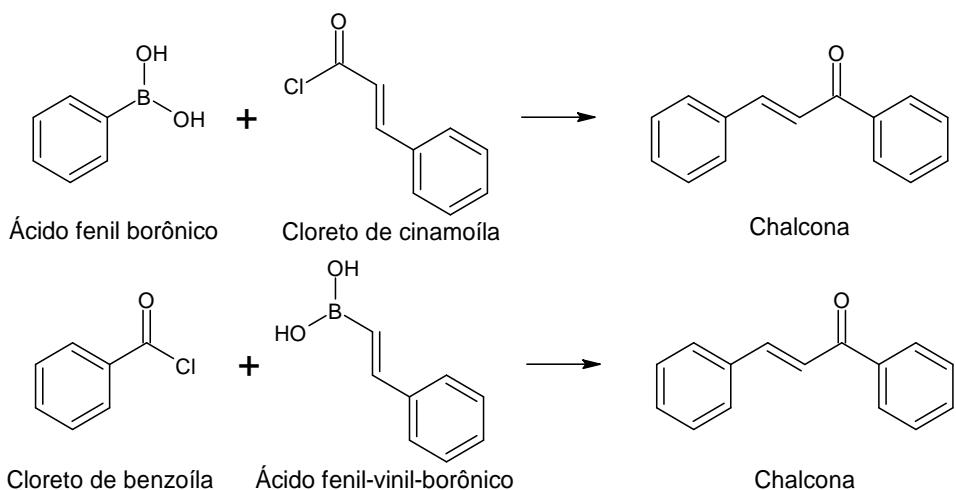
**Esquema 2.** Reação de Claisen-Schmidt: condensação entre benzaldeído e acetofenona.

Dependendo das condições de temperatura e tempo de reação, pode ocorrer desproporcionamento do benzaldeído formando um álcool primário e um ácido carboxílico via mecanismo de reação de Cannizzaro (Esquema 3), fazendo com que haja redução no rendimento dos produtos desejados (GAONKAR & VIGNESH, 2017).



**Esquema 3.** Mecanismo simplificado da reação de Cannizzaro.

No caso da síntese via reação de Suzuki, a condensação ocorre entre o ácido fenil-borônico e o cloreto de cinamoíla, ou entre o cloreto de benzoíla e o ácido fenil-vinil-borônico (Esquema 4) (GAONKAR & VIGNESH, 2017).



**Esquema 4.** Reação de Suzuki: condensação entre ácido fenil-borônico e cloreto de cinamoila ou entre cloreto de benzoila e ácido fenil-vinil-borônico.

É possível encontrar outras rotas de síntese na literatura para se obter os mais variados compostos chalcônicos. Porém, neste trabalho, foram utilizadas apenas reações de condensação aldólica visando produzir as chalconas intermediárias. Outras rotas de síntese serão apresentadas na metodologia para a obtenção dos derivados de interesse, sendo estas substâncias as imino-chalconas e as chalconas-tiosemicarbazonas.

## 1.2 Fungos

Os fungos são organismos eucarióticos heterotróficos que podem ser uni ou pluricelulares com as mais diversas características morfológicas compondo o chamado Reino *Fungi*. Devido às suas funções essenciais para os ecossistemas terrestres e aquáticos, circulando a matéria orgânica e canalizando nutrientes através de níveis tróficos, pode-se dizer que esse reino está entre os organismos mais importantes do mundo (NILSSON *et al.*, 2019).

Capazes de fazer uso de uma ampla variedade de substratos para adquirir carbono orgânico, os fungos apresentam adaptações para diversas condições de vida. Desse modo, são capazes de colonizar diversos habitats e desempenhar funções importantes para os ecossistemas, como por exemplo agentes decompositores. Além disso, apresentam grande importância econômica com aplicações na indústria alimentícia de fermentados, tais como cervejas, vinhos, pães e bolos; fermentação industrial; e aplicações na indústria farmacêutica e biotecnológica (BARRETO *et al.*, 2021).

Por outro lado, há também implicações das colonizações fúngicas como o desenvolvimento de doenças fúngicas que resultam em perdas de nutrientes em frutas e vegetais de um modo geral, sobretudo para sementes e grãos em processo de estocagem. Esse transtorno acaba resultando em fatores de risco para a saúde humana e animal que possivelmente levam a micotoxicoses – síndromes tóxicas causadas por ingestão ou aspiração dessas micotoxinas (DUKARE *et al.*, 2018).

O reconhecimento dos fungos se baseia quase que exclusivamente nas suas morfologias macro e microscópicas. Por habitarem os mais diversos ambientes e substratos, apresentam uma impressionante sucessão de morfologias observáveis macroscópica e microscopicamente, além das características fenotípicas e genotípicas, constituindo o que se conhece hoje como a base sistemática de identificação dessas espécies (MOREIRA *et al.*, 2022).

### **1.2.1 Resistência Antimicrobiana**

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a resistência microbiana ocorre quando bactérias, vírus, fungos e parasitas não respondem mais aos medicamentos, dificultando o tratamento das infecções comuns e aumentando o risco de propagação e agravamento de doenças podendo levar o indivíduo a morte. Muitos fatores aceleraram a ameaça da resistência microbiana em todo o mundo, como por exemplo: o uso indevido, e muitas vezes excessivo, de medicamentos em humanos, pecuária e agricultura; o baixo acesso à água limpa, saneamento e higiene; e as más práticas de diagnóstico, prescrição e continuidade de tratamentos.

Além de possibilitar tratamentos de doenças infecciosas, os medicamentos antibióticos possibilitaram o desenvolvimento de diversos procedimentos médicos modernos, como por exemplo tratamentos para câncer e transplantes de órgãos. Porém, o uso indiscriminado dessas substâncias tem como principal consequência o vertiginoso crescimento de resistências antimicrobianas (RAM), resultando em algumas infecções que hoje se apresentam intratáveis. As ameaças referentes ao aumento de RAM têm impulsionado gradualmente o interesse na descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos (BERMAN & KRYSAN, 2020; HUTCHINGS, TRUMAN & WILKINSON, 2019).

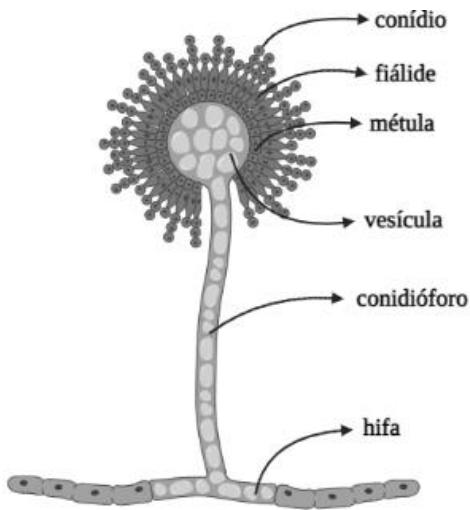
A alta ocorrência de infecções fúngicas oportunistas, seja por espécies leveduriformes ou filamentosas, tem se configurado um desafio para os profissionais da

saúde de diferentes especialidades devido às dificuldades no diagnóstico e nos tratamentos dessas infecções. Somado a isso, essas doenças têm se apresentado como uma das principais causas de incidência e mortalidade em todo o mundo, sendo ainda mais recorrentes em pacientes imunocomprometidos (KUMAR *et al.*, 2022; De ARAÚJO NETO, 2017).

Apesar da existência de diversas classes de agentes antifúngicos disponíveis hoje para tratamentos, tais como os compostos azólicos, a descoberta de novos fármacos ativos em processos infecciosos tem sido de grande relevância, visto que os medicamentos disponíveis hoje manifestam alguma toxicidade ao paciente (KUMAR *et al.*, 2022; GEERSING *et al.*, 2021; NISHIMOTO *et al.*, 2020; De ARAÚJO NETO, 2017). Ao mesmo tempo, vários estudos realizados ao redor do mundo demonstraram casos de resistência a estas e outras classes de medicamentos, indicando um aumento da incidência de espécies fúngicas resistentes e, por consequência, do insucesso terapêutico (KUMAR *et al.*, 2022; LEE *et al.*, 2021; BERMAN & KRYSAN, 2020; REVIE *et al.*, 2018).

### **1.2.2 O gênero *Aspergillus***

O gênero *Aspergillus* consiste no conjunto de mais de 180 espécies de fungos saprofíticos filamentosos encontrados em todo o mundo tanto em ambientes naturais, quanto urbanizados, porém com maior frequência em zonas tropicais e subtropicais (CHACKO & MOSS, 2020; PERRONE & GALLO, 2017). As espécies compreendidas no gênero são aeróbicas sendo normalmente isoladas do solo e das superfícies de substratos orgânicos (PERRONE & GALLO, 2017). Para sobreviver a condições hostis ou simplesmente para reprodução, suas espécies produzem conídios assexuados em hifas com formato de ‘T’ ou ‘L’ denominadas conidióforos que se estendem até 100 µm no ar (Figura 2), facilitando a dispersão de seus esporos e, consequentemente, suas reproduções (BALTUSSEN *et al.*, 2020).



**Figura 2.** Micélio reprodutivo de fungos *Aspergillus*.  
FONTE: criado com BioRender.com.

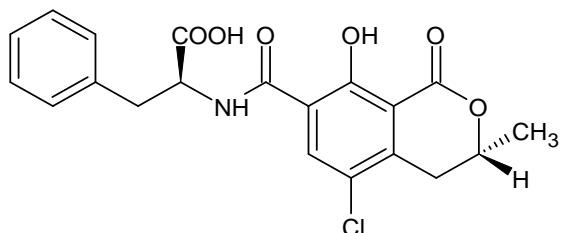
É muito provável que esse seja o gênero fúngico mais reconhecido ao redor do mundo com atividades que trazem problemas à qualidade da produção de grãos e à saúde humana (BARBOSA *et al.*, 2019). Como exemplo, tem-se determinadas cepas de *A. fumigatus* agindo como patógenos para homens e animais através da aspiração de seus esporos e causando aspergiloma pulmonar provocando nódulos, aspergilose pulmonar crônica e bronquite, acometendo principalmente pacientes imunocomprometidos (CHACKO & MOSS, 2020). Além disso, suas espécies se apresentam como perigosos produtores de inúmeras micotoxinas exemplificadas na Tabela 1 (PERRONE & GALLO, 2017).

**Tabela 1.** Micotoxinas de *Aspergillus* presentes em produtos vegetais e espécies produtoras associadas.

MICOTOXINAS	PRODUTOS AGRÍCOLAS	ESPÉCIES*
<b>Aflatoxinas</b>	Amendoim, milho, algodão, especiarias e nozes	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i>
	Castanha do Brasil, amêndoas, figos, pistache	<i>A. minisclerotigens</i> , <i>A. mottae</i> , <i>A. arachidiocola</i> <i>A. transmontanensis</i> , <i>A. sergii</i>
<b>Ocratoxinas</b>	Cereais e grãos	<i>A. westerdijkiae</i> , <i>A. steynii</i>
	Uva e vinho	<i>A. carbonarius</i> , <i>A. welwitschiae</i> , <i>A. niger</i>
	Café e especiarias	<i>A. steynii</i> , <i>A. westerdijkiae</i> , <i>A. ochraceus</i>
	Figos	<i>A. niger</i> , <i>A. carbonarius</i>
<b>Fumonisinas</b>	Uva, uva-passas, figos, cebolas e milho	<i>A. welwitschiae</i> , <i>A. niger</i>

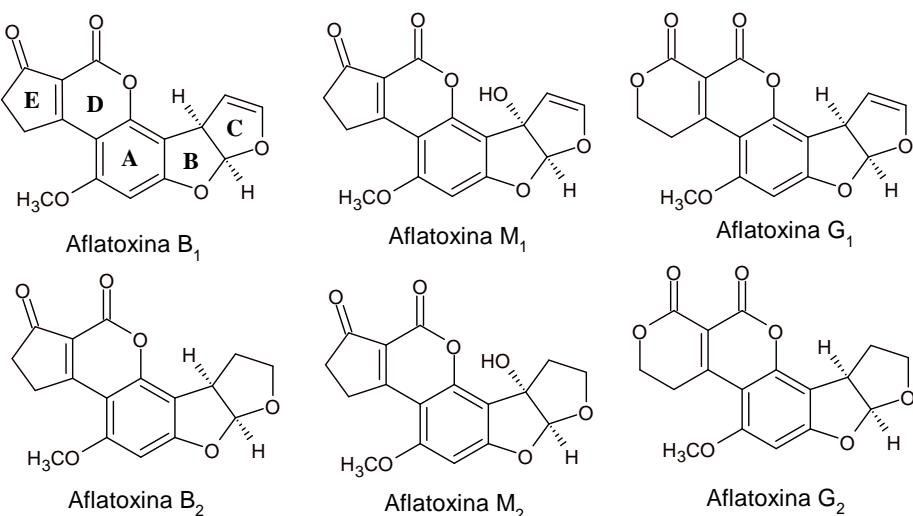
\*As espécies em negrito representam as principais ocorrências nos produtos associados.  
FONTE: Adaptado de PERRONE & GALLO, 2017.

Das espécies produtoras de toxinas isoladas a partir de grãos no Brasil, pode-se destacar espécies capazes de produzir ocratoxina-A (OTA) (Figura 3), tendo como principais produtores *A. ochraceus*, *A. niger* e *A. carbonarius*; e aflatoxinas, com destaque para as espécies *A. flavus*, *A. nomius* e *A. parasiticus* (PERRONE & GALLO, 2017).



**Figura 3.** Estrutura química da ocratoxina A.

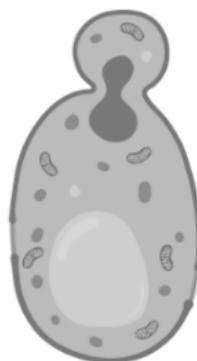
A OTA é uma micotoxina que apresenta grande dificuldade de ser removida de alimentos contaminados devido à sua forte estabilidade térmica, e afeta principalmente os rins dos pacientes imunocomprometidos causando nefropatia, podendo levar a quadros severos de carcinoma de células renais (KAMALI *et al.*, 2017). Já as aflatoxinas (Figura 4) são uma classe de micotoxinas presentes em diversos produtos alimentícios, principalmente em grãos, e que apresentam grande potencial hepatocarcinogênico (YANG & WANG, 2021).



**Figura 4.** Estruturas moleculares das principais aflatoxinas.  
FONTE: Adaptado de YANG & WANG, 2021.

### 1.2.3 O gênero *Candida*

O gênero *Candida* é representado como sendo um grupo de fungos leveduriformes e, sob condições favoráveis, sua proliferação se dá exponencialmente na forma de blastoconídios (MODRZEWSKA & KURNATOWSKI, 2013, apud ROCHA *et al.*, 2021), como representado na Figura 5. Assim como boa parte dos gêneros leveduriformes, são caracterizados pela presença de uma parede celular composta por quitina e membrana citoplasmática fosfolipídica, formada por proteínas com ações enzimáticas e ergosterol (ROCHA *et al.*, 2021).



**Figura 5.** Representação de blastoconídio de espécies do gênero *Candida*.  
FONTE: criado com BioRender.com.

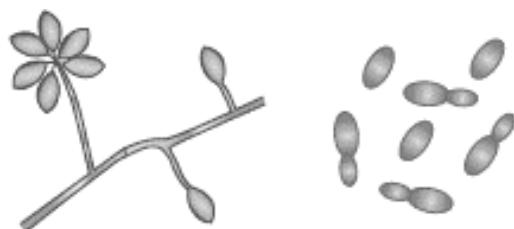
Sendo comumente encontrados na microbiota de mucosas reprodutivas e gastrointestinais de indivíduos saudáveis, este grupo é representado por espécies de microrganismos comensais, se apresentando patogênicos em hospedeiros imunocomprometidos e causando uma série de infecções que nesses casos podem trazer graves riscos às suas vidas. Deste modo, estes microrganismos são considerados patógenos oportunistas e se destacam entre as espécies de microrganismos causadores de infecções como a candidíase, podendo ser superficiais ou invasivas (ROCHA *et al.*, 2021).

A espécie *C. albicans* além de ser prevalente entre as infecções causadas pelo gênero, representa uma das maiores ameaças à saúde humana, tendo taxas de mortalidade por infecção invasiva de 60 a 72% (UTHAYAKUMAR *et al.*, 2021). Além disso, outras espécies de cândida, tais como *C. glabrata*, têm aumentado rapidamente em prevalência e novas espécies como *C. auris* estão surgindo como patógenos multirresistentes a medicamentos antifúngicos, tais como os pertencentes à classe dos azólicos, polienos e equinocandinas (KUMAR *et al.*, 2022; ROCHA *et al.*, 2021).

A consonância das altas taxas de mortalidade causadas por infecções geradas por cândida, limitação de agentes antifúngicos disponíveis para tratamentos e o surgimento de espécies recém-descobertas que são resistentes aos tratamentos expõem a necessidade de se buscar compreender melhor as patogenias causadas por esses microrganismos e seus mecanismos de resistência a medicamentos, para que assim possam ser desenvolvidos novos medicamentos propiciando novos tratamentos.

#### 1.2.4 O gênero *Sporothrix*

Os fungos pertencentes ao gênero *Sporothrix* são caracterizados como dimórficos, sendo que em fase saprofítica, ou quando cultivados a 25 °C, apresentam-se filamentosos com hifas hialinas, septadas, ramificadas e com conídios unicelulares de dois tipos: hialinos e demáceos. No início desta fase, a macroscopia da colônia se apresenta com coloração branca e conforme os conídios escuros vão se formando, assumem colorações que variam do marrom ao preto. Quando em fase parasítica, ou quando as espécies clínicas são cultivadas a 37 °C em meio de cultura ideal, a exemplo da espécie *S. schenckii*, se apresentam como leveduras unicelulares em formatos ovalados e globosas em forma de charuto, podendo apresentar um ou mais brotamentos. Nesta fase, colônias de *S. schenckii* apresentam coloração amarelada em tons de bege e textura cremosa (SIL & ANDRIANOPOULOS, 2015). Na Figura 6 encontram-se as ilustrações de ambas as fases para a espécie *S. schenckii*.

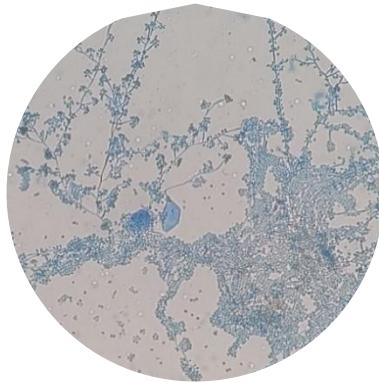


**Figura 6.** Representações das fases saprofítica (esquerda) e parasítica (direita) da espécie *Sporothrix schenckii*.

FONTE: Adaptado de Sil e Andrianopoulos, 2015.

A esporotricose é uma doença fúngica que afeta tanto animais quanto humanos, e quase sempre está localizada na derme e nos tecidos subcutâneos. O processo de infecção mais comum se dá através da inoculação traumática dos conídios de *Sporothrix* ao interagir com tecidos vegetais em decomposição, podendo ser classificada então como

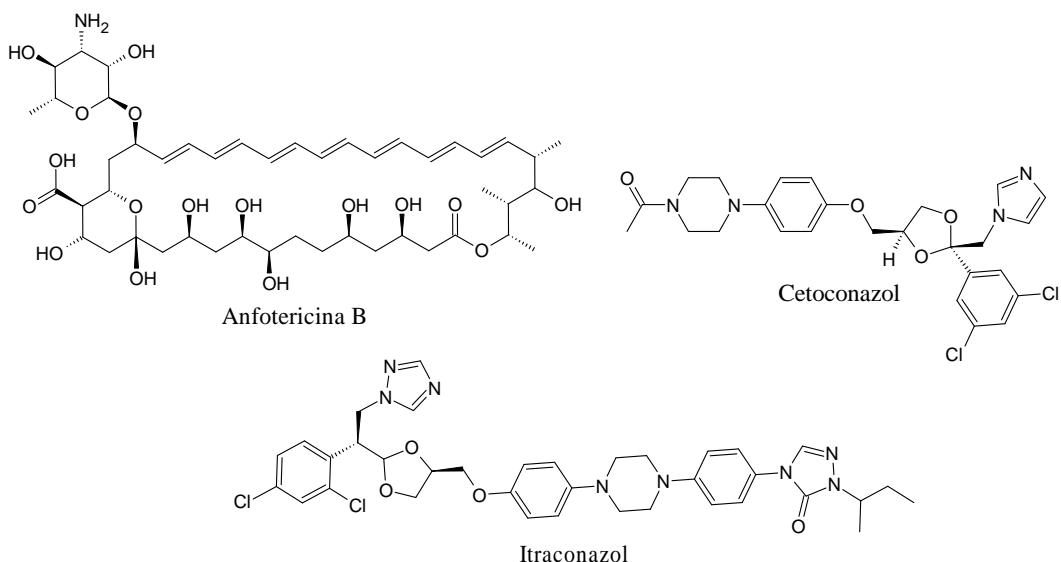
uma sapronose (NAVA-PÉREZ *et al.*, 2022). Os principais agentes etiológicos clínicos das espécies são *S. schenckii*, *S. brasiliensis* (Figura 7), *S. globosa* e *S. luriei* (WALLER *et al.*, 2021). No entanto, surtos epidêmicos de esporotricose em animais domésticos demonstram que o fungo também pode ser transmitido por contato próximo entre animais infectados e seres humanos, podendo então ser classificada como uma zoonose (NAVA-PÉREZ *et al.*, 2022).



**Figura 7.** Fotografia de *Sporothrix brasiliensis* sob ótica de microscópio (400x).  
FONTE: Dr.<sup>a</sup> Águida Aparecida de Oliveira.

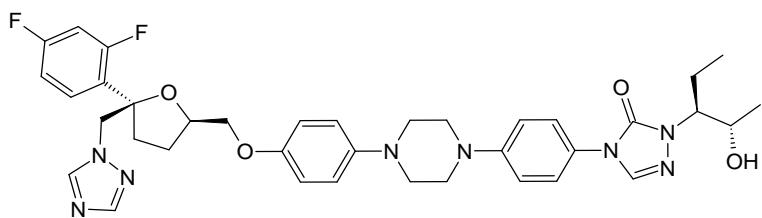
Há alguns anos, tem-se observado um crescimento no número de relatos do aumento de resistência a antifúngicos de espécies do gênero *Sporothrix* (WALLER *et al.*, 2021). Por essa razão, vale ressaltar que os estudos que classificam a suscetibilidade antifúngica das espécies são padronizados por pelo menos duas grandes entidades de pesquisa: o *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI) e o *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST).

Do CLSI, surgem estudos que classificam a suscetibilidade de espécies *S. schenckii* a diversos medicamentos antifúngicos e apontando que as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) iguais ou superiores a  $8 \mu\text{g mL}^{-1}$  já indicam resistência ao tratamento (2021). Desse modo, foi possível caracterizar os valores de corte epidemiológicos (VCEs) se baseando nos dados de CIM de agentes antifúngicos disponíveis em laboratórios pelo mundo, tais como Anfotericina B, Cetoconazol e Itraconazol (Figura 8). Estes valores permitiram identificar as espécies *Sporothrix* com baixa suscetibilidade a agentes antifúngicos devido a mutações adquiridas ou a mecanismos de resistência (WALLER *et al.*, 2021 & ESPINEL-INGROFF *et al.*, 2017).



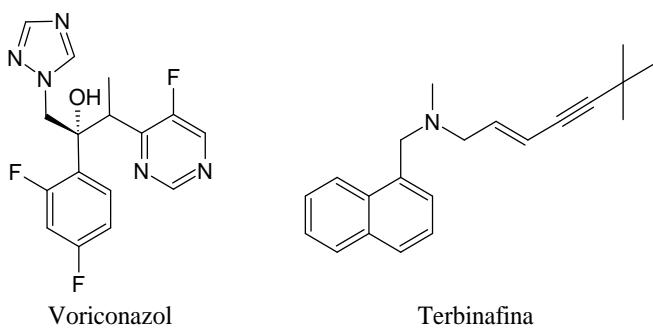
**Figura 8.** Estruturas moleculares dos antifúngicos Anfotericina B, Cetoconazol e Itraconazol.

De acordo com Espinel-Ingroff e colaboradores (2017), *S. schenckii* de todo o mundo, quando tratados com Itraconazol, apresentaram altos valores de  $CIM_{50}$  ( $4,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e  $CIM_{90}$  ( $32,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), bem como com Anfotericina B, onde ambos os valores de  $CIM$  se apresentaram iguais a  $4,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , e Posaconazol ( $CIM_{90} = 8 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). A espécie *S. schenckii* no Brasil apresentou respostas a tratamentos com Anfotericina B com valores de  $CIM_{50}$  em  $8 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $CIM_{90} > 16 \mu\text{g mL}^{-1}$ , e Itraconazol com  $CIM_{90}$  de  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ .



**Figura 9.** Estrutura molecular do antifúngico Posaconazol.

Nos ensaios onde *S. brasiliensis* foram avaliados, foram observados tratamentos eficazes com Voriconazol (Figura 10) ( $CIM_{90} = 64 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e Itraconazol ( $CIM_{90} > 16 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Em contrapartida, isolados selvagens de *S. brasiliensis* puderam ser reconhecidos frente a outros antifúngicos, tais como Cetoconazol, Anfotericina B e Terbinafina (Figura 11) (WALLER *et al.*, 2021).



**Figura 10.** Estruturas moleculares dos antifúngicos Voriconazol (esquerda) e Terbinafina (direita).

Foram encontrados poucos trabalhos utilizando testes de microdiluição em espécies de *Sporothrix*, onde um desses estudos apresentou testes com 91 cepas de *S. schenckii* brasileiras e espanholas, indicando uma variabilidade antifúngica nesta espécie. Este trabalho ainda revelou cepas de *S. schenckii* isoladas que apresentaram resistências aos antifúngicos Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol, Posaconazol e Terbinafina (GUTIERREZ-GALHARDO *et al.*, 2010).

Além disso, o trabalho de Gutierrez-Galhardo e colaboradores (2010) relata o caso de um paciente imunocomprometido diagnosticado com esporotricose cutânea, de onde foi isolada uma cepa de *S. schenckii* que apresentou valores de CIM maiores que 8 µg mL<sup>-1</sup> para Aconitraconazol, Voriconazol, Fluconazol, Isavuconazol e Anidulafungina pelo teste EUCAST; sinalizando sua resistência *in vitro* e, por consequência, a classificando como uma cepa possivelmente não selvagem com mecanismo de resistência adquirido.

No trabalho de SONG e colaboradores (2021), as condições utilizadas para o teste de suscetibilidade *in vitro*, como temperatura de incubação e fase de crescimento, foram intimamente relacionadas à sensibilidade aos agentes antifúngicos de *S. schenckii* *sensu stricto* e *S. brasiliensis*. Os perfis de suscetibilidade *in vitro* neste trabalho demonstraram que, à medida que a temperatura de incubação das microplacas aumentava, os CIMs dos antifúngicos testados contra *S. globosa* diminuíam significativamente, exceto para Anfotericina B e Terbinafina.

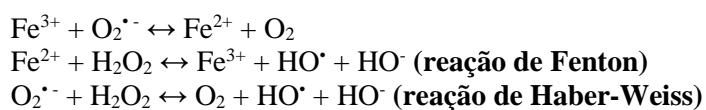
Dessa forma, destaca-se que o surgimento de cepas de *S. schenckii* e *S. brasiliensis* é possivelmente menos propenso a responder à terapia antifúngica com Itraconazol, Anfotericina B, Terbinafina e Voriconazol e, portanto, potencialmente resistentes aos agentes antifúngicos; demonstrando a necessidade de se desenvolver novos antifúngicos e mecanismos de tratamento ou até mesmo de prevenção para suas infecções (SONG *et al.*, 2021; GUTIERREZ-GALHARDO *et al.*, 2010).

### 1.3 Ferro Dependência de Espécies Fúngicas

A capacidade do ferro de receber e ceder elétrons facilmente transitando entre dois estados de oxidação faz com que acabe agindo como um cofator redox ativo conveniente para diversas enzimas e proteínas que necessitam transferir elétrons em processos celulares centrais. Desse modo, o ferro é um micronutriente essencial para praticamente todos os organismos eucarióticos, uma vez que está envolvido em vias vitais como a fosforilação oxidativa, o ciclo do ácido tricarboxílico, desintoxicação por estresse oxidativo, bem como a biossíntese de aminoácidos, nucleotídeos e esteroides e reparo e replicação de DNA (MISSLINGER *et al.*, 2021; MARTÍNEZ-PASTOR & PUIG, 2020).

Apesar de ser um dos elementos mais abundantes na Terra, a biodisponibilidade do ferro é muito baixa em ambientes aeróbicos devido à facilidade de sofrer oxidação na presença de oxigênio atmosférico em complexos de  $\text{Fe}^{+3}$  pouco solúveis. Por esta razão, os organismos possuem diversas formas para aumentar a solubilidade do ferro, tornando-o disponível para ser utilizado em vias bioquímicas (MISSLINGER *et al.*, 2021; MARTÍNEZ-PASTOR & PUIG, 2020).

Por outro lado, as propriedades redox do ferro também acabam tornando-o citotóxico quando encontrado em excesso por causa da sua participação nas reações de Fenton e Haber-Weiss (Esquema 5), levando ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que promovem danos a membranas biológicas, proteínas e ácidos nucleicos. Devido à falta de sistemas de excreção para ferro, os microrganismos desenvolveram fatores regulatórios mais específicos capazes de detectar, absorver, armazenar e utilizar o ferro através de modulações finas (MARTÍNEZ-PASTOR & PUIG, 2020).



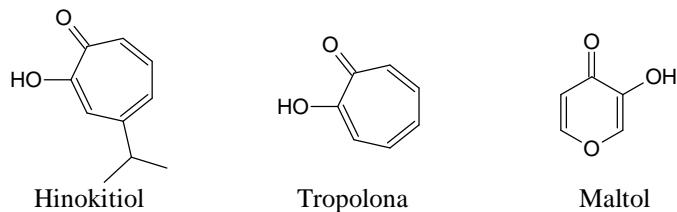
**Esquema 5.** Reações de Fenton e Haber-Weiss.

Desse modo, em processos de infecções fúngicas, o ferro se apresenta como um fator essencial para a sobrevivência, persistência e virulência, sendo a competição entre o patógeno e o hospedeiro por ferro um dos fatores determinantes do curso infeccioso. Como exemplo, tem-se o estudo de cepas mutantes de *A. fumigatus* que não apresentavam sistemas de absorção de ferro de alta afinidade sendo capazes de proliferar na presença de grandes quantidades de íon  $\text{Fe}^{+3}$ , caracterizando assim a presença de um sistema de

absorção de baixa afinidade (SCHRETTL *et al.*, 2004). Além disso, algumas espécies fúngicas, tais como *C. albicans* e *Cryptococcus neoformans*, possuem a capacidade de usar grupos heme como fontes de ferro (HORIANOPOULOS & KRONSTAD, 2019; KORNITZER, 2019), diferentemente do caso de *A. fumigatus* que aparentou não ter um sistema com a mesma capacidade (SCHRETTL *et al.*, 2004).

Logo, pacientes com doenças de sobrecarga de ferro, tal qual a hemocromatose, apresentam elevado risco de infecções da corrente sanguínea por microrganismos e uma forma de tratamento para reduzir essas infecções é através do uso de substâncias com capacidade de quelar o ferro (MARTÍNEZ-PASTOR & PUIG, 2020).

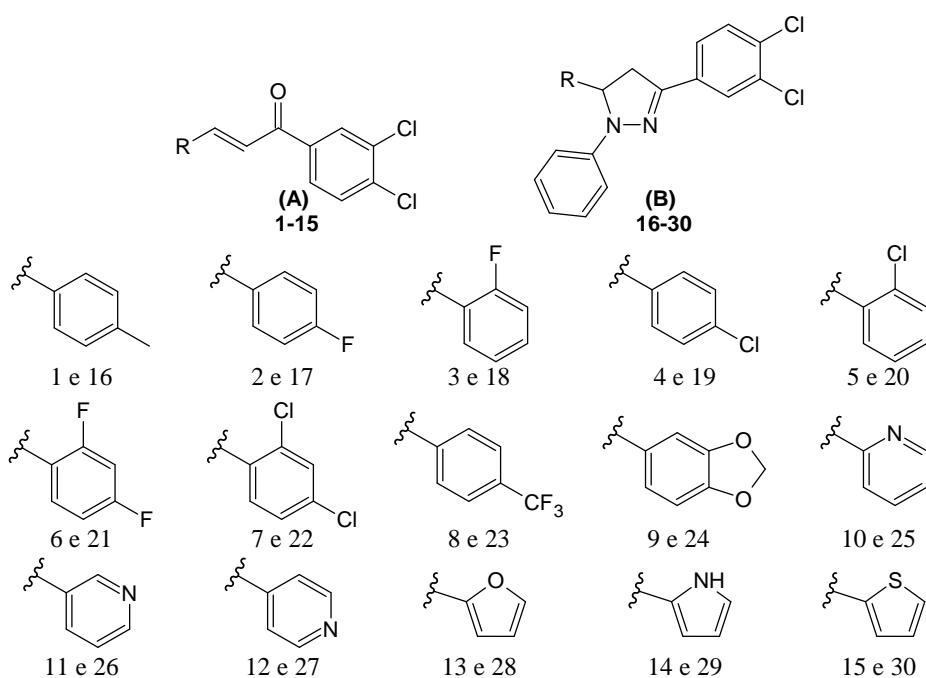
Sobre a capacidade quelante, um estudo recente feito com Hinokitiol, Tropolona e Maltol (Figura 11), cujas interações com o ferro se dão através das suas frações hidroxicetona, exibiram potenciais para o tratamento de infecções fúngicas de forma direta ou até mesmo de forma indireta ao elevar a sensibilidade dos fungos a medicamentos já reconhecidos, como o Fluconazol e a Nistatina (JIN *et al.*, 2021).



**Figura 11.** Estruturas moleculares da Hinokitiol, Tropolona e Maltol.  
FONTE: adaptado de Jin *et al.*, 2021.

#### 1.4 Chalconas e Derivados com Atividades Antifúngicas

O grupamento carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado se apresenta como altamente reativo, fazendo com que as chalconas sejam materiais de partida valiosos para a síntese de diversos compostos com atividades biológicas relevantes; podendo destacar a ação antifúngica, por exemplo, de chalconas e derivados di-hidropirazóis clorados (Figura 12) com atividade contra *C. tropicalis* e *A. niger* (Tabela 2) onde, a partir de análises computacionais, sugerem potencial atividade biológica atribuída aos grupos cloro (SHAIK *et al.*, 2020).



**Figura 12.** (A) chalconas e (B) derivados di-hidropirazóis.  
FONTE: adaptado de Shaik *et al.*, 2020.

**Tabela 2.** Atividades antifúngicas (CIM em  $\mu\text{M}$ ) de chalconas (1-15) e di-hidropirazóis (16-30).

Composto	<i>A. niger</i>	<i>C. tropicalis</i>	Composto	<i>A. niger</i>	<i>C. tropicalis</i>
<b>1</b>	109,9	109,9	<b>16</b>	41,96	41,96
<b>2</b>	54,21	54,21	<b>17</b>	20,76	41,53
<b>3</b>	27,10	54,21	<b>18</b>	20,76	41,53
<b>4</b>	25,67	51,34	<b>19</b>	19,91	39,82
<b>5</b>	25,67	51,34	<b>20</b>	19,91	39,82
<b>6</b>	25,54	51,09	<b>21</b>	19,83	19,83
<b>7</b>	23,11	46,23	<b>22</b>	18,34	36,68
<b>8</b>	11,58	11,58	<b>23</b>	9,18	9,18
<b>9</b>	23,11	180,62	<b>24</b>	19,45	19,45
<b>10</b>	28,87	28,87	<b>25</b>	21,72	21,72
<b>11</b>	28,87	14,43	<b>26</b>	27,72	27,72
<b>12</b>	57,75	112,8	<b>27</b>	21,72	21,72
<b>13</b>	234,97	117,48	<b>28</b>	11,19	11,19
<b>14</b>	60,37	60,37	<b>29</b>	44,91	44,91
<b>15</b>	14,12	19,58	<b>30</b>	5,35	5,35
<b>Fluconazol</b>	26,11	19,58	<b>Fluconazol</b>	26,11	19,58

FONTE: adaptado de SHAIK *et al.*, 2020.

A chalcona 1, monossubstituída com grupo metil na posição *para* (*p*), apresentou a menor atividade antifúngica com CIM de 109,9  $\mu\text{M}$ . Por outro lado, a troca do

substituinte metil por flúor e cloro nas chalconas 2 e 4, respectivamente, resultou em melhorias de duas e quatro vezes nas atividades frente ao fungo filamentoso *A. niger*, e duas vezes frente ao fungo leveduriforme *C. tropicalis*.

A troca do substituinte flúor da posição *para* para a posição *orto* (*o*) resultou em uma atividade duas vezes maior contra *A. niger*, porém sem alterações visíveis frente à *C. tropicalis*. Já o substituinte cloro, quando na posição *orto*, não apresentou mudanças na atividade frente à ambas as cepas.

Por outro lado, quando o grupo metil na posição *p*- foi substituído por um grupo  $\text{CF}_3$ , que é altamente retirador de elétrons, observou-se melhorias nas atividades de duas vezes e cerca de 1,5 vezes contra *A. niger* e *C. tropicalis* (CIM = 11,58  $\mu\text{M}$ ), respectivamente, quando comparados com o tratamento feito com Fluconazol (CIMs respectivos: 26,11 e 19,58  $\mu\text{M}$ ); sugerindo que um grupo altamente retirador de elétrons nesta posição se apresenta mais ativo.

Observando os resultados das chalconas dissubstituídas **6** e **7**, observa-se que entre os substituintes flúor e cloro nas posições *orto* e *para* não houve diferenças significativas nas atividades. No entanto, na série das chalconas bioisostéricas, a substituição de um anel fenila por metileno-dioxi-fenila, caso do composto **9**, houve redução da CIM para 23  $\mu\text{M}$  frente à cepa de *A. niger*, porém baixa atividade frente a *C. tropicalis* com 180  $\mu\text{M}$ . Entre os compostos **10**, **11** e **12**, que são heterociclos com seis membros, o composto **11** representou melhor atividade frente a *C. tropicalis*, com CIM 14,43  $\mu\text{M}$ , indicando que o nitrogênio na posição 3 do anel piridínico apresenta melhor atividade em comparação com os compostos que possuem nitrogênio nas posições 2 e 4.

Dentro do grupo de compostos bioisósteros com grupo pentacíclico – **13**, **14** e **15** – a substituição pelo grupo 2-tienil foi indicada com uma melhor atividade antifúngica para ambas as espécies (CIM = 14,12  $\mu\text{M}$ ). Por outro lado, os seus bioisósteros 2-furfuril e 2-pirrolil apresentaram atividades mais baixas, como mostrado na tabela 2.

De um modo geral, a série de compostos di-hidropirazólicos apresentou resultados melhores (CIM entre 5,35 e 44,91  $\mu\text{M}$ ) do que a série das chalconas (CIM entre 11,58 e 180,62  $\mu\text{M}$ ) frente às duas cepas de fungos (SHAIK *et al.*, 2020).

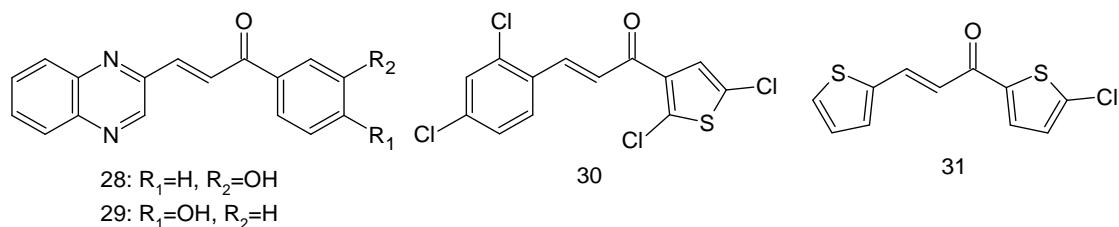
Dentre os compostos **16** a **20** e **23**, a atividade antifúngica apresentou variação de 9,18 a 41,96  $\mu\text{M}$  contra *A. niger* e *C. tropicalis*, respectivamente. A substituição por grupo metil no composto **16** representou a menor atividade entre as séries monossubstituídas, com CIM de 41,96  $\mu\text{M}$ . Em comparação ao composto **16**, a presença do substituinte  $\text{CF}_3$

no composto **23** levou a uma melhora de aproximadamente 4,5 vezes na atividade contra ambas as espécies e a uma melhora de quase três vezes frente ao tratamento de *A. niger* com Fluconazol e de duas vezes frente ao tratamento de *C. tropicalis*, sugerindo novamente que um grupo retirador de elétrons na posição *para* contém atividade beneficiada. Os compostos **17-20** – com substituições flúor e cloro nas posições *ortho* e *para* – tiveram suas atividades antifúngicas muito semelhantes entre si e otimizadas em duas vezes em comparação ao grupo substituinte metil frente a *A. niger* com CIM entre 19,91 e 20,76  $\mu\text{M}$ . Já frente a *C. tropicalis*, ambos os compostos mantiveram um efeito similar ao composto **16**.

A atividade dos compostos dissubstituídos **21** e **22** não apresentou melhoras significativas em comparação com os compostos monossubstituídos **17-20** frente ao fungo filamentoso. Porém, em comparação com os compostos monossubstituídos com flúor (**17** e **18**), o composto dissubstituído **21** foi capaz de dobrar a atividade contra a espécie leveduriforme, sendo representado por um CIM de 19,83  $\mu\text{M}$ .

Os bioisômeros **24-30** apresentaram atividades que variam entre 5,35 e 44,91  $\mu\text{M}$ , sendo o bioisôstero **24** igualmente eficaz contra os fungos quando comparado ao padrão. E do mesmo modo, a substituição do anel piridínico nos compostos **25**, **26** e **27** não promoveu alterações significativas na atividade antifúngica. Por outro lado, entre os compostos heterocíclicos de cinco membros, a melhor atividade apresentada foi do composto substituído com 2-tienil, onde apresentou uma atividade cinco vezes maior em *A. niger* e cerca de quatro vezes maior em *C. tropicalis* em comparação com o tratamento com Fluconazol.

Em trabalho mais recente, os compostos **28**, **29**, **30** e **31** (Figura 13) apresentaram efeitos antimicrobianos, como representado na Tabela 3. O composto **28** não apresentou atividade antifúngica, porém mostrou potencial atividade antibacteriana frente a bactérias gram-positiva (*S. aureus*) e gram-negativa (*E. coli*). O composto **29**, por sua vez, apresentou atividade antibacteriana frente às mesmas cepas, além de atividade antifúngica frente à cepa de *C. albicans*. O composto **30** foi representado por valores de CIM notáveis, sendo melhores do que o grupo controle tratado com Fluconazol frente às cepas de *C. tropicalis* e *A. niger*. Por fim, o composto **31** também pode ser destacado devido às suas potenciais atividades frente a *C. albicans* e *A. niger* (ELKANZI *et al.*, 2022).



**Figura 13.** Compostos **28** e **29**: derivados chalconas monohidroxilados; composto **30**: derivado chalcona e 3-acetiltiofeno diclorado; composto **31**: derivado 3-acetiltiofeno monoclorado (ELKANZI *et al.*, 2022).

**Tabela 3.** Potencial antimicrobiano de derivados chalconas **138**, **139**, **207** e **209** em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Composto	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>A. niger</i>
<b>28</b>	5	5	Sem atividade	-	-
<b>29</b>	10	5	10	-	-
<b>30</b>	-	-	-	4	4
<b>31</b>	-	-	128	-	64
Ciprofloxacina	2	2	-	-	-
Fluconazol	-	-	16	19,58	26,11

FONTE: Dados extraídos de ELKANZI *et al.*, 2022.

Por fim, espera-se com este trabalho identificar as capacidades antifúngicas das chalconas, utilizadas como precursoras, e de seus derivados imino-chalconas e chalconas-tiossemicarbazonas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Sintetizar uma série de chalconas, seus derivados chalconas-tiossemicarbazonas e fenetil-imino-chalconas e avaliar suas atividades antifúngicas.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar uma série de 8 chalconas derivadas de benzaldeídos *para*-substituídos com grupos doadores e retiradores de elétrons;
- Sintetizar os correspondentes derivados chalconas-tiossemicarbazonas a partir das chalconas mais ativas, previamente avaliadas frente aos fungos *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus carbonarius* através dos ensaios de inibição do crescimento radial em placas de Petri;
- Sintetizar os correspondentes derivados fenetil-imino-chalconas a partir das chalconas mais ativas avaliadas frente aos fungos *A. parasiticus* e *A. carbonarius* através dos ensaios de inibição do crescimento radial em placas de Petri;
- Avaliar a atividade antifúngica das chalconas-tiossemicarbazonas e fenetil-imino-chalconas frente aos fungos *A. parasiticus* e *A. carbonarius* através do ensaio de inibição do crescimento radial em placas de Petri;
- Avaliar a concentração mínima inibitória (CIM) através do método colorimétrico de microdiluição dos derivados que apresentarem melhores atividades antifúngicas frente a fungos leveduriformes (*Candida albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. auris*) e dimorfos (*Sporothrix schenckii*, *S. braziliensis* e uma cepa clínica de *S. braziliensis*);
- Avaliar o efeito quelante das substâncias mais ativas frente a íons  $Fe^{2+}$ .

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Equipamentos

##### 3.1.1 Equipamentos utilizados para a síntese e caracterização das chalconas, chalconas-tiossemicarbazonas e imino-chalconas

- Placas de aquecimento e agitação da marca IKA®: RH basic 1 e C-MAG HS 7;
- Aparelho Ponto de Fusão PF 1500 Farma, GEHAKA;
- Balança analítica MARK S 203, classe II, de três casas decimais da marca BEL Engenering;
- Espectrofotômetro da Bruker, modelo VERTEX 70, para os espectros na região do infravermelho;
- Espectrofotômetro de Ressonância Magnética Nuclear da marca Bruker, modelo Avance-400, 500 MHz.

##### 3.1.2 Equipamentos e programas utilizados para os ensaios de avaliação biológica e efeito quelante

- Autoclave;
- Câmara de fluxo laminar vertical PA-115 da marca PACHANE;
- Balança analítica de quatro casas decimais da marca OHAUS;
- Estufas microbiológicas das marcas Heraeus;
- Espectrofotômetro JASCO J-815 CD Spectrometer;
- Software OriginPro 8®, para análise de dados;
- Software MestReNova v6.0.2-5475;
- Plataforma SwissADME, para análises farmacocinéticas teóricas.

#### 3.2 Reagentes

##### 3.2.1 Reagentes e solventes utilizados nas sínteses

Os reagentes e solventes obtidos da Vetec®, Neon®, Sigma-Aldrich® e Merck®: benzaldeído, *p*-flúor-benzaldeído, *p*-cloro-benzaldeído, *p*-bromo-benzaldeído, *p*-metil-benzaldeído, *p*-nitro-benzaldeído, *p*-ciano-benzaldeído, acetofenona, *p*-dimetilamino-

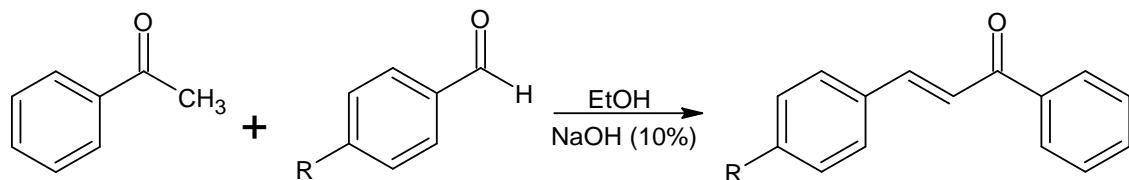
benzaldeído, tiosseemicarbazida, fenetil-amina, hidróxido de sódio, ácido clorídrico, etanol e água destilada.

### 3.2.2 Reagentes e solventes utilizados nos ensaios biológicos

Os reagentes e solventes foram obtidos da Sigma-Aldrich® e Merck®: Anfotericina B, Cetoconazol, Fluconazol, Itraconazol, resazurina, Sabouraud dextrose agar (SAD), RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium*) (SIGMA®) com MOPS (Ácido 3-morfolinopropano 1-sulfônico) (SIGMA® M3183), DMSO, Tween 80, ágar bacteriológico, extrato de malte, glicose, peptona e água destilada.

### 3.3 Síntese das Chalconas Precursoras

Os compostos chalconas foram obtidos a partir de reações de condensação de Claisen-Schmidt em quantidades equimolares de acetofenona e benzaldeídos substituídos, utilizando etanol (EtOH) como solvente e hidróxido de sódio (NaOH) a 10% (m/v) (Esquema 6). Inicialmente, foi realizada a adição da solução de NaOH sobre a acetofenona em banho de gelo e, após 15 minutos, foi adicionado benzaldeído de interesse à temperatura ambiente, com a mistura sob agitação magnética por 60 minutos. Posteriormente, a mistura da reação foi deixada em repouso por 24 h, sendo o produto filtrado e lavado com água gelada. Os produtos foram purificados por recristalização em etanol.



**Esquema 6.** Reação de síntese de chalconas substituídas, sendo R = H, F, Cl, Br, NO<sub>2</sub>, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>N, CN e CH<sub>3</sub>.

Identificação das chalconas sintetizadas:

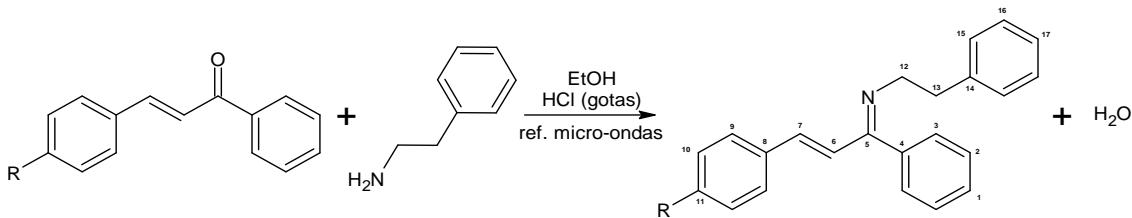
- **(CH-H)** (1E,2E)-3-fenil-1-fenilprop-2-en-1-ona: rendimento: 85%; sólido amorfo branco; ponto de fusão: 53 – 56 °C (lit. 55 – 56 °C, KUMAR *et al.*, 2008). IV v cm<sup>-1</sup> (KCl, v, cm<sup>-1</sup>): 3082 (C-H aromático), 1662 (C=O), 1574 (C=C).

- **(CH-F)** (*1E,2E*)-3-(4-flúor-fenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona: rendimento: 79%; sólido espiculado amarelo-pálido; ponto de fusão: 87,5 – 90,2 °C (lit. 88 – 90 °C, STROBA *et al.*, 2009). IV  $\nu$  cm<sup>-1</sup> (KCl,  $\nu$ , cm<sup>-1</sup>): 3062 (C-H aromático), 1660 (C=O), 1575 (C=C), 1413, 1014 (C-F).
- **(CH-Cl)** (*1E,2E*)-3-(4-cloro-fenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona: rendimento: 94%; sólido espiculado branco; ponto de fusão: 114 – 115 °C (lit. 112 – 113 °C, KUMAR *et al.*, 2008). IV  $\nu$  cm<sup>-1</sup> (KCl,  $\nu$ , cm<sup>-1</sup>): 3062 (C-H aromático), 1656 (C=O), 1594 (C=C), 819, 630 (C-Cl).
- **(CH-Br)** (*1E,2E*)-3-(4-bromo-fenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona: rendimento: 87%; sólido amorfó branco; ponto de fusão: 121 – 123 °C (lit. 124 – 125 °C, STROBA *et al.*, 2009). IV  $\nu$  cm<sup>-1</sup> (KCl,  $\nu$ , cm<sup>-1</sup>): 3055 (C-H aromático), 1662 (C=O), 1579 (C=C), 752, 530 (C-Br).
- **(CH-NO<sub>2</sub>)** (*1E,2E*)-3-(4-nitro-fenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona: rendimento: 93%; sólido amorfó amarelo-pálido; ponto de fusão: 163 – 165 °C (lit. 160 – 161 °C, KUMAR *et al.*, 2008). IV  $\nu$  cm<sup>-1</sup> (KCl,  $\nu$ , cm<sup>-1</sup>): 3076 (C-H aromático), 1656 (C=O), 1593 (C=C), 1512 (C-NO<sub>2</sub>).
- **(CH-NMe<sub>2</sub>)** (*1E,2E*)-3-(4-N,N-dimetil-amino-fenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona: rendimento: 82%; sólido amorfó cobre; ponto de fusão: 112 – 113 °C (lit. 113 – 114 °C, MAHDI *et al.*, 2015). IV  $\nu$  cm<sup>-1</sup> (KCl,  $\nu$ , cm<sup>-1</sup>): 3054 (C-H aromático), 2826 (C-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1647 (C=O), 1597 (C=C).
- **(CH-CN)** (*1E,2E*)-3-(4-ciano-fenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona: rendimento: 96%; sólido amorfó branco; ponto de fusão: 154 – 156 °C (lit. 150 – 153 °C, CHAPHEKAR & SAMANT, 2004). IV  $\nu$  cm<sup>-1</sup> (KCl,  $\nu$ , cm<sup>-1</sup>): 3065 (C-H aromático), 2219 (C-CN), 1658 (C=O), 1600, 1500 (C=C).
- **(CH-Me)** (*1E,2E*)-3-(4-metil-fenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona: rendimento: 83,4%; sólido amorfó branco; ponto de fusão: 90 – 91 °C (lit. 96 – 97,5 °C, KUBOTA *et al.*, 2006). IV  $\nu$  cm<sup>-1</sup> (KCl,  $\nu$ , cm<sup>-1</sup>): 3055 (C-H aromático), 2915 (C-C), 1656 (C=O), 1593, 1567 (C=C).

### 3.4 Síntese das fenetil-imino-chalconas

As fenetil-imino-chalconas, foram preparadas a partir de 2 mmol de cada chalcona em reação com 8 mmol de 2-fenetilamina em meio alcóolico acidificado (gotas de HCl)

sob refluxo em micro-ondas a 78 °C e 100 W em 4 ciclos de 10 minutos (Esquema 7), com acompanhamento da reação por cromatografia em camada delgada com eluente acetato de etila-hexano (1:1).



**Esquema 7.** Reação de síntese de fenetil-imino-chalconas substituídas, sendo R = H, F, Cl e Br.

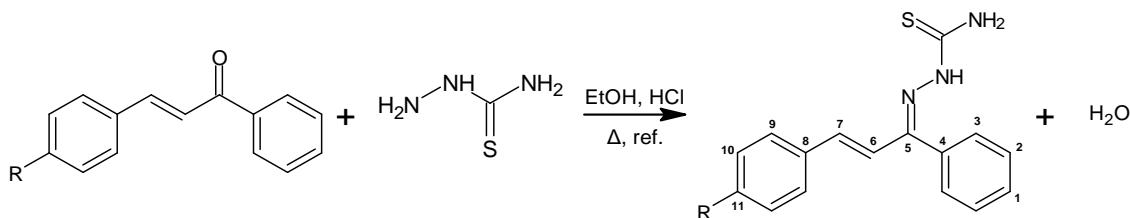
Caracterização das fenetil-imino-chalconas sintetizadas:

- **(FIC-H)** (1Z,2E)-1,3-difenil-N-(2-feniletil)prop-2-en-1-imina: rendimento: 91%; óleo amarelo pálido a temperatura ambiente. IV  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$  (ATR,  $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3025, 2848, 1645, 1600, 1450. RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 8,20 (*m*, 1H, Ar-H), 7,56 (*m*, 1H, CH), 7,23 (*m*, 1H, Ar-H), 6,43 (*d*, 1H,  $J$  = 5 Hz, H-6), 3,56 (*t*, 2H,  $J$  = 8 Hz, H-12), 3,05 (*t*, 2H,  $J$  = 8, H-13). RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 166,7 (C-5), 142,9 (C-4), 141,7 (C-14), 137,9 (C-7), 135,9 (C-8), 125,8 (C-6), 58,8 (C-12) e 36,9 (C-13).
- **(FIC-F)** (1Z,2E)-3-(4-flúor-fenil)-1-fenil-N-(2-fenil-etyl)prop-2-en-1-imina: rendimento: 72%; óleo castanho a temperatura ambiente. IV (ATR,  $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3010, 2877, 1616, 1187. RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 8 (*m*, 1H, Ar-H), 7,52 (*m*, 1H, H-6), 6,68 (*m*, 1H, H-7), 3,82 (*t*, 2H,  $J$  = 8 Hz, H-12), 3,08 (*t*, 2H,  $J$  = 8 Hz, H-13), RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 165,46/159,81 (C-11), 163,24 (C-5), 140,07 (C-4), 138,97 (C-14), 137,04 (C-7), 133,86/133,52 (C-8), 115,98 (C-6), 63,25 (C-12) e 37,70 (C-13) .
- **(FIC-Cl)** (1Z,2E)-3-(4-cloro-fenil)-1-fenil-N-(2-fenil-etyl)prop-2-en-1-imina: rendimento: 93%; óleo castanho escuro a temperatura ambiente. IV (ATR,  $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3027, 2863, 1643, 696. RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 7,67 (*m*, 1H, H-6), 7,15 (*m*, 1H, H-7), 3,88 (*t*, 2H,  $J$  = 8 Hz, H-12), 3,03 (*t*, 2H,  $J$  = 8 Hz, H-13). RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 159,95 (C-5), 139,53 (C-4), 138,00 (C-14), 137,17 (C-7), 136,30 (C-8), 134,38 (C-11), 126,18 (C-6), 62,86 (C-13), 37,17 (C-12).
- **(FIC-Br)** (1Z,2E)-3-(4-bromo-fenil)-1-fenil-N-(2-fenil-etyl)prop-2-en-1-imina: rendimento: 89%; óleo laranja a temperatura ambiente. IV (ATR,  $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3043,

2875, 1612, 695. RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 7,39 (m, 1H, H-6), 6,71 (d, 1H,  $J = 5$  Hz, H-7), 3,65 (t, 2H,  $J = 8$  Hz, H-12), 3,12 (t, 2H,  $J = 8$  Hz, H-13), RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ):  $\delta$  159,97 (C-5); 139,50 (C-4); 135,24 (C-14); 134,80 (C-8); 132,95 (C-7); 125,88 (C-6); 124,69 (C-11); 62,81 (C-12); 37,10 (C-13).

### 3.5 Síntese das chalconas tiosseemicarbazonas

As chalconas tiosseemicarbazonas foram preparadas com 2 mmol da chalcona selecionada e 2,4 mmol de tiosseemicarbazida em etanol com gotas de HCl. As reações ocorreram sob agitação em refluxo a 78 °C por até 6 horas (Esquema 8), sendo a reação monitorada por cromatografia em camada delgada com eluente acetato de etila-hexano na proporção (4:1). Ao final, foi procedida a recristalização, lavagem com etanol a frio e, por fim, filtrado.



**Esquema 8.** Reação de síntese de chalconas-tiosseemicarbazonas substituídas, sendo R = H, F, Cl e Br.

Caracterização das chalconas-tiosseemicarbazonas sintetizadas:

- **(CT-H)** (2Z,2E)-2-[(2E)-1,3-difenilprop-2-en-1-ilideno]hidrazina-1-carbotioamida: rendimento: 82%; sólido amarelado; ponto de fusão: 132 – 134 °C. IV (KBr,  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ ): 3469, 3287, 3187 e 3140 (N-H), 3036 (C-H vinílico e aromático), 1585 (C=N), 1498 e 1444 (C=C aromático), 1128 (C=S), 968 (C=C trans substituída), 755 (C-H aromático, anel monossubstituído). RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ): 8,65 e 8,50 (2H, 2s, NH<sub>2</sub>), 8,16 (1H, s, NH), 7,67-7,60 (3H, m, H-2 e H-1), 7,47-7,46 (2H, d,  $J = 7,0$  Hz, H-3), 7,38-7,29 (5H, m, H-9, H-10 e H-11), 7,20-7,17 (1H, d,  $J = 16,0$  Hz, H-7), 6,45-6,42 (1H, d,  $J = 16,0$  Hz, H-6). RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPTQ (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ): 179,3 (C=S), 148,6 (C=N), 140,1 (C-7), 137,3 (C-4), 136,2 (C-8), 130,2 (C-11), 129,7 (C-3), 129,1 (C-9), 128,7 (C-2), 128,4 (C-10), 127,3 (C-1), 119,2 (C-6).
- **(CT-F)** (2Z,2E)-2-[(2E)-3-(4-flúor-fenil)-1-fenilprop-2-en-1-ilideno]hidrazina-1-carbotioamida: rendimento: 37%; sólido alaranjado; ponto de fusão: 148 – 150,5 °C.

IV (KBr,  $\nu$  cm<sup>-1</sup>): 3413, 3342, 3256 e 3154 (N-H), 3043 (C-H vinílico e aromático), 1598 (C=N), 1476 e 1443 (C=C aromático), 1229 (<sub>Ar</sub>C-F), 1127 (C=S), 967 (C=C *trans* substituída), 828 (C-H aromático, anel 1,4-dissubstituído), 771 (C-H aromático, anel monossubstituído). RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$ ): 8,63 e 8,50 (2H, 2s, NH<sub>2</sub>), 8,12 (1H, s, NH), 7,68-7,62 (3H, m, H-2 e H-1), 7,57-7,53 (2H, dd,  $J$  = 8,8 Hz e <sup>3</sup>J<sub>H-F</sub> = 3,2 Hz, H-10), 7,37-7,34 (2H, dd,  $J$  = 8,1 e 1,5 Hz, H-3), 7,23-7,18 (2H, d,  $J$  = 8,8 Hz, H-9), 7,15-7,11 (1H, d,  $J$  = 16,4 Hz, H-7), 6,48-6,44 (1H, d,  $J$  = 16,4 Hz, H-6). RMN <sup>13</sup>C-DEPTQ (DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$ ): 179,3 (C=S), 164,1 e 162,1 (1C, d, <sup>1</sup>J<sub>C-F</sub> = 248,0 Hz, C-11), 148,4 (C=N), 138,8 (C-7), 137,2 (C-4), 132,9 e 132,9 (1C, d, <sup>4</sup>J<sub>C-F</sub> = 2,5 Hz, C-8), 130,6 e 130,5 (2C, d, <sup>3</sup>J<sub>C-F</sub> = 8,5 Hz, C-9), 129,7 (C-3), 129,5 (C-1), 128,7 (C-2), 119,0 (C-6), 116,1 e 115,9 (2C, d, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub> = 21,5 Hz, C-10).

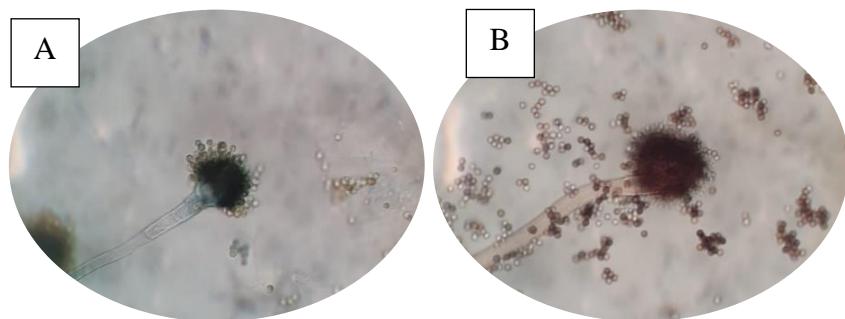
- **(CT-Cl)** (2Z,2E)-2-[(2E)-3-(4-cloro-fenil)-1-fenilprop-2-en-1-ilideno]hidrazina-1-carbotioamida: rendimento: 57%; sólido amarelo pálido; ponto de fusão: 156 – 160 °C. IV (KBr,  $\nu$  cm<sup>-1</sup>): 3413, 3341, 3256 e 3154 (N-H), 3043 (C-H vinílico e aromático), 1598 (C=N), 1476 e 1441 (C=C aromático), 1127 (C=S), 1093 (<sub>Ar</sub>C-Cl), 968 (C=C *trans* substituída), 821 (C-H aromático, anel 1,4-dissubstituído), 780 (C-H aromático, anel monossubstituído). RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$ ): 8,63 e 8,53 (2H, 2s, NH<sub>2</sub>), 8,12 (1H, s, NH), 7,67-7,60 (3H, m, H-2 e H-1), 7,52-7,50 (2H, d,  $J$  = 8,5 Hz, H-9), 7,42-7,41 (2H, d,  $J$  = 8,5 Hz, H-10), 7,37-7,35 (2H, dd,  $J$  = 6,9 e 1,0 Hz, H-3), 7,20-7,16 (1H, d,  $J$  = 16,4 Hz, H-7), 6,47-6,44 (1H, d,  $J$  = 16,4 Hz, H-6). RMN <sup>13</sup>C-DEPTQ (DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$ ): 178,3 (C=S), 150,7 (C=N), 135,5 (C-7), 135,2 (C-4), 133,6 (C-8), 130,6 (C-11), 130,5 (C-1), 130,2 (C-3), 129,6 (C-6), 129,3 (C-9), 129,0 (C-10), 128,7 (C-2).
- **(CT-Br)** (2Z,2E)-2-[(2E)-3-(4-bromo-fenil)-1-fenilprop-2-en-1-ilideno]hidrazina-1-carbotioamida: rendimento 43%; sólido amarelo pálido; ponto de fusão: 165,5 – 168 °C. IV (KBr,  $\nu$  cm<sup>-1</sup>): 3414, 3341, 3256 e 3154 (N-H), 3043 (C-H vinílico e aromático), 1598 (C=N), 1476 e 1441 (C=C aromático), 1127 (C=S), 1072 (<sub>Ar</sub>C-Br), 969 (C=C *trans* substituída), 816 (C-H aromático, anel 1,4-dissubstituído), 779 (C-H aromático, anel monossubstituído). RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$ ): 8,65 e 8,54 (2H, 2s, NH<sub>2</sub>), 8,15 (1H, s, NH), 7,68-7,62 (3H, m, H-2 e H-1), 7,57-7,55 (2H, d,  $J$  = 8,5 Hz, H-9), 7,46-7,44 (2H, d,  $J$  = 8,5 Hz, H-10), 7,37-7,35 (2H, dd,  $J$  = 7,0 e 1,5 Hz, H-3), 7,22-7,18 (1H, d,  $J$  = 16,5 Hz, H-7), 6,46-6,41 (1H, d,  $J$  = 16,5 Hz, H-6). RMN <sup>13</sup>C-DEPTQ (DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$ ): 178,3 (C=S), 150,7 (C=N), 135,5 (C-7), 135,5 (C-4), 132,3

(C-10), 130,6 (C-8), 130,5 (C-1), 130,2 (C-3), 129,6 (C-6), 129,3 (C-9), 128,7 (C-2), 122,3 (C-11).

### 3.6 Avaliação da Atividade Antifúngica das Chalconas e seus Derivados

#### 3.6.1 Inibição *in vitro* do crescimento radial de fungos do gênero *Aspergillus*

Nestes experimentos foram investigadas as possíveis atividades antifúngicas dos produtos frente às cepas de *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 (Figura 14A) e *Aspergillus carbonarius* RC 2054 (Figura 14B); como também, a observação das suas morfologias macroscópicas (MARIATH *et al.*, 2016).



**Figura 14.** Visão de *Aspergillus parasiticus* (A) e *Aspergillus carbonarius* (B) sob a ótica de microscópio (400x).

Os experimentos foram feitos em triplicatas, utilizando placas de Petri de poliestireno, nas dimensões 90 x 15 mm. E o meio de cultura usado para o crescimento do microrganismo, ágar extrato de malte (MEA), foi preparado utilizando-se 20,0 g de extrato de malte, 20,0 g de glicose, 20,0 g de ágar bacteriológico, 1,0 g de peptona em 1,0 L de água destilada. Este meio, depois de fundido em micro-ondas, foi separado para tubos de ensaio em frações de 20,0 mL e, em seguida, autoclavados.

Após esterilização do meio de cultura, foi prosseguida a homogeneização com as alíquotas dos compostos auxiliado de vórtex de acordo com as concentrações finais em placas a  $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Em seguida, as soluções de meio de cultura foram vertidas para as placas, assim como os meios de cultura de controle negativo.

As culturas dos fungos que já se encontravam desenvolvidas em placas num período entre cinco e sete dias, foram utilizadas para compor soluções ágar-água 0,2%

em água destilada para serem retirados inóculos; que em seguida foram inseridos por meio de uma picada central em cada uma das placas preparadas, que, por fim, foram vedadas com Parafilm®. A observação do crescimento do halo foi feita diariamente durante 7 dias consecutivos para as cepas de *A. parasiticus* e 9 dias para as cepas de *A. carbonarius*, a contar do dia de inoculação dos fungos. Os tempos desses ensaios depende do tempo de crescimento que cada cepa fúngica apresenta até atingir um halo máximo na placa de Petri, tendo a cepa de *A. parasiticus* um crescimento mais acelerado que a cepa de *A. carbonarius*.

### 3.6.2 Ensaio de microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Os ensaios foram realizados com o objetivo de determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de fármacos utilizados como controles positivos e os derivados das chalconas frente a espécies microbiológicas dos gêneros *Candida* e *Sporothrix*.

#### 3.6.2.1 Gênero *Candida*

O bioensaio para determinar a concentração mínima inibitória dos derivados selecionados foi realizado de acordo com a norma M27-A2 do CLSI (2002) em microplacas de 96 poços com fundo plano, incubadas a 35 °C, nas quais cada coluna da placa representa o tratamento de um composto derivado da chalcona.

Os microrganismos do gênero *Candida*, seus códigos de origem, assim como os agentes antifúngicos de referência utilizados para cada cepa, são descritos na Tabela 4. Os fungos foram manipulados seguindo as normas de biossegurança vigentes para microrganismos da classe de risco 2.

**Tabela 4.** Espécies leveduriformes e seus códigos.

Leveduras	Códigos	Antifúngicos de referência
<i>C. albicans</i>	ATCC 89	Anfotericina B, Cetoconazol e Itraconazol
<i>C. krusei</i>	ATCC 6258	Anfotericina B, Cetoconazol e Itraconazol
<i>C. tropicalis</i>	CFP 304	Anfotericina B, Cetoconazol e Itraconazol
<i>C. auris</i>	CDC B 11903	Fluconazol

A reativação das culturas se deu a partir das soluções de pré-inóculos, que foram obtidas coletando colônias das cepas identificadas de placas de Petri Sabouraud-dextrose 2% ágar (SDA) após incubação por 24 horas a 35 °C.

Para a preparação dos inóculos, as colônias foram transferidas para tubos contendo 5 mL de solução salina a 0,85%. Desta solução, foram transferidos 1 mL para tubos contendo 1 mL de formol a 10%. As absorbâncias destas soluções foram obtidas em espectrofotômetro com comprimento de onda em 530 nm, cujo valor ideal de densidade ótica a ser encontrada esteja na faixa de 0,12 a 0,15, correspondendo à faixa de 1,0 a 5,0  $\times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>. Por fim, foram realizadas diluições 1:50 (1 mL da suspensão a 10<sup>6</sup> em 49 mL de solução RPMI-1640) seguida de uma diluição 1:20 (1 mL da suspensão 1:50 em 19 mL de RPMI), resultando numa concentração de 1,0 – 5,0  $\times 10^3$  UFC mL<sup>-1</sup>.

Os compostos foram solubilizados a 1,0 mg mL<sup>-1</sup> em solução 1:1:8 de DMSO-Tween 80-meio RPMI 1640 tamponado com MOPS e a solução formada adicionada aos poços. As soluções-estoque a 1600  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> dos antifúngicos Anfotericina B, Cetoconazol e Itraconazol e a solução-estoque a 3200  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> do antifúngico Fluconazol, utilizados como grupos controle positivos, foram homogeneizados com o meio de cultura RPMI 1640, onde as soluções-padrão para o teste se encontraram nas concentrações de 64  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> e 512  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>.

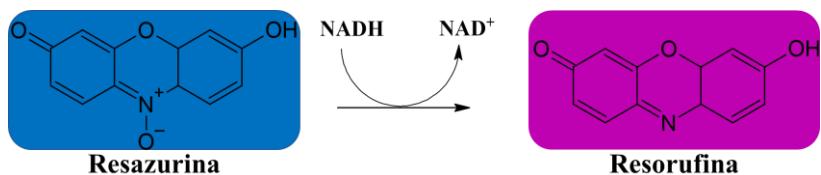
O preparo das microplacas se iniciou com a aplicação de 100  $\mu$ L de RPMI em todos os poços das colunas de 1 a 11. Com o auxílio de micropipeta, foram aplicados e homogeneizados 100  $\mu$ L das soluções estoque dos compostos de interesse nos poços A. Em seguida, para diluição seriada dos compostos, foram transferidos 100  $\mu$ L dos poços A para os poços B e assim sucessivamente até os poços H, onde os 100  $\mu$ L restantes retirados foram descartados, mantendo os volumes finais de cada poço com tratamento iguais a 100  $\mu$ L.

Para os fungos *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, as colunas 9, 10 e 11 receberam os fármacos antifúngicos Anfotericina B, Itraconazol e Cetoconazol, respectivamente. Para *C. auris*, apenas o agente antifúngico Fluconazol foi utilizado, sendo aplicado na coluna 11. Para todas as placas, os poços da coluna 12 foram utilizados como grupos controle para crescimento das leveduras sem tratamento (poços A-C), esterilidade do meio de cultura (D-F) e DMSO + Tween 80 na proporção 1:1 (G e H).

Ao final desse procedimento, foram adicionados 100  $\mu$ L das culturas leveduriformes em cada poço, com exceção para os poços A-C da coluna 12, totalizando o volume final igual a 200  $\mu$ L, representando então a segunda etapa das duas diluições seriadas.

Foram realizadas triplicatas de cada uma das soluções testadas e verificado o resultado em 48 horas após incubação em estufa a temperatura de 35 °C. Decorridas as 48 horas de tratamento, foram adicionados 20 µL de solução resazurina a 0,01 mg mL<sup>-1</sup> em todos os poços, sendo incubadas por mais 2 horas.

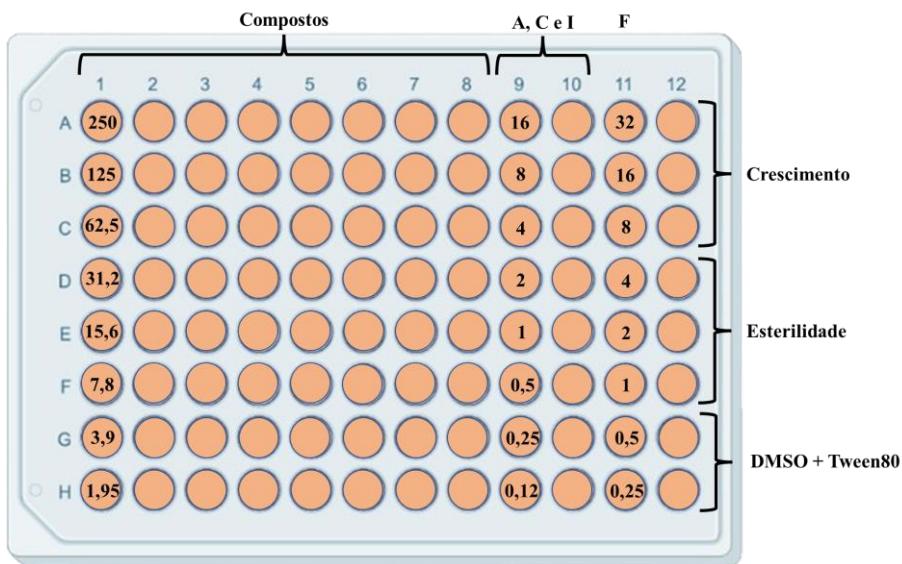
O crescimento leveduriforme foi caracterizado pela presença da coloração rosa avermelhada, que ocorre pela metabolização das moléculas de resazurina sendo convertidas a resorufina (Esquema 9).



**Esquema 9.** Reação de redução de resazurina a resorufina.

Caso após a adição do revelador, a coloração da solução no poço permanecer inalterada (azul), se tem a indicação de que o crescimento microbiano foi inibido pela concentração específica da amostra. Sendo assim, a CIM é determinada como a concentração mínima em que o crescimento microbiano foi inibido, ou seja, não houve troca de coloração (LIU *et al.*, 2007).

A Figura 15 apresenta o esquema organizacional de microplacas usado com os respectivos valores de concentrações finais para os compostos de interesse e para os tratamentos com os controles positivos.



**Figura 15.** Organização de microplacas para ensaios de determinação de CIM e suas concentrações em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Poços controle de esterilidade – 200  $\mu\text{L}$  de cultura RPMI com MOPS; poços controle de crescimento – 100  $\mu\text{L}$  meio de cultura RPMI com MOPS + 100  $\mu\text{L}$  de solução leveduriforme; poços controle DMSO + Tween 80 - 100  $\mu\text{L}$  de solução DMSO + Tween 80 1:1 + 100  $\mu\text{L}$  de solução leveduriforme. Legenda dos antifúngicos usados como controles positivos: A – Anfotericina B; I – Itraconazol; C – Cetoconazol; F – Fluconazol.

### 3.6.2.2 Gênero *Sporothrix*

O procedimento para determinar o CIM em cepas de *Sporothrix* também foi realizado segundo a norma M60-S1 (2017) do CLSI, porém, diferente dos ensaios com as cepas do gênero *Candida*, em microplacas de 96 poços de fundo em “U” incubadas a 37 °C; onde em cada linha foi realizado tratamento com um dos compostos derivados de chalconas.

Os microrganismos do gênero *Sporothrix* e seus códigos de origem são descritos na Tabela 5. Os fungos foram manipulados seguindo as normas de biossegurança vigentes para microrganismos da classe de risco 2.

**Tabela 5.** Espécies fúngicas e seus códigos.

Fungos	Códigos
<i>S. schenckii</i>	INCQS 40286
<i>S. brasiliensis</i>	INCQS 40360
<i>Sporothrix spp.</i> (cepa clínica)	SisGen ADE44FF

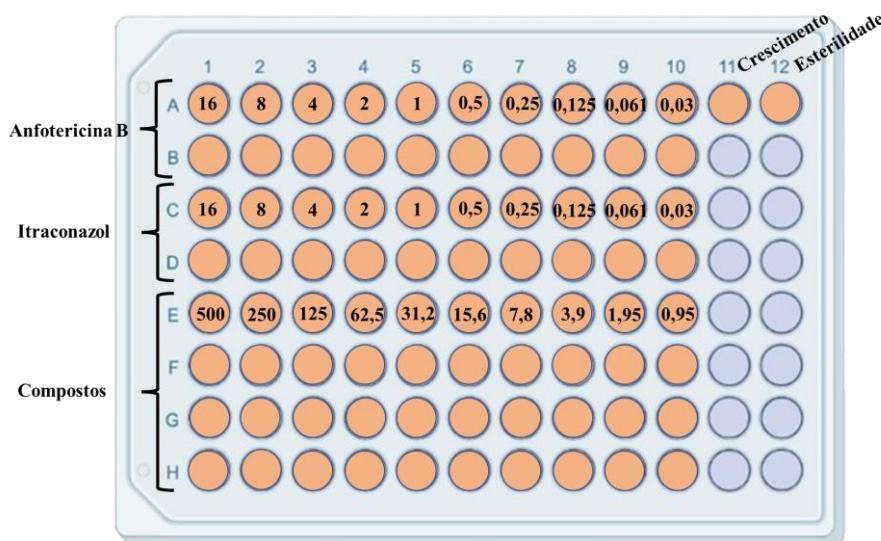
As soluções dos produtos foram feitas a partir de soluções estoques de 10  $\text{mg mL}^{-1}$  preparadas em DMSO e Tween 80 na proporção 1:1, onde as alíquotas retiradas foram homogeneizadas em meio de cultura RPMI a uma concentração final de 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . O Itraconazol e Anfotericina B, fármacos antifúngicos utilizados como controles positivos

em todas as cepas, foram igualmente homogeneizados diretamente em meio de cultura a concentrações de  $32 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Nas linhas A e B, foi adicionado o agente antifúngico Anfotericina B, e nas linhas C e D, o agente antifúngico Itraconazol em esquemas de diluição seriada. Nas linhas subsequentes, os produtos foram testados, executando o mesmo procedimento realizado com os antifúngicos em esquema de duplicatas. Por fim, em cada um dos poços foram adicionados  $100 \mu\text{L}$  de inóculo do microrganismo.

O poço A da coluna 11 foi utilizado como controle de crescimento, adicionando  $100 \mu\text{L}$  do inóculo a  $100 \mu\text{L}$  do meio de cultura, e o poço A da coluna 12 como controle de esterilidade do meio de cultura, adicionando-se apenas  $100 \mu\text{L}$  do meio de cultura RPMI-1640 com 2% de glicose e  $100 \mu\text{L}$  de água estéril. A suspensão contendo a cepa clínica teve a densidade ajustada até obter turbidez equivalente ao de uma solução padrão de sulfato de bário McFarland 0,5 (0,5 mL de  $\text{BaCl}_2$  0,048 M, 99,5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,18 M), correspondente a aproximadamente  $10^6$  a  $10^7$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ .

Foram realizadas triplicatas de cada uma das soluções testadas e verificado o resultado em 48 h após incubação em estufa a temperatura de  $37^\circ\text{C}$ . A Figura 16 ilustra o esquema das placas para avaliação do MIC frente às cepas de *Sporothrix spp*.

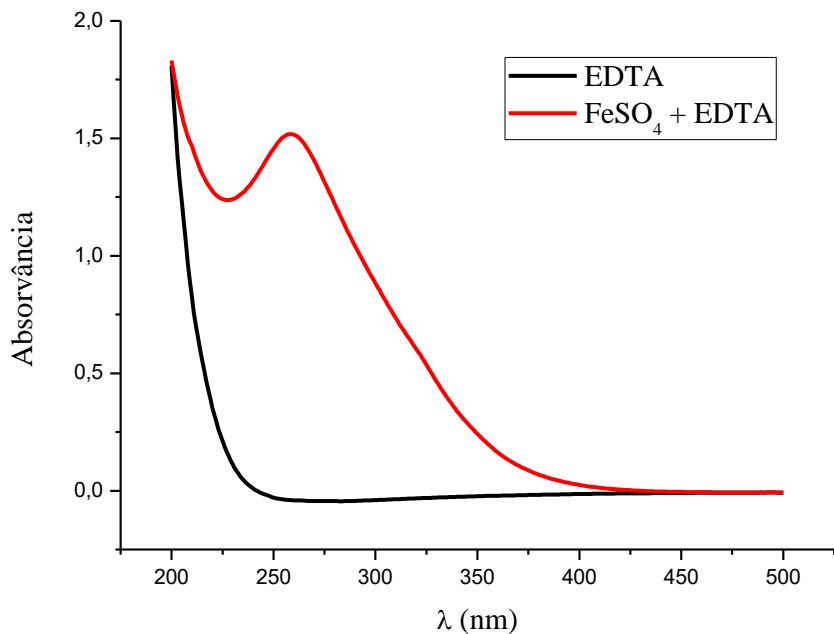


**Figura 16.** Organização de microplacas para ensaios de determinação de CIM e suas concentrações em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Poços controle de esterilidade –  $100 \mu\text{L}$  de cultura RPMI e  $100 \mu\text{L}$  de água estéril; poços controle de crescimento –  $100 \mu\text{L}$  meio de cultura RPMI +  $100 \mu\text{L}$  de solução leveduriforme.

### 3.7 Avaliação da Atividade Quelante dos Derivados Mais Ativos

A análise foi realizada por espectrofotometria com o auxílio de cubeta de quartzo de 1,5 mL e para obtenção dos espectros foram utilizadas soluções estoque dos produtos com melhores resultados avaliados nos ensaios de atividades antifúngicas: **CT-H** ( $9,95 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>), **CT-F** ( $10,02 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>), **CT-Cl** ( $9,99 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>), **CT-Br** ( $1,013 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup>) e **FIC-Cl** ( $9,97 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>) em DMSO como solvente. Utilizou-se também as soluções aquosas de FeSO<sub>4</sub> ( $1,60 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>) e de EDTA ( $1,60 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>) como padrão de efeito quelante com o ferro, uma vez que o EDTA complexa de forma equimolar com íons Fe (II).

A sobreposição dos espectros de UV/Vis obtidos foi realizada utilizando o programa Origin 8.0. A Figura 17 ilustra o gráfico da curva padrão (FeSO<sub>4</sub> + EDTA, 1:1) obtida neste experimento.



**Figura 17.** Espectro UV/Vis de EDTA ( $1,60 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>) e com FeSO<sub>4</sub> + EDTA ( $1,60 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>).

As capacidades quelantes das amostras frente a íons Fe (II) foram calculadas usando a equação a seguir expressa em porcentagem (PAIVA, 2015):

$$Efeito\ quelante\ (%) = - \left[ 1 - \frac{A_{amostra}}{A_{controle}} \right] * 100\%$$

onde, A<sub>amostra</sub>: absorvância da amostra; A<sub>controle</sub>: absorvância do controle.

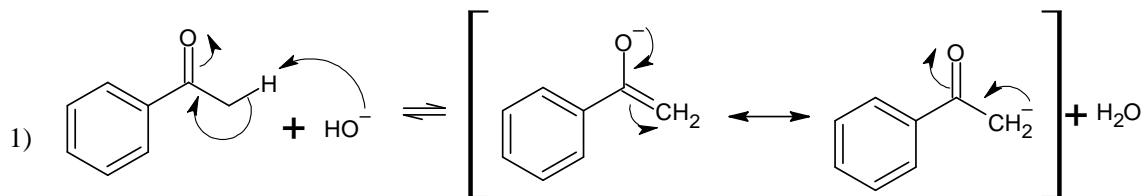
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

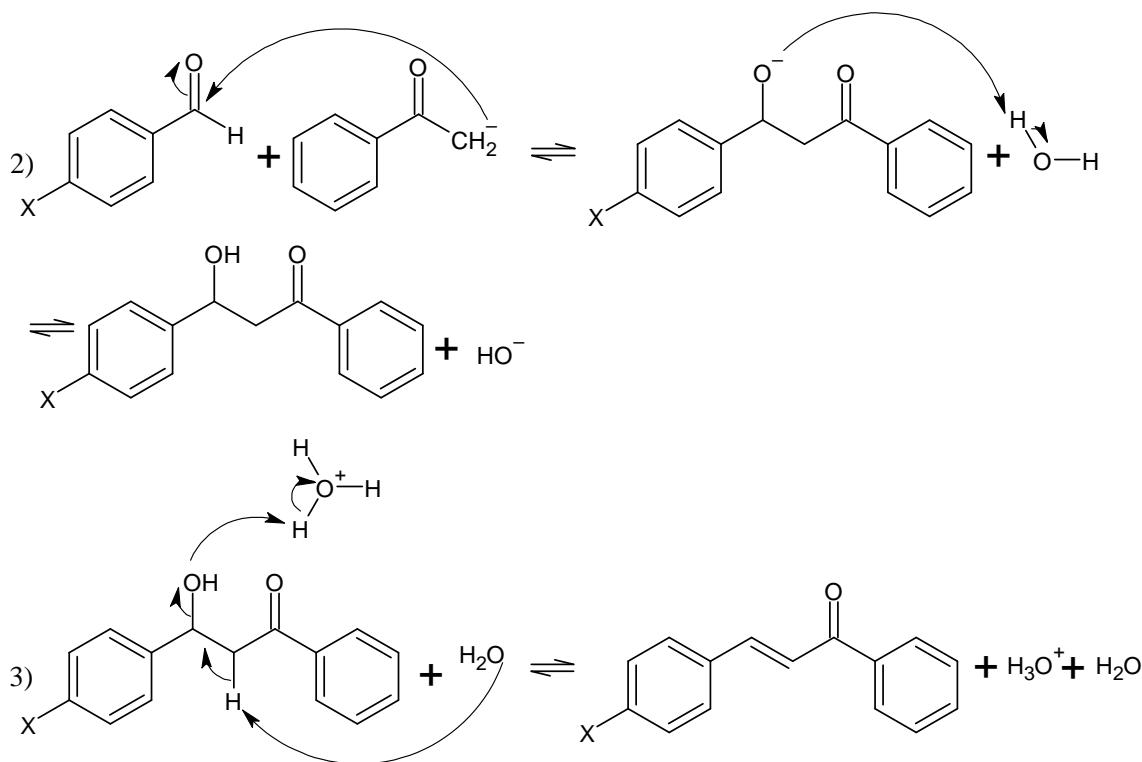
### 4.1 Síntese das chalconas

Oito chalconas foram sintetizadas e posteriormente utilizadas na preparação das fenetil-imino-chalconas e das chalconas-tiossemicarbazonas. A síntese das chalconas foi feita através da reação de condensação aldólica cruzada (Claisen-Schmidt), em meio básico, entre a acetofenona e benzaldeídos *para*-substituídos com grupos retiradores e doadores de elétrons.

Na primeira etapa, a acetofenona foi desprotonada em solução alcoólica básica à frio por cerca de 15 minutos sob agitação. Decorrido esse tempo, o benzaldeído foi adicionado ao meio reacional em temperatura ambiente, mantendo a agitação por, pelo menos, mais uma hora. Ao término deste período, a solução foi levada à geladeira para repouso por 24 horas. A terceira etapa consistiu em uma desidratação do produto de condensação a partir da neutralização com solução de ácido clorídrico 10% (v/v), e o sólido formado filtrado sob pressão reduzida em funil de Büchner (LAWRENCE *et al.*, 2001; SOARES *et al.*, 1988). Por fim, procedeu-se a recristalização do produto em etanol e, posteriormente, feita nova filtração para recolher a chalcona purificada após secagem.

O mecanismo resumido sugerido para a síntese das chalconas se inicia com a abstração de um próton da metila da acetofenona, provocada pela base (NaOH), formando o íon enolato (carbânion) estabilizado por ressonância (Esquema 10.1). Este carbânion ataca o grupo carbonila do benzaldeído substituído, formando uma ligação C-C (Esquema 10.2). Na última etapa, ocorre a abstração do hidrogênio  $\alpha$  à carbonila, acompanhada da saída de uma molécula de água, promovendo a formação do derivado  $\alpha,\beta$ -insaturado – chalcona (Esquema 10.3) (SANTOS, 2008).





**Esquema 10.** Mecanismo resumido proposto para obtenção de chalconas substituídas.  
FONTE: Adaptado de SANTOS, 2008.

Para organização e simplificação das explicações, na Tabela 6 são apresentadas as nomenclaturas IUPAC dos compostos chalconas, seus grupos substituintes e seus códigos, respectivamente.

**Tabela 6.** Códigos dos compostos chalconas.

Nomenclatura IUPAC do composto	Substituinte	Código
(1E,2E)-3-fenil-1-fenilprop-2-en-1-ona	H	CH-H
(1E,2E)-3-(4-flúor-fenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona	F	CH-F
(1E,2E)-3-(4-cloro-fenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona	Cl	CH-Cl
(1E,2E)-3-(4-bromo-fenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona	Br	CH-Br
(1E,2E)-3-(4-ciano-fenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona	CN	CH-CN
(1E,2E)-3-(4-metil-fenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona	CH <sub>3</sub>	CH-Me
(1E,2E)-3-(4-nitro-fenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona	NO <sub>2</sub>	CH-NO <sub>2</sub>
(1E,2E)-3-(4-dimetilamino-fenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CH-NMe <sub>2</sub>

Por ser uma classe de compostos bem conhecida e recorrentemente utilizada em artigos de química medicinal, as caracterizações das chalconas precursoras foram realizadas por comparação com as informações encontradas na literatura, utilizando a técnica de infravermelho e seus respectivos pontos de fusão experimentais. Na Tabela 7 encontram-se os valores de rendimento, pontos de fusão experimentais e pontos de fusão relatados na literatura.

**Tabela 7.** Rendimentos e pontos de fusão experimentais e encontrados na literatura para as chalconas sintetizadas.

Composto	Rendimento (%)	P.F. experimental (°C)	P.F. literatura (°C)
<b>CH-H</b>	85	53 – 56	55 – 56 <sup>a</sup>
<b>CH-F</b>	79	87,5 – 90,2	88 – 90 <sup>b</sup>
<b>CH-Cl</b>	94	114 – 115	112 – 113 <sup>a</sup>
<b>CH-Br</b>	87	121 – 123	124 – 125 <sup>b</sup>
<b>CH-NO<sub>2</sub></b>	93	163 – 165	160 – 161 <sup>a</sup>
<b>CH-NMe<sub>2</sub></b>	82	112 – 113	111 – 113 <sup>c</sup>
<b>CH-CN</b>	96	154 – 156	150 – 153 <sup>d</sup>
<b>CH-Me</b>	83	90 – 91	96 – 97,5 <sup>e</sup>

<sup>a</sup>KUMAR *et al.*, 2008; <sup>b</sup>STROBA *et al.*, 2009; <sup>c</sup>MAHDI *et al.*, 2015; <sup>d</sup>CHAPHEKAR & SAMANT, 2004; <sup>e</sup>KUBOTA *et al.*, 2006.

Os espectros de infravermelho das chalconas apresentaram bandas de absorção características dos modos vibracionais esperados, conforme os espectros localizados nos anexos e cujas principais absorções estão resumidas na Tabela 8.

**Tabela 8.** Principais bandas de absorção (cm<sup>-1</sup>) observadas nos espectros de infravermelho das chalconas sintetizadas.

Composto	X	νC-H aromático	νC=C	νC=O	νC-X
<b>CH-H</b>	H	3082,32	1573,73	1662,45	-
<b>CH-F</b>	F	3062,01	1575,66	1660,52	1014 – 1413
<b>CH-Cl</b>	Cl	3062,01	1594,95	1656,66	630 – 819
<b>CH-Br</b>	Br	3055,24	1579,52	1662,45	530 – 752
<b>CH-NO<sub>2</sub></b>	NO <sub>2</sub>	3076,10	1593,02	1656,66	1512,02
<b>CH-NMe<sub>2</sub></b>	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	3053,91	1596,87	1647,02	2826,36
<b>CH-CN</b>	CN	3065,02	1500 – 1600	1658,59	2219,81
<b>CH-Me</b>	CH <sub>3</sub>	3055,24	1567 – 1593	1656,66	2915,33

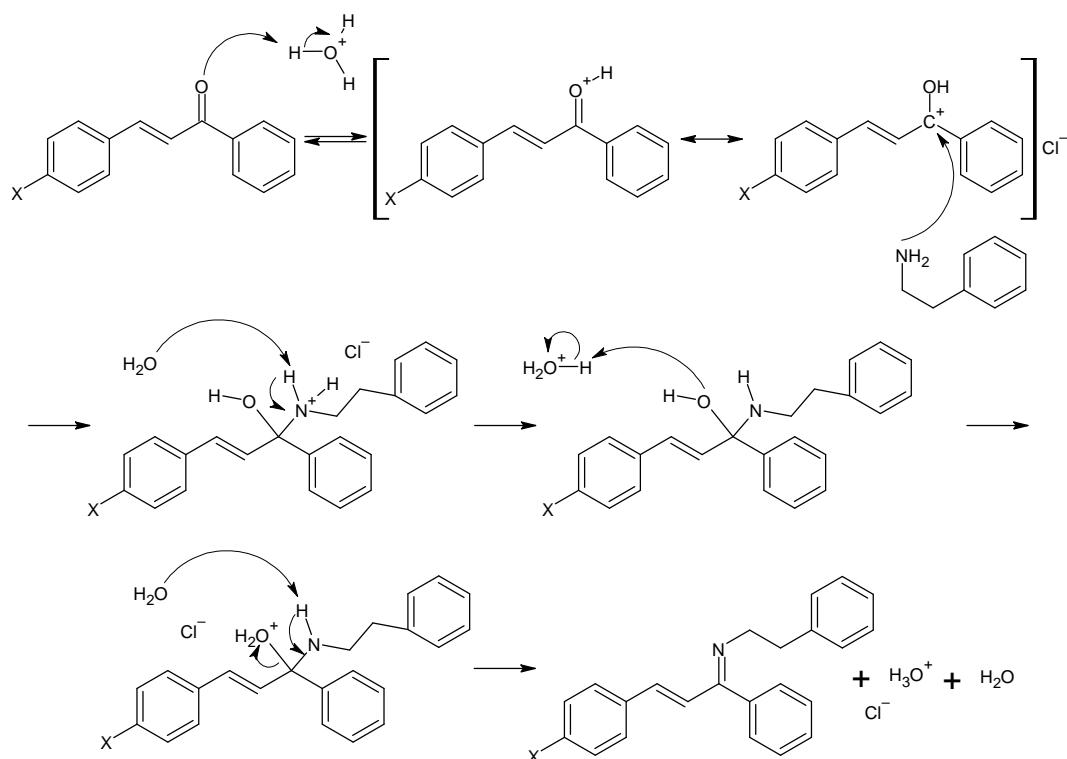
Assim, com os dados dos pontos de fusão e principais absorções nos espectros de infravermelho, pode-se confirmar que as chalconas sintetizadas correspondem aos compostos planejados para esta etapa.

#### 4.2 Síntese das fenetil-imino-chalconas

As bases de Schiff, fenetil-imino-chalconas, foram obtidas a partir das chalconas sintetizadas e previamente avaliadas nos ensaios frente aos fungos *A. parasiticus* e *A. carbonarius*, sendo 4 selecionadas, pois apresentaram os maiores efeitos inibitórios. As fenetil-imino-chalconas (**FIC-H**, **FIC-F**, **FIC-Cl** e **FIC-Br**) foram previamente sintetizadas e caracterizadas por Carlos (2022), conforme espectros em anexo e publicação em Carlos e colaboradores (2021). A síntese foi realizada com as respectivas

chalconas precursoras e a 2-fenetilamina em etanol como solvente e gotas de ácido clorídrico como catalisador sob a irradiação de micro-ondas.

O Esquema 11 representa o mecanismo sugerido para a síntese das fenetil-imino-chalconas, se iniciando pela ativação da chalcona por protonação do oxigênio. A partir de então, o grupamento amino da fenetil-amina pode atacar o carbono carbonílico, formando o intermediário hemiaminal. Um dos hidrogênios ligados ao nitrogênio é capturado pela água do meio reacional, retomando a formação de íon hidrônio. Um dos pares de elétrons do oxigênio captura um hidrogênio do íon hidrônio, proporcionando a eliminação de uma molécula de água através de um mecanismo concertado onde ocorre a formação de uma ligação  $\pi$  entre o nitrogênio e o carbono, resultando na produção do grupamento imino.



**Esquema 11.** Mecanismo resumido proposto para obtenção de fenetil-imino-chalconas substituídas.

Para organização e simplificação das explicações, na Tabela 9 são apresentadas as nomenclaturas IUPAC dos compostos fenetil-imino-chalconas, seus grupos substituintes e seus códigos, respectivamente.

**Tabela 9.** Códigos dos compostos fenetil-imino-chalconas.

Nomenclatura IUPAC dos compostos	Substituinte	Código
(1Z,2E)-1,3-difenil-N-(2-feniletil)prop-2-en-1-imina	H	<b>FIC-H</b>
(1Z,2E)-3-(4-flúor-fenil)-1-fenil-N-(2-fenil-etyl)prop-2-en-1-imina	F	<b>FIC-F</b>
(1Z,2E)-3-(4-cloro-fenil)-1-fenil-N-(2-fenil-etyl)prop-2-en-1-imina	Cl	<b>FIC-Cl</b>
(1Z,2E)-3-(4-bromo-fenil)-1-fenil-N-(2-fenil-etyl)prop-2-en-1-imina	Br	<b>FIC-Br</b>

Na Tabela 10, encontram-se os valores dos rendimentos experimentais e índices de refração dos derivados fenetil-imino-chalconas sintetizados.

**Tabela 10.** Rendimentos experimentais e índices de refração das fenetil-imino-chalconas sintetizadas.

Composto	Rendimento (%)	Índice de refração
<b>FIC-H</b>	91	1,600*
<b>FIC-F</b>	72	1,569*
<b>FIC-Cl</b>	93	1,598*
<b>FIC-Br</b>	89	1,592*

\*CARLOS *et al.*, 2021.

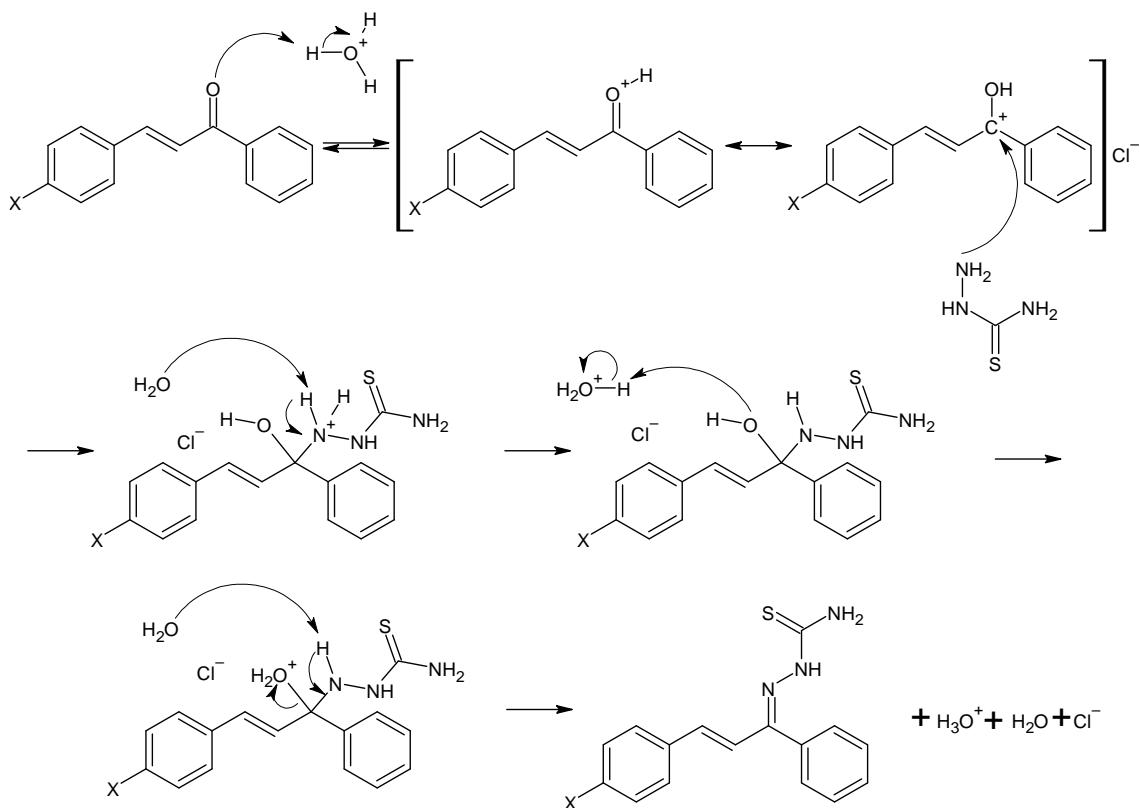
#### 4.3 Síntese das chalconas-tiossemicarbazonas

A obtenção das chalconas-tiossemicarbazonas foi realizada a partir das chalconas previamente selecionadas em função de sua melhor atividade antifúngica frente às espécies de *Aspergillus* e a tiossemicarbazida em etanol como solvente e gotas de ácido clorídrico concentrado como catalisador (OLIVEIRA *et al.*, 2008; MENDES *et al.*, 2019).

As reações de condensação ocorreram sob agitação em refluxo por até 6 horas, sendo monitoradas por cromatografia em camada fina com solventes de eluição hexano-acetato de etila em proporção 4:1. Após o resfriamento, o precipitado foi recristalizado em etanol e filtrado à vácuo. As chalconas-tiossemicarbazonas foram previamente sintetizadas e caracterizadas por Goulart (2015), conforme espectros em anexo e publicação em Mendes e colaboradores (2019).

O Esquema 12 representa o mecanismo proposto para a obtenção dos compostos desta classe de derivados, onde, assim como no caso das fenetil-imino-chalconas, as chalconas passam pela etapa de ativação da carbonila a partir da protonação do oxigênio. Com a carbonila ativada, a tiossemicarbazida é capaz de se ligar ao carbono carbonílico, formando um intermediário hemiaminal protonado. O hidrogênio ácido é capturado pela água do meio reacional formando novamente íon hidrônio, que por sua vez proporciona a saída de uma molécula de água por eliminação via mecanismo concertado com a

formação de uma ligação  $\pi$  entre o nitrogênio que antes pertencia à tiossemicarbazida para formar o grupamento tiossemicarbazona.



**Esquema 12.** Mecanismo resumido proposto para obtenção de chalconas tiossemicarbazonas substituídas.

Para organização e simplificação das explicações, na Tabela 11 são apresentadas as nomenclaturas IUPAC dos compostos chalconas-tiossemicarbazonas, seus grupos substituintes e seus códigos, respectivamente.

**Tabela 11.** Códigos dos compostos chalconas-tiossemicarbazonas.

Nomenclatura IUPAC dos compostos	Substituinte	Código
(2Z,2E)-2-[(2E)-1,3-difenilprop-2-en-1-ilideno]hidrazina-1-carbotioamida	H	CT-H
(2Z,2E)-2-[(2E)-3-(4-flúor-fenil)-1-fenilprop-2-en-1-ilideno]hidrazina-1-carbotioamida	F	CT-F
(2Z,2E)-2-[(2E)-3-(4-cloro-fenil)-1-fenilprop-2-en-1-ilideno]hidrazina-1-carbotioamida	Cl	CT-Cl
(2Z,2E)-2-[(2E)-3-(4-bromo-fenil)-1-fenilprop-2-en-1-ilideno]hidrazina-1-carbotioamida	Br	CT-Br

A Tabela 12 apresenta os valores de rendimentos das sínteses dos 4 derivados chalconas-tiossemicarbazonas e seus respectivos valores de pontos de fusão experimentais e da literatura.

**Tabela 12.** Rendimentos e pontos de fusão (P.F.) experimentais e encontrados na literatura das chalconas tiosemicarbazonas sintetizadas.

Composto	Rendimento (%)	P.F. experimentais (°C)	P.F. literatura (°C)
CT-H	82	133-135	135-137 <sup>a</sup>
CT-F	37	152-154	152-154 <sup>c</sup>
CT-Cl	57	163-164	164-166 <sup>b</sup>
CT-Br	43	166-168	166-168 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>BAYER AG, 1954; <sup>b</sup>DIMOCK *et al.*, 1990; <sup>c</sup>MENDES *et al.*, 2019.

#### 4.4 Regra de Lipinski Aplicada aos Compostos Chalconas e Derivados

Em 1997, para avaliar se uma determinada molécula é mais permeável a membranas celulares e facilmente absorvidas pelo organismo, o químico medicinal Christopher Lipinski e seus colegas desenvolveram uma metodologia teórica para definir quando uma molécula pode ser considerada interessante como possível fármaco. Dessa metodologia, surgiram as seguintes características que esses compostos deveriam apresentar: peso molecular inferior a 500 g mol<sup>-1</sup>, lipofilicidade ( $\log P$ ) inferior a 4,15, número de grupos na molécula capazes de doar átomos de hidrogênio para ligações de hidrogênio ser inferior a 5 e o número de grupos capazes de aceitar átomos de hidrogênio para formar ligações de hidrogênio ser inferior a 10. Estas regras se aplicam apenas à absorção por difusão passiva de compostos através de membranas celulares. Compostos que são ativamente transportados através de membranas celulares por proteínas transportadoras são exceções à regra (LEESON, 2012).

Em função de sua grande simplicidade, esses quatro critérios de Lipinski são amplamente empregados por químicos medicinais para prever não apenas a absorção de compostos, como Lipinski originalmente pretendia, mas também realizar a comparação da semelhança geral com fármacos já existentes.

A seguir, na Tabela 13, são apresentados os dados pertinentes para determinar se as chalconas aqui sintetizadas e avaliadas neste trabalho apresentam, ou não, violações à regra de Lipinski.

**Tabela 13.** Propriedades físico-químicas das chalconas.

Chalcona	Fórmula molecular	Massa molecular (g mol <sup>-1</sup> )	Lipofilicidade (LogP)	Violações à regra de Lipinski
<b>CH-H</b>	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O	208,26	3,44	0
<b>CH-F</b>	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> FO	226,25	3,83	0
<b>CH-Cl</b>	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> ClO	247,70	3,96	0
<b>CH-Br</b>	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> BrO	287,15	4,08	0
<b>CH-CN</b>	C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> NO	233,26	2,69	0
<b>CH-Me</b>	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O	222,28	3,69	0
<b>CH-NO<sub>2</sub></b>	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	253,25	2,19	0
<b>CH-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b>	C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> NO	251,32	3,27	0

FONTE: Dados extraídos da plataforma SwissADME, por Swiss Institute of Bioinformatics.

Os dados obtidos levam a inferir que as chalconas apresentam propriedades interessantes para serem avaliadas como possíveis fármacos, uma vez que nenhuma delas apresentou violações à regra de Lipinski.

Na Tabela 14, são apresentados os dados dos derivados fenetil-imino-chalconas verificando-se a regra de Lipinski.

**Tabela 14.** Propriedades físico-químicas das fenetil-imino-chalconas.

Composto	Fórmula molecular	Massa molecular (g mol <sup>-1</sup> )	Lipofilicidade (LogP)	Violações à regra de Lipinski
<b>FIC-H</b>	C <sub>23</sub> H <sub>21</sub> N	311,42	5,06	1
<b>FIC-F</b>	C <sub>23</sub> H <sub>20</sub> FN	329,41	5,44	1
<b>FIC-Cl</b>	C <sub>23</sub> H <sub>20</sub> ClN	345,86	5,54	1
<b>FIC-Br</b>	C <sub>23</sub> H <sub>20</sub> BrN	390,32	5,65	1

FONTE: Dados extraídos da plataforma SwissADME, por Swiss Institute of Bioinformatics.

De acordo com o programa utilizado (plataforma SwissADME), as quatro fenetil-imino-chalconas sintetizadas apresentam lipofilicidade superior a 4,15, fazendo com que, em teoria, as moléculas apresentem certo grau de dificuldade em permear membranas plasmáticas de forma passiva.

Na Tabela 15, são apresentados os dados dos parâmetros físico-químicos dos derivados chalconas-tiossemicarbazonas verificando-se a regra de Lipinski.

**Tabela 15.** Propriedades físico-químicas das chalconas-tiossemicarbazonas.

Composto	Fórmula molecular	Massa molecular (g mol <sup>-1</sup> )	Lipofilicidade (LogP)	Violações à regra de Lipinski
<b>CT-H</b>	C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> S	281,38	3,02	0
<b>CT-F</b>	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> FN <sub>3</sub> S	299,37	3,41	0
<b>CT-Cl</b>	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> ClN <sub>3</sub> S	315,82	3,53	0
<b>CT-Br</b>	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> BrN <sub>3</sub> S	360,27	3,65	0

FONTE: Dados extraídos da plataforma SwissADME, por Swiss Institute of Bioinformatics.

Os dados fornecidos pelo programa indicam que todos os derivados chalconastiossemicarbazonas apresentam valores de lipofilicidade reduzidos em relação aos seus respectivos precursores chalconas. Além disso, nenhum dos compostos desta série apresentou violações à regra de Lipinski, demonstrando que esta classe de produtos possui propriedades interessantes para serem avaliados como possíveis fármacos.

## 4.5 Ensaios Biológicos

Todos os compostos sintetizados neste estudo foram avaliados quanto às suas atividades antifúngicas e antiproliferativas empregando protocolos padronizados. Os estudos antiproliferativos dos compostos sintetizados foram realizados no Laboratório de Micologia e Micotoxicologia (LMM) da UFRRJ, sob a orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Águida Aparecida de Oliveira, e no Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos (LTBBF), no Instituto Oswaldo Cruz (IOC), sob a orientação da Dr.<sup>a</sup> Gisela Lara da Costa.

### 4.5.1 Ensaios *in vitro* de inibição do crescimento radial dos fungos

#### 4.5.1.1 Tratamentos com as chalconas precursoras:

Os ensaios foram realizados com as oito chalconas sintetizadas onde foram observadas as capacidades de inibição do crescimento fúngico através da medida do diâmetro da circunferência diariamente.

Deste modo, foram utilizados os compostos em concentrações de 62,5, 125, 250 e 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , para avaliar a inibição do crescimento dos fungos filamentosos *A. parasiticus* e *A. carbonarius*, que são patógenos oportunistas micotoxígenos. Os ensaios ocorreram ao longo de um período de 7 dias para *A. parasiticus* e 9 dias para *A. carbonarius*, a contar a partir do dia do inóculo. Foram verificadas também as capacidades dos compostos em retardar o desenvolvimento das estruturas conidiofóricas de ambas as espécies fúngicas filamentosas.

Como características macromorfológicas, *A. parasiticus* em meio de cultura ágar-extrato de malte (MEA), no sétimo dia de crescimento, apresentou diâmetro médio de 7,5 cm; se mostrou pulverulento, de coloração amarelo ocre e micélio esbranquiçado (Figura 18). *A. parasiticus* também se caracteriza microscopicamente como um fungo

filamentoso hialino; com vesícula subglobosa; cabeça aspergilar unisseriada; conídios e a maioria dos conidióforos rugosos.



**Figura 18.** Controle negativo do ensaio de inibição de difusão radial do fungo *Aspergillus parasiticus* em temperatura média de 29 °C.

As características macromorfológicas de *A. carbonarius* em MEA após 9 dias de crescimento, apresentou diâmetro médio de 5,6 cm; se mostrando pulverulento, de coloração negra e micélios esbranquiçados (Figura 19). Suas características microscópicas relacionam a cabeça aspergilar bisseriada e vesículas esféricas com conídios esféricos variando entre rugosos e espiculados.



**Figura 19.** Controle negativo do ensaio de inibição de difusão radial do fungo *Aspergillus carbonarius* em temperatura média de 31,5 °C.

Conforme relatos de Paiva (2013) e Rocha (2021), a avaliação do crescimento de ambas as espécies filamentosas foi realizada em placas de Petri em triplicatas utilizando

MEA, onde foram adicionadas as soluções de chalconas em DMSO em diferentes concentrações (62,5 – 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) sendo feitas medições diárias dos halos de crescimento das cepas, obtendo-se assim as médias dos diâmetros em centímetros, além das análises de mudanças macromorfológicas observadas neste período.

Deste modo, foi observado que nos tratamentos com as menores concentrações dos compostos as massas fúngicas apresentavam, em sua maioria, coloração amarelada e, à medida que as concentrações aumentavam, a coloração se apresentava mais esbranquiçada para a espécie *A. parasiticus* em ensaios que se deram na faixa de temperatura de 27 °C a 31 °C.

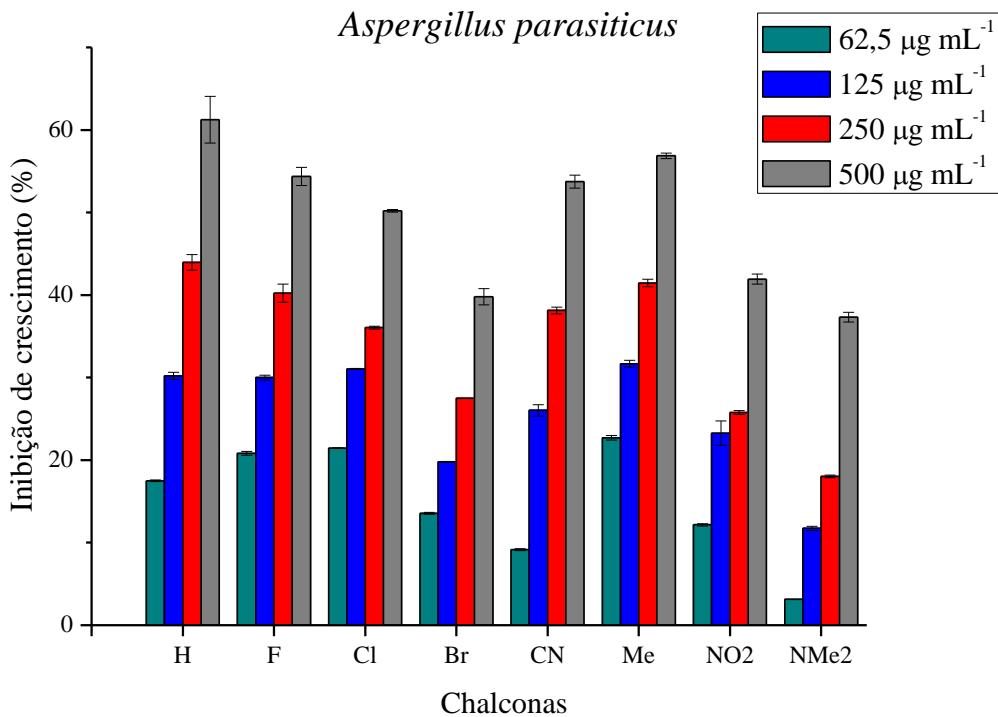
Posteriormente, com os valores dos diâmetros do crescimento radial dos fungos sem tratamento (controles negativos) e das placas tratadas com as chalconas sintetizadas, foram realizados os cálculos para verificar o percentual da inibição do crescimento, fazendo a comparação entre a média dos diâmetros dos controles negativos com as médias dos diâmetros das cepas tratadas com as chalconas. Esses cálculos foram realizados utilizando a seguinte equação:

$$\text{Inibição do crescimento (\%)} = \frac{D_{\text{controle}} - D_{\text{tratado}}}{D_{\text{controle}}} * 100$$

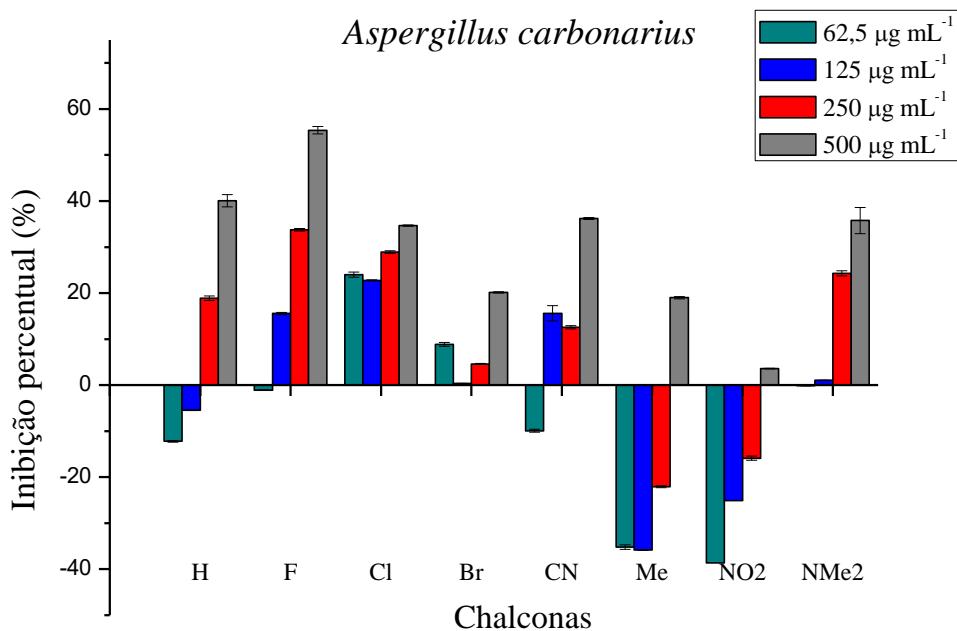
onde  $D_{\text{controle}}$ : média do diâmetro do grupo controle negativo;  $D_{\text{tratado}}$ : média do diâmetro da cepa em cada tratamento.

Os experimentos de avaliação da inibição do crescimento radial da cepa de *A. carbonarius* foi realizada sob condições similares aos ensaios com *A. parasiticus*. Deste modo, foi possível observar que, de modo geral, os grupos com as menores concentrações de chalconas apresentaram maiores desenvolvimentos de massa fúngica com coloração bege e à medida que a concentração de compostos aumentou, suas massas fúngicas se apresentaram mais esbranquiçadas com menor formação dos conídios negros. Os ensaios foram realizados na faixa de temperatura de 28 °C a 35 °C.

Os gráficos referentes a estes ensaios se encontram nos anexos. Já as representações gráficas do último dia de avaliação para os diferentes tratamentos com chalconas podem ser observadas na Figura 20, para as cepas de *A. parasiticus*, e na Figura 21 para as cepas de *A. carbonarius*.



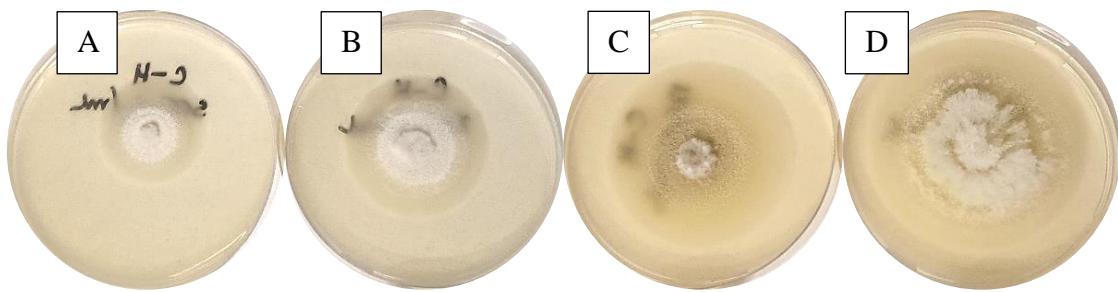
**Figura 20.** Tratamentos de *Aspergillus parasiticus* com chalconas precursoras. **Ciano:** Percentual de inibição de crescimento radial sob tratamento com chalconas em concentração de  $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , onde os valores de inibição de crescimento radial acompanhados de seus respectivos erros são: **CH-H** =  $17,5\% \pm 0,11$ ; **CH-F** =  $20,83\% \pm 0,24$ ; **CH-Cl** =  $21,46\% \pm 0,04$ ; **CH-Br** =  $13,54\% \pm 0,12$ ; **CH-CN** =  $9,17\% \pm 0,12$ ; **CH-Me** =  $22,71\% \pm 0,26$ ; **CH-NO<sub>2</sub>** =  $12,16\% \pm 0,14$ ; **CH-NMe<sub>2</sub>** =  $3,14\% \pm 0$ . **Azul:** Percentual de inibição de crescimento radial sob tratamento com chalconas em concentração de  $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ , onde os valores de inibição de crescimento radial acompanhados de seus respectivos erros são: **CH-H** =  $30,21\% \pm 0,42$ ; **CH-F** =  $30\% \pm 0,29$ ; **CH-Cl** =  $31,04\% \pm 0,07$ ; **CH-Br** =  $19,79\% \pm 0,03$ ; **CH-CN** =  $26,04\% \pm 0,69$ ; **CH-Me** =  $31,67\% \pm 0,41$ ; **CH-NO<sub>2</sub>** =  $23,27\% \pm 1,49$ ; **CH-NMe<sub>2</sub>** =  $11,74\% \pm 0,25$ . **Vermelho:** Percentual de inibição de crescimento radial sob tratamento com chalconas em concentração de  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ , onde os valores de inibição de crescimento radial acompanhados de seus respectivos erros são: **CH-H** =  $43,96\% \pm 0,95$ ; **CH-F** =  $40,21\% \pm 1,10$ ; **CH-Cl** =  $36,04\% \pm 0,17$ ; **CH-Br** =  $27,5\% \pm 0$ ; **CH-CN** =  $38,12\% \pm 0,42$ ; **CH-Me** =  $41,46\% \pm 0,45$ ; **CH-NO<sub>2</sub>** =  $25,79\% \pm 0,24$ ; **CH-NMe<sub>2</sub>** =  $18,03\% \pm 0,14$ . **Cinza:** Percentual de inibição de crescimento radial sob tratamento com chalconas em concentração de  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ , onde os valores de inibição de crescimento radial com seus respectivos erros são: **CH-H** =  $61,25\% \pm 2,82$ ; **CH-F** =  $54,38\% \pm 1,10$ ; **CH-Cl** =  $50,21\% \pm 0,15$ ; **CH-Br** =  $39,79\% \pm 0,97$ ; **CH-CN** =  $53,75\% \pm 0,78$ ; **CH-Me** =  $56,88\% \pm 0,34$ ; **CH-NO<sub>2</sub>** =  $41,93\% \pm 0,60$ ; **CH-NMe<sub>2</sub>** =  $37,32\% \pm 0,58$ .



**Figura 21.** Tratamentos de *Aspergillus carbonarius* com chalconas precursoras. **Ciano:** Percentual de inibição de crescimento radial sob tratamento com chalconas em concentração de 62,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , onde os valores de inibição de crescimento radial acompanhados de seus respectivos erros são: **CH-H** = -12,22%  $\pm$  0,17; **CH-F** = -1,08%  $\pm$  0,02; **CH-Cl** = 24,01%  $\pm$  0,57; **CH-Br** = 8,83%  $\pm$  0,41; **CH-CN** = -9,94%  $\pm$  0,31; **CH-Me** = -35,18%  $\pm$  0,49; **CH-NO<sub>2</sub>** = -38,65%  $\pm$  0; **CH-NMe<sub>2</sub>** = -0,12%  $\pm$  0. **Azul:** Percentual de inibição de crescimento radial sob tratamento com chalconas em concentração de 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , onde os valores de inibição de crescimento radial acompanhados de seus respectivos erros são: **CH-H** = -5,44%  $\pm$  0,07; **CH-F** = 15,58%  $\pm$  0,25; **CH-Cl** = 22,77%  $\pm$  0,10; **CH-Br** = 0,35%  $\pm$  0,06; **CH-CN** = 15,60%  $\pm$  1,65; **CH-Me** = -35,82%  $\pm$  0,09; **CH-NO<sub>2</sub>** = -25,13%  $\pm$  0; **CH-NMe<sub>2</sub>** = 1,04%  $\pm$  0,02. **Vermelho:** Percentual de inibição de crescimento radial sob tratamento com chalconas em concentração de 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , onde os valores de inibição de crescimento radial acompanhados de seus respectivos erros são: **CH-H** = 18,87%  $\pm$  0,51; **CH-F** = 33,75%  $\pm$  0,31; **CH-Cl** = 28,88%  $\pm$  0,28; **CH-Br** = 4,59%  $\pm$  0,12; **CH-CN** = 12,59%  $\pm$  0,35; **CH-Me** = -22,07%  $\pm$  0,22; **CH-NO<sub>2</sub>** = -15,89%  $\pm$  0,45; **CH-NMe<sub>2</sub>** = 24,26%  $\pm$  0,57. **Cinza:** Percentual de inibição de crescimento radial sob tratamento com chalconas em concentração de 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , onde os valores de inibição de crescimento radial com seus respectivos erros são: **CH-H** = 40,07%  $\pm$  1,30; **CH-F** = 55,38%  $\pm$  0,82; **CH-Cl** = 34,68%  $\pm$  0,16; **CH-Br** = 20,14%  $\pm$  0,13; **CH-CN** = 36,22%  $\pm$  0,20; **CH-Me** = 19,00%  $\pm$  0,26; **CH-NO<sub>2</sub>** = 3,58%  $\pm$  0,08; **CH-NMe<sub>2</sub>** = 35,76%  $\pm$  2,87.

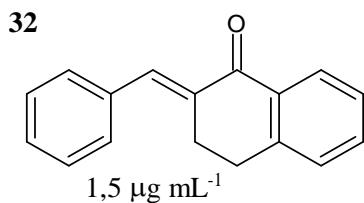
Ao analisar os dados do ensaio com as chalconas precursoras quando utilizadas em concentração máxima, percebe-se que todas elas apresentaram capacidade de inibir a proliferação de *A. parasiticus*, destacando os compostos: chalcona não substituída (**CH-H**), *p*-metil-chalcona (**CH-Me**), *p*-flúor-chalcona (**CH-F**), *p*-ciano-chalcona (**CH-CN**) e *p*-cloro-chalcona (**CH-Cl**).

A chalcona não substituída apresentou a melhor capacidade inibitória para a proliferação dos fungos (Figura 22).



**Figura 22.** *Aspergillus parasiticus* tratado com **CH-H** a 500 µg mL<sup>-1</sup> (**A**), 250 µg mL<sup>-1</sup> (**B**), 125 µg mL<sup>-1</sup> (**C**) e 62,5 µg mL<sup>-1</sup> (**D**).

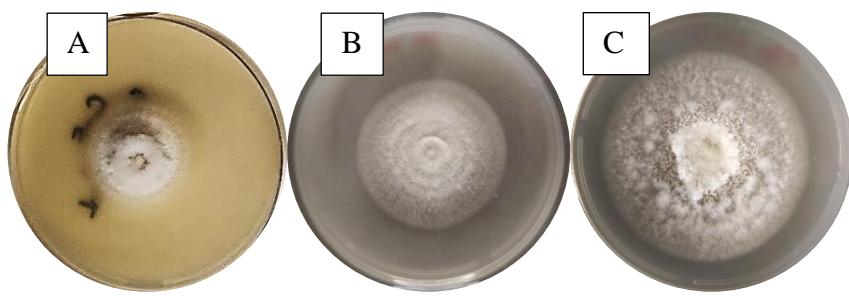
Os resultados encontrados com as chalconas precursoras se mostram relevantes, uma vez que, ao contrário do que foi observado com os derivados 2-aryliden-3,4-dihidronaftalen-1-ona que não apresentaram atividades frente às cepas de *Aspergillus spp.* e *Candida spp.* (GUPTA & JAIN, 2015), as chalconas precursoras apresentaram atividades relevantes. Porém o derivado não substituído (Figura 23) também apresentou a maior capacidade de inibir a espécie *Microsporum gypseum* dentre todos os compostos relatados que foram avaliados, sendo representado por uma concentração inibitória mínima (MIC) de 1,5 µg mL<sup>-1</sup>.



**Figura 23.** 2-aryliden-3,4-di-hidronaftalen-1-ona (**32**) e seu valor de concentração mínima inibitória frente à *M. gypseum*.

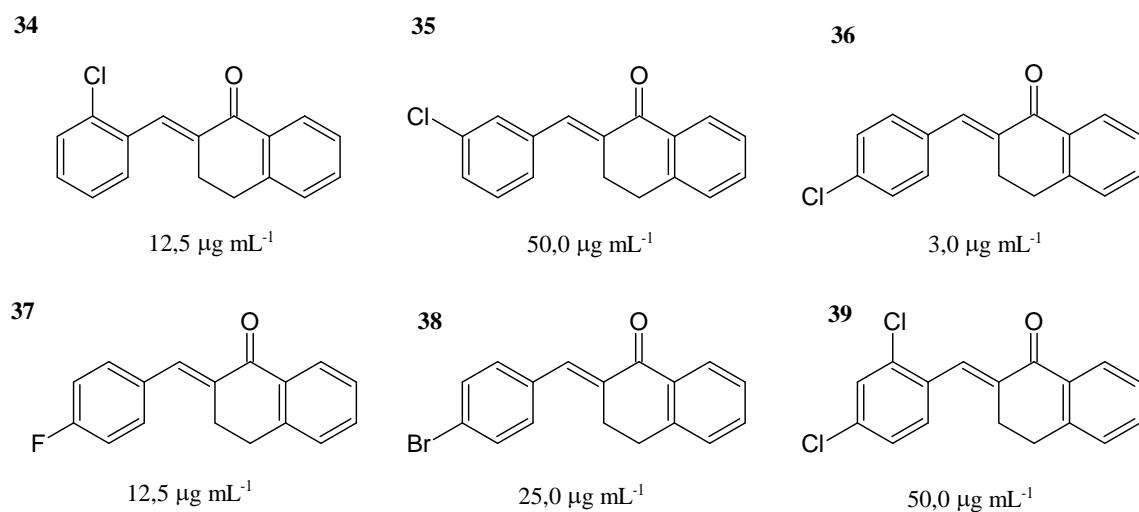
FONTE: Adaptado de GUPTA & JAIN, 2015.

Analizando os tratamentos de *A. parasiticus* frente ao subgrupo das chalconas *p*-halogenadas é possível observar um aumento da capacidade inibitória conforme se diminui o raio atômico do halogênio associado à chalcona (Figura 24).



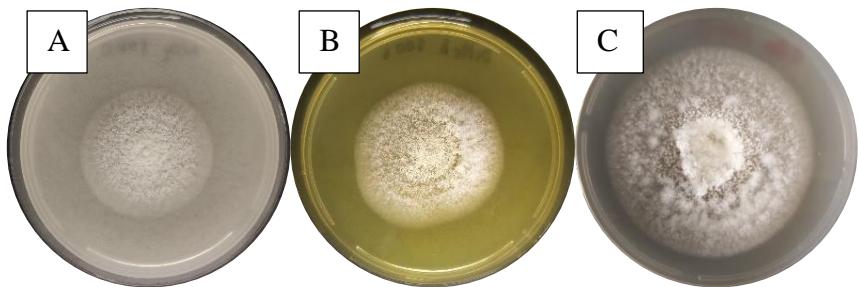
**Figura 24.** *Aspergillus parasiticus* tratados com **CH-F** (A), **CH-Cl** (B) e **CH-Br** (C) a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Este fenômeno inibitório acaba divergindo do que foi observado por Gupta e Jain com derivados de chalconas halogenados frente ao fungo *M. gypseum*, onde o composto **35** apresentou o menor MIC quando comparado com os compostos **36** e **37** (Figura 25). Um segundo fenômeno observado no trabalho de Gupta e Jain foi a alteração dos valores de MIC ao alterar as posições do grupo cloro no anel B, onde o composto **35** continuou apresentando o melhor valor de MIC quando comparado com os compostos **33** e **34**, consecutivamente o segundo e o último em melhores valores de MIC aqui avaliados. Um terceiro fenômeno percebido vem da comparação dos valores de MIC dos compostos **35** e **38**, onde o segundo composto apresenta uma dissubstituição por grupos cloro nas posições *ortho* e *para* e representou uma piora na avaliação frente ao fungo.



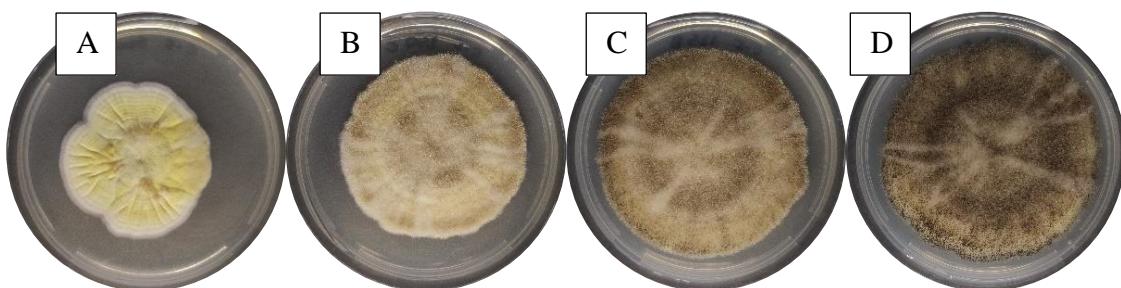
**Figura 25.** Derivados 2-arilideno-3,4-di-hidronaftalen-1-onas. Monossubstituídos por cloro na posição 2 (33), na posição 3 (34) e na posição 4 (35), monossubstituído por flúor na posição 4 (36), monossubstituído por bromo na posição 4 (37) e dissubstituído por cloro nas posições 2 e 4 (38) com seus respectivos valores de concentrações mínimas inibitórias frente a *M. gypseum*.  
FONTE: Adaptado de GUPTA & JAIN, 2015.

A **CH-Br**, a **CH-NO<sub>2</sub>** e a **CH-NMe<sub>2</sub>**, apesar de apresentarem as menores capacidades inibitórias referentes à proliferação da espécie *A. parasiticus* foram capazes de inibir a formação dos conídios (Figura 26).



**Figura 26.** *Aspergillus parasiticus* tratados com **CH-NO<sub>2</sub>** (A), **CH-NMe<sub>2</sub>** (B) e **CH-Br** (C) a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Os resultados dos experimentos com os fungos *A. carbonarius* indicaram que a **CH-F** (Figura 27) foi o único composto capaz de inibir a difusão radial dos fungos em mais de 50% quando aplicada a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Além disso, pode-se perceber que, conforme os fungos foram tratados com concentrações mais baixas dos compostos, houve maior similaridade macromorfológicas com os grupos não tratados, indicando que as atividades de inibição da produção das frações reprodutivas dos fungos podem ser dose-dependentes.

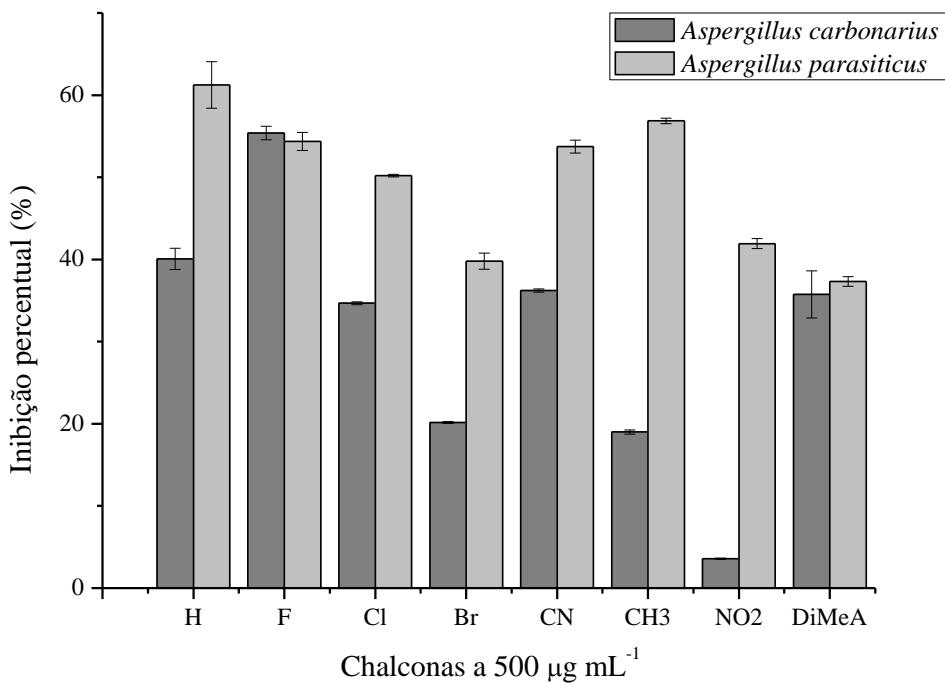


**Figura 27.** *Aspergillus carbonarius* tratado com **CH-F** a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (A), 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (B), 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (C) e 62,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (D).

Os demais compostos também apresentaram relevante eficácia em impedir o desenvolvimento das estruturas conidiofóricas nesta espécie fúngica. No entanto, não foram tão eficientes em inibir a difusão radial, como é possível observar nas imagens das placas de Petri com fungos no último dia de ensaio e dos gráficos de difusão dos fungos em tratamento, ambos no campo dos anexos.

Nos tratamentos com menores concentrações da **CH-H**, **CH-CN**, **CH-Me** e **CH-NO<sub>2</sub>** é perceptível que os fungos foram capazes de se difundir mais do que os grupos de controle negativo. Este fenômeno é evidenciado pela inibição percentual negativa. Esta observação possibilita indagar sobre um possível mecanismo de defesa deste fungo quando colocado em situação de estresse, assim como ocorre em determinadas espécies fúngicas que são induzidas a produzir espécies reativas de oxigênio (EROs) (ILKHECHI, MOZAMMEL & KHOSROUSHAH, 2021). A **CH-NMe<sub>2</sub>** a 62,5 µg mL<sup>-1</sup> não apresentou inibição do crescimento radial do seu grupo experimental.

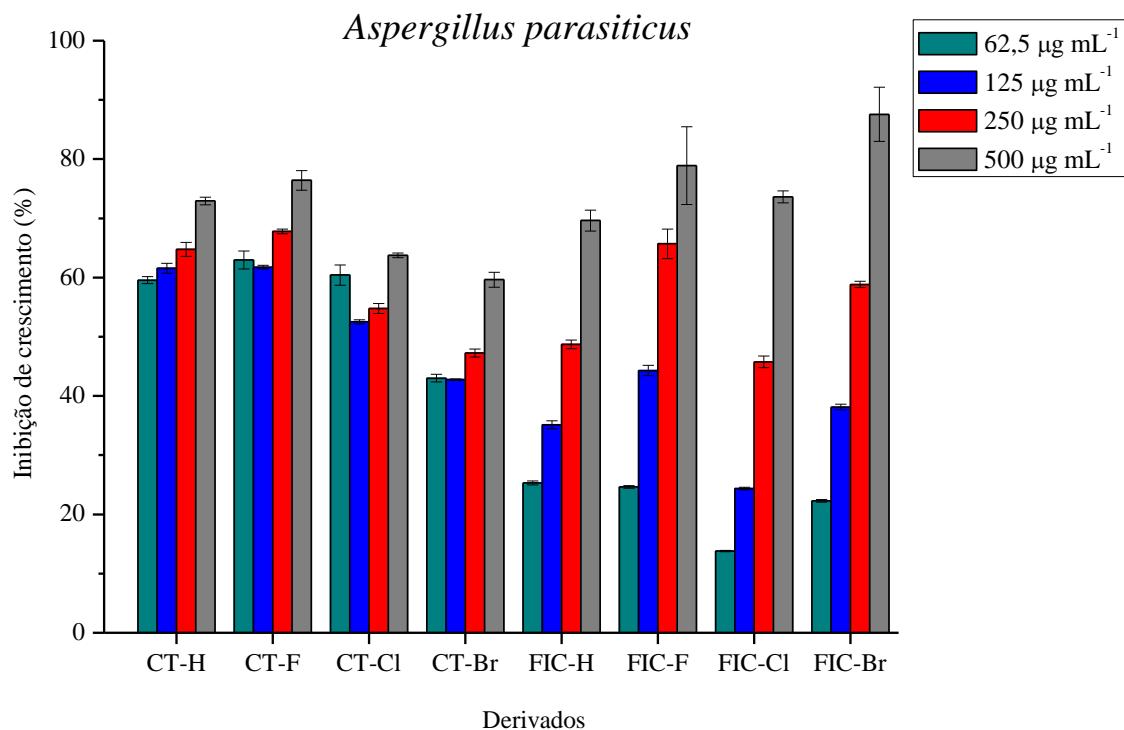
Com estes resultados, pode-se observar e selecionar quais chalconas apresentaram as melhores respostas de inibição do crescimento radial e assim serem usadas para produzir seus derivados fenetil-imino-chalconas e chalconas-tiossemicarbazonas. Além disso, constata-se que, de modo geral, as chalconas apresentaram maior eficiência em impedir o crescimento e a formação das estruturas reprodutivas dos fungos da espécie *A. parasiticus* em comparação com *A. carbonarius*, como constatado no Figura 28, contendo o gráfico onde correlacionam-se os percentuais de inibição de cada composto em concentração de 500 µg mL<sup>-1</sup> para ambas as espécies fúngicas.



**Figura 28.** Comparativo da atividade inibitória dos tratamentos das chalconas frente aos fungos *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus parasiticus*. **Cinza escuro:** Percentual de inibição de crescimento radial de fungos *A. carbonarius* sob tratamento com chalconas em concentração de  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ , onde os valores de inibição de crescimento radial com seus respectivos erros são: **CH-H** =  $40,07\% \pm 1,30$ ; **CH-F** =  $55,38\% \pm 0,82$ ; **CH-Cl** =  $34,68\% \pm 0,16$ ; **CH-Br** =  $20,14\% \pm 0,13$ ; **CH-CN** =  $36,22\% \pm 0,20$ ; **CH-Me** =  $19,00\% \pm 0,26$ ; **CH-NO<sub>2</sub>** =  $3,58\% \pm 0,08$ ; **CH-N(Me)<sub>2</sub>** =  $35,76\% \pm 2,87$ . **Cinza claro:** Percentual de inibição de crescimento radial de fungos *A. parasiticus* sob tratamento com chalconas em concentração de  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ , onde os valores de inibição de crescimento radial com seus respectivos erros são: **CH-H** =  $61,25\% \pm 2,82$ ; **CH-F** =  $54,38\% \pm 1,10$ ; **CH-Cl** =  $50,21\% \pm 0,15$ ; **CH-Br** =  $39,79\% \pm 0,97$ ; **CH-CN** =  $53,75\% \pm 0,78$ ; **CH-Me** =  $56,88\% \pm 0,34$ ; **CH-NO<sub>2</sub>** =  $41,93\% \pm 0,60$ ; **CH-N(Me)<sub>2</sub>** =  $37,32\% \pm 0,58$ .

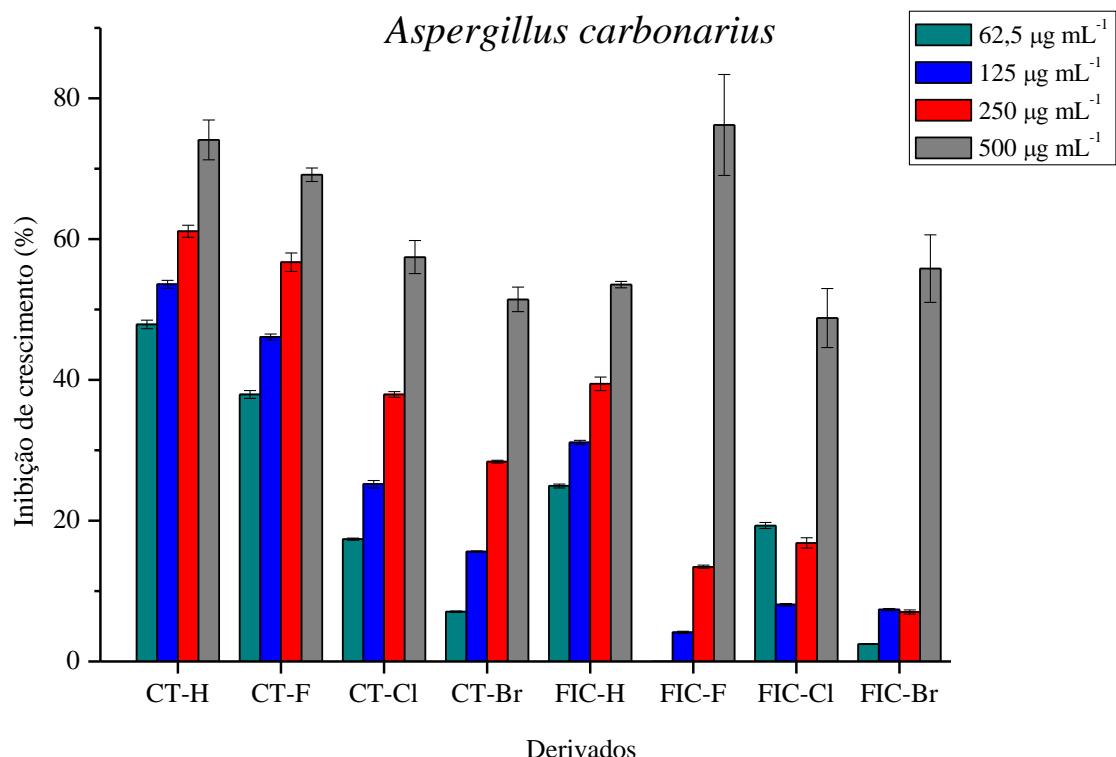
#### 4.5.1.2 Tratamentos com os compostos derivados das chalconas

Os ensaios dos derivados das chalconas frente às espécies *A. parasiticus* e *A. carbonarius* foram realizados com as fenetil-imino-chalconas (**FIC-H**, **FIC-F**, **FIC-Cl** e **FIC-Br**) e as chalconas-tiossemicarbazonas (**CT-H**, **CT-F**, **CT-Cl** e **CT-Br**) sob as mesmas condições dos tratamentos feitos com as chalconas. Os gráficos de cada tratamento ao longo dos dias referentes a estes ensaios se encontram nos anexos. Já as representações gráficas do último dia de avaliação para os diferentes tratamentos com os derivados podem ser observadas no Figura 29, para a cepa de *A. parasiticus*, e na Figura 30 para a cepa de *A. carbonarius*.



**Figura 29.** Tratamentos de *Aspergillus parasiticus* com os derivados das chalconas. **Ciano:** Percentual de inibição de crescimento radial sob tratamento com os derivados em concentração de 62,5 µg mL<sup>-1</sup>, onde os valores de inibição de crescimento radial acompanhados de seus respectivos erros são: **CT-H** = 59,56% ± 0,60; **CT-F** = 62,95% ± 1,53; **CT-Cl** = 60,42% ± 1,71; **CT-Br** = 43,01% ± 0,64; **FIC-H** = 25,32% ± 0,33; **FIC-F** = 24,63% ± 0,24; **FIC-Cl** = 13,78% ± 0,11; **FIC-Br** = 22,29% ± 0,21. **Azul:** Percentual de inibição de crescimento radial sob tratamento com os derivados em concentração de 125 µg mL<sup>-1</sup>, onde os valores de inibição de crescimento radial acompanhados de seus respectivos erros são: **CT-H** = 61,58% ± 0,85; **CT-F** = 61,74% ± 0,30; **CT-Cl** = 52,50% ± 0,36; **CT-Br** = 42,74% ± 0,14; **FIC-H** = 35,13% ± 0,67; **FIC-F** = 42,28% ± 0,87; **FIC-Cl** = 24,34% ± 0,23; **FIC-Br** = 38,12% ± 0,46. **Vermelho:** Percentual de inibição de crescimento radial sob tratamento com os derivados em concentração de 250 µg mL<sup>-1</sup>, onde os valores de inibição de crescimento radial acompanhados de seus respectivos erros são: **CT-H** = 64,75% ± 1,16; **CT-F** = 67,81% ± 0,39; **CT-Cl** = 54,78% ± 0,86; **CT-Br** = 47,23% ± 0,67; **FIC-H** = 48,73% ± 0,74; **FIC-F** = 65,69% ± 2,48; **FIC-Cl** = 45,75% ± 0,97; **FIC-Br** = 58,83% ± 0,54. **Cinza:** Percentual de inibição de crescimento radial sob tratamento com os derivados em concentração de 500 µg mL<sup>-1</sup>, onde os valores de inibição de crescimento radial com seus respectivos erros são: **CT-H** = 72,94% ± 0,64; **CT-F** = 76,41% ± 0,41.

1,66; **CT-Cl** =  $63,75\% \pm 0,41$ ; **CT-Br** =  $59,63\% \pm 1,26$ ; **FIC-H** =  $69,62\% \pm 1,78$ ; **FIC-F** =  $78,89\% \pm 6,57$ ; **FIC-Cl** =  $73,61\% \pm 1,00$ ; **FIC-Br** =  $87,57\% \pm 4,56$ .



**Figura 30.** Tratamentos de *Aspergillus carbonarius* com os derivados das chalconas. **Ciano:** Percentual de inibição de crescimento radial sob tratamento com os derivados em concentração de  $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , onde os valores de inibição de crescimento radial acompanhados de seus respectivos erros são: **CT-H** =  $47,88\% \pm 0,62$ ; **CT-F** =  $37,94\% \pm 0,55$ ; **CT-Cl** =  $17,38\% \pm 0,14$ ; **CT-Br** =  $7,09\% \pm 0,10$ ; **FIC-H** =  $24,95\% \pm 0,28$ ; **FIC-F** =  $-0,83\% \pm 0,03$ ; **FIC-Cl** =  $19,30\% \pm 0,43$ ; **FIC-Br** =  $2,46\% \pm 0,05$ . **Azul:** Percentual de inibição de crescimento radial sob tratamento com os derivados em concentração de  $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ , onde os valores de inibição de crescimento radial acompanhados de seus respectivos erros são: **CT-H** =  $53,60\% \pm 0,56$ ; **CT-F** =  $46,10\% \pm 0,43$ ; **CT-Cl** =  $25,18\% \pm 0,55$ ; **CT-Br** =  $15,60\% \pm 0,12$ ; **FIC-H** =  $31,13\% \pm 0,30$ ; **FIC-F** =  $4,14\% \pm 0,16$ ; **FIC-Cl** =  $8,07\% \pm 0,19$ ; **FIC-Br** =  $7,37\% \pm 0,17$ . **Vermelho:** Percentual de inibição de crescimento radial sob tratamento com os derivados em concentração de  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ , onde os valores de inibição de crescimento radial acompanhados de seus respectivos erros são: **CT-H** =  $61,11\% \pm 0,88$ ; **CT-F** =  $56,74\% \pm 1,31$ ; **CT-Cl** =  $37,94\% \pm 0,41$ ; **CT-Br** =  $28,37\% \pm 0,19$ ; **FIC-H** =  $39,45\% \pm 0,97$ ; **FIC-F** =  $13,45\% \pm 0,23$ ; **FIC-Cl** =  $16,84\% \pm 0,71$ ; **FIC-Br** =  $7,02\% \pm 0,30$ . **Cinza:** Percentual de inibição de crescimento radial sob tratamento com os derivados em concentração de  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ , onde os valores de inibição de crescimento radial com seus respectivos erros são: **CT-H** =  $74,07\% \pm 2,83$ ; **CT-F** =  $69,15\% \pm 0,97$ ; **CT-Cl** =  $57,45\% \pm 2,34$ ; **CT-Br** =  $51,42\% \pm 1,74$ ; **FIC-H** =  $53,52\% \pm 0,46$ ; **FIC-F** =  $76,21\% \pm 7,16$ ; **FIC-Cl** =  $48,77\% \pm 4,20$ ; **FIC-Br** =  $55,79\% \pm 4,80$ .

Os resultados dos ensaios com os compostos derivados de chalconas indicam que todas estas substâncias apresentaram capacidade inibitória em relação ao desenvolvimento proliferativo de ambas as cepas de fungos filamentosos, tanto relacionado à formação dos conidióforos, quanto relacionado ao espalhamento radial.

Frente à espécie *A. parasiticus*, todos os compostos apresentaram maiores atividades antiproliferativas em relação às suas respectivas chalconas precursoras.

Entre os compostos derivados, destacam-se em ordem decrescente de efeito inibitório os compostos **FIC-Br** > **FIC-F** > **FIC-Cl** > **CT-H** > **FIC-H** > **CT-Cl**. Analisando os resultados destes experimentos, constata-se que os derivados fenetil-imino-chalconas (FIC) halogenados apresentaram os melhores resultados frente ao fungo *A. parasiticus* quando utilizados em tratamento com a maior concentração (500 µg mL<sup>-1</sup>). Por outro lado, quando se observa os resultados sob as menores concentrações de tratamento, nota-se uma resposta mais favorável aos tratamentos com as chalconas-tiossemicarbazonas (CT).

Entre os derivados CT-halogenados observa-se novamente a tendência de aumento do efeito inibitório conforme se aumenta a eletronegatividade do halogênio substituinte. Este efeito também pode ser observado com as respectivas chalconas precursoras.

Comparando-se, ainda, os resultados encontrados nos tratamentos da cepa de *A. parasiticus* frente às chalconas precursoras e seus respectivos derivados CT e FIC é possível destacar os significativos aumentos nas capacidades de inibição das substâncias derivadas não substituídas e halogenadas em relação aos compostos precursores como apresentado na Tabela 16.

**Tabela 16.** Comparação dos resultados percentuais dos experimentos de inibição do crescimento radial das chalconas precursoras (CH) e seus respectivos derivados (CT e FIC) halogenados e não substituídos frente à cepa de *Aspergillus parasiticus*.

Tratamento (µg mL <sup>-1</sup> )	H			F			Cl			Br		
	CH	CT	FIC									
62,5	17,5 ±0,11	59,6 ±0,60	25,3 ±0,33	20,8 ±0,24	62,9 ±1,53	24,6 ±0,24	21,5 ±0,04	60,4 ±1,71	13,8 ±0,11	13,5 ±0,12	43,0 ±0,64	22,3 ±0,21
125	30,2 ±0,42	61,6 ±0,85	35,1 ±0,67	30,0 ±0,29	61,7 ±0,30	44,3 ±0,87	31,0 ±0,07	52,5 ±0,36	24,3 ±0,23	19,8 ±0,04	42,7 ±0,14	38,1 ±0,46
250	43,9 ±0,95	64,8 ±1,16	48,7 ±0,74	40,2 ±1,10	67,8 ±0,39	65,7 ±2,48	40,2 ±1,10	54,8 ±0,86	45,7 ±0,97	27,5 ±0,00	47,2 ±0,67	58,8 ±0,54
500	61,3 ±2,82	72,9 ±0,64	69,6 ±1,78	54,4 ±1,10	76,4 ±1,66	78,9 ±6,57	54,4 ±1,10	63,7 ±0,41	73,6 ±1,00	39,8 ±0,97	59,6 ±1,26	87,6 ±4,56

Nos ensaios frente à espécie *A. carbonarius*, destacam-se os compostos **CT-H** e **CT-F**, cujos tratamentos com menores concentrações resultaram nos melhores resultados inibitórios em relação aos demais; e o composto **FIC-F** que apresentou a maior capacidade inibitória sob o tratamento de maior concentração (500 µg mL<sup>-1</sup>). Ao contrapor os resultados encontrados com os derivados **FIC-H** e **CT-H** com a chalcona

não substituída frente ao fungo *A. carbonarius*, é possível constatar novamente uma melhora significativa na capacidade de inibição do crescimento radial como mostrado na Tabela 17.

**Tabela 17.** Comparação dos resultados percentuais dos experimentos de inibição do crescimento radial das chalconas precursoras (CH) e seus respectivos derivados (CT e FIC) halogenados e não substituídos frente à cepa de *Aspergillus carbonarius*.

Tratamento ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	H			F			Cl			Br		
	CH	CT	FIC	CH	CT	FIC	CH	CT	FIC	CH	CT	FIC
62,5	-12,2 $\pm 0,17$	47,9 $\pm 0,62$	24,9 $\pm 0,28$	-1,1 $\pm 0,02$	37,9 $\pm 0,55$	-0,8 $\pm 0,03$	24,0 $\pm 0,57$	17,4 $\pm 0,14$	19,3 $\pm 0,43$	8,8 $\pm 0,41$	7,1 $\pm 0,10$	2,5 $\pm 0,05$
	-5,4 $\pm 0,07$	53,6 $\pm 0,56$	31,1 $\pm 0,30$	15,6 $\pm 0,25$	46,1 $\pm 0,42$	4,1 $\pm 0,16$	22,8 $\pm 0,10$	25,2 $\pm 0,55$	8,1 $\pm 0,19$	0,35 $\pm 0,01$	15,6 $\pm 0,12$	7,37 $\pm 0,17$
125	18,9 $\pm 0,51$	61,1 $\pm 0,88$	39,4 $\pm 0,97$	33,7 $\pm 0,31$	56,7 $\pm 1,31$	13,4 $\pm 0,23$	28,9 $\pm 0,28$	37,9 $\pm 0,41$	16,8 $\pm 0,71$	4,59 $\pm 0,12$	28,4 $\pm 0,20$	7,0 $\pm 0,30$
	40,1 $\pm 1,30$	74,1 $\pm 2,82$	53,5 $\pm 0,46$	55,4 $\pm 0,82$	69,1 $\pm 0,97$	76,2 $\pm 7,16$	34,7 $\pm 0,16$	57,4 $\pm 2,34$	48,8 $\pm 4,20$	20,1 $\pm 0,13$	51,4 $\pm 1,74$	55,8 $\pm 4,80$
250												
500												

Analizando os resultados dos ensaios com *A. carbonarius* apresentados na tabela 17, é possível observar novamente um aumento da capacidade inibitória das CT-halogenadas conforme se aumenta o raio atômico do halogênio, assim como observado nos ensaios com *A. parasiticus*. Por outro lado, o mesmo efeito não pode ser observado na comparação das FIC-halogenadas.

#### 4.5.2 Bioensaio em Microplaca pelo Método Colorimétrico de Determinação da Concentração Inibitória Mínima

Os ensaios foram realizados para determinar as concentrações inibitórias mínimas (CIM) das fenetil-imino-chalconas e das chalconas-tiossemicarbazonas sintetizadas frente aos fungos leveduriformes *Candida spp.* e fungos dimorfos *Sporothrix spp.*

##### 4.5.2.1 *Candida spp.*

A Tabela 18 apresenta os valores de CIM em  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para os ensaios em placas de 96 poços contendo as espécies de *Candida* em meio RPMI 1640 com adição de resazurina após 48 horas de tratamento dos fungos. Como controles positivos foram utilizados os agentes antifúngicos Anfotericina B, Cetoconazol, Fluconazol e Itraconazol.

**Tabela 18.** Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) dos derivados das chalconas (FIC e CT) avaliados em bioensaio frente a *Candida spp.* colorimétrico em microplaca em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Composto	<i>C. albicans</i>	<i>C. auris</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. tropicalis</i>
<b>FIC-H</b>	S/A	S/A	S/A	S/A
<b>FIC-F</b>	S/A	S/A	S/A	S/A
<b>FIC-Cl</b>	3,90	S/A	S/A	125,00
<b>FIC-Br</b>	S/A	S/A	S/A	S/A
<b>CT-H</b>	S/A	S/A	3,90	S/A
<b>CT-F</b>	S/A	S/A	7,80	S/A
<b>CT-Cl</b>	S/A	S/A	7,80	S/A
<b>CT-Br</b>	S/A	S/A	3,90	S/A
<b>Anfotericina B</b>	0,12	*	0,25	0,25
<b>Cetoconazol</b>	0,12	*	1,00	2,00
<b>Fluconazol</b>	*	8,00	*	*
<b>Itraconazol</b>	2,00	*	2,00	16,00

\*: Antifúngico não testado nas cepas referenciadas. S/A: sem atividade sob o crescimento fúngico para a substância até a concentração de 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Os resultados obtidos para as fenetil-imino-chalconas indicam que apenas o derivado **FIC-Cl** apresentou capacidade de inibir o crescimento de *C. albicans* e *C. tropicalis* com CIMs iguais a 3,90 e 125,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente.

A cepa de *C. krusei* foi a única que apresentou expressiva suscetibilidade aos compostos da classe das CTs (**CT-H** e **CT-Br** com CIMs em 3,90  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e **CT-F** e **CT-Cl** em 7,80  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Apesar da espécie *C. albicans* continuar sendo a principal causadora de candidíase, é possível observar nos últimos anos um aumento significativo de infecções atribuídas a espécies de *Candida* não-albicans (CNA). Uma das possíveis causas para essa mudança epidemiológica está relacionada ao aumento da resistência de CNA aos fármacos antifúngicos. *C. krusei* se apresenta como uma espécie leveduriforme que habita a membrana mucosa de indivíduos saudáveis com potencial de causar infecções com risco de vida em pacientes imunocomprometidos, além de que pacientes com malignidade hematológica e aqueles que apresentam uso prolongado de profilaxia azólicas apresentam maiores riscos (JAMIU *et al.*, 2021).

#### 4.5.2.2 *Sporothrix spp.*

A Tabela 19 apresenta os valores de CIM em  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para os ensaios em placas de 96 poços contendo as espécies do gênero *Sporothrix* em meio RPMI 1640 após 48 horas de tratamento dos fungos. Como controles positivos foram utilizados os antifúngicos Itraconazol e Anfotericina B.

**Tabela 19.** Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) dos compostos derivados de chalconas (FIC e CT) frente aos fungos *Sporothrix spp.* em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Composto	<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. schenckii</i>	<i>Sporothrix spp.</i>
<b>FIC-H</b>	500,00	500,00	500,00
<b>FIC-F</b>	250,00	250,00	500,00
<b>FIC-Cl</b>	500,00	S/A	S/A
<b>FIC-Br</b>	S/A	S/A	S/A
<b>CT-H</b>	S/A	500,00	500,00
<b>CT-F</b>	500,00	S/A	250,00
<b>CT-Cl</b>	500,00	S/A	125,00
<b>CT-Br</b>	500,00	S/A	500,00
<b>Anfotericina B</b>	8,00	4,00	2,00
<b>Itraconazol</b>	2,00	8,00	8,00

S/A: sem atividade sob o crescimento fúngico para a substância até a concentração de 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Os resultados obtidos para as fenetil-imino-chalconas, com exceção do composto **FIC-Br**, indicaram atividade inibitória para o crescimento frente às cepas de *Sporothrix* aqui avaliadas com valores de CIMs entre 500,00 e 250,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Dentre os compostos chalconas-tiossemicarbazonas, o mais ativo foi o derivado **CT-Cl** que apresentou a melhor capacidade inibitória frente à cepa clínica de *Sporothrix spp.* com valor de CIM igual a 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A imino-chalcona **FIC-F** também apresentou atividade inibitória destacada quando comparada aos outros derivados frente às espécies *S. brasiliensis* e *S. schenckii* com valores de CIM iguais a 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

As colônias da cepa clínica identificada como pertencente ao complexo *Sporothrix spp.* possui uma maior probabilidade de pertencer à espécie *S. brasiliensis* uma vez que esta espécie é predominante na região sudeste do país, contudo não houve uma identificação molecular. Esta cepa foi obtida a partir da lesão grave de um felino e registrada na plataforma Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o código ADE44FF.

#### 4.6 Ensaio de Avaliação do Efeito Quelante

Os derivados das chalconas mais ativos (**FIC-Cl**, **CT-H**, **CT-F**, **CT-Cl** e **CT-Br**) frente aos fungos investigados foram avaliados quanto à atividade quelante com  $\text{Fe}^{+2}$ . Assim, foram realizadas análises quanto às suas possíveis capacidades de complexação,

através da espectroscopia UV/Vis, correlacionando-se com a inibição do crescimento e da proliferação dos fungos *Aspergillus spp.*, *Candida spp.* e *Sporothrix spp.*

Esses experimentos foram realizados porque estes fungos, assim como grande parte das espécies eucarióticas, apresentam ferro-dependência para diversas atividades bioquímicas oxirredutoras, tais como a biossíntese de aminoácidos, esteroides e nucleotídeos; seu envolvimento em mecanismos de desintoxicação por estresse oxidativo; em vias de metabolismo energético na fosforilação oxidativa e no ciclo do ácido cítrico; em processos de reparo e replicação de DNA; entre tantas outras funções vitais (MISSLINGER *et al.*, 2021; MARTÍNEZ-PASTOR & PUIG, 2020). Deste modo, um possível mecanismo de inibição das substâncias ativas poderia ser explicado pelas suas potenciais capacidades de quelar ferro.

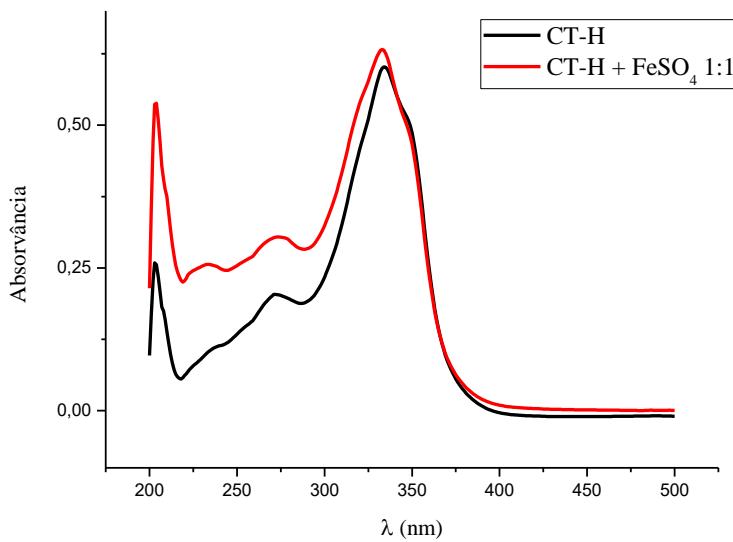
Para isso, a avaliação da capacidade de complexação foi realizada utilizando-se a técnica de espectroscopia, onde os espectros de UV/Vis foram obtidos na proporção 1:1 de soluções dos compostos derivados e  $\text{FeSO}_4$ , respectivamente. Após análise das melhores concentrações a serem usadas, os espectros de absorção foram obtidos na faixa de 200-500 nm. Em seguida, foi avaliado se houve formação de complexo com as soluções contendo os derivados escolhidos e íons  $\text{Fe}^{2+}$  ( $5,078 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ).

A Tabela 20 contém os valores de concentrações dos compostos FIC e CT mais adequadas para a avaliação da formação de seus complexos e suas capacidades quelantes percentuais com relação às soluções correspondentes na ausência de  $\text{Fe}^{2+}$  nos comprimentos de onda 298 e 325 nm (PAIVA, 2015).

**Tabela 20.** Concentrações das amostras dos derivados utilizadas no ensaio de avaliação do efeito quelante e suas respectivas capacidades quelantes frente a íons  $\text{Fe}^{2+}$ .

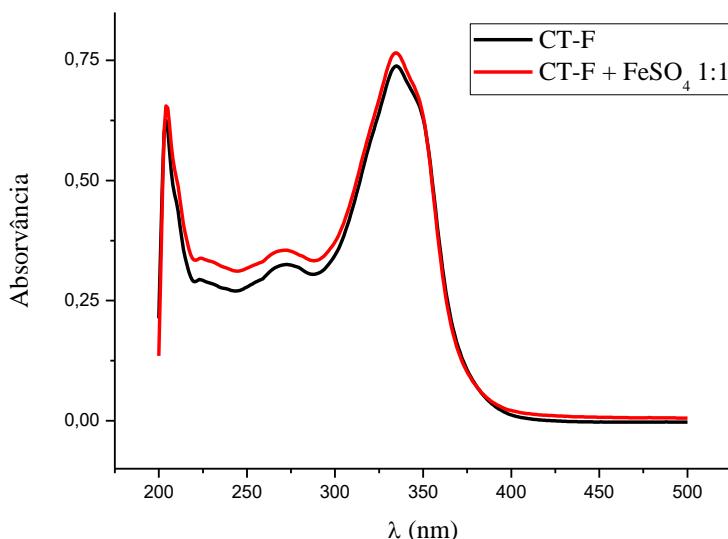
Amostra	Concentração ( $\text{mol L}^{-1}$ )	Capacidade quelante (%)	
		298 nm	325 nm
CT-H	$1,66 \times 10^{-5}$	40,77	12,97
CT-F	$2,33 \times 10^{-5}$	8,37	4,32
CT-Cl	$2,33 \times 10^{-5}$	-7,87	-10,93
CT-Br	$2,33 \times 10^{-5}$	48,10	26,51
FIC-Cl	$2,33 \times 10^{-5}$	3,57	5,99

A Figura 31 mostra a superposição dos espectros de UV-Vis do composto **CT-H** na ausência e na presença de  $\text{Fe}^{2+}$  na proporção 1:1, assim como os demais compostos avaliados neste experimento. O efeito hipocrômico na absorção em 298 nm indica que houve formação de complexo sendo o efeito quelante calculado em 40,77 %.



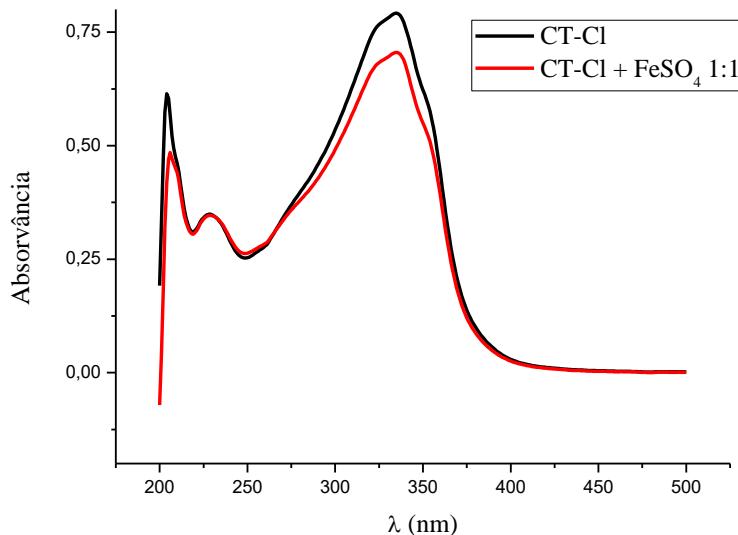
**Figura 31.** Espectro UV/Vis da substância **CT-H**. Para avaliação da atividade quelante do  $\text{Fe}^{2+}$  foi utilizada uma solução da chalcona-tiosemicarbazona não substituída (CT-H) em etanol ( $1,66 \times 10^{-5}$  mol L $^{-1}$ ) e de sulfato ferroso em água ( $5,078 \times 10^{-3}$  mol L $^{-1}$ ).

A Figura 32 mostra a superposição dos espectros de UV-Vis do composto **CT-F** na ausência e na presença de  $\text{Fe}^{2+}$ . O efeito hipocrômico na absorção em 298 nm indica que houve pequena formação de complexo, uma vez que o efeito quelante foi calculado em 8,37 %.



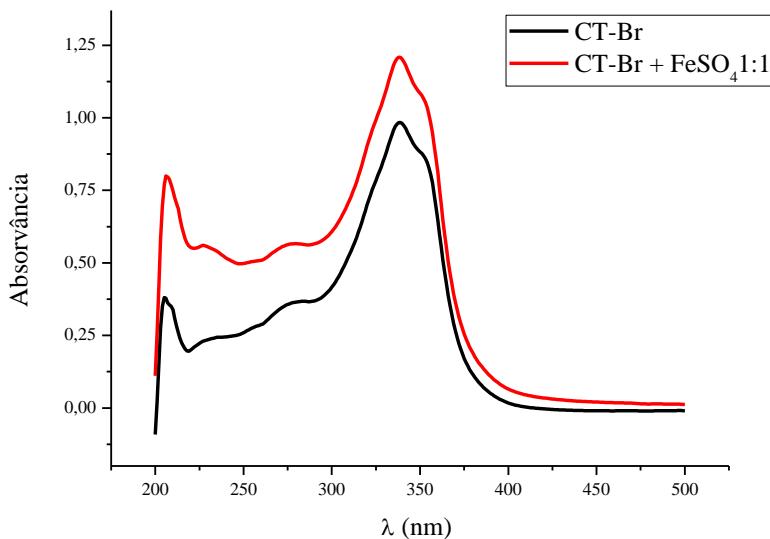
**Figura 32.** Espectro UV/Vis da substância **CT-F**. Para avaliação da atividade quelante do  $\text{Fe}^{2+}$  foi utilizada uma solução da 4-flúor-chalcona-tiosemicarbazona (**CT-F**) em etanol ( $2,33 \times 10^{-5}$  mol L $^{-1}$ ) e de sulfato ferroso em água ( $5,078 \times 10^{-3}$  mol L $^{-1}$ ).

A Figura 33 mostra a superposição dos espectros de UV-Vis do composto **CT-Cl** na ausência e na presença de  $\text{Fe}^{2+}$ . O efeito hipocrômico sob absorção em 325 nm indica que houve formação de complexo sendo o efeito quelante calculado em -10,93 %.



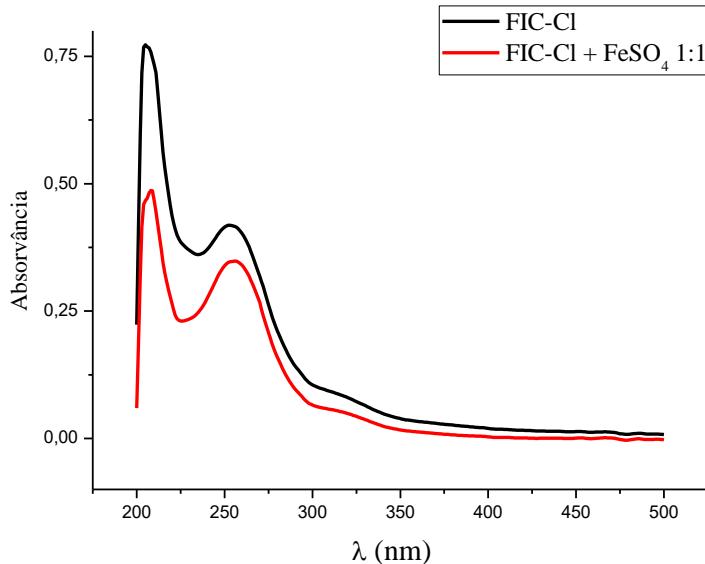
**Figura 33.** Espectro UV/Vis da substância **CT-Cl**. Para avaliação da atividade quelante do  $\text{Fe}^{2+}$  foi utilizada uma solução da 4-cloro-chalcona-tiossemicarbazona (**CT-Cl**) em etanol ( $2,33 \times 10^{-5}$  mol  $\text{L}^{-1}$ ) e de sulfato ferroso em água ( $5,078 \times 10^{-3}$  mol  $\text{L}^{-1}$ ).

A Figura 34 mostra a superposição dos espectros de UV-Vis do composto **CT-Br** na ausência e na presença de  $\text{Fe}^{2+}$ . O efeito hipercrômico sob absorção em 298 nm indicando que houve formação de complexo com efeito quelante calculado em 48,10 %.



**Figura 34.** Espectro UV/Vis da substância **CT-Br**. Para avaliação da atividade quelante do  $\text{Fe}^{2+}$  foi utilizada uma solução da 4-bromo-chalcona-tiossemicarbazona (**CT-Br**) em etanol ( $2,33 \times 10^{-5}$  mol L $^{-1}$ ) e de sulfato ferroso em água ( $5,078 \times 10^{-3}$  mol L $^{-1}$ ).

A Figura 35 mostra a superposição dos espectros de UV-Vis do composto **FIC-Cl** na ausência e na presença de  $\text{Fe}^{2+}$ . O efeito hipocrômico sob absorção em 325 nm indica que houve baixa formação de complexo com efeito quelante calculado em 5,99 %.



**Figura 35.** Espectro UV/Vis da substância **FIC-Cl**. Para avaliação da atividade quelante do  $\text{Fe}^{2+}$  foi utilizada uma solução da 4-cloro-fenetil-imino-chalcona (**FIC-Cl**) em etanol ( $2,33 \times 10^{-5}$  mol L $^{-1}$ ) e de sulfato ferroso em água ( $5,078 \times 10^{-3}$  mol L $^{-1}$ ).

Em um primeiro momento, os efeitos quelantes das substâncias da classe das chalconas-tiossemicarbazonas e da fenetil-imino-chalcona clorada aqui avaliados frente

aos íons  $\text{Fe}^{2+}$  puderam ser confirmados neste ensaio, sugerindo uma capacidade quelante frente aos íons de ferro não-heme, que por sua vez geralmente são encontrados em meio celular dos fungos e causam interações que podem interferir no funcionamento de enzimas-chave envolvidas em processos fundamentais ao metabolismo do organismo, conforme relatos da literatura (MISSLINGER *et al.*, 2021; MARTÍNEZ-PASTOR & PUIG, 2020). Além disso, os derivados **CT-Br**, **CT-H** e **FIC-Cl** foram os mais ativos nos ensaios com as espécies de *Candida spp.* e apresentaram os maiores efeitos sugerindo a complexação com os íons  $\text{Fe}^{2+}$ . Contudo, mais experimentos precisam ser realizados para poder correlacionar os efeitos dessas substâncias com a atividade antifúngica.

## 5 CONCLUSÃO

Os compostos com esqueletos chalcônicos compõem um dos melhores exemplos de grupos farmacofóricos na variedade de moléculas bioativas de origem natural, tanto quanto de origem sintética. Sendo assim, foram sintetizadas oito chalconas *p*-substituídas inicialmente para fazer uma seleção das mais promissoras com o intuito de sintetizar seus derivados híbridos chalconas-tiossemicarbazonas e imino-chalconas com possíveis capacidades antifúngicas. Assim, 4 chalconas apresentaram os melhores efeitos de inibição do crescimento fúngico frente aos fungos filamentosos *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus parasiticus*, sendo elas: **CH-H, CH-F, CH-Cl e CH-Br**. Desse modo, essas chalconas precursoras foram utilizadas para sintetizar os respectivos derivados fenetil-imino-chalconas e chalconas-tiossemicarbazonas.

Nos ensaios de inibição de crescimento radial pode-se ressaltar a maior suscetibilidade de inibição da espécie *A. parasiticus* em comparação com a espécie *A. carbonarius* em tratamentos com as três classes de compostos. Além disso, todos os derivados sintetizados apresentaram maior capacidade inibitória quando comparados com seus respectivos compostos precursores, destacando os compostos **CT-H** e **CT-F**, que apresentaram os melhores resultados frente a ambas as cepas fúngicas.

Os ensaios de determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foram direcionados para fungos clínicos e recorrentemente utilizados para avaliação de antimicrobianos. Com isso, os ensaios com espécies fúngicas dos gêneros *Candida* e *Sporothrix* indicaram que os compostos da classe das chalconas-tiossemicarbazonas foram mais ativos que os compostos da classe das fenetil-imino-chalconas.

Da avaliação de efeito quelante dos compostos CT e FIC, pode-se observar que a classe das chalconas-tiossemicarbazonas apresentaram as melhores capacidades em comparação com a fenetil-imino-chalcona clorada frente aos íons  $Fe^{2+}$ . Sugere-se que o grupamento tiossemicarbazona apresente uma maior capacidade quelante frente aos íons de ferro não-heme, uma vez que este grupo químico apresenta densidade eletrônica mais proeminente que o grupamento fenetil-amina, possibilitando mais interações intermoleculares.

Atualmente, a busca por substâncias com propriedades antifúngicas frente a espécies micotoxigênicas tem se apresentado como um campo de pesquisa de muito

interesse para países, principalmente como o Brasil, uma vez que além dos problemas de saúde pública decorrentes de intoxicação em humanos, ainda ocorrem impactos na produção agropecuária e na saúde animal que impactam também a economia e o bem-estar da população.

Por fim, espera-se que esses resultados possam auxiliar no desenvolvimento de novos agentes antifúngicos e tratamentos mais eficazes para o controle de fungos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALTUSSEN, T. H.; ZOLL, J.; VERWEIJ P. E.; MELCHERS W. J. G. Molecular Mechanisms of Conidial Germination in *Aspergillus spp.* *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 84, ed. 1, 2020.
- BARBOSA, R. P.; Da SILVA, R.; RODRIGUES, A. G.; RAMALHO, V. Aspergilose Pulmonar Invasiva Causada por *Aspergillus fumigatus*. *Revista Saúde em Foco*, n. 11, p. 463-467, 2019.
- BARRETO, A. S.; De OLIVEIRA, J.; Da SILVA, L. T.; RHODEN, S. A. Fungos, Diversidade e Prospecção no Brasil: Um Recurso Pouco Explorado?. *Revista Metodologias e Aprendizados*, v. 4, p. 164-168, 2021.
- BAYER AG. New Chemotherapeutic Thiosemicarbazones. Titular: Farbenfabriken Bayer Aktiengesellschaft. GB708013. Depósito: 06 de julho de 1951. Publicação: 28 de abril de 1954.
- BERMAN, J.; KRYSAN, D. J. Drug Resistance and Tolerance in Fungi. *Nature Reviews Microbiology*. 18, p. 319-331, 2020.
- CARLOS, M. F. L. P. Síntese e Avaliação da Atividade Anticorrosiva de  $\beta$ -Enaminoésteres e Iminochalconas Frente ao Aço Carbono AISI 1020 em Meio Ácido. Tese de Doutorado, PPGQ-UFRRJ, 2022.
- CARLOS, M. F. L. P.; VALBON, A.; XAVIER JÚNIOR, N. F.; SANTOS, M. R. L.; BAUERFELDT, G. F.; ECHEVARRIA, A. Avaliação teórica e experimental da atividade anticorrosiva de enaminoésteres frente ao aço-carbono em meio ácido. *Brazilian Journal of Development*, v. 7, n. 2, p. 17518-17533, 2021.
- CHACKO, A.; MOSS, R. B. Manifestations of Pulmonary Aspergillosis in Pediatrics. *Current Opinion in Pediatrics*, 32 (3), p. 389-394, 2020.
- CHAPHEKAR, S. S.; SAMANT, S. D. Novel Gel-Entrapped Base Catalysts for the Claisen-Schmidt Reaction. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79, p. 769-773, 2004.
- CONSTANTINESCU, T.; LUNGU, C. N. Anticancer Activity of Natural and Synthetic Chalcones. *Int. J. Mol. Sci.*, 22 (21), 11306, 2021.
- De ARAÚJO NETO, L. N.; De LIMA, M. C. A.; De OLIVEIRA, J. F.; De SOUZA, E. R.; BUONAFINA, M. D. S.; ANJOS, M. N. V.; BRAYNER, F. A.; ALVES, L. C.; NEVES, R. P.; MENDONÇA-JÚNIOR, F. J. B. Synthesis, Cytotoxicity and Antifungal Activity of 5-Nitro-Thiophene-Thiosemicarbazones derivatives. *Chemico-Biological Interactions*, 2017.
- De MELLO, M. V. P.; ABRAHIM-VIEIRA, B. A.; DOMINGOS, T. F. S.; DE JESUS, J. B.; DE SOUSA, A. C. C.; RODRIGUES, C. R.; DE SOUZA, A. M. T. A Comprehensive Review of Chalcone Derivatives as Antileishmanial Agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 150, p. 920-929, 2018.
- DIMOCK, J.R.; JONNALAGADDA, S.S.; HUSSEIN, S.; TEWARI, S.; QUAIL, J.W.; REID, R.S.; DELBAERE, L.T.J.; PRASAD, L. Evaluation of some thiosemicarbazones

and arylidene ketones and analogues for anticonvulsant activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 25, p. 581–588, 1990.

DUKARE, A.S.; PAUL, S.; NAMBI, V.E.; GUPTA, R.K.; SINGH, R.; SHARMA, K.; VISHWAKARMA, R.K. Exploitation of microbial antagonists for the control of postharvest diseases of fruits: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 59 (9), p. 1498-1513, 2018.

DU, H.; BING, J.; HU, T.; ENNIS, C. L.; NOBILE, C. J.; HUANG, G. *Candida auris*: Epidemiology, biology, antifungal resistance, and virulence. *Plos pathogens*, v. 16, ed. 10, 2020.

ELKANZI, N. A. A.; HRICHI, H.; ALOLAYAN, R. A.; DERAFA, W.; ZAHOU, F. M.; BAKR, R. B. Synthesis of Chalcones Derivatives and Their Biological Activities: A Review. *ACS Omega*, 7, v. 32, p. 27769-27786, 2022.

ESPINEL-INGROFF, A.; ABREU, D. P. B.; ALMEIDA-PAES, R.; BRILHANTE, R. S. N.; CHAKRABARTI, A.; CHOWDHARY, A.; HAGEN, F.; CÓRDOBA, S.; GONZALES, G. M.; GOVENDER, N. P.; GUARRO, J.; JOHNSON, E. M.; KIDD, S. E.; PEREIRA, S. A.; RODRIGUES, A. M.; ROZENTAL, S.; SCESCS, M. W.; BALLESTÉ ALANIZ, R.; BONIFAZ, A.; BONFIETTI, L. X.; BORBA-SANTOS, L. P.; CAPILLA, J.; COLOMBO, A. L.; DOLANDE, M.; ISLA, M. G.; MELHEM, M. S. C.; MESA-ARANGO, A. C.; OLIVEIRA, M. M. E.; PANIZO, M. M.; PIRES DE CAMARGO, Z.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; MEIS, J. F.; TURNIDGE, J. Multicenter, International Study of MIC/MEC Distributions for Definition of Epidemiological Cutoff Values for *Sporothrix* Species Identified by Molecular Methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 61, 10<sup>a</sup> ed., e01057-17, 2017.

GAONKAR, S. L.; VIGNESH, U. N. Synthesis and Pharmacological Properties of Chalcones: A Review. *Res. Chem. Intermed.*, v. 43, p. 6043-6077, 2017.

MUNKVOLD, G. P.; ARIAS, S.; TASCHL, I.; GRUBER-DORNINGER, C. Mycotoxins in Corn: Occurrence, Impacts, and Management. *Corn*, 3<sup>a</sup> ed., cap. 9, p. 235–287, 2019.

GEERSING, T. H.; FRANSSEN, E. J. F.; SPRONK, P. E.; VAN KAN, H. J. M.; DEN REIJER, M.; VAN DER VOORT, P. H. J. Nephrotoxicity of Continuous Amphotericin B in Critically ill Patients with Abdominal Sepsis: A Retrospective Analysis with Propensity Score Matching. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 77, 1<sup>a</sup> ed., p. 246-252, 2021.

GOULART, C. M. Síntese e Avaliação da Atividade Anticorrosiva de Tiossemicarbazonas, Chalconas-Tiossemicarbazonas e 1-Tiocarbamoil-4,5-Diidro-1H-Pirazóis. Tese de doutorado, PPGQ-UFRRJ (2015).

GUPTA, D.; JAIN, D. K. Chalcone Derivatives as Potential Antifungal agents: Synthesis, and Antifungal Activity. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, v. 6, 3<sup>a</sup> ed., p. 114-117, 2015.

GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; MONZÓN, A.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; CUENCA-ESTRELLA, M. Antifungal Susceptibility Profile *in vitro* of *Sporothrix schenckii* in two Growth Phases and by two Methods: Microdilution and E-test. *Mycoses*, v. 53, 3<sup>a</sup> ed., p. 227-231, 2010.

- HORIANOPOULOS, L. C.; KRONSTAD, J. Connecting Iron Regulation and Mitochondrial Function in *Cryptococcus neoformans*. *Current Opinion in Microbiology*, v. 52, p. 7-13, 2019.
- HUTCHINGS, M.I.; TRUMAN, A.W.; WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. *Curr Opin Microbiol.* 51:72-80. Epub 2019 Nov 13.
- ILKHECHI, N. N.; MOZAMMEL, M.; KHOSROUSHAH, A. Antifungal effects of ZnO, TiO<sub>2</sub> and ZnO-TiO<sub>2</sub> nanostructures on *Aspergillus flavus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 176, 104869, 2021.
- JAMIU, A. T.; ALBERTYN, J.; SEBOLAI, O. M.; POHL, C. H. Update on *Candida krusei*, a potential multidrug-resistant pathogen. *Medical Mycology*, v. 59, 1<sup>a</sup> ed., p. 14-30, 2021.
- JASIM, M. A.; NAHAR, L.; JASIM, M. A.; MOORE, S. A.; RITCHIE, K. J.; SARKER, S. D. Chalcones: Synthetic Chemistry Follows Where Nature Leads. *Biomolecules*, v. 11, nº 8, artigo 1203, 2021.
- JIN, X.; ZHANG, M.; LU, J.; DUAN, X.; CHEN, J.; LIU, Y.; CHANG, W.; LOU, H. Hinokitiol Chelates Intracellular Iron to Retard Fungal Growth by Disturbing Mitochondrial Respiration. *Journal of Advanced Research*, v. 34, p. 65-77, 2021.
- KAMALI, A.; MEHNI, S.; KAMALI, M.; SARVTIN, M. T. Detection of Ochratoxin A in Human Breast Milk in Jiroft City, South of Iran. *Current Medical Mycology*, 3 (3), p. 1-4, 2017.
- KAMLE, M.; MAHATO, D. K.; GUPTA, A.; PANDHI, S.; SHARMA, N.; SHARMA, B.; MISHRA, S.; ARORA, S.; SELVAKUMAR, R.; SAURABH, V.; DHAKANE-LAD, J.; KUMAR, M.; BARUA, S.; KUMAR, A.; GAMLAJATH, S.; KUMAR, P. Citrinin Mycotoxin Contamination in Food and Feed: Impact on Agriculture, Human Health, and Detection and Management Strategies. *Toxins*. V. 14, ed. 2, nº 85, 2022.
- KUBOTA, Y.; IKEYA, H.; SUGI, Y.; YAMADA, T.; TATSUMI, T. Organic-Inorganic Hybrid Catalysts Based on Oedered Porous Structures fo Michael Reaction. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 249, p. 181-190, 2006.
- KUMAR, S.; KUMAR, A.; ROUDBARY, M.; MOHAMMADI, R.; ČERNÁKOVÁ, L.; RODRIGUES, C.F. Overview on the Infections Related to Rare *Candida* Species. *Patógenos*, 11 (9) 963, 2022.
- KUMAR, S.; LAMBA, M. S.; MAKRANDI, J. K. An Efficient Green Procedure for the Synthesis of Chalcones Using C-200 as Solid Support Under Grinding Conditions. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 1 (2), p. 123-125, 2008.
- LAWRENCE, N. J.; RENNISON, D.; MCGOWN, A. T.; DUCKI, S.; GUL, L. A.; HADFIELD, J. A.; KHAN, N. Linked Parallel Synthesis and MTT Bioassay Screening of Substituted Chalcones. *Journal of Combinatorial Chemistry*, v. 3, n. 5, 2001.
- LEE, Y.; PUUMALA, E.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and beyond. *Chemical Reviews*, v. 121, p. 3390-3411, 2021.
- LEESON, P. Chemical Beauty Contest. *Nature*, v. 481, p. 455-456, 2012.

LIU, M.; SEIDEL, V.; KATERERE, D. R.; GRAY, A. I. Colorimetric Broth Microdilution Method for the Antifungal Screening of Plant Extracts Against Yeasts. *Methods*, v. 42, 325-329, 2007.

MAHDI, M. F.; RAAUF, A. M. R.; MOHAMMED, N. M. Synthesis, characterization, and preliminary pharmacological evaluation of new non-steroidal anti-inflammatory pyrazoline derivatives. *European Journal of Chemistry*, v. 6, nº. 4, p. 461-467, 2015.

MARIATH, I. R.; LIMA, I. O.; LIMA, E. O.; BATISTA, L. M. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Eugenia aromatica* B. contra fungos dematiáceos. *Revista Brasileira de Farmacologia*, v. 87, n. 3, p. 81 - 84, 2006.

MARTÍNEZ-PASTOR, M. T.; PUIG, S. Adaptation to Iron Deficiency in Human Pathogenic Fungi. *BBA – Molecular Cell Research*, v. 1867, 10<sup>a</sup> ed., artigo 118797, 2020.

MELLADO, M.; ESPINOZA, L.; MADRID, A.; MELLA, J.; CHÁVEZ-WELSSER, E.; DIAZ, K.; CUELLAR, M. Design, Synthesis, Antifungal Activity and Structure-Activity relationship Studies of Chalcones and Hybrid Dihydrochromane-Chalcones. *Molecular Diversity*, v. 24, 3<sup>a</sup> ed., p. 603-615, 2020.

MENDES, E. P.; GOULART, C. M.; CHAVES, O. A.; FAIÓES, V. S.; CANTO-CARVALHO, M. M.; MACHADO, G. C.; TORRES-SANTOS, E. C.; ECHEVARRIA, A. Evaluation of Novel Chalcone-Thiosemicarbazones Derivatives as Potential Anti-*Leishmania amazonensis* Agents and Its HSA Binding Studies. *Biomolecules*. v. 9, n. 11, 643. 2019.

MISSLINGER, M.; HORTCHANSKY, P.; BRAKHAGE, A. A.; HAAS, H. Fungal Iron Homeostasis with a Focus on *Aspergillus fumigatus*. *BBA – Molecular Cell Research*, v. 1868, 1<sup>a</sup> ed., 2021.

MODRZEWSKA, B.; KURNATOWSKI, P. Selected Pathogenic Characteristics of Fungi from the Genus *Candida*. *Annals of parasitology*, v. 59, ed. 2, p. 57-66, 2013.

MOREIRA, F. M.; LAGE, R. V. S.; COSTA, L. V.; BRANDÃO, M. L. L. Identificação de Fungos Filamentosos em Indústrias Farmacêuticas: uma revisão integrativa da literatura. *R. Científica UBM*, v. 24, n. 46, p. 124-144, 2022.

NAVA-PÉREZ, N.; NERI-GARCÍA, L.G.; ROMERO-GONZÁLEZ, O.E.; TERRONES-CRUZ, J.A., GARCÍA-CARNERO, L.C.; MORA-MONTES, H.M. Biological and Clinical Attributes of *Sporothrix globosa*, a Causative Agent of Sporotrichosis. *Infection and Drug Resistance*, v. 15, p. 2067-2090, 2022.

NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada—Segunda Edição. Norma M27-A2 do NCCLS (ISBN 1-56238-469-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002

NGUYEN, W.; GRIGORI, L.; JUST, E.; SANTOS, C.; SELEEM, D. The in vivo Anti-*Candida albicans* Activity of Flavonoids. *Journal of Oral Biosciences*, v. 63, p. 120-128, 2021.

NILSSON, R.H.; ANSLAN, S.; BAHRAM, M.; WURZBACHER, C.; BALDRIAN, P.; TEDERSOO, L. Mycobiome diversity: high-throughput sequencing and identification of fungi. *Nat Rev Microbiol*, 17(2):95-109, 2019.

- NISHIMOTO, A. T.; SHARMA, C.; ROGERS, P. D. Molecular and Genetic Basis of Azole Antifungal Resistance in the Opportunistic Pathogenic Fungus *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 75, 2<sup>a</sup> ed., p. 257-270, 2020.
- OLIVEIRA, R. B.; SOUZA-FAGUNDES, E. M.; SOARES, R. P. P.; ANDRADE, A. A.; KRETTLI, A. U.; ZANI, C. L. Synthesis and Antimalarial Activity of Semicarbazone and Thiosemicarbazone Derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 43, p. 1983-1988, 2008.
- OUYANG, Y.; LI, J.; CHEN, X.; FU, X.; SUN, S.; WU, Q. Chalcone Derivatives: Role in Anticancer Therapy. *Biomolecules*, v. 11, 894, 2021.
- PAIVA, R. O. Avaliação das Atividades Antifúngicas de Substâncias Sintéticas Frente a Fungos Micotoxigênicos de Interesse Agropecuário. Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação – Programa de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação Em Agropecuária, UFRRJ, 2013.
- PERRONE, G.; GALLO, A. *Aspergillus* Species and Their Associated Mycotoxins. *Mycotoxicogenic Fungi: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*, v. 1542, p. 33-49, 2017.
- RASHID, H. U.; XU, Y.; AHMAD, N.; MUHAMMAD, Y.; WANG, L. Promising Anti-Inflammatory Effects of Chalcones Via Inhibition of Cyclooxygenase, Prostaglandin E 2, Inducible NO Synthase and Nuclear Factor Kb Activities. *Bioorganic Chemistry*, v. 87, p. 335-365, 2019.
- REVIE, N. M.; IYER, K. R.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Antifungal Drug Resistance: Evolution, Mechanisms, and Impact. *Current Opinion in Microbiology*, 45, p. 70-75, 2018.
- ROCHA, W. R. V.; NUNES, L. E.; NEVES, M. L. R.; XIMENES, E. C. P. A.; ALBUQUERQUE, M. C. P. A. Gênero *Candida* – Fatores de virulência, Epidemiologia, Candidíase e Mecanismos de resistência. *Research, Society and Development*, v. 10 n. 4, p. 1 – 14, 2021.
- ROCHA, G. X. Síntese e Avaliação da Atividade Antifúngica de Isatina-aryl-tiossemicarbazonas. Dissertação de Mestrado, UFRRJ (2021).
- ROY, U.; KORNITZER, D. Heme-iron Acquisition in Fungi. *Current Opinion in Microbiology*, v. 52, p. 77-83, 2019.
- RUDRAPAL, M.; KHAN, J.; DUKHYIL, A. A. B.; ALAROUSY, R. M. I. I.; ATTAH, E. I.; SHARMA, T.; KHAIRNAR, S. J.; BENDALE, A. R. Chalcone Scaffolds, Bioprecursors of Flavonoids: Chemistry, Bioactivities and Pharmacokinetics. *Molecules*, 26, 7177, 2021.
- SANTOS, C. M. M.; SILVA, A. M. S. The Antioxidant Activity of Prenylflavonoids. *Molecules*, 25, 696, 2020.
- SANTOS, L. Síntese, Caracterização e Avaliação do Potencial Biológico de Derivados Obtidos a Partir de Chalconas. Tese de Doutorado, UFSC (2008).
- SCHRETTL, M.; BIGNELL, E.; KRAGL, C.; JOECHL, C.; ROGERS, T.; ARST Jr., H. N.; HAYNES, K.; HAAS, H. Siderophore Biosynthesis but Not Reductive Iron

Assimilation Is Essential for *Aspergillus fumigatus* Virulence. *Journal of Experimental Medicine*, v. 200, 9<sup>a</sup> ed., 2004.

SHAIK, A. B.; BHANDARE, R. R.; NISSANKARARAO, S.; EDIS, Z.; TANGIRALA, N. R.; SHAHANAAZ, S.; RAHMAN, M. M. Design, Facile Synthesis and Characterization of Dichloro Substituted Chalcones and Dihydropyrazole Derivatives for Their Antifungal, Antitubercular and Antiproliferative Activities. *Molecules*, 25, 3188, 2020.

SHUKLA, S.; SOOD, A. K.; GOYAL, K.; SINGH, A.; SHARMA, V.; GULIYA, N.; GULATI, S.; KUMAR, S. Chalcone Scaffolds as Anticancer Drugs: A Review on Molecular Insight in Action of Mechanisms and Anticancer Properties. *Anticancer Agents Medicinal Chemistry*. 21(13), p. 1650-1670, 2021.

SIL, A.; ANDRIANOPOULOS, A. Thermally Dimorphic Human Fungal Pathogens – Polyphyletic Pathogens with a Convergent Pathogenicity Trait. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 5, a019794, 2015.

SOARES, B. G.; SOUSA, N. A.; PIRES, D. X. *Química Orgânica: Teoria e Técnicas de Preparação, Purificação e Identificação de Compostos Orgânicos*, Editora Guanabara, 1988, Rio de Janeiro.

SONG, Y.; LI, S.; SHI, Y.; ZHAO, L.; CUI, Y.; YAO, L.; ZHEN, Y.; CHEN, R.; CUI, Y. In vitro antifungal susceptibility of *Sporothrix globosa* isolates from Jilin Province, northeastern China: comparison of yeast and mycelial phases. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52, p. 81-90, 2021.

SPALLONE, A.; SCHWARTZ, I. S. Emerging Fungal Infections. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 35, 2<sup>a</sup> ed., p. 261-277, 2021.

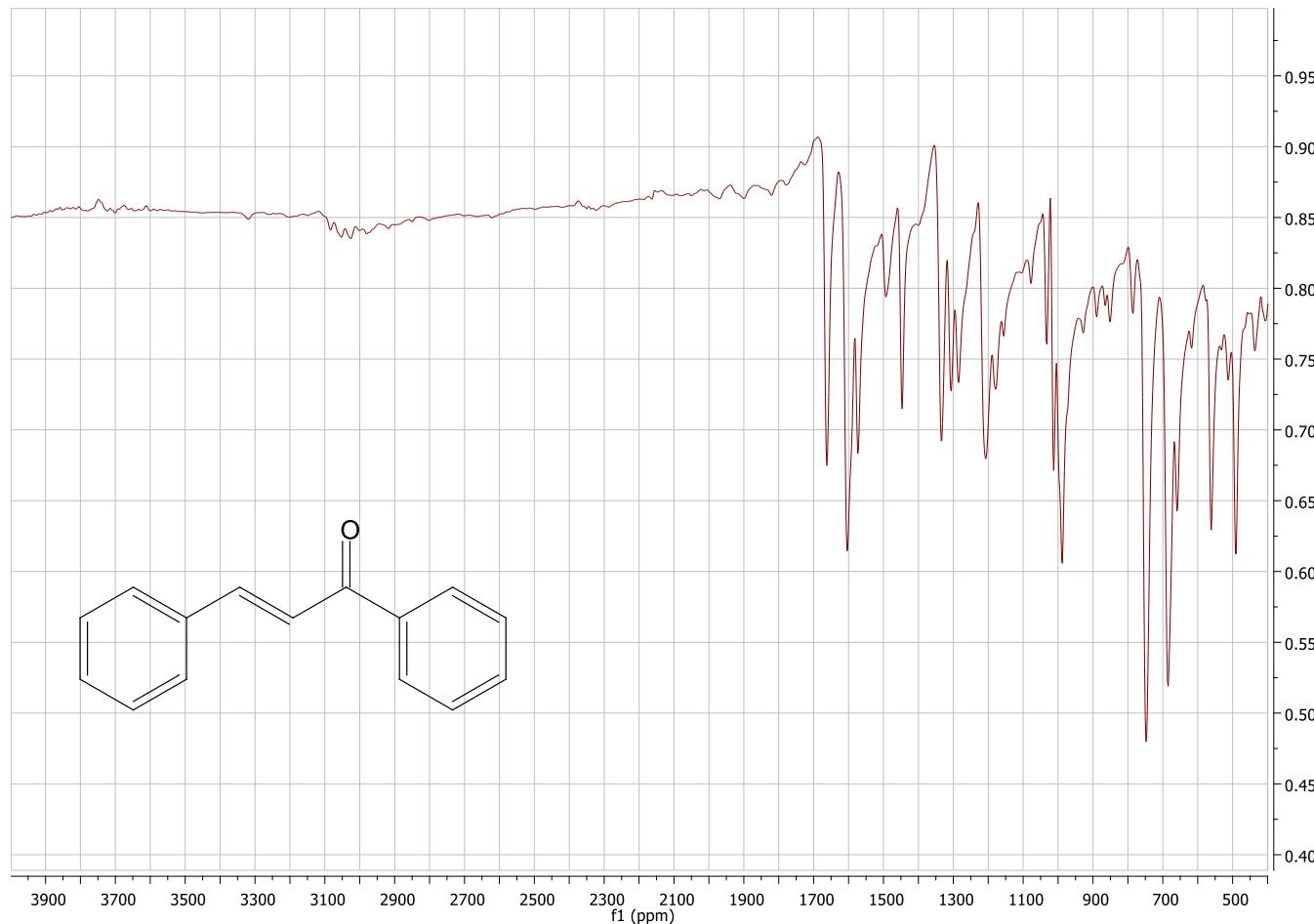
STROBA, A.; SCHAEFFER, F.; HINDIE, V.; LOPEZ-GARCIA, L.; ADRIAN, I.; FRÖHNER, W.; HARTMANN, R. W.; BIONDI, R. M.; ENGEL, M. 3,5-Diphenylpent-2-enoic Acids as Allosteric Activators of the Protein Kinase PDK1: Structure-Activity Relationships and Thermodynamic Characterization of Binding as Paradigms for PIF-Binding Pocket-Targeting Compounds. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52, p. 4683-4693, 2009.

UTHAYAKUMAR, D.; SHARMA, J.; WENSING, L.; SHAPIRO, R.S. CRISPR-Based Genetic Manipulation of *Candida* Species: Historical Perspectives and Current Approaches. *Frontiers in Genome Editing*. v. 2, artigo 606281, 2021.

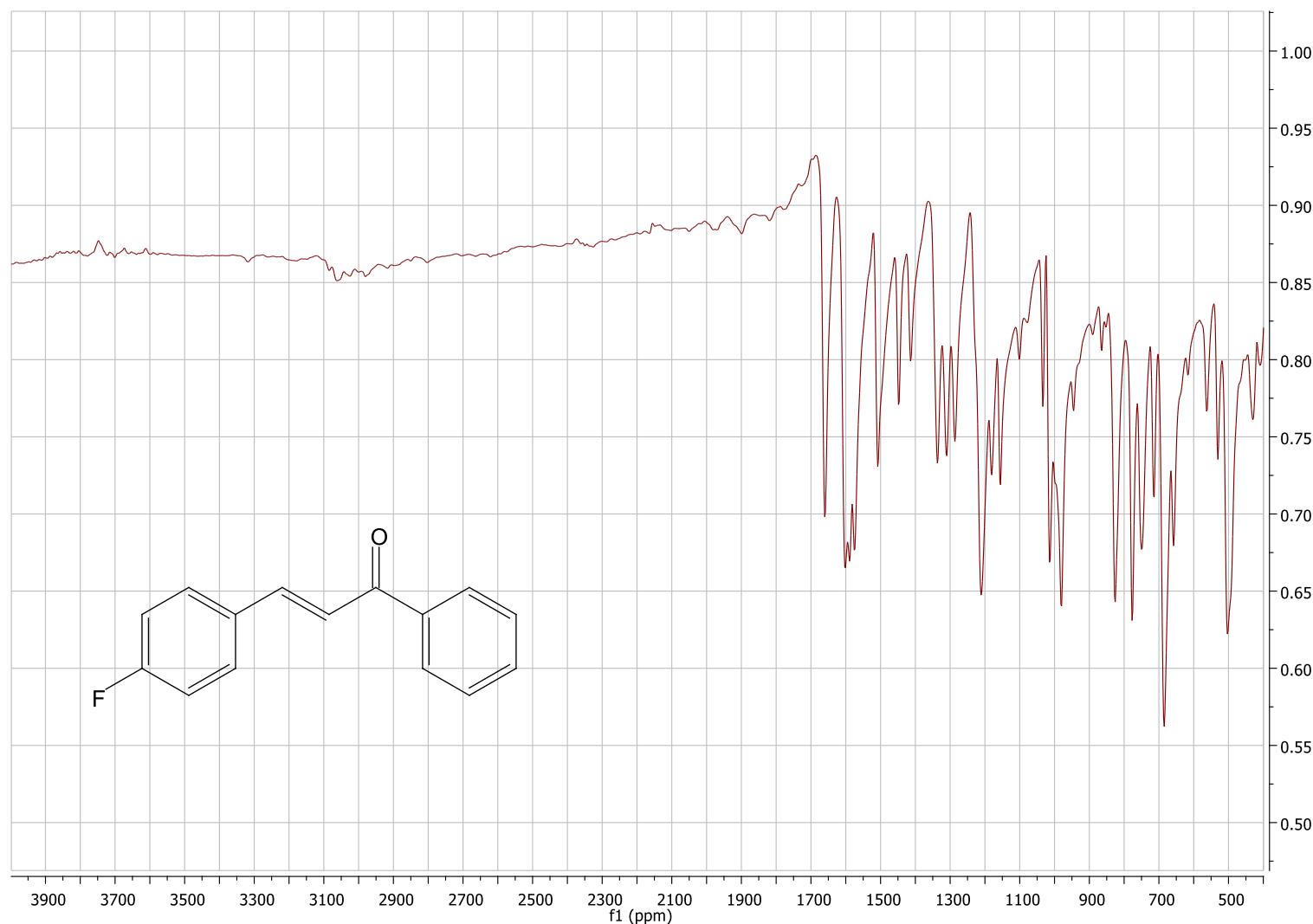
WALLER, S. B.; LANA, D. F. D.; QUATRIN, P. M.; FERREIRA, M. R. A.; FUENTEFRIA, A. M.; MEZZARI, A. Antifungal resistance on *Sporothrix* species: an overview. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 52, 1<sup>a</sup> ed., p. 73-80, 2021.

XU, M.; WU, P.; SHEN, F.; JI, J.; RAKESH, K. P. Chalcone Derivatives and Their Antibacterial Activities: Current Development. *Bioorganic Chemistry*. 91, 103133, 2019.

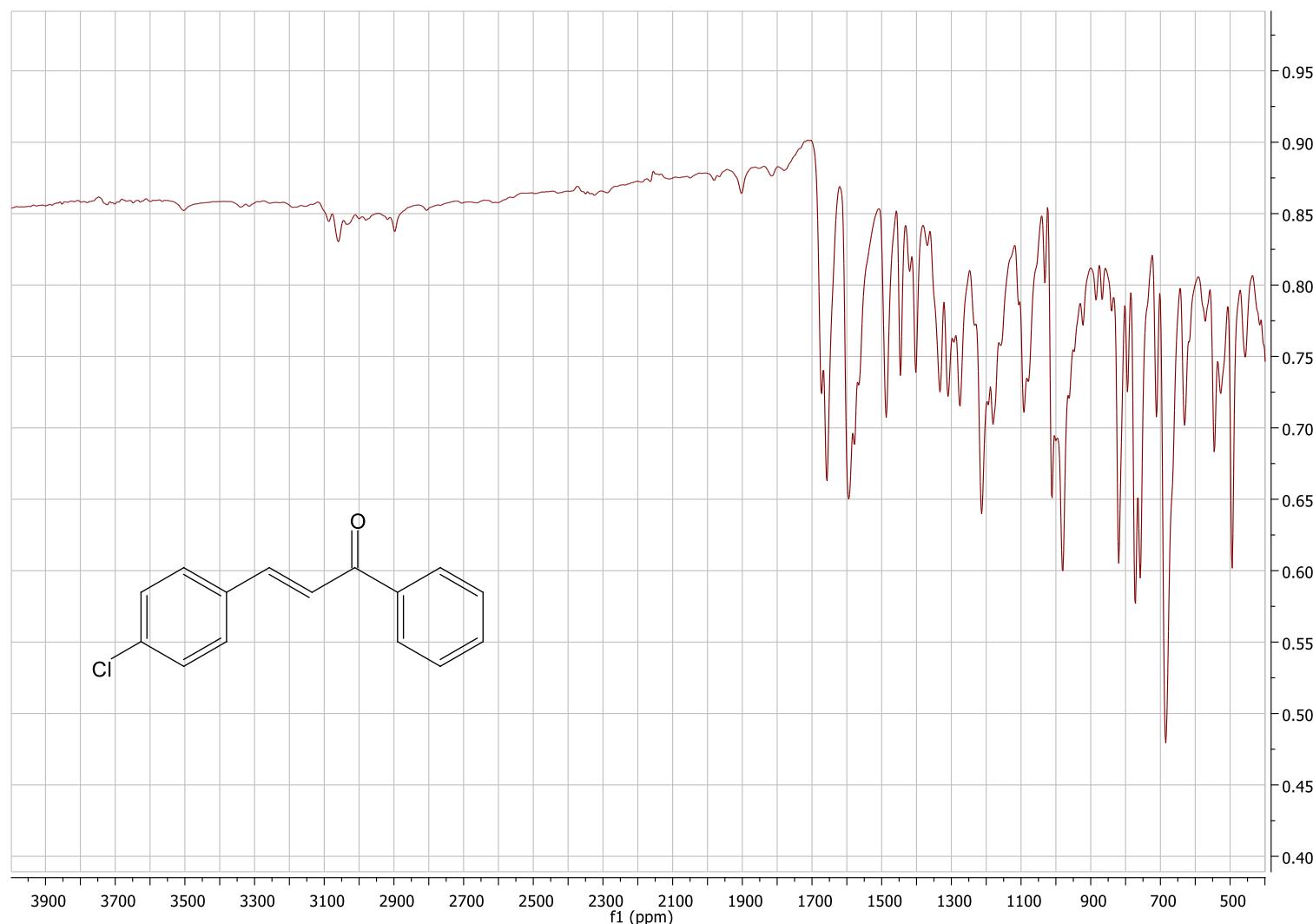
YANG, L.; WANG, Z. Advances in the Total Synthesis of Aflatoxins. *Frontiers in Chemistry*, 9: 779765, 2021.

**ANEXOS****Espectros de infravermelho dos compostos chalconas**

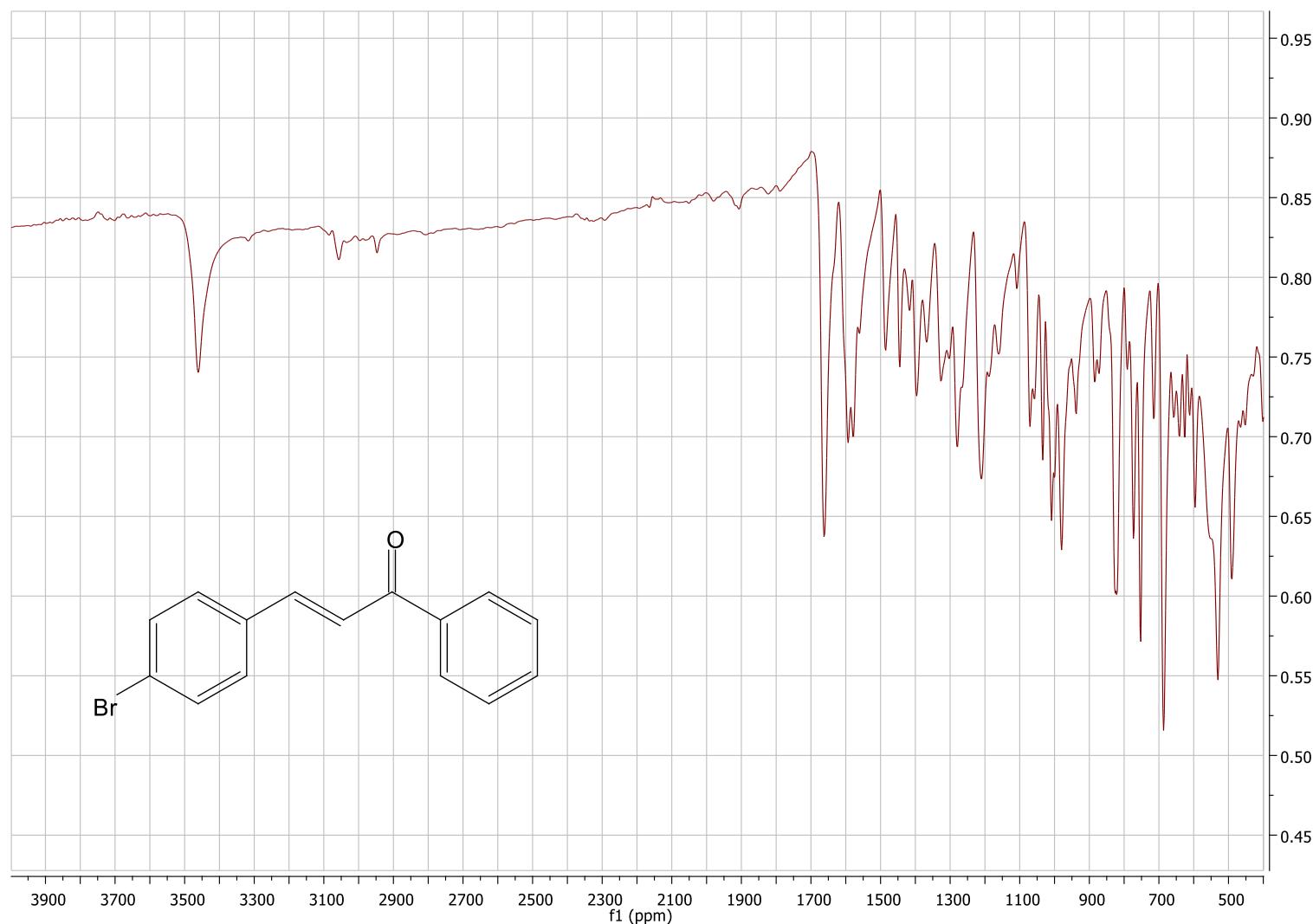
Espectro infravermelho da chalcona não substituída.



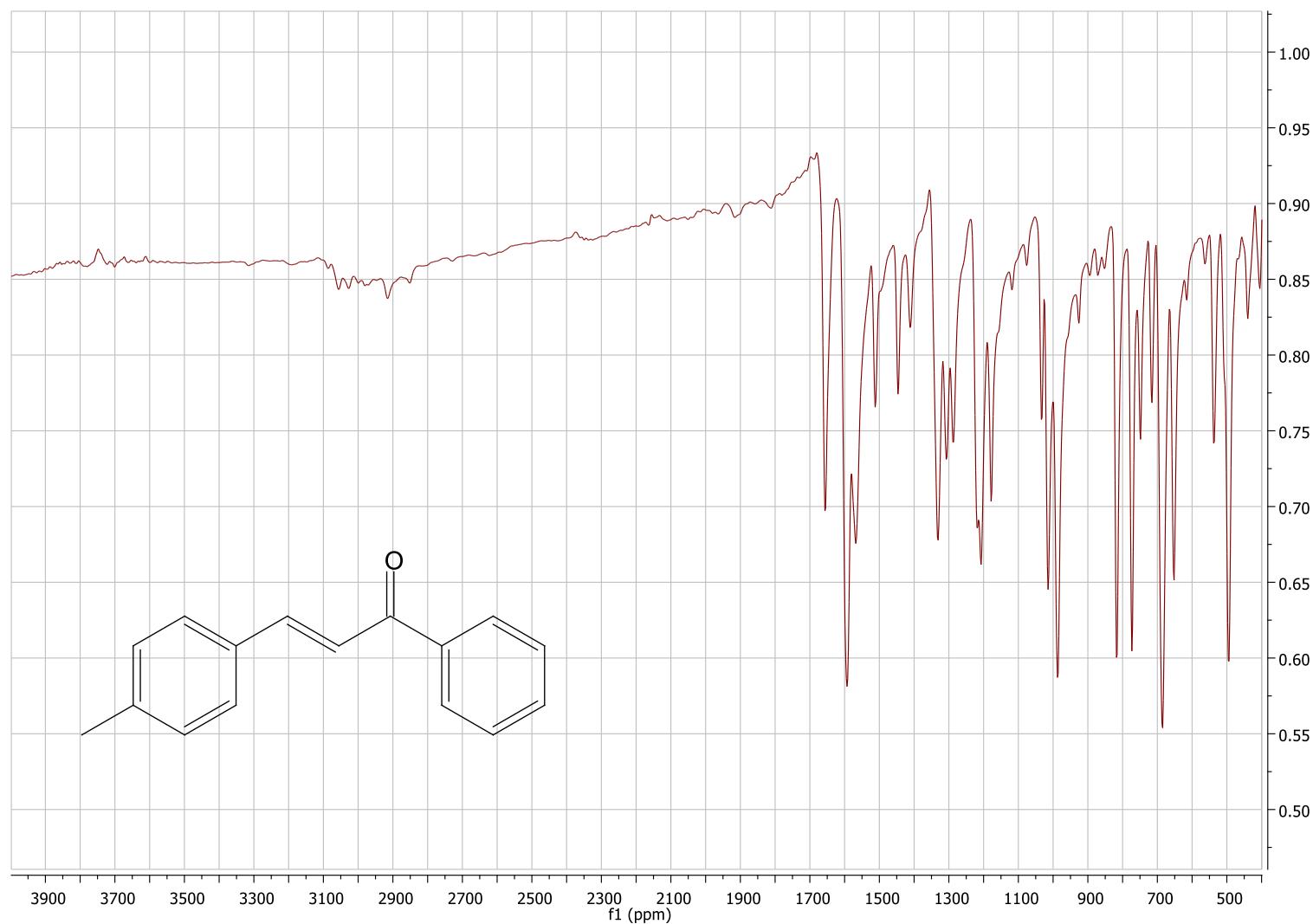
Espectro infravermelho da 4-flúor-chalcona.



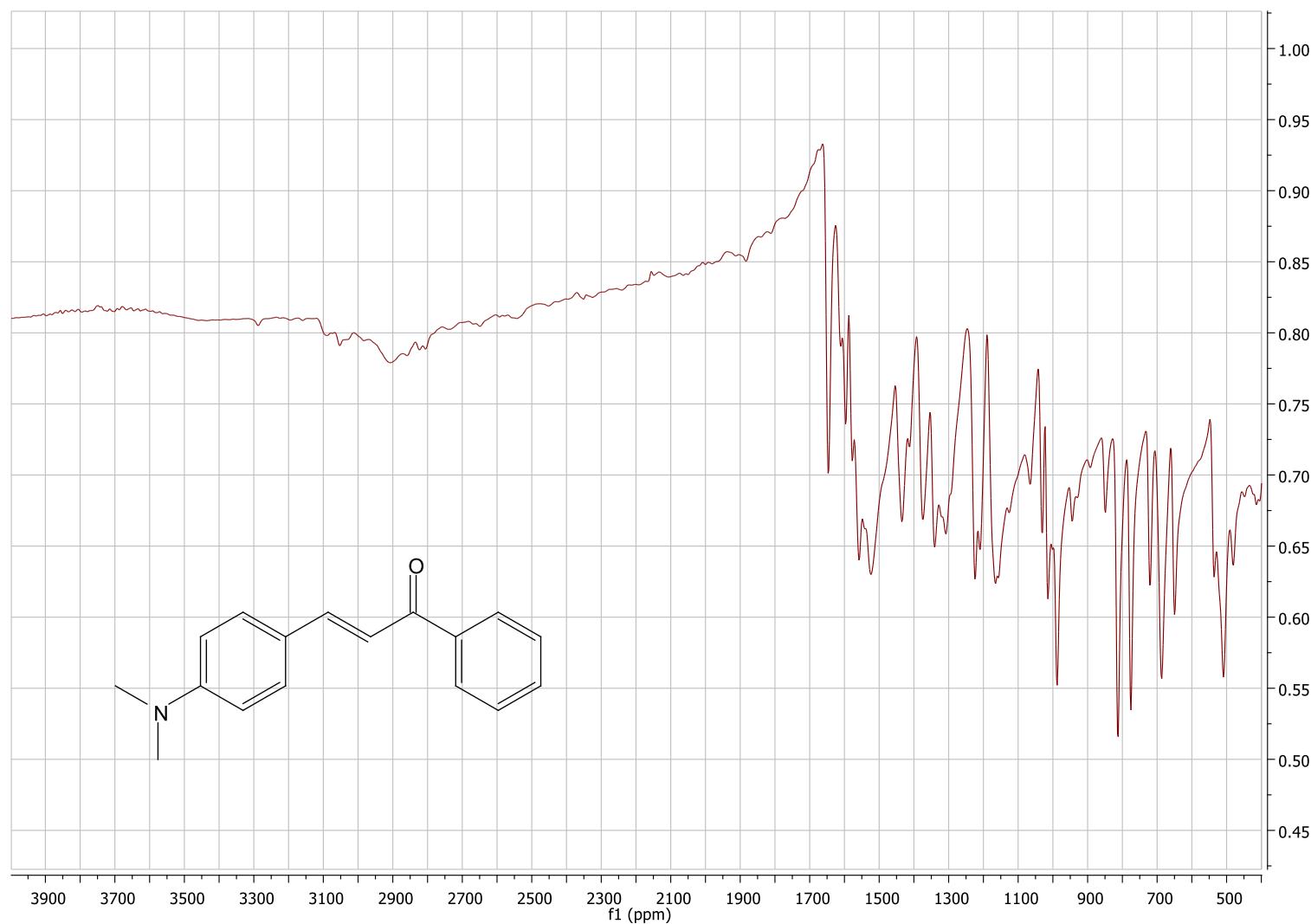
Espectro infravermelho da 4-cloro-chalcona.



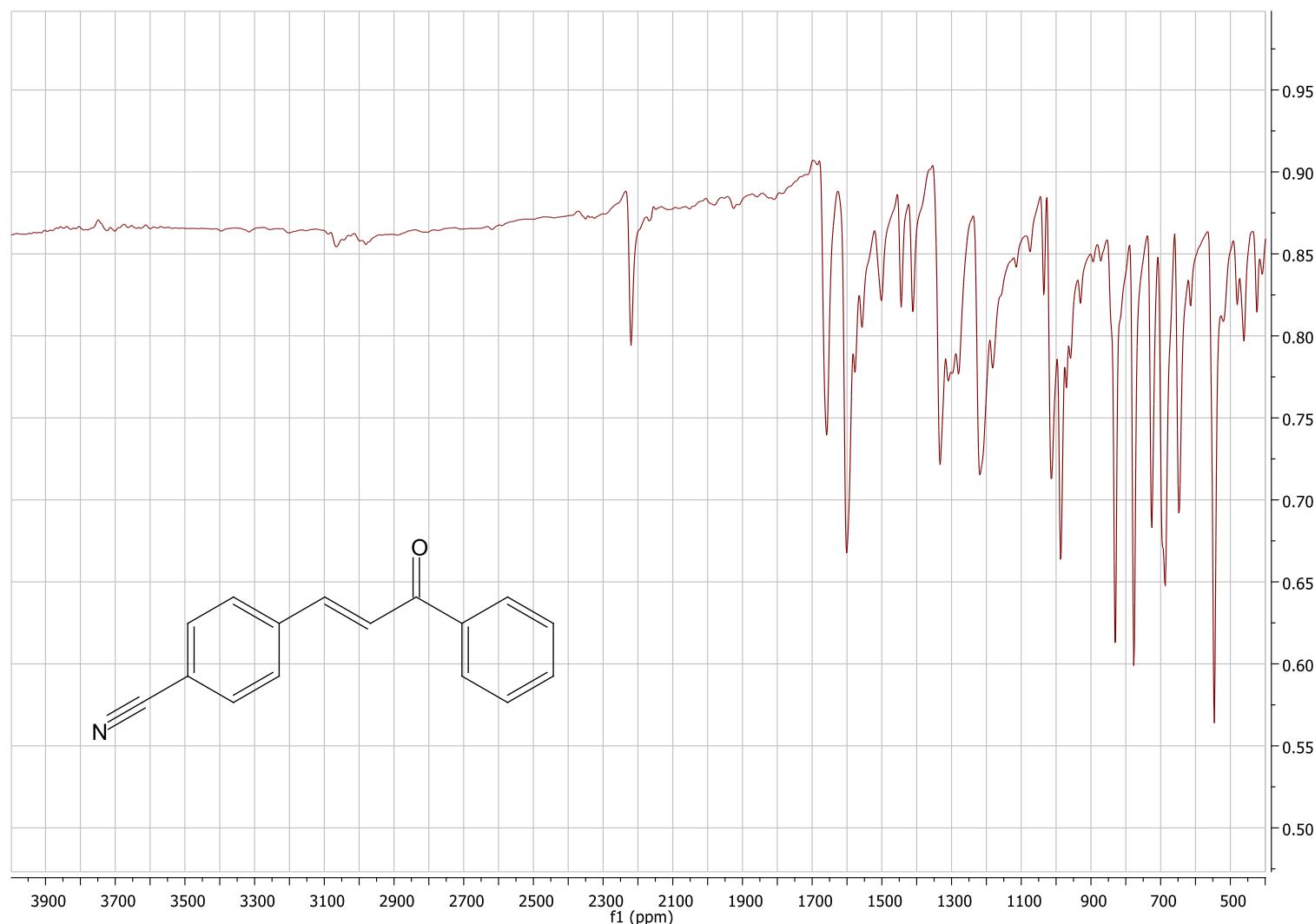
Espectro infravermelho da 4-bromo-chalcona.



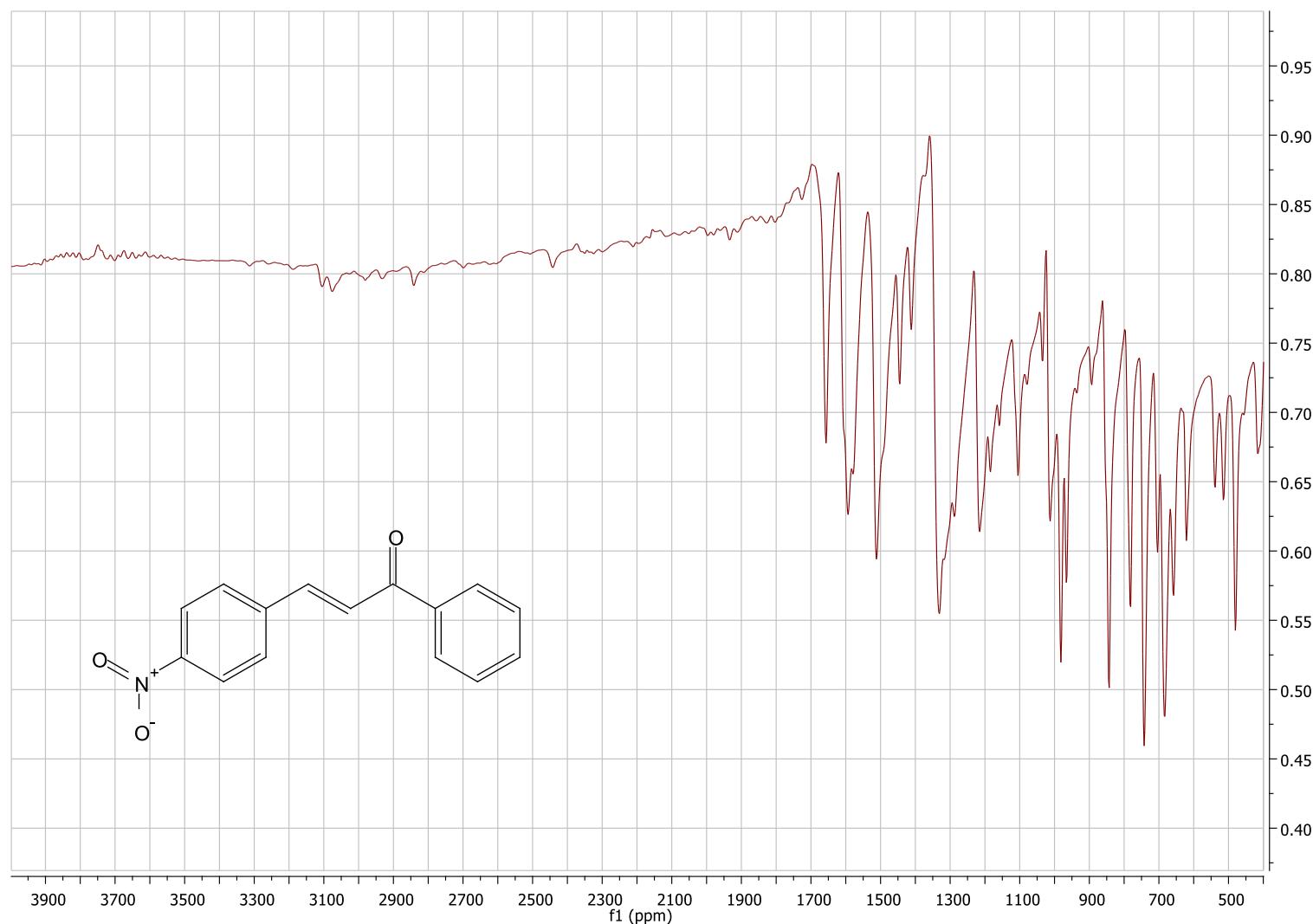
Espectro infravermelho da 4-metil-chalcona.



Espectro infravermelho da 4-dimetyl-amino-chalcona.

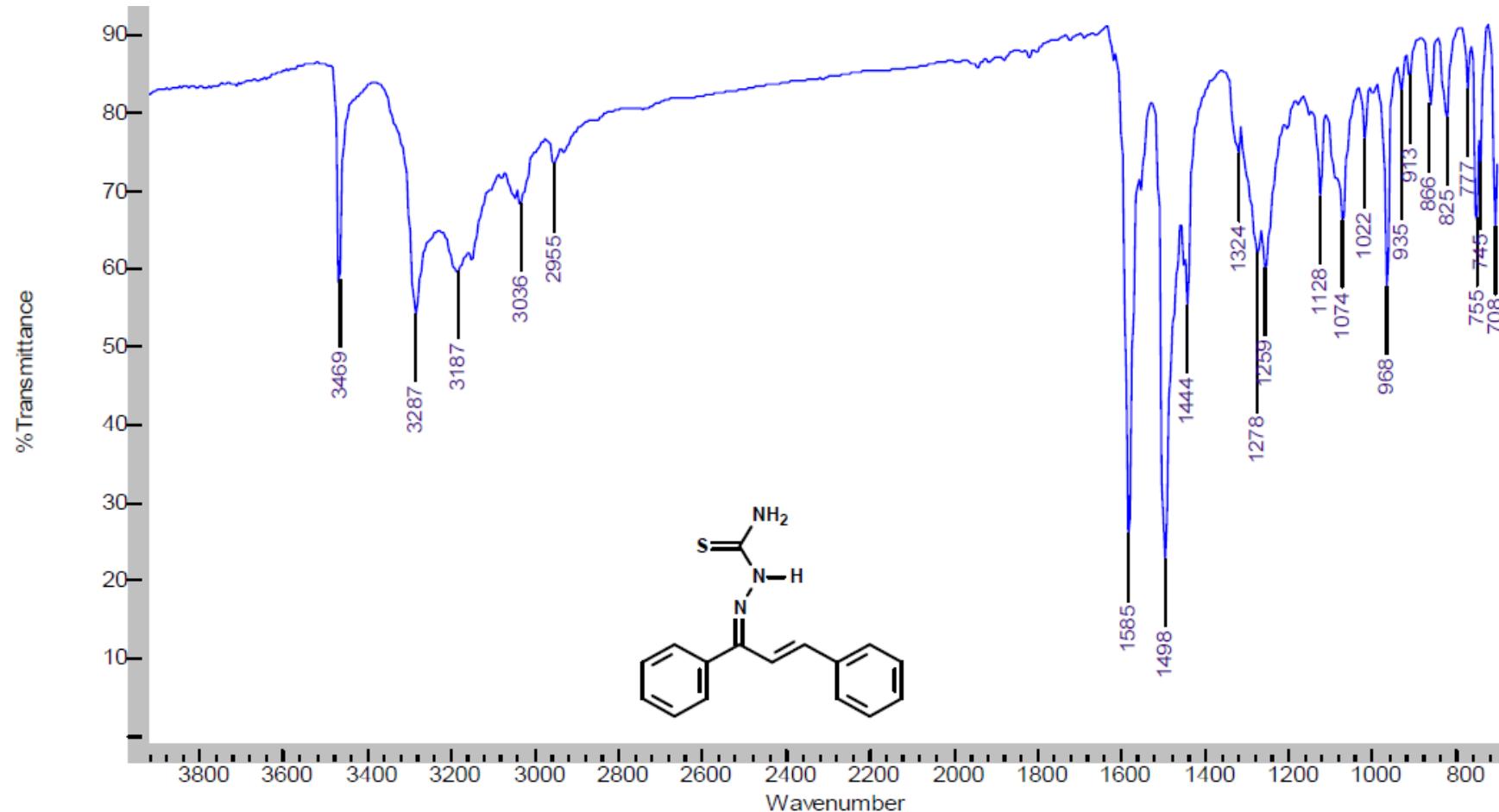


Espectro infravermelho da 4-ciano-chalcona.

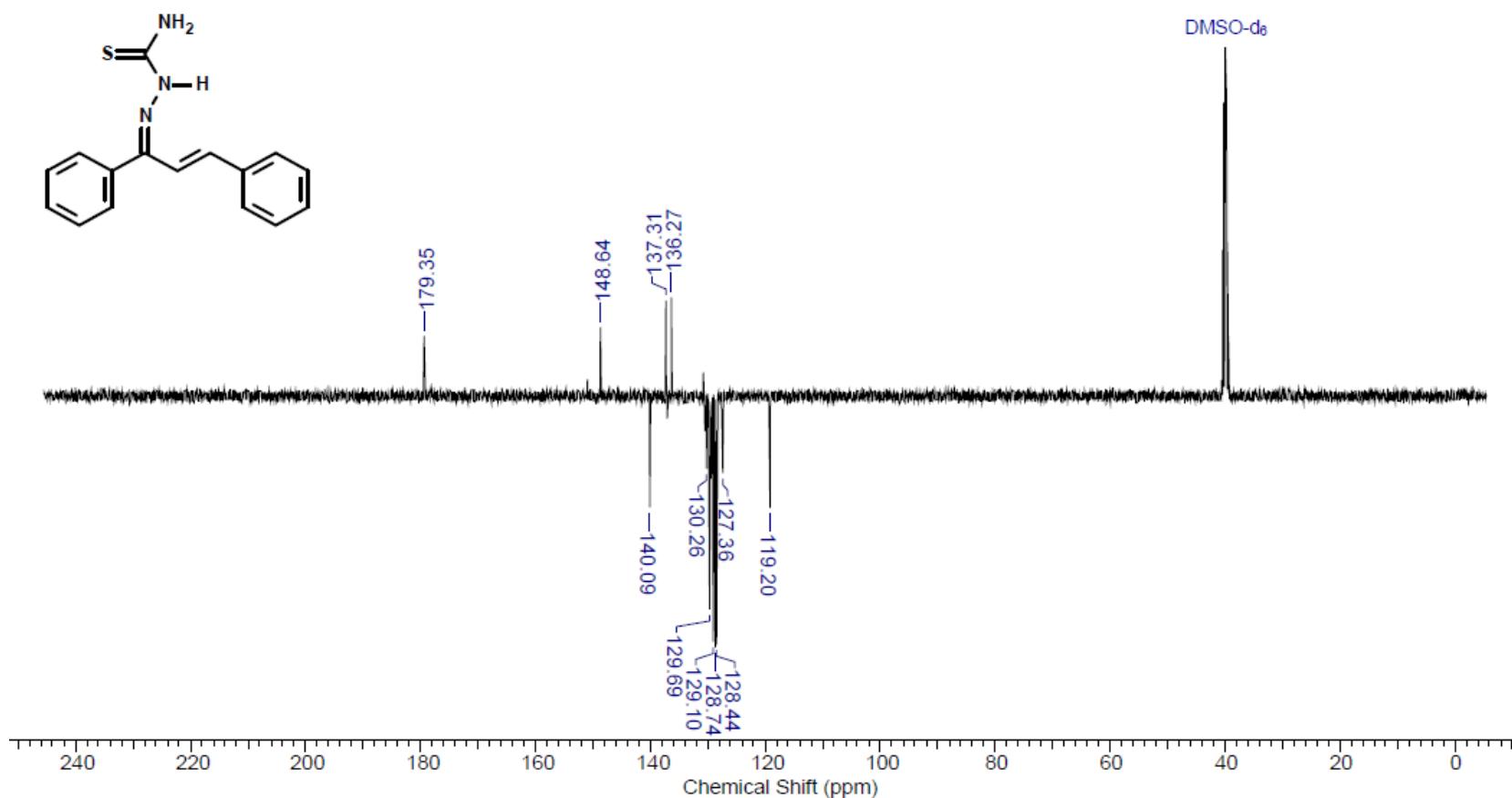


Espectro infravermelho da 4-nitro-chalcona.

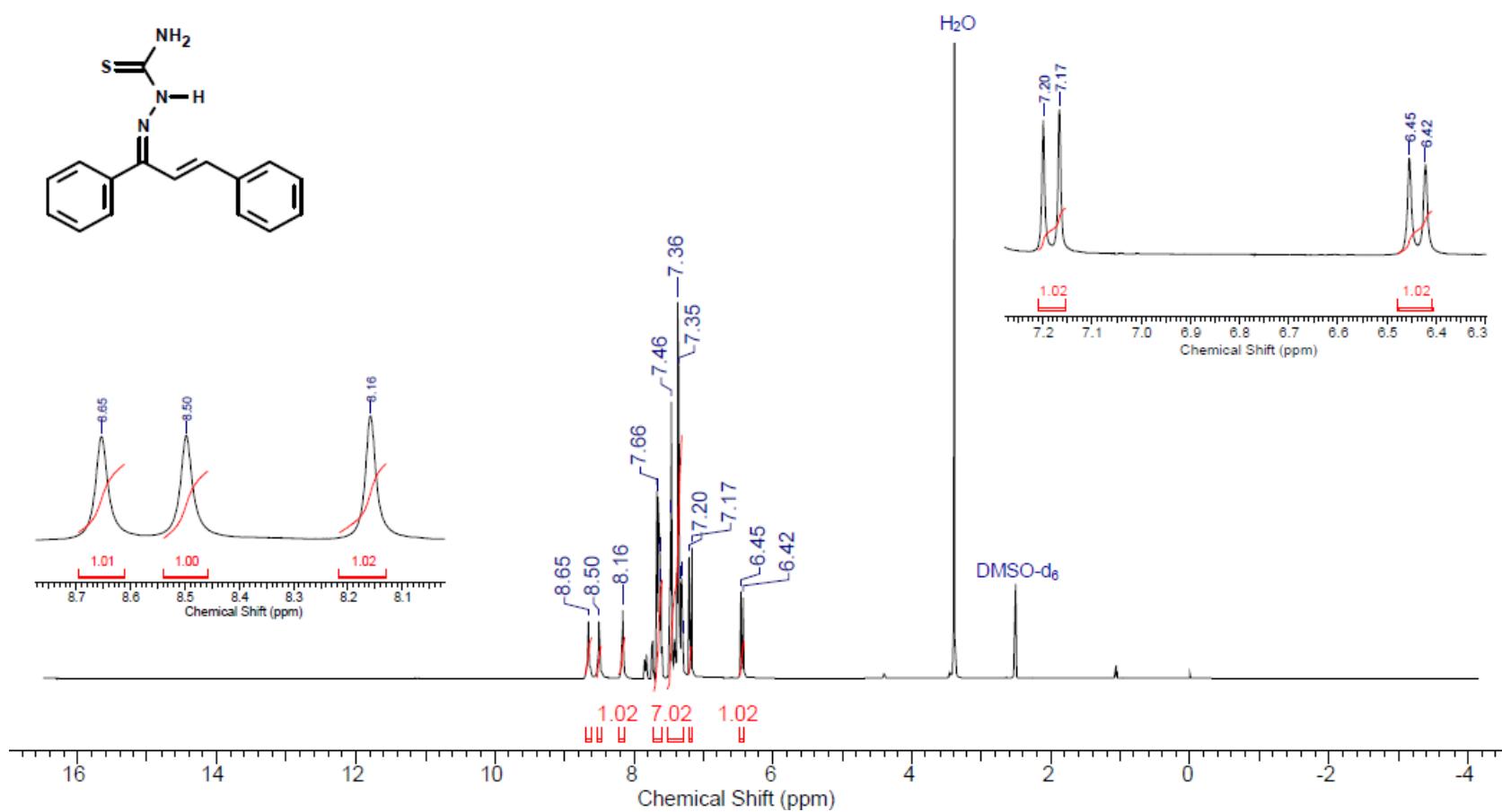
Espectros de I.V., DEPTQ/<sup>13</sup>C-RMN e <sup>1</sup>H-RMN dos compostos derivados



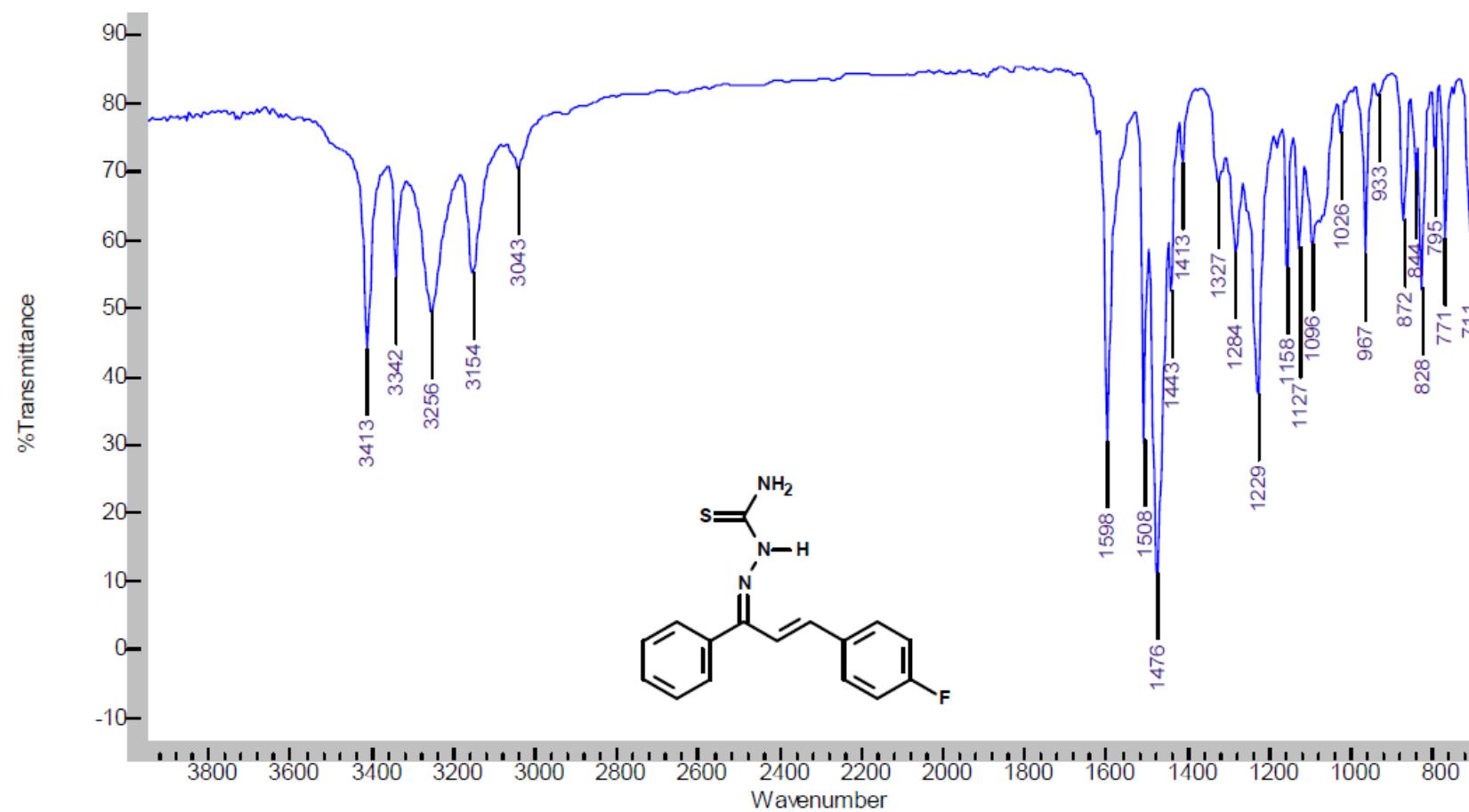
Espectro de infravermelho da chalcona-tiosemicarbazona. FONTE: GOULART, 2015.



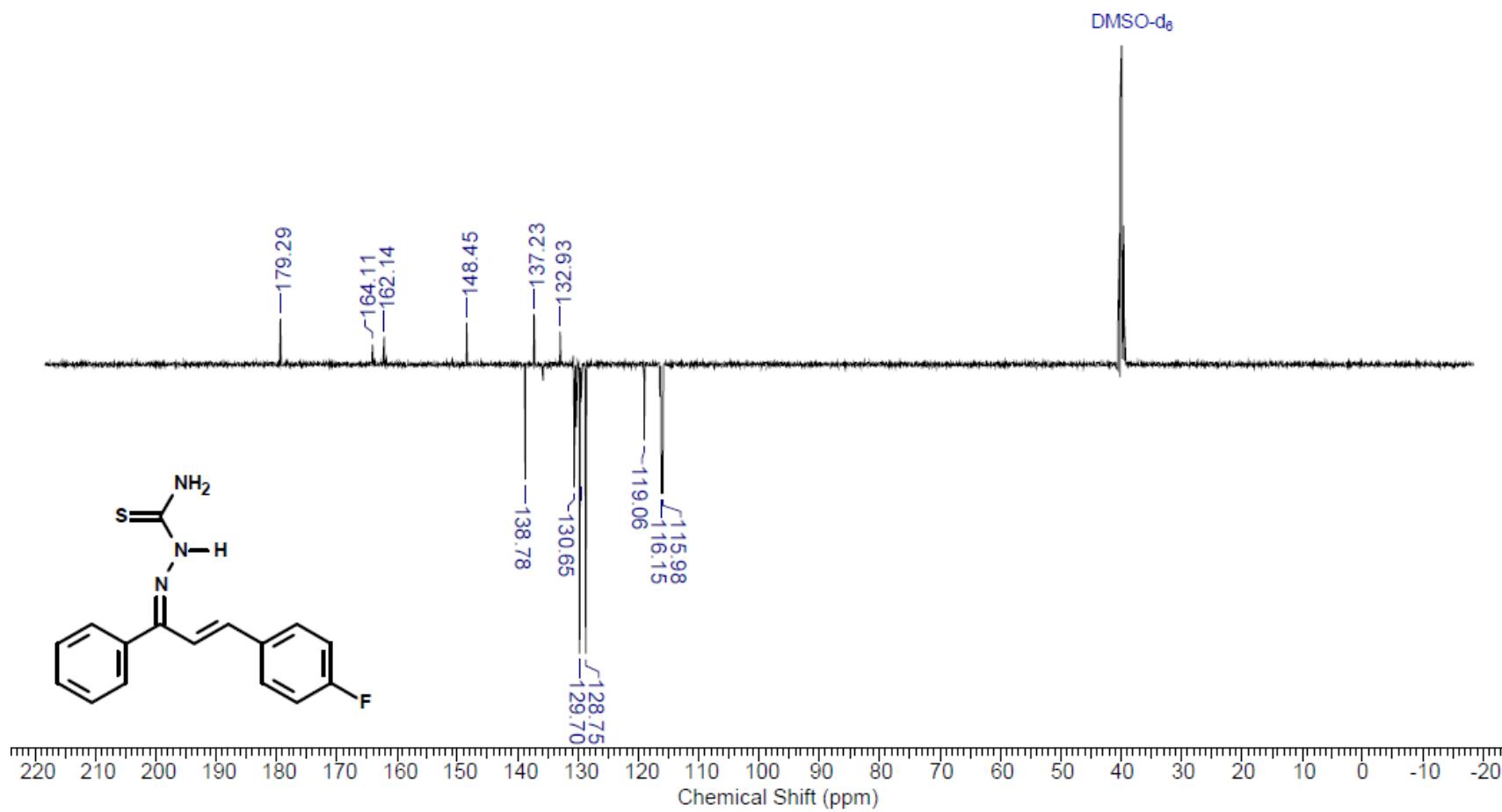
Espectro de DEPTQ da chalcona-tiosemicarbazona. FONTE: GOULART, 2015.



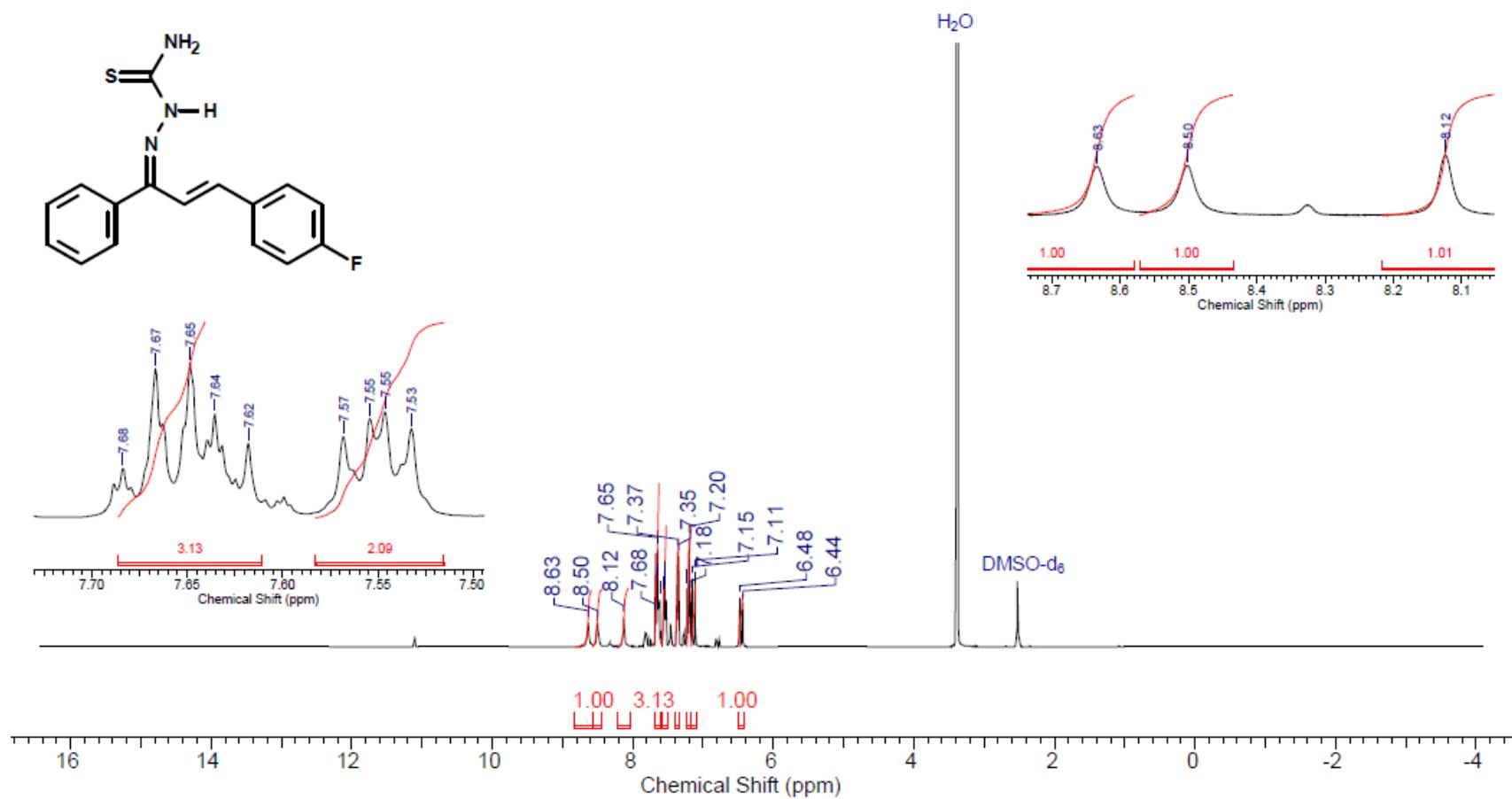
Especro de  $^1\text{H}$ -RMN da chalcona-tiosemicarbazona. FONTE: GOULART, 2015.



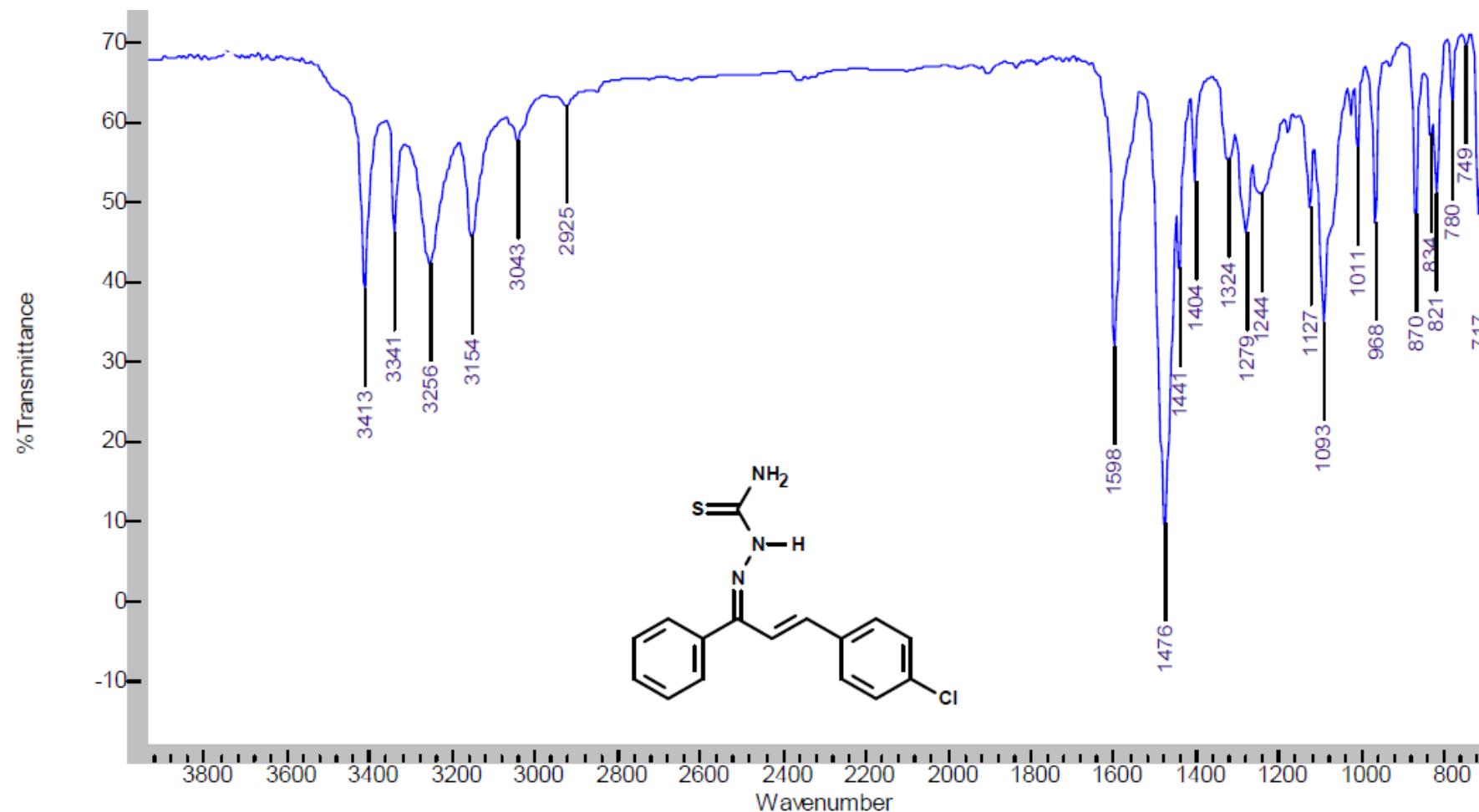
Espectro de infravermelho da 4-flúor-chalcona-tiosemicarbazona. FONTE: GOULART, 2015.



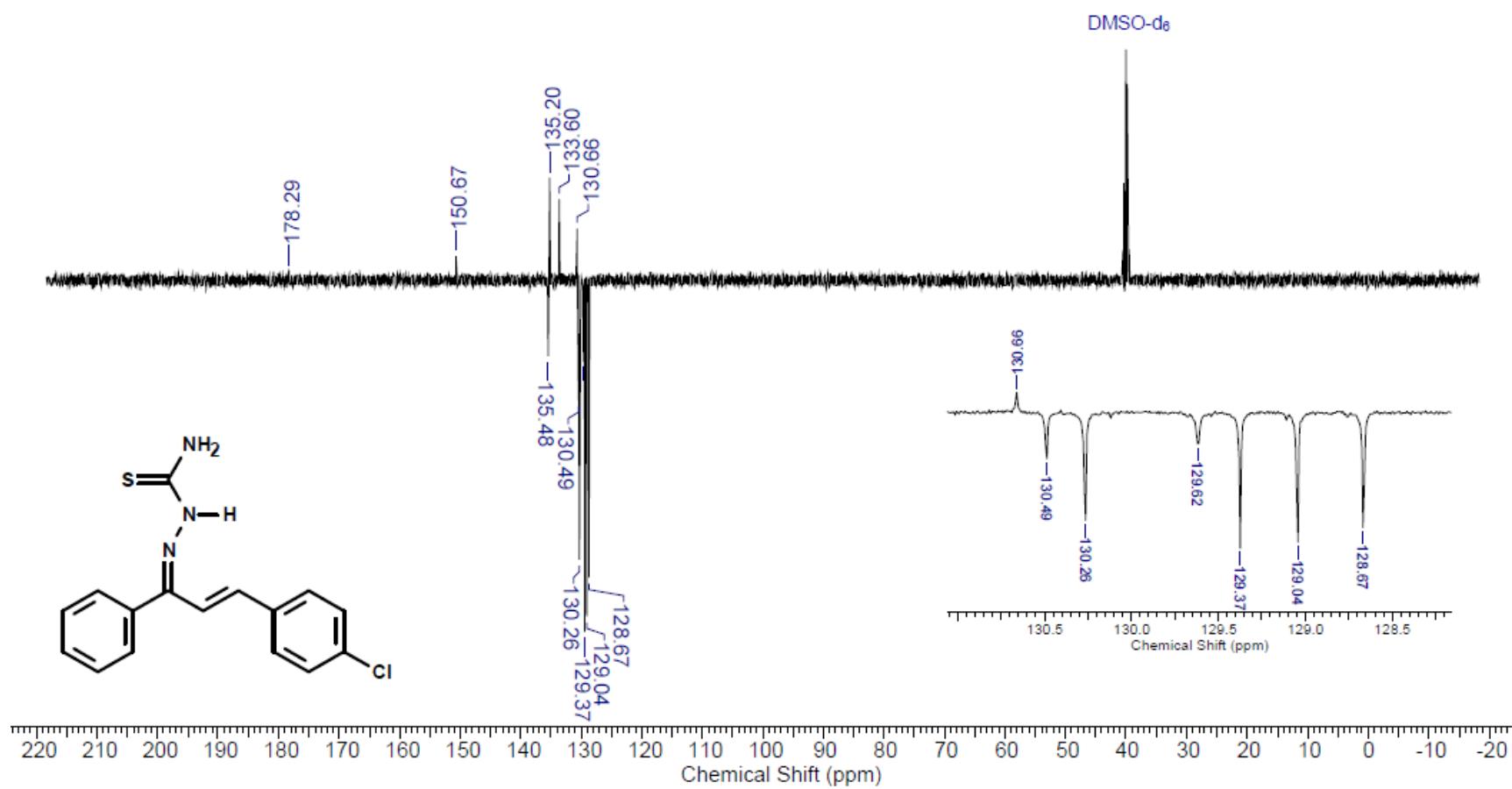
Espectro de DEPTQ da 4-flúor-chalcona-tiosemicarbazona. FONTE: GOULART, 2015.



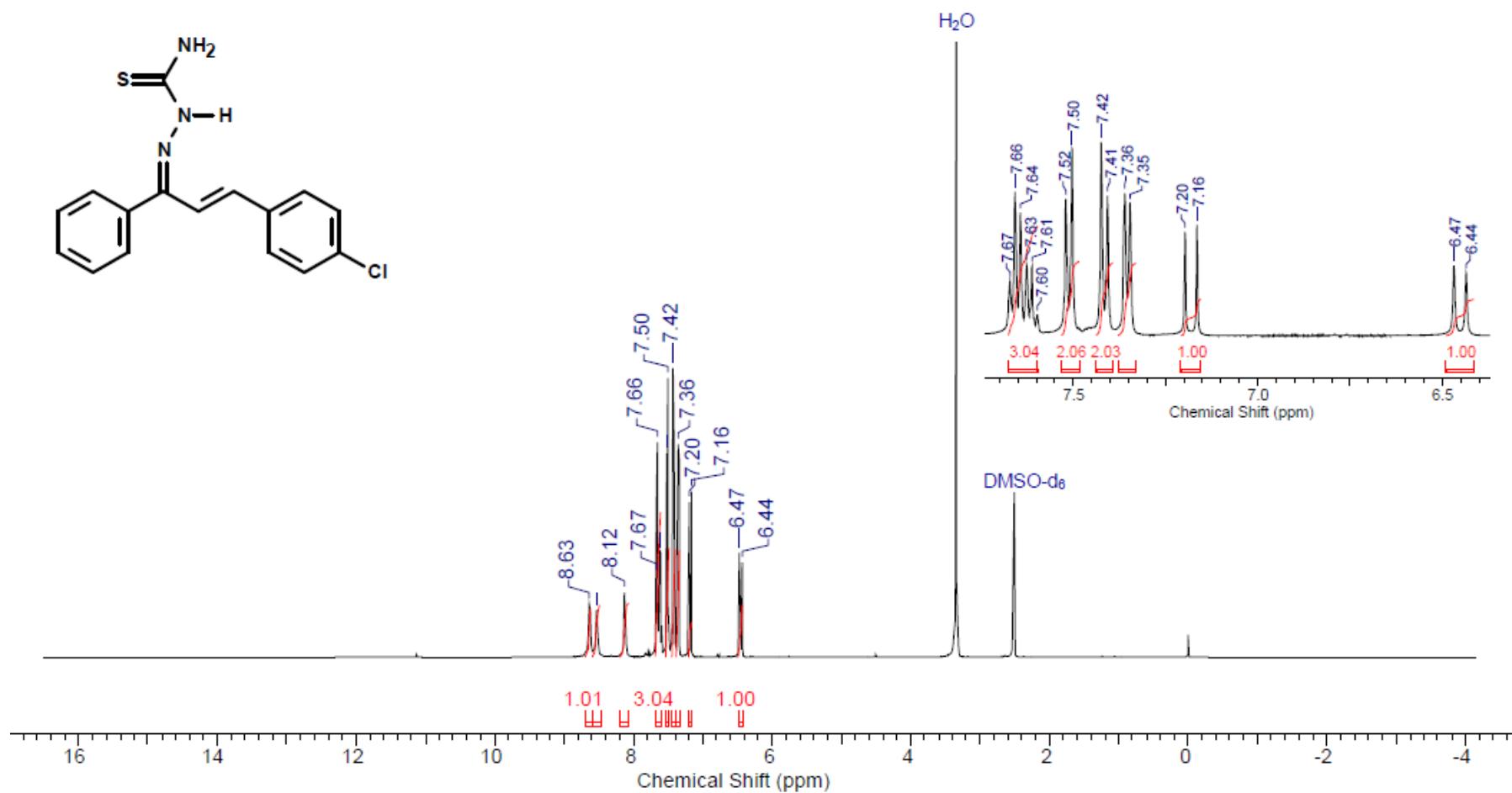
Especro de  $^1\text{H}$ -RMN da 4-flúor-chalcona-tiosemicarbazona. FONTE: GOULART, 2015.



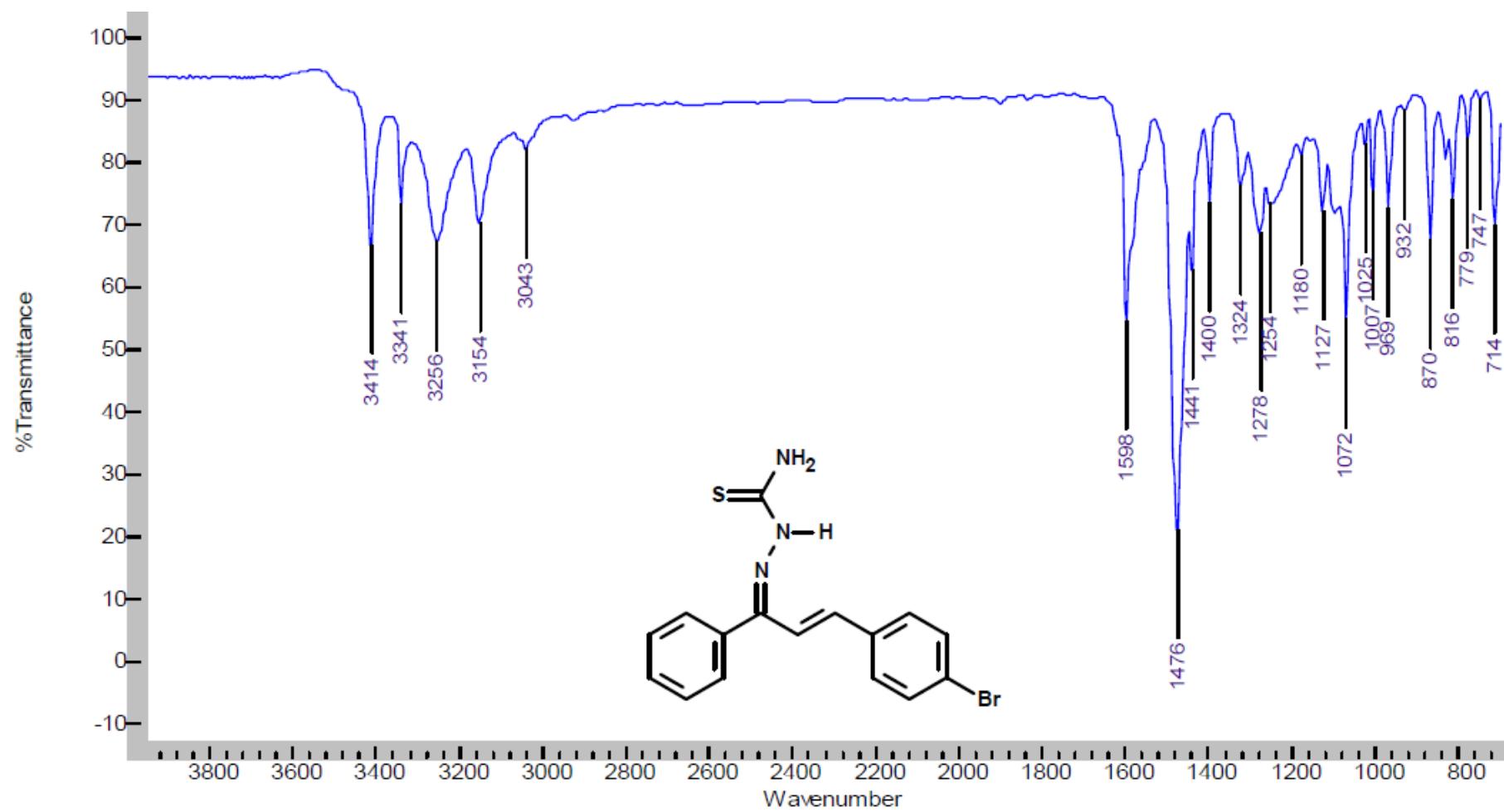
Espectro de infravermelho da 4-cloro-chalcona-tiosemicarbazona. FONTE: GOULART, 2015



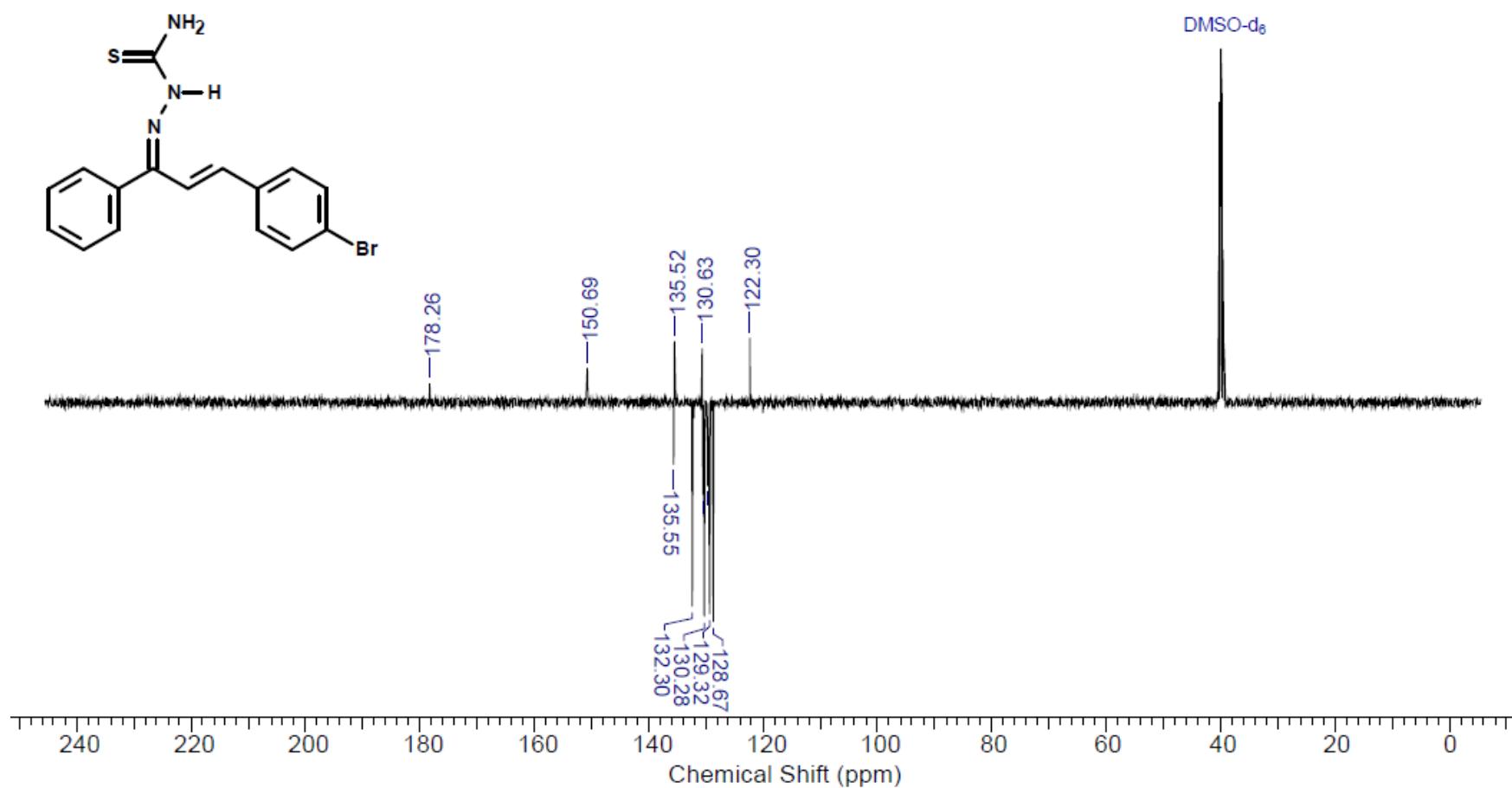
Espectro de DEPTQ da 4-cloro-chalcona-tiosemicarbazona. FONTE: GOULART, 2015.



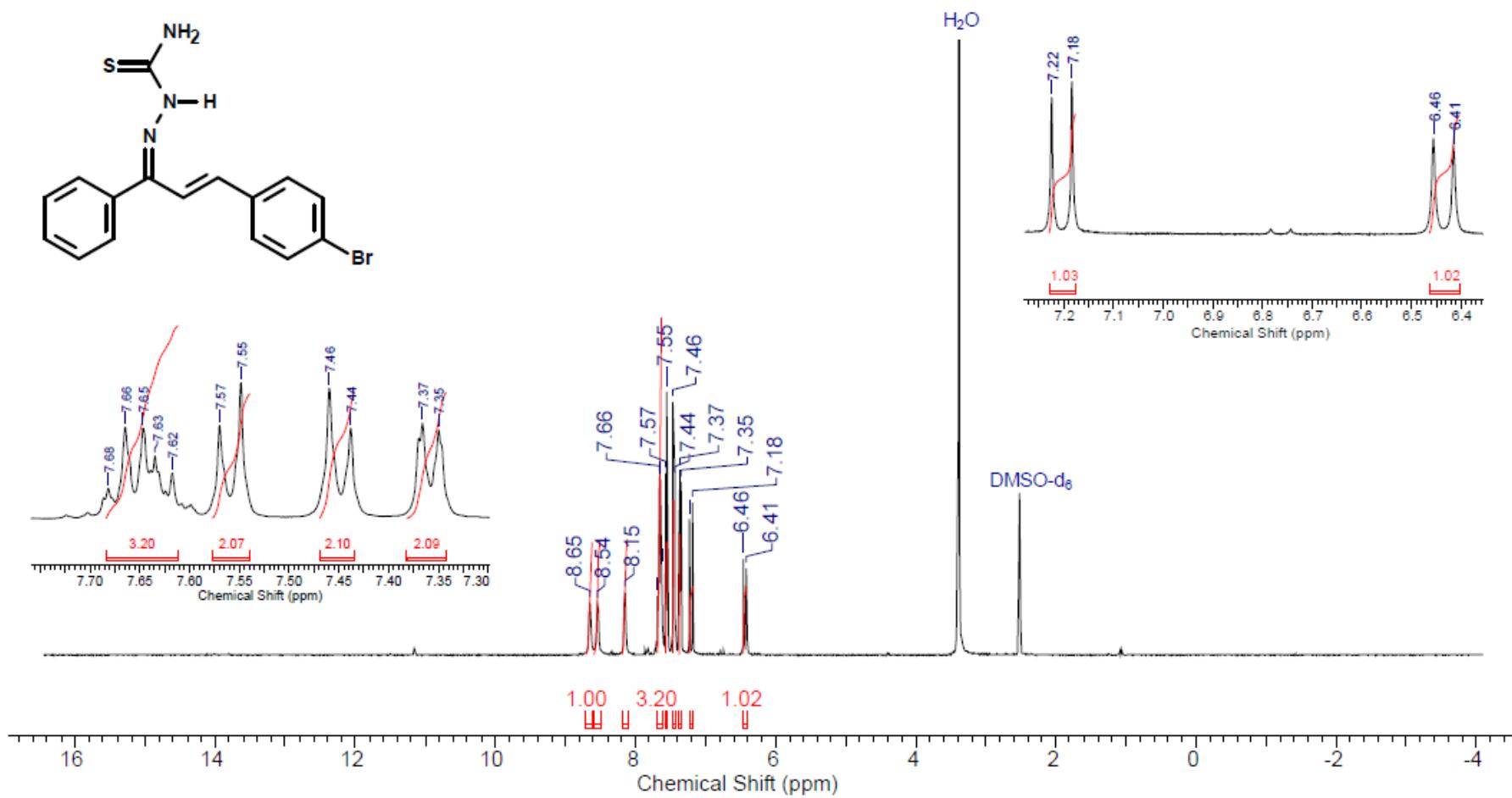
Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN da 4-cloro-chalcona-tiossemicarbazona. FONTE: GOULART, 2015.



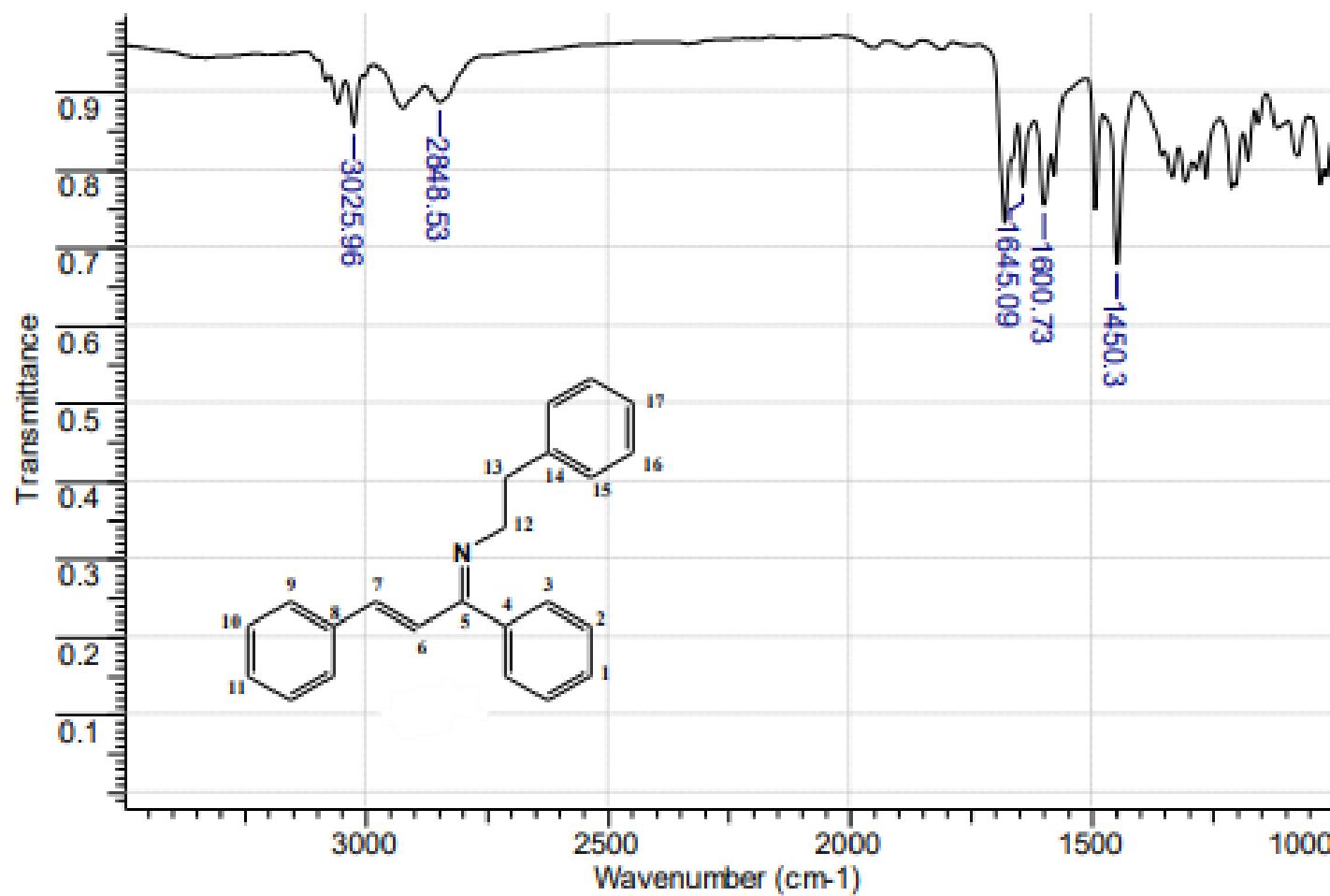
Espectro de infravermelho da 4-bromo-chalcona-tiosemicarbazona. FONTE: GOULART, 2015.



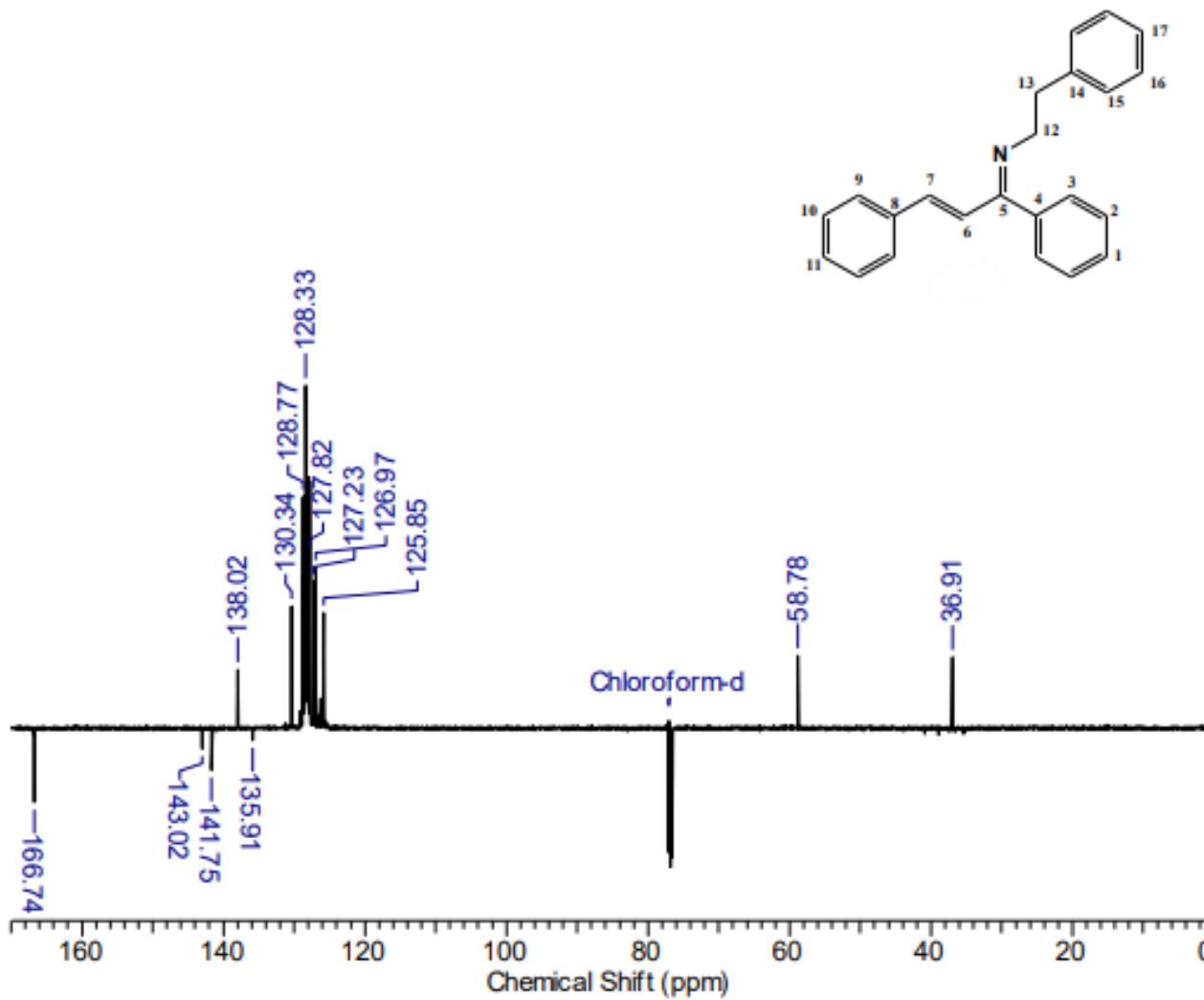
Espectro de DEPTQ da 4-bromo-chalcona-tiosemicarbazona. FONTE: GOULART, 2015.



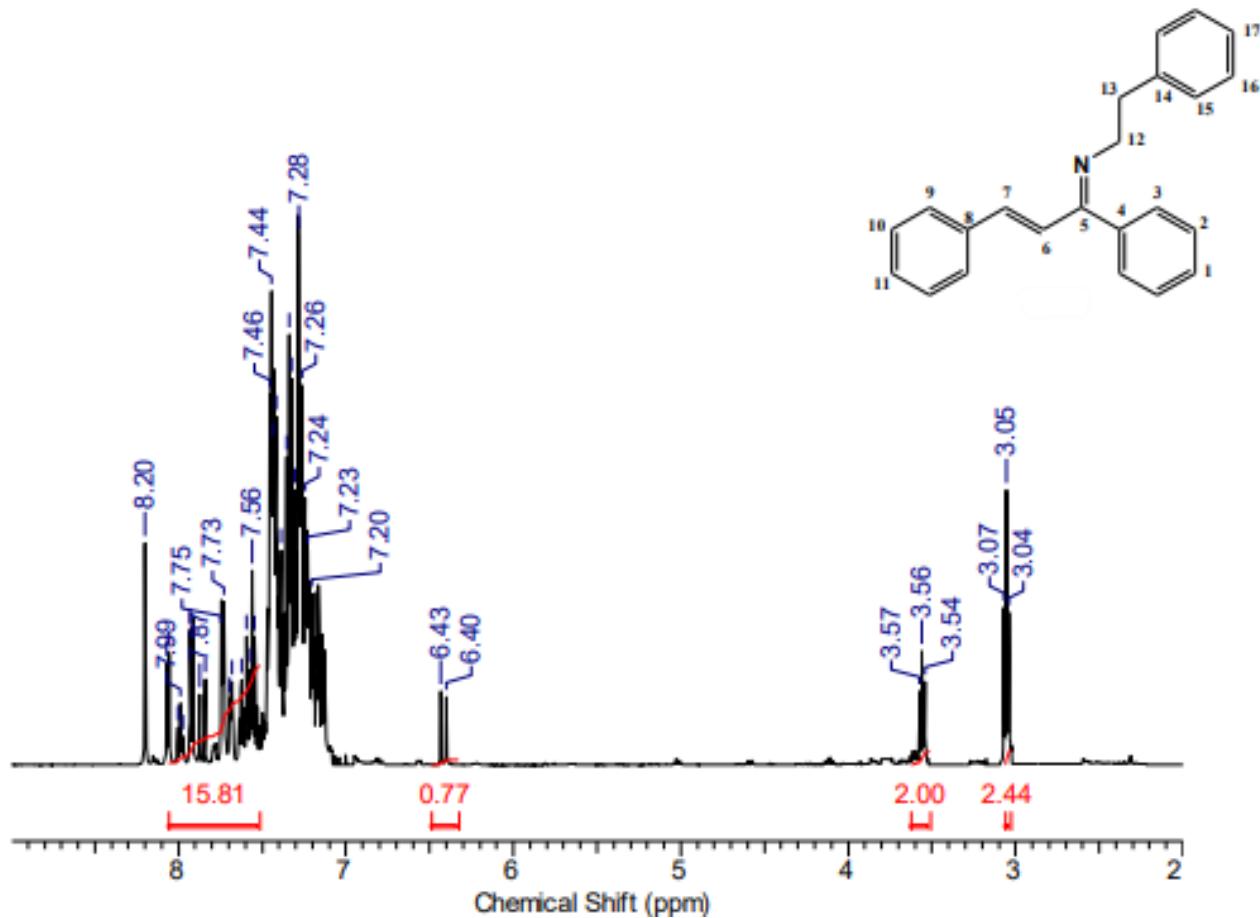
Espectro de <sup>1</sup>H-RMN da 4-bromo-chalcona-tiosemicarbazona. FONTE: GOULART, 2015.



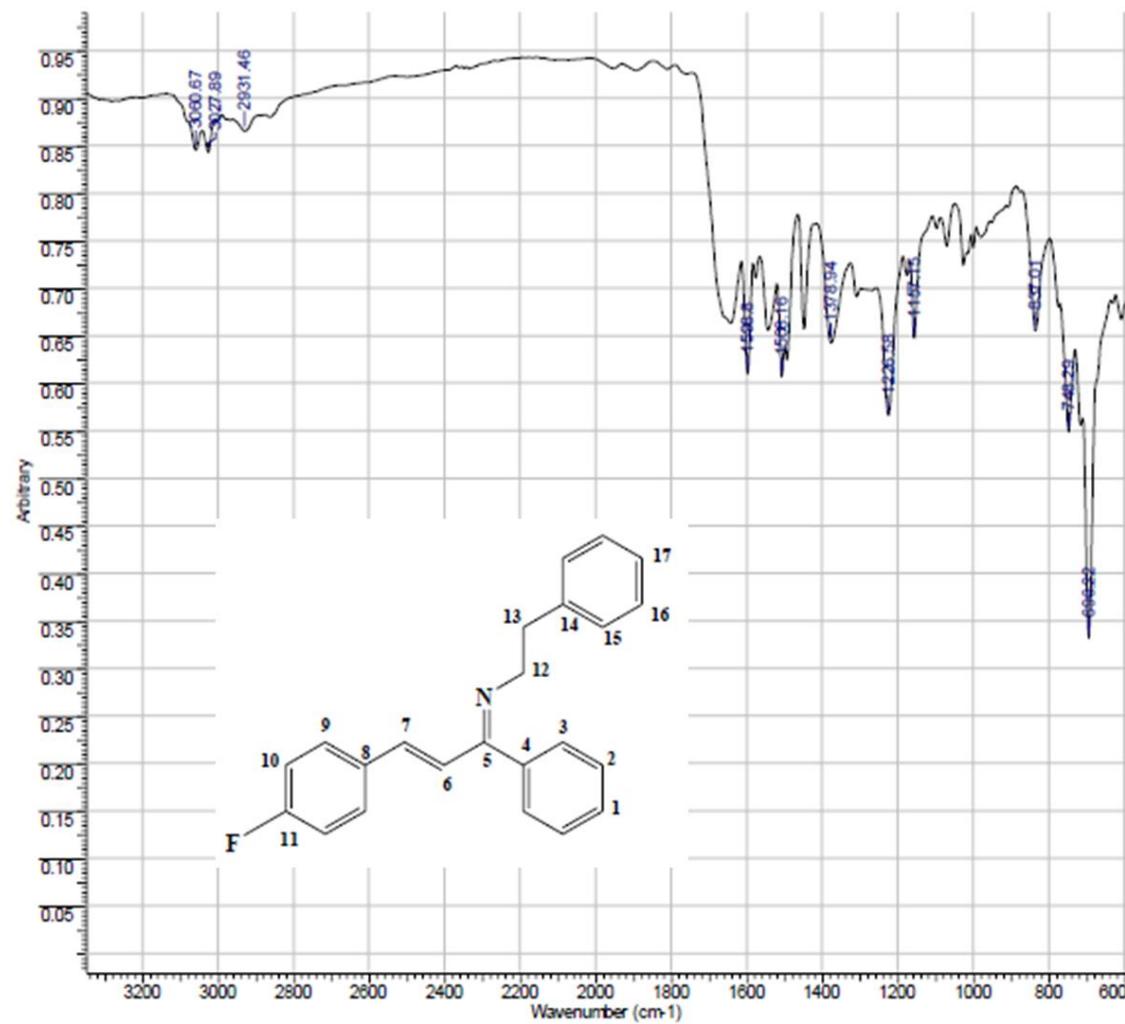
Espectro de infravermelho da fenetil-imino-chalcona. FONTE: CARLOS, 2022.



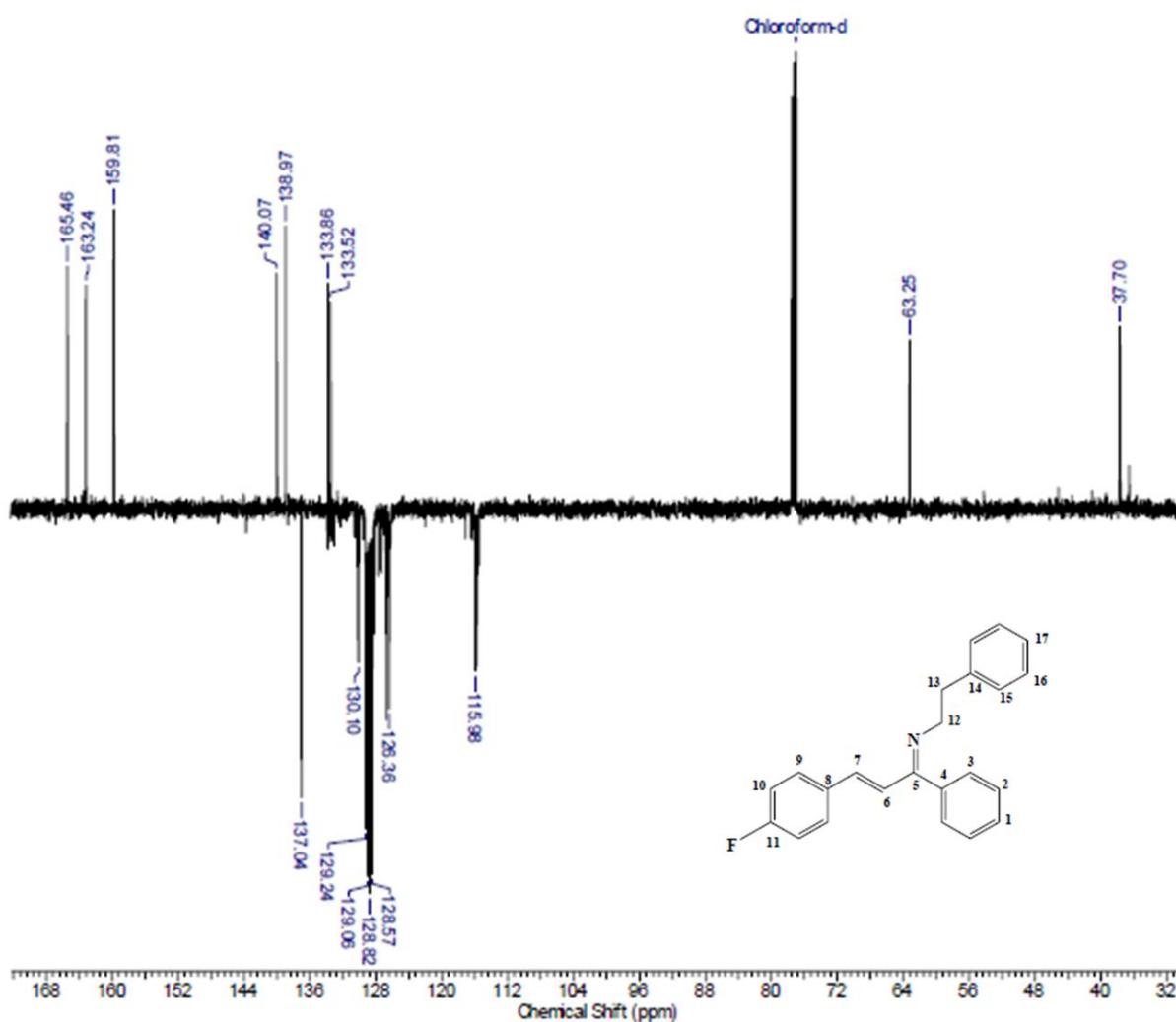
Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN da fenetil-imino-chalcona. FONTE: CARLOS, 2022.



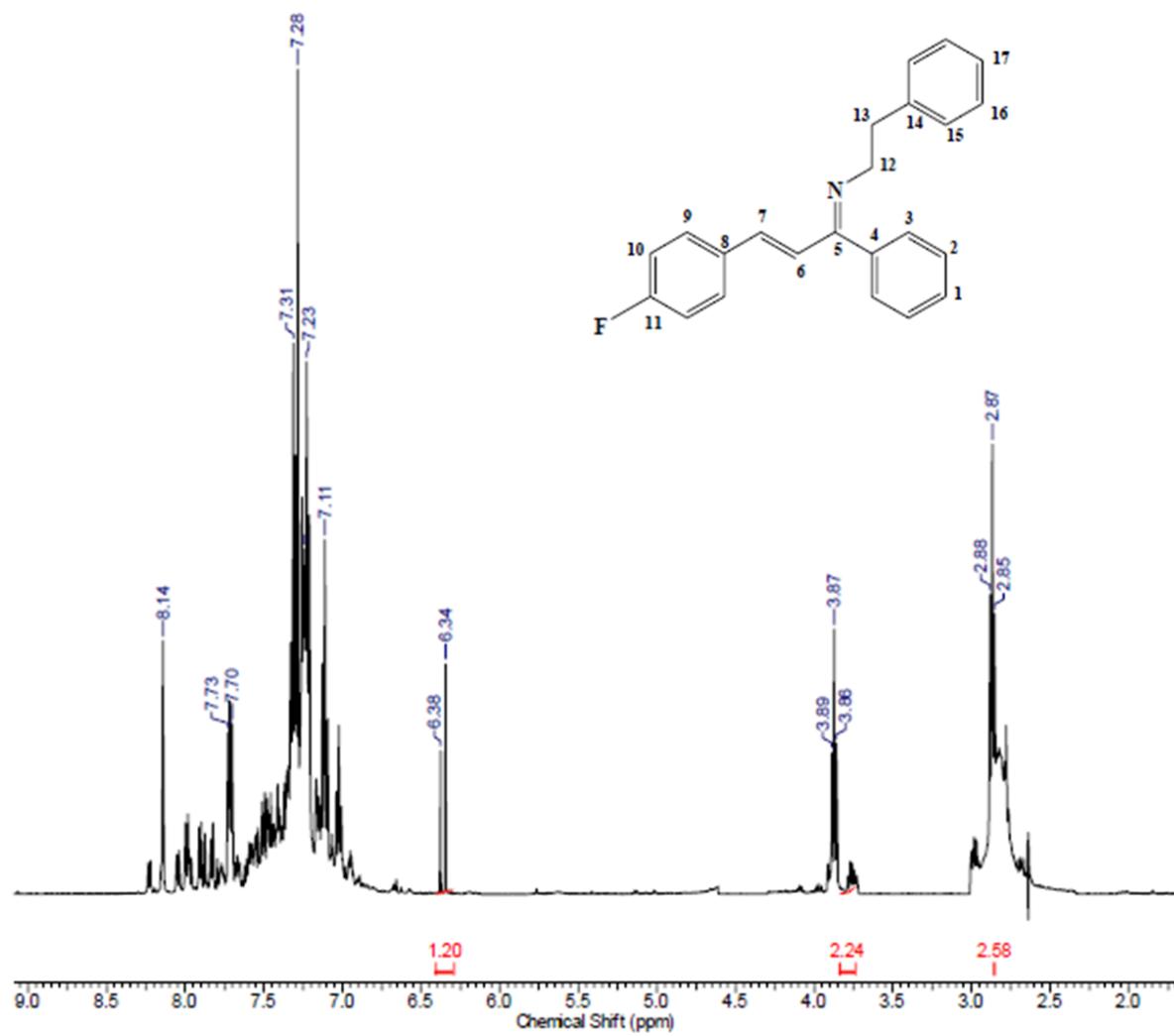
Especro de <sup>1</sup>H-RMN da fenetil-imino-chalcona. FONTE: CARLOS, 2022.



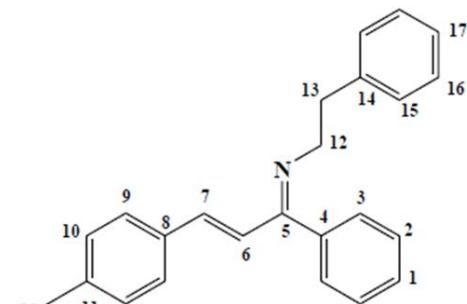
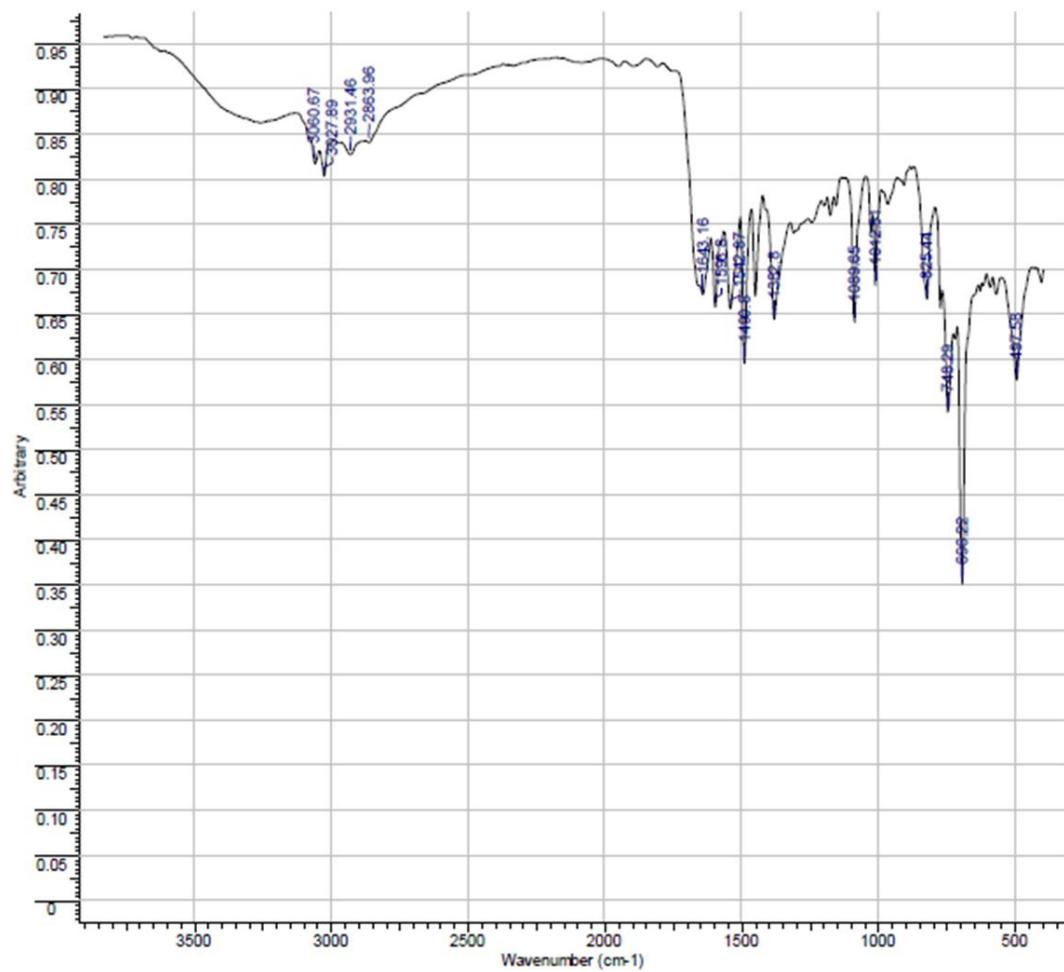
Espectro de infravermelho da 4-flúor-fenetil-imino-chalcona. FONTE: CARLOS, 2022.



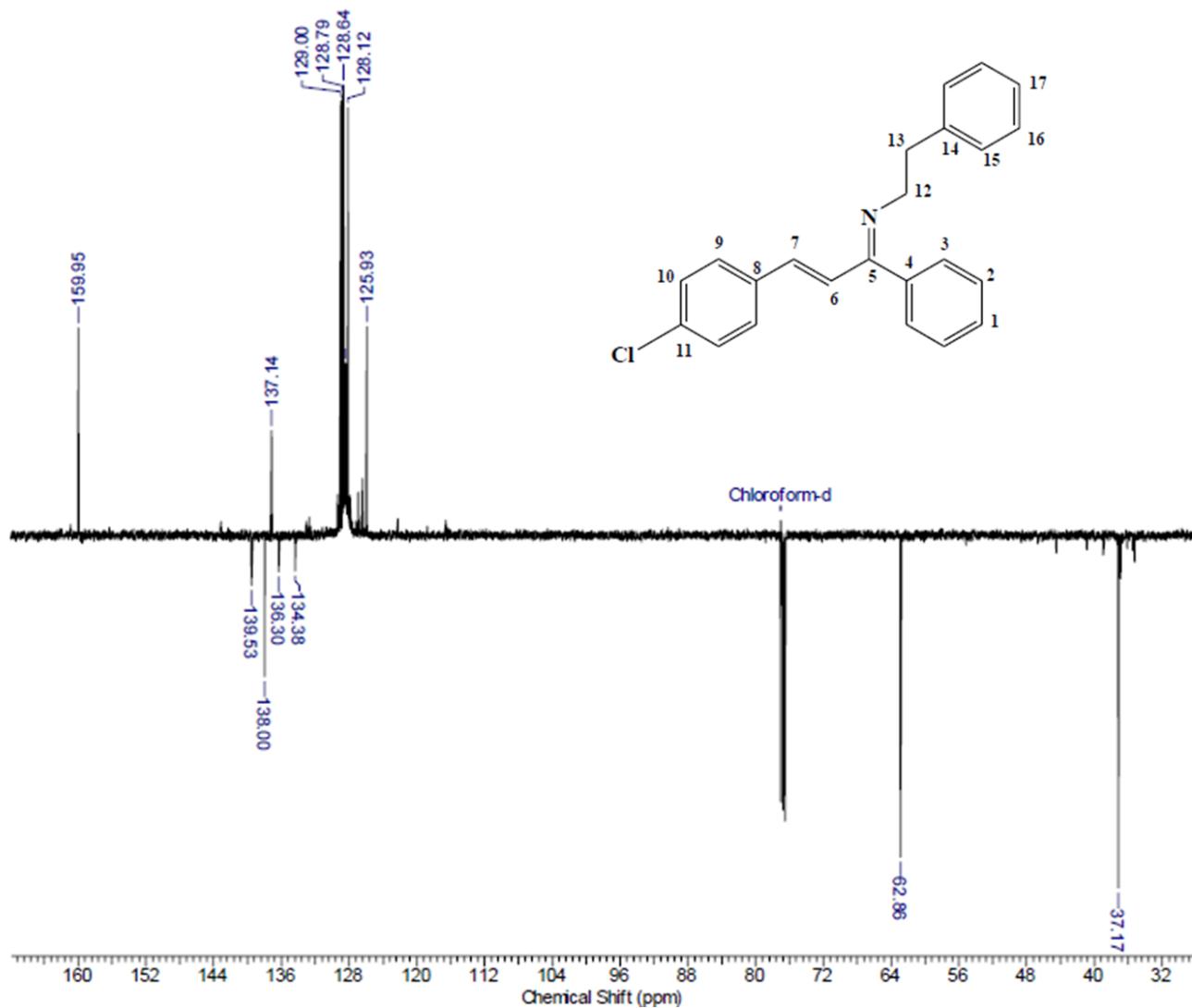
Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN da 4-flúor-fenetyl-imino-chalcona. FONTE: CARLOS, 2022.



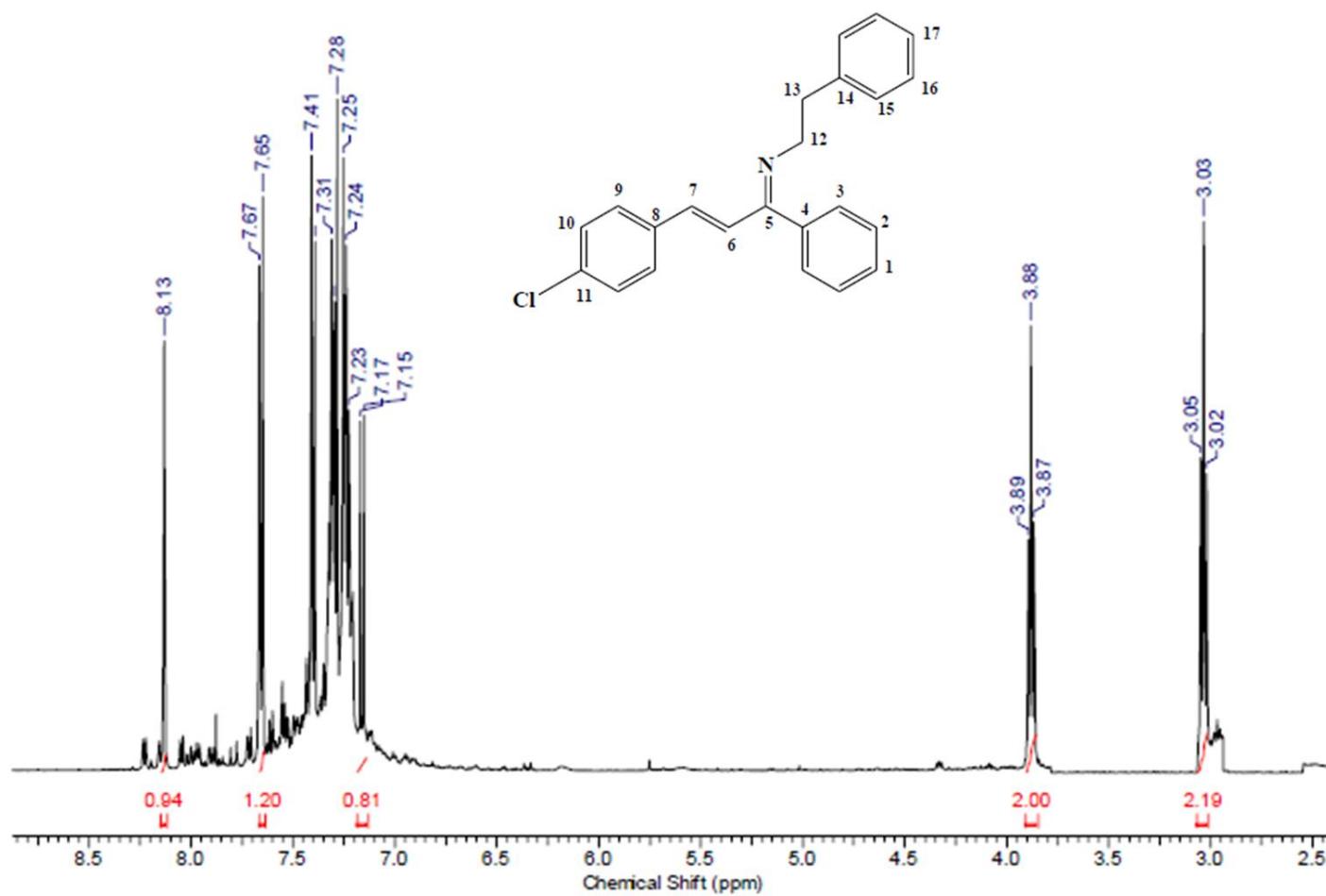
Espectro de <sup>1</sup>H-RMN da 4-flúor-fenetil-imino-chalcona. FONTE: CARLOS, 2022.



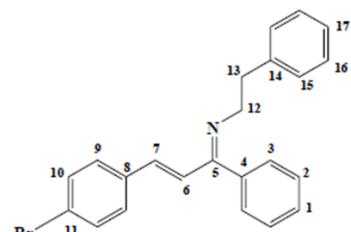
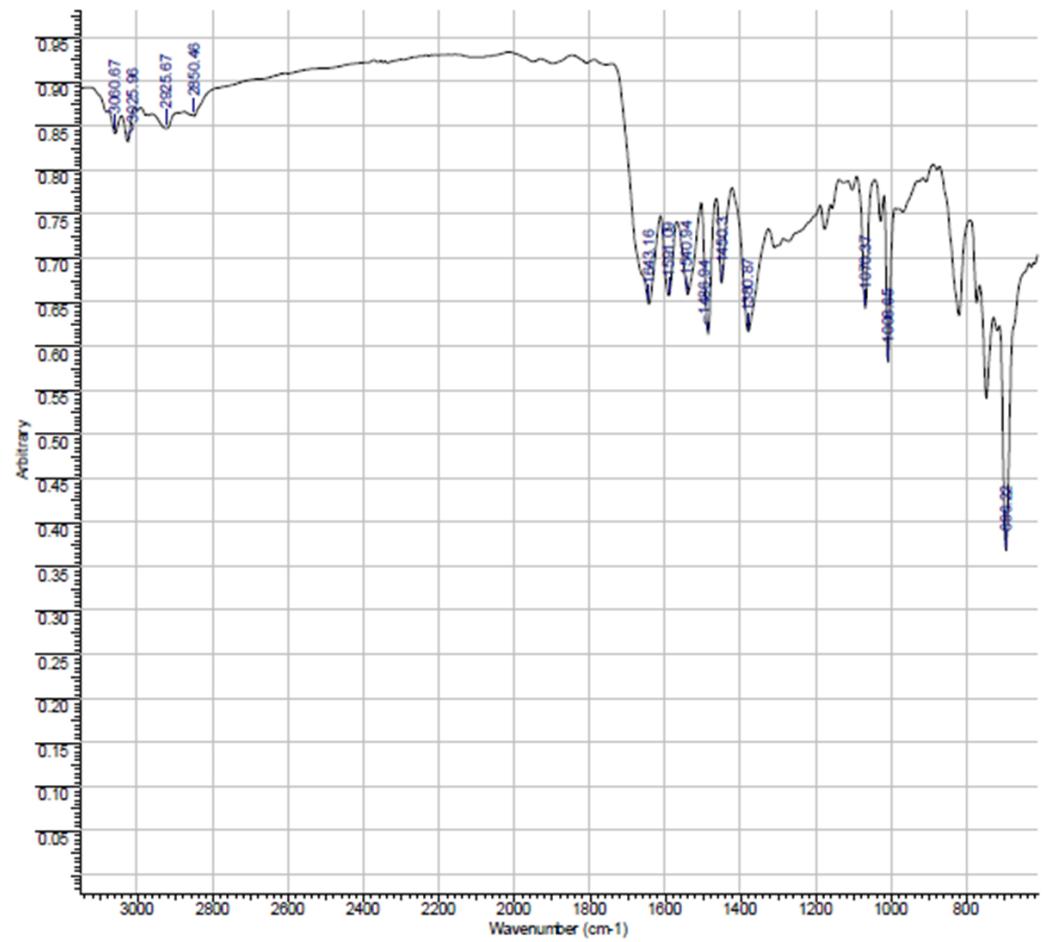
Espectro de infravermelho da 4-cloro-fenetil-imino-chalcona. FONTE: CARLOS, 2022.



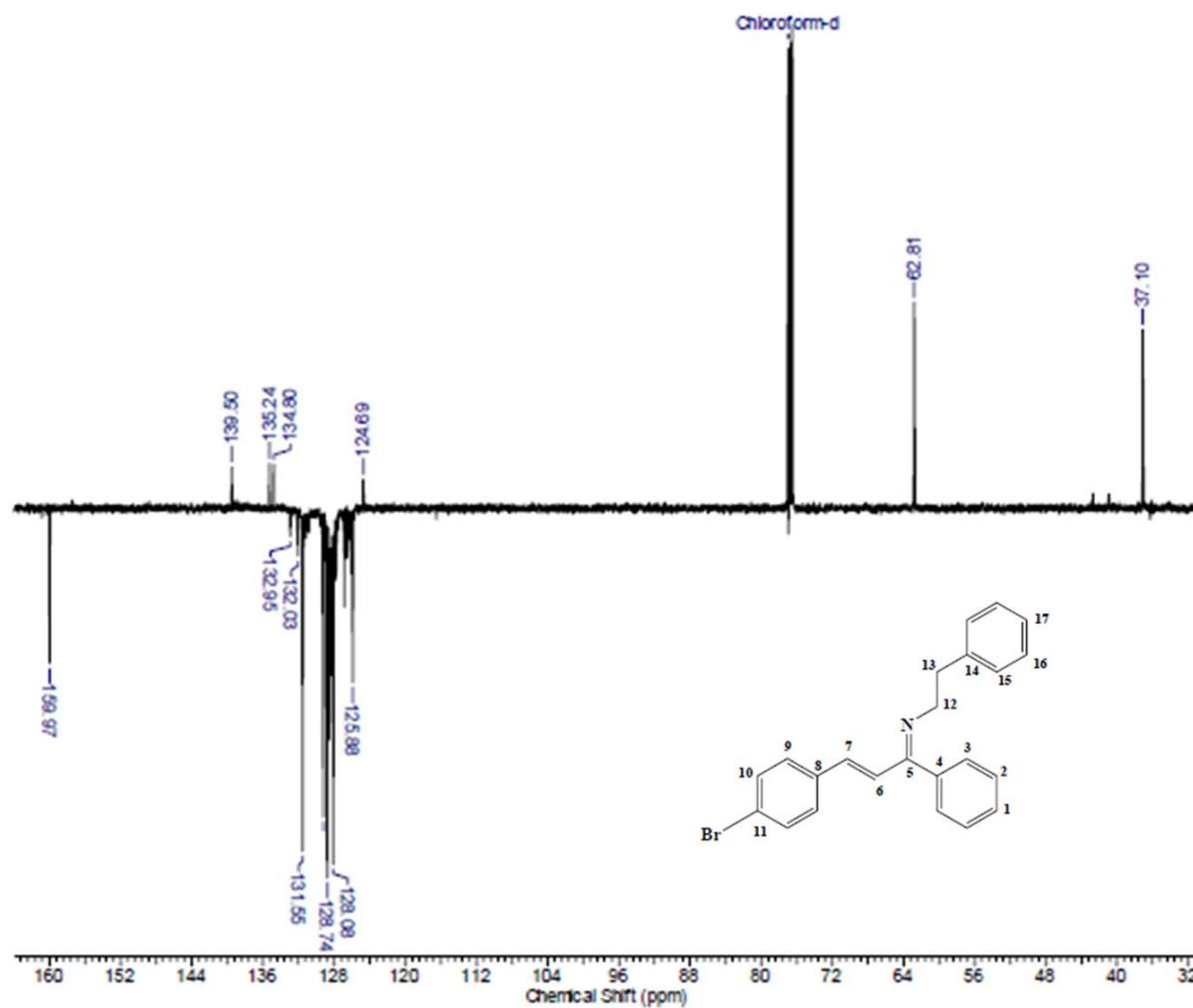
Espectro de <sup>13</sup>C-RMN da 4-cloro-fenetyl-imino-chalcona. FONTE: CARLOS, 2022.



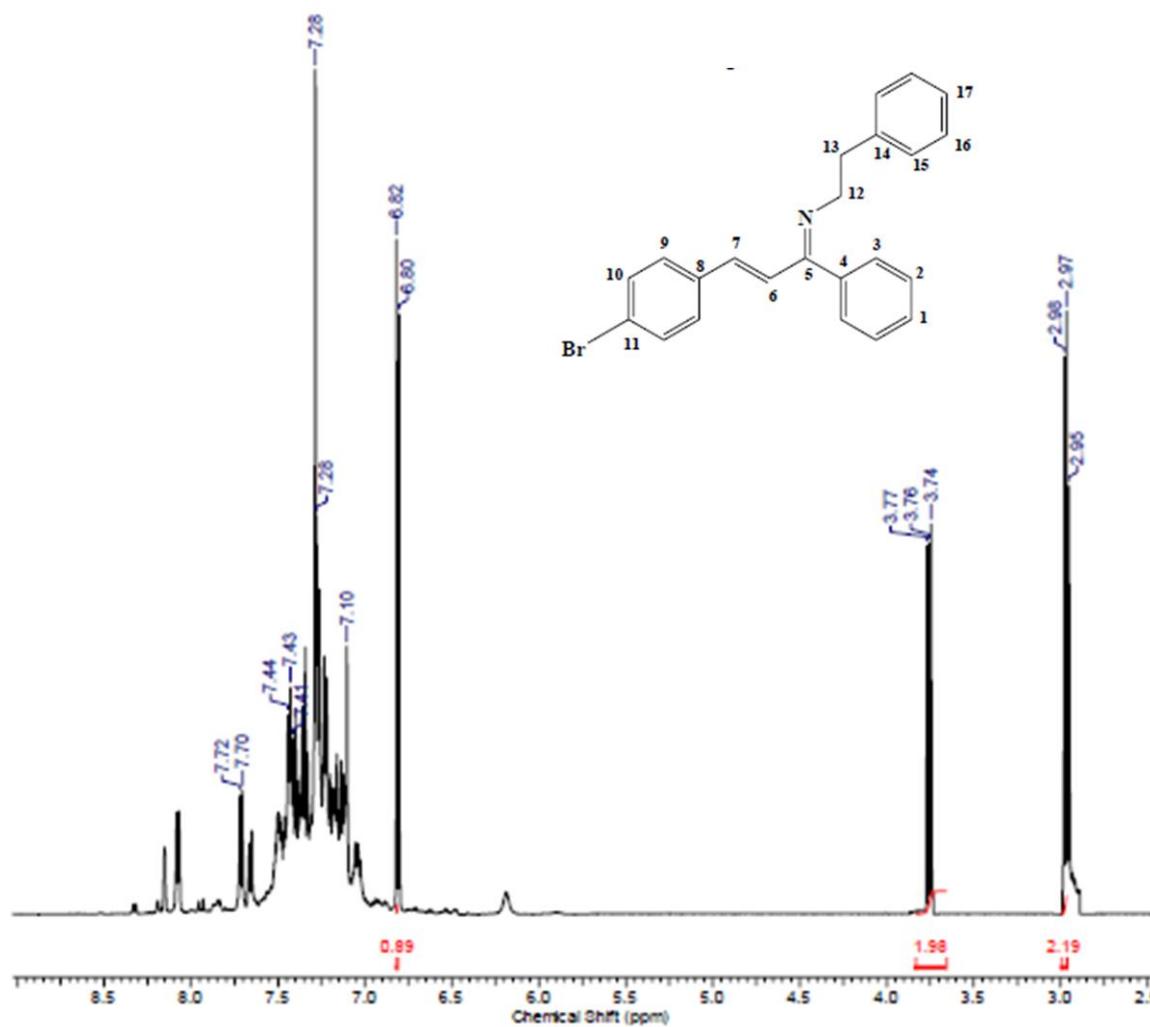
Espectro de <sup>1</sup>H-RMN da 4-cloro-fenetil-imino-chalcona. FONTE: CARLOS, 2022.



Espectro de infravermelho da 4-bromo-fenetil-imino-chalcona. FONTE: CARLOS, 2022.



Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN da 4-bromo-fenetyl-imino-chalcona. FONTE: CARLOS, 2022.



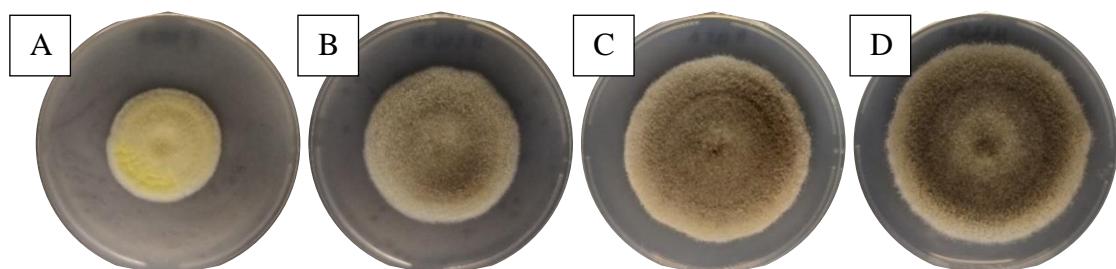
Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN da 4-bromo-fenetil-imino-chalcona. FONTE: CARLOS, 2022.

**Placas de Petri com cepas de *Aspergillus carbonarius* no último dia de análise em experimento de inibição do crescimento radial:**

**Avaliações com chalconas:**



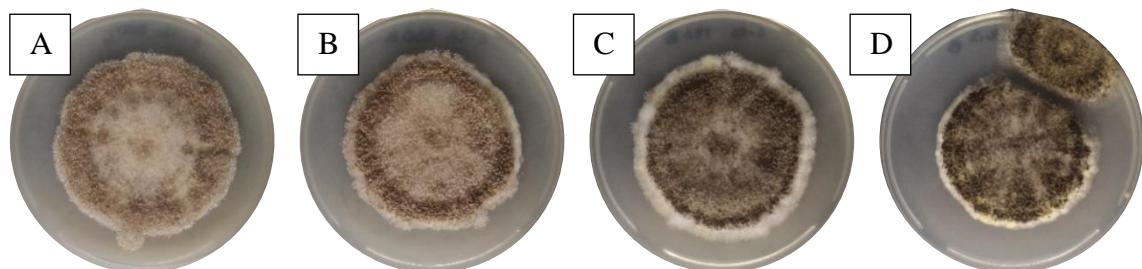
Controle negativo *Aspergillus carbonarius*.



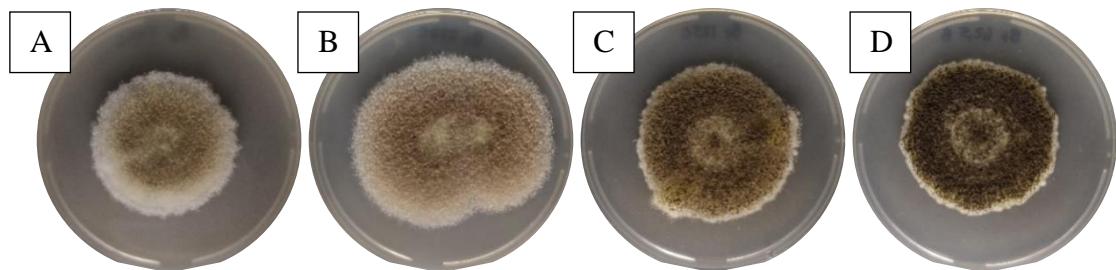
*Aspergillus carbonarius* tratado com chalcona não substituída a 500 µg mL<sup>-1</sup> (A), 250 µg mL<sup>-1</sup> (B), 125 µg mL<sup>-1</sup> (C) e 62,5 µg mL<sup>-1</sup> (D).



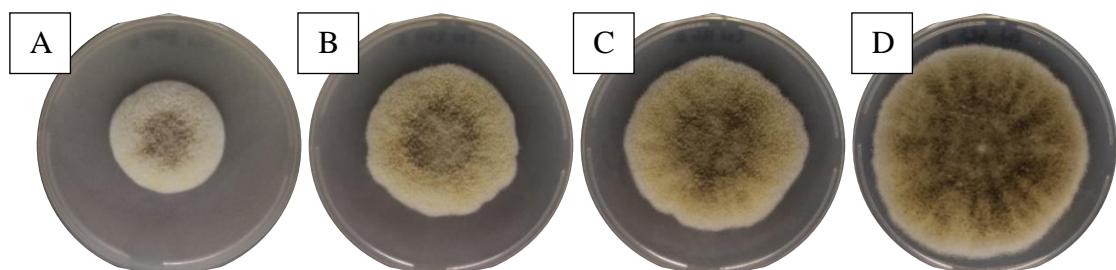
*Aspergillus carbonarius* tratado com *p*-flúor-chalcona a 500 µg mL<sup>-1</sup> (A), 250 µg mL<sup>-1</sup> (B), 125 µg mL<sup>-1</sup> (C) e 62,5 µg mL<sup>-1</sup> (D).



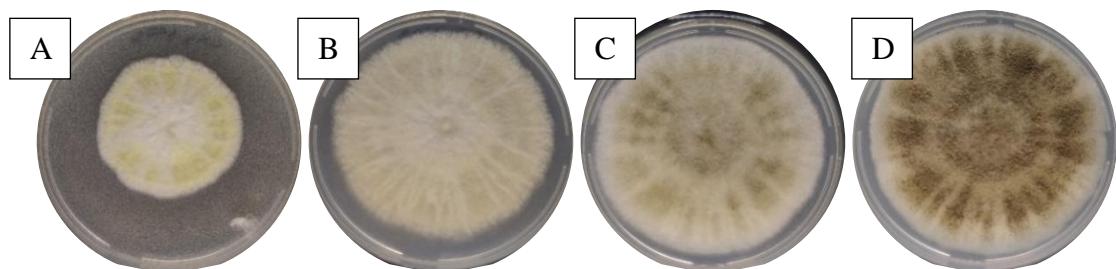
*Aspergillus carbonarius* tratado com *p*-cloro-chalcona a 500 µg mL<sup>-1</sup> (A), 250 µg mL<sup>-1</sup> (B), 125 µg mL<sup>-1</sup> (C) e 62,5 µg mL<sup>-1</sup> (D).



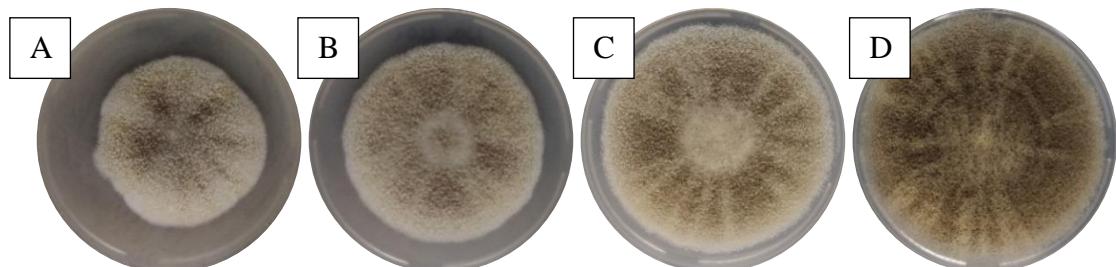
*Aspergillus carbonarius* tratado com *p*-bromo-chalcona a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (A), 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (B), 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (C) e 62,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (D).



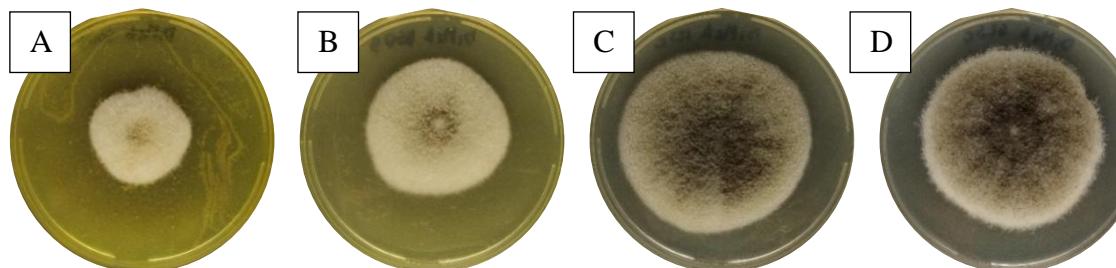
*Aspergillus carbonarius* tratado com *p*-ciano-chalcona a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (A), 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (B), 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (C) e 62,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (D).



*Aspergillus carbonarius* tratado com *p*-metil-chalcona a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (A), 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (B), 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (C) e 62,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (D).

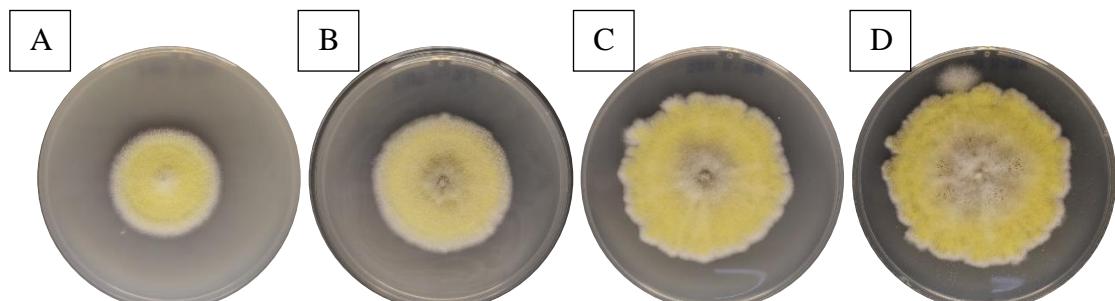


*Aspergillus carbonarius* tratado com *p*-nitro-chalcona a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (A), 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (B), 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (C) e 62,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (D).

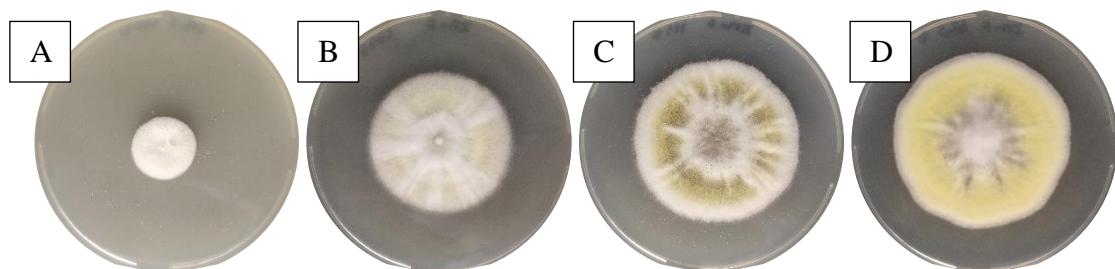


*Aspergillus carbonarius* tratado com *p*-dimetil-amino-chalcona a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (A), 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (B), 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (C) e 62,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (D).

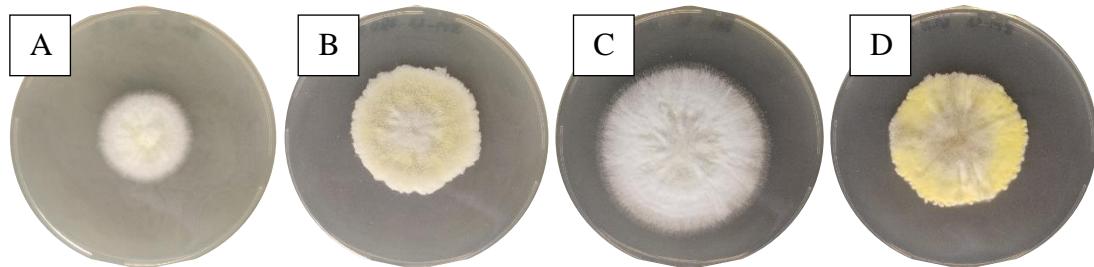
**Avaliações com fenetil-imino-chalconas:**



*Aspergillus carbonarius* tratado com fenetil-imino-chalcona não substituída a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (A), 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (B), 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (C) e 62,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (D).



*Aspergillus carbonarius* tratado com *p*-flúor-fenetil-imino-chalcona a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (A), 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (B), 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (C) e 62,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (D).

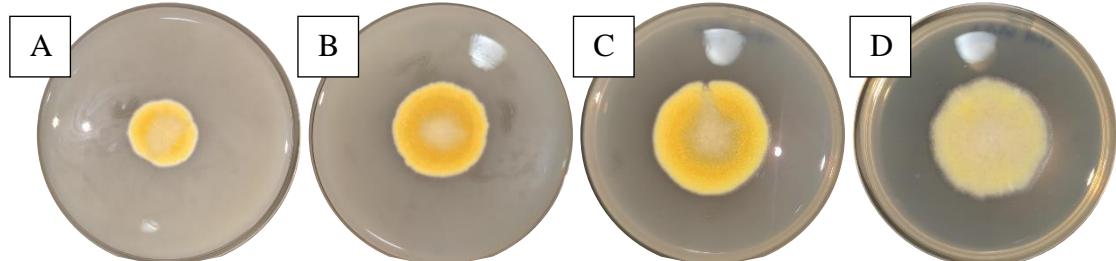


*Aspergillus carbonarius* tratado com *p*-cloro-fenetil-imino-chalcona a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (A), 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (B), 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (C) e 62,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (D).

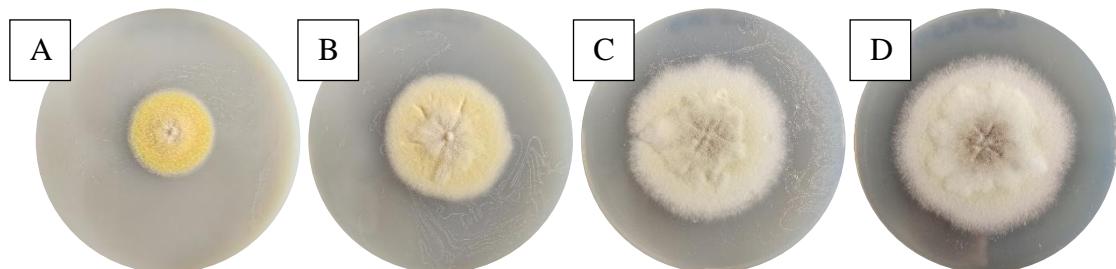


*Aspergillus carbonarius* tratado com *p*-bromo-fenetil-imino-chalcona a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (A), 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (B), 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (C) e 62,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (D).

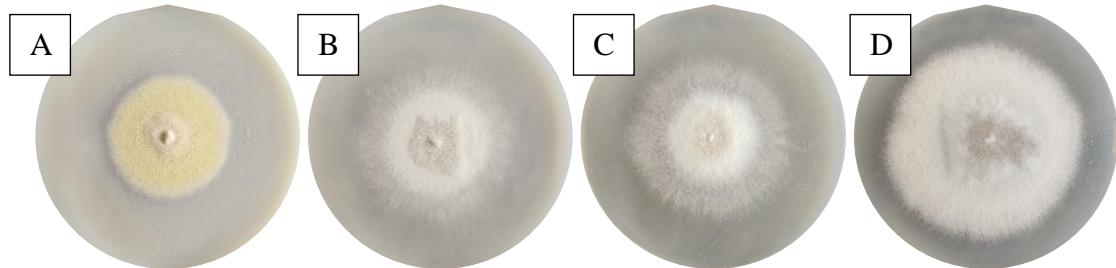
**Avaliações com chalconas-tiossemicarbazonas:**



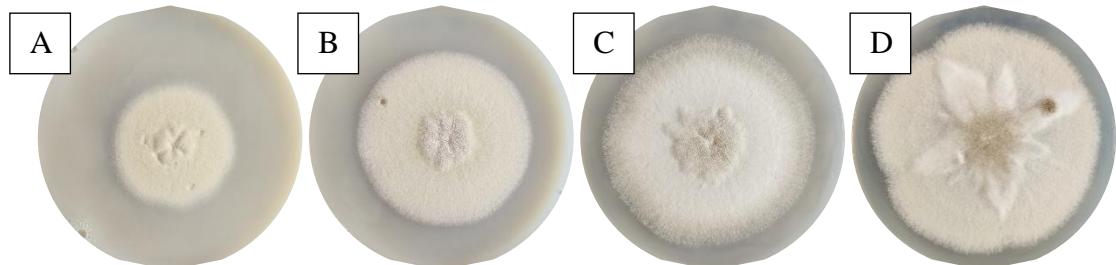
*Aspergillus carbonarius* tratado com chalcona-tiossemicarbazona não substituída a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (A), 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (B), 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (C) e 62,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (D).



*Aspergillus carbonarius* tratado com *p*-flúor-chalcona-tiossemicarbazona a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (A), 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (B), 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (C) e 62,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (D).



*Aspergillus carbonarius* tratado com *p*-cloro-chalcona-tiossemicarbazona a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (A), 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (B), 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (C) e 62,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (D).



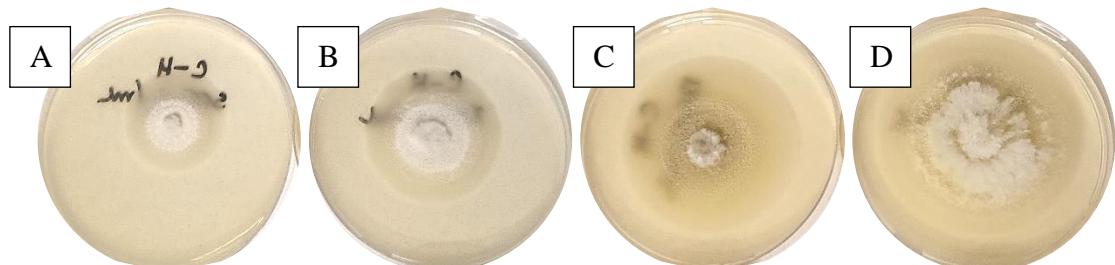
*Aspergillus carbonarius* tratado com *p*-bromo-chalcona-tiossemicarbazona a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (A), 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (B), 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (C) e 62,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (D).

**Placas de Petri com cepas de *Aspergillus parasiticus* no último dia de análise em experimento de inibição do crescimento radial:**

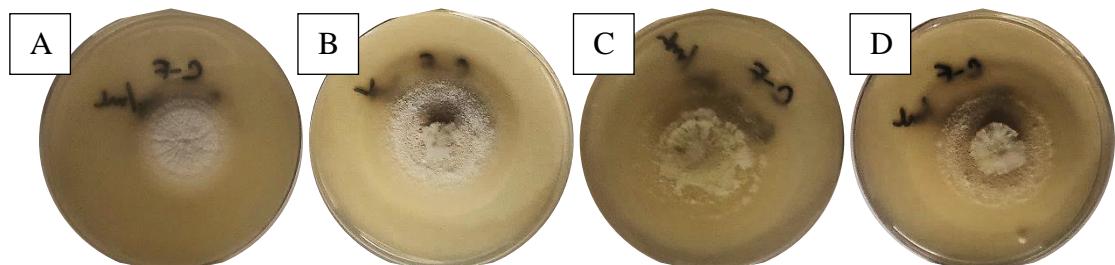
**Avaliações com chalconas:**



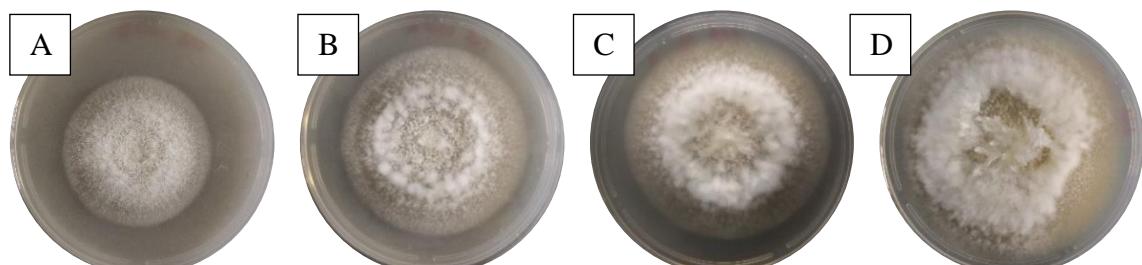
Controle negativo *Aspergillus parasiticus*.



*Aspergillus parasiticus* tratado com chalcona não substituída a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (A), 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (B), 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (C) e 62,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (D).



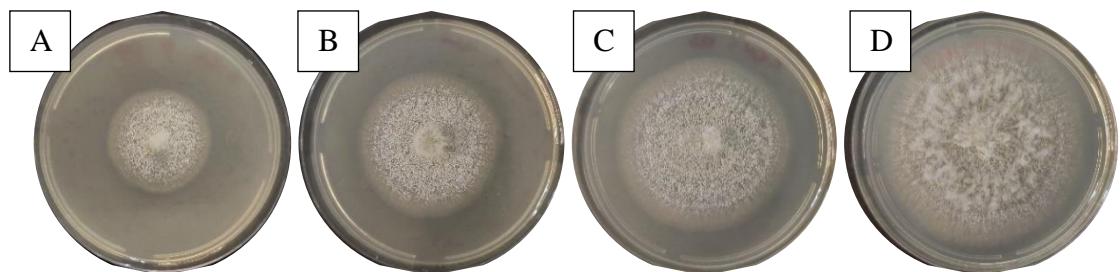
*Aspergillus parasiticus* tratado com *p*-flúor-chalcona a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (A), 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (B), 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (C) e 62,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (D).



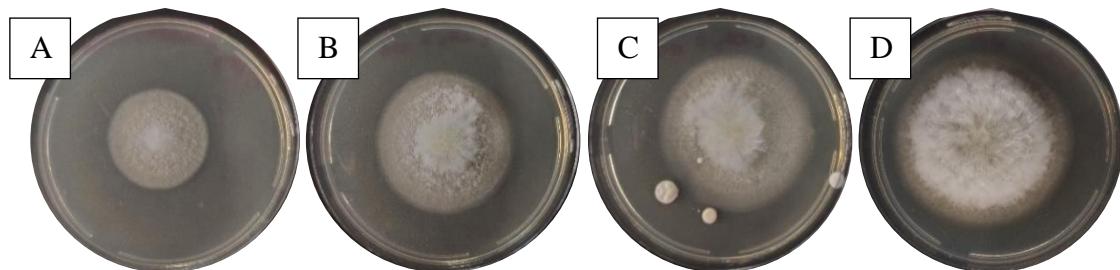
*Aspergillus parasiticus* tratado com *p*-cloro-chalcona a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (A), 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (B), 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (C) e 62,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (D).



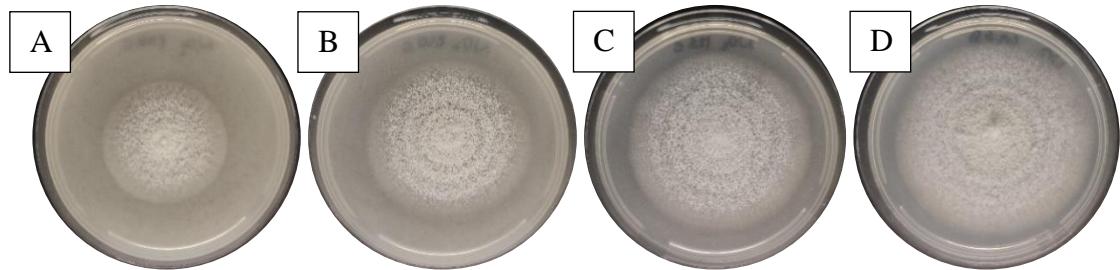
*Aspergillus parasiticus* tratado com *p*-bromo-chalcona a 500 µg mL<sup>-1</sup> (A), 250 µg mL<sup>-1</sup> (B), 125 µg mL<sup>-1</sup> (C) e 62,5 µg mL<sup>-1</sup> (D).



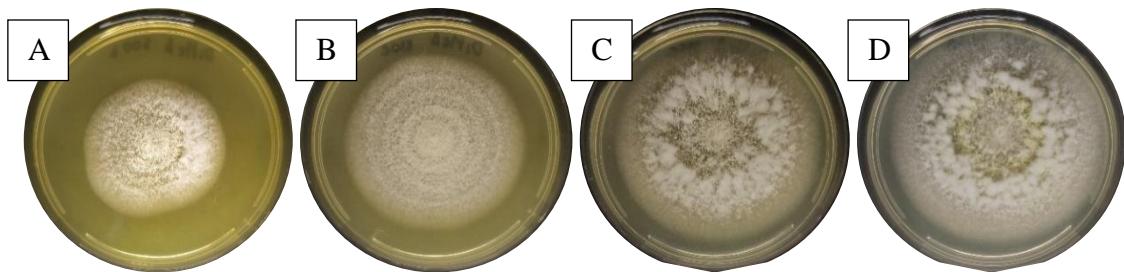
*Aspergillus parasiticus* tratado com *p*-ciano-chalcona a 500 µg mL<sup>-1</sup> (A), 250 µg mL<sup>-1</sup> (B), 125 µg mL<sup>-1</sup> (C) e 62,5 µg mL<sup>-1</sup> (D).



*Aspergillus parasiticus* tratado com *p*-metil-chalcona a 500 µg mL<sup>-1</sup> (A), 250 µg mL<sup>-1</sup> (B), 125 µg mL<sup>-1</sup> (C) e 62,5 µg mL<sup>-1</sup> (D).

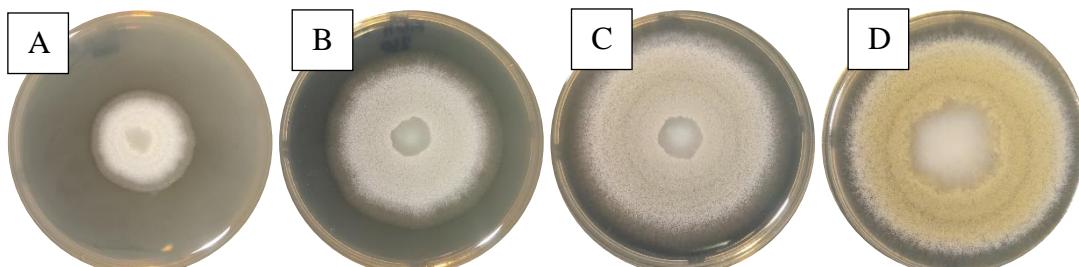


*Aspergillus parasiticus* tratado com *p*-nitro-chalcona a 500 µg mL<sup>-1</sup> (A), 250 µg mL<sup>-1</sup> (B), 125 µg mL<sup>-1</sup> (C) e 62,5 µg mL<sup>-1</sup> (D).

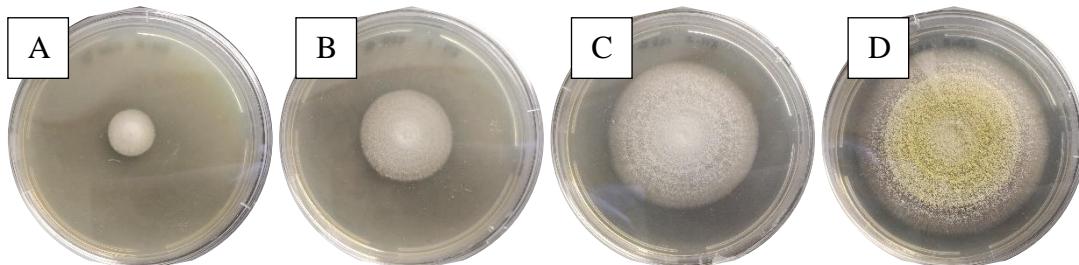


*Aspergillus parasiticus* tratado com *p*-dimetilamino-chalcona a 500 µg mL<sup>-1</sup> (A), 250 µg mL<sup>-1</sup> (B), 125 µg mL<sup>-1</sup> (C) e 62,5 µg mL<sup>-1</sup> (D).

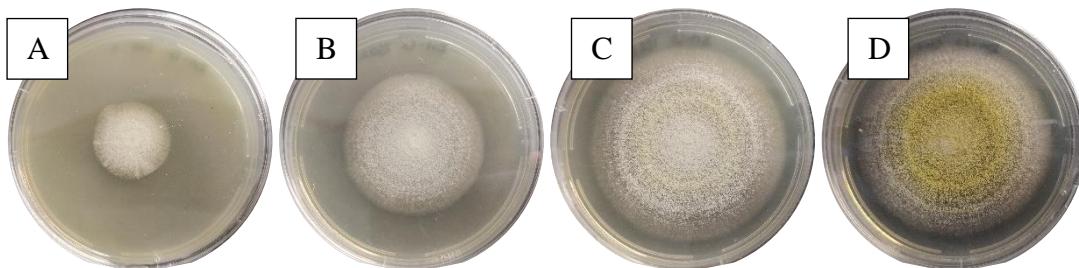
#### Avaliações com fenetil-imino-chalconas:



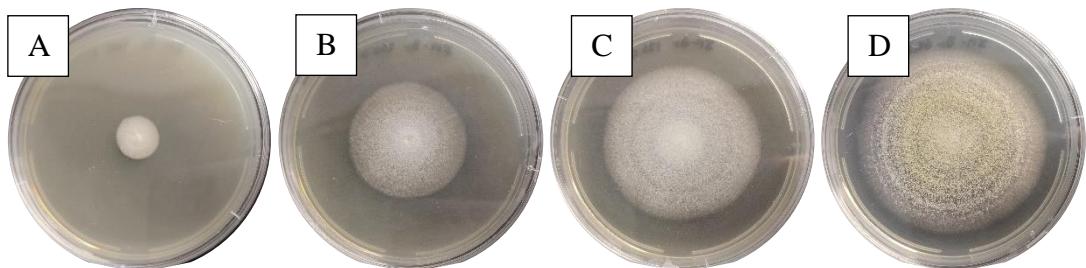
*Aspergillus parasiticus* tratado com fenetil-imino-chalcona não substituída a 500 µg mL<sup>-1</sup> (A), 250 µg mL<sup>-1</sup> (B), 125 µg mL<sup>-1</sup> (C) e 62,5 µg mL<sup>-1</sup> (D).



*Aspergillus parasiticus* tratado com *p*-flúor-fenetil-imino-chalcona a 500 µg mL<sup>-1</sup> (A), 250 µg mL<sup>-1</sup> (B), 125 µg mL<sup>-1</sup> (C) e 62,5 µg mL<sup>-1</sup> (D).

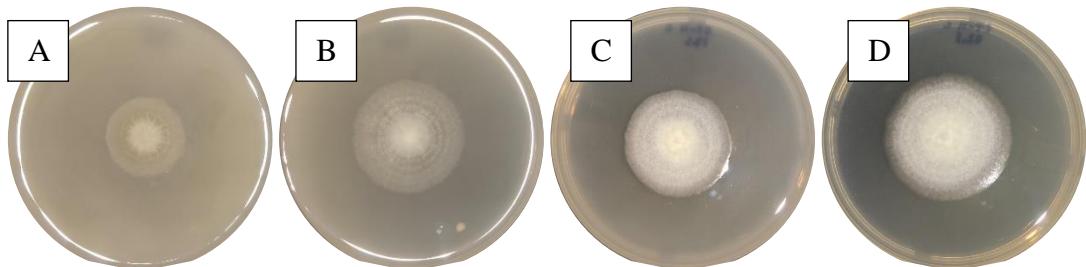


*Aspergillus parasiticus* tratado com *p*-cloro-fenetil-imino-chalcona a 500 µg mL<sup>-1</sup> (A), 250 µg mL<sup>-1</sup> (B), 125 µg mL<sup>-1</sup> (C) e 62,5 µg mL<sup>-1</sup> (D).



*Aspergillus parasiticus* tratado com *p*-bromo-fenetyl-imino-chalcona a 500 µg mL<sup>-1</sup> (A), 250 µg mL<sup>-1</sup> (B), 125 µg mL<sup>-1</sup> (C) e 62,5 µg mL<sup>-1</sup> (D).

#### Avaliações com chalconas-tiossemicarbazonas:



*Aspergillus parasiticus* tratado com chalcona-tiossemicarbazona não substituída a 500 µg mL<sup>-1</sup> (A), 250 µg mL<sup>-1</sup> (B), 125 µg mL<sup>-1</sup> (C) e 62,5 µg mL<sup>-1</sup> (D).



*Aspergillus parasiticus* tratado com *p*-flúor-chalcona-tiossemicarbazona a 500 µg mL<sup>-1</sup> (A), 250 µg mL<sup>-1</sup> (B), 125 µg mL<sup>-1</sup> (C) e 62,5 µg mL<sup>-1</sup> (D).



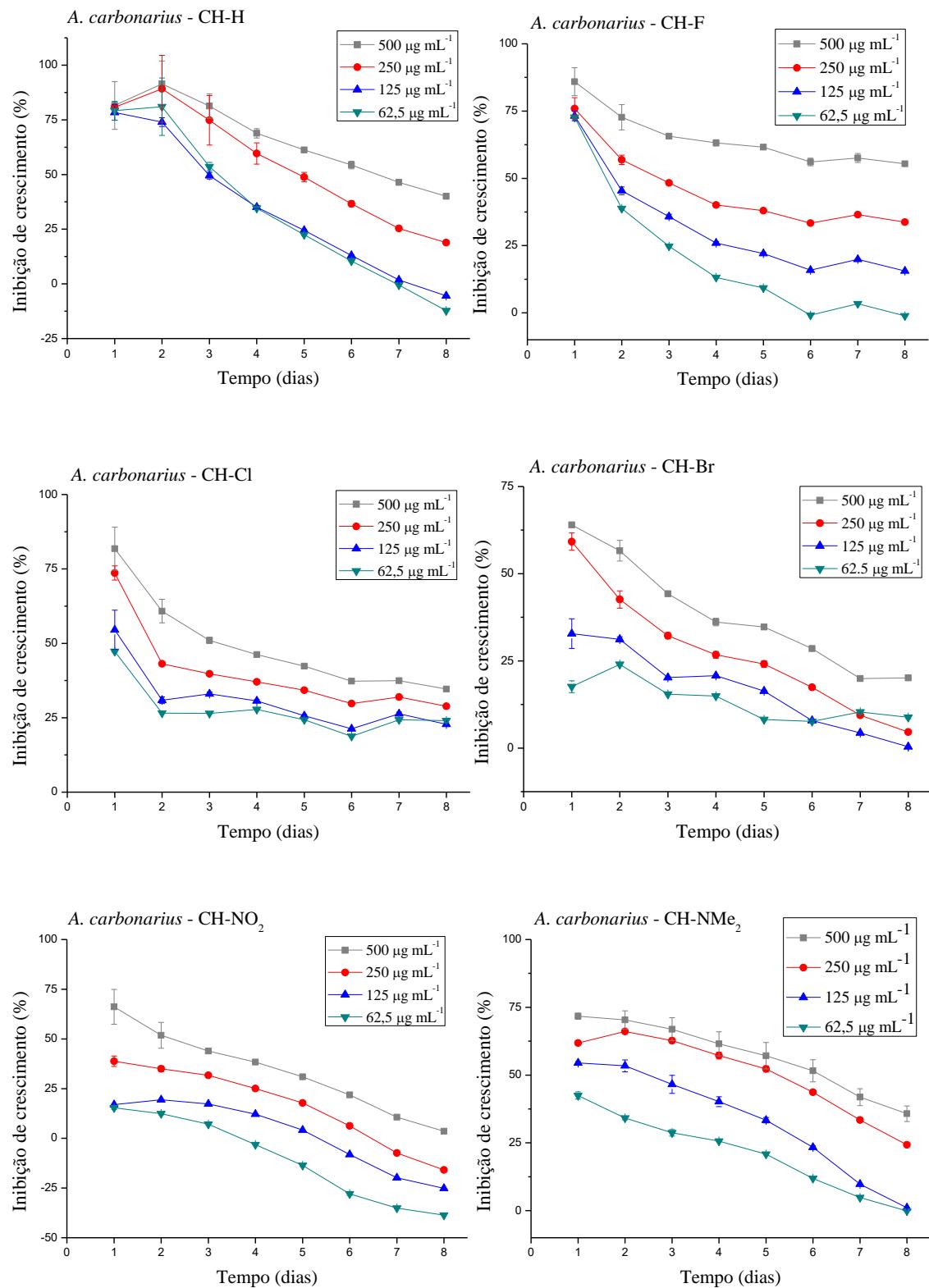
*Aspergillus parasiticus* tratado com *p*-cloro-chalcona-tiossemicarbazona a 500 µg mL<sup>-1</sup> (A), 250 µg mL<sup>-1</sup> (B), 125 µg mL<sup>-1</sup> (C) e 62,5 µg mL<sup>-1</sup> (D).

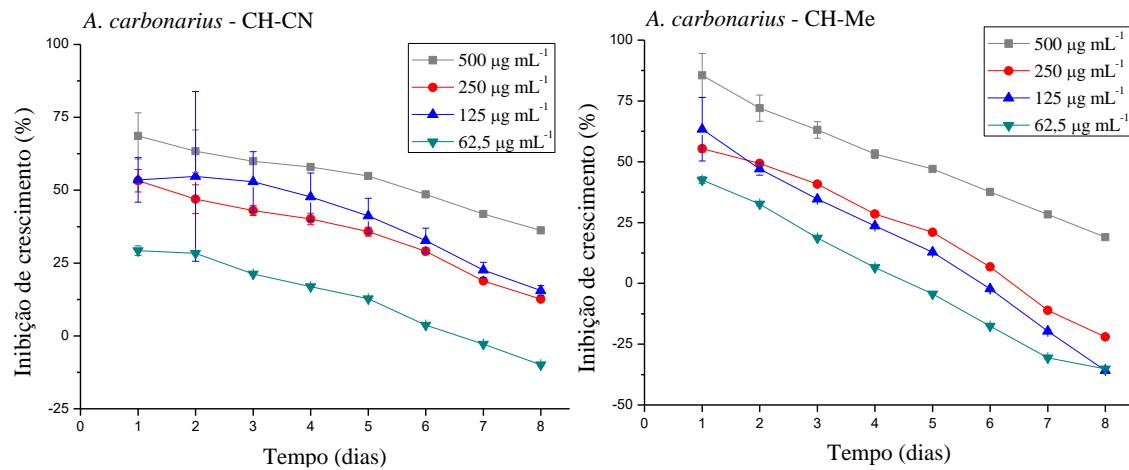


*Aspergillus parasiticus* tratado com *p*-bromo-chalcona-tiossemicarbazona a 500 µg mL<sup>-1</sup> (A), 250 µg mL<sup>-1</sup> (B), 125 µg mL<sup>-1</sup> (C) e 62,5 µg mL<sup>-1</sup> (D).

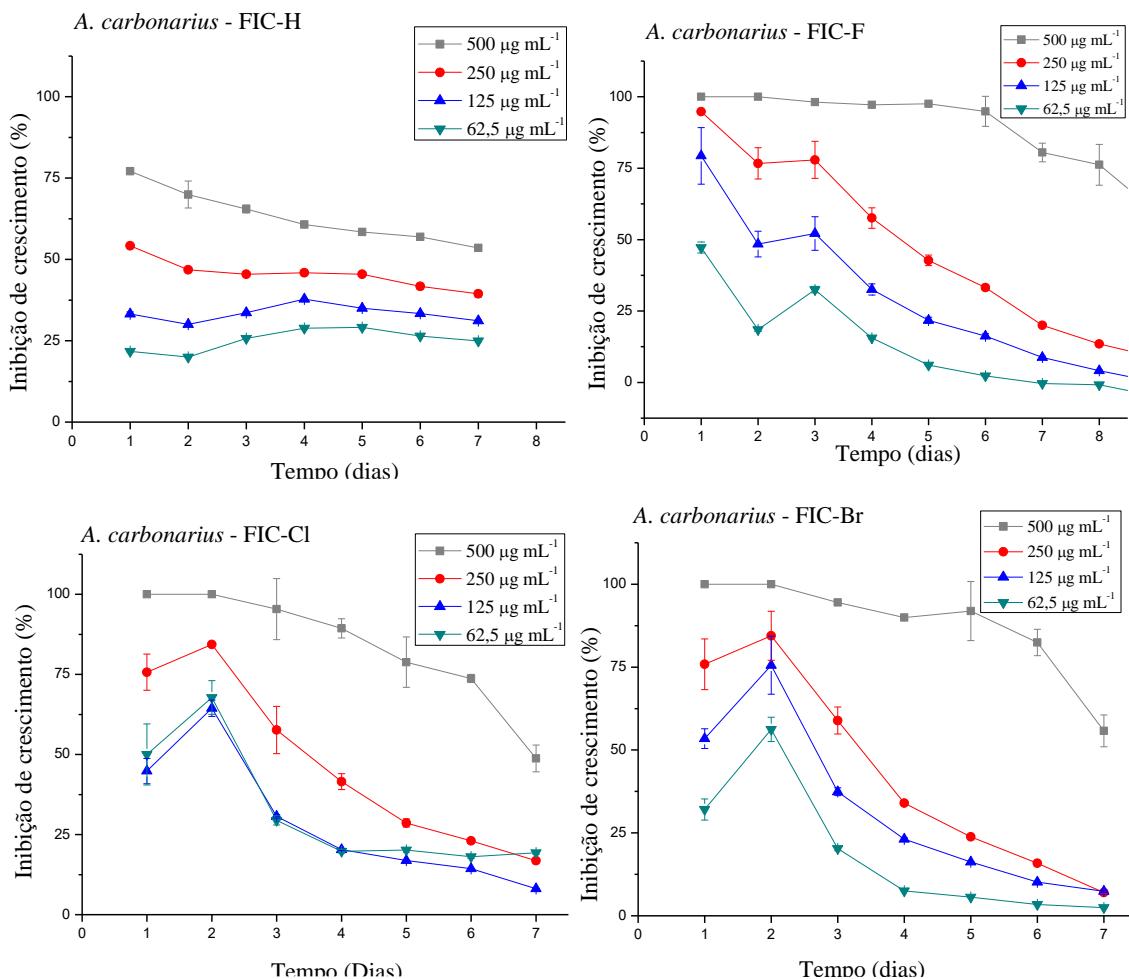
**Gráficos de inibição percentual de crescimento radial de fungos *Aspergillus carbonarius* x Tempo em dias:**

**Avaliações com chalconas:**

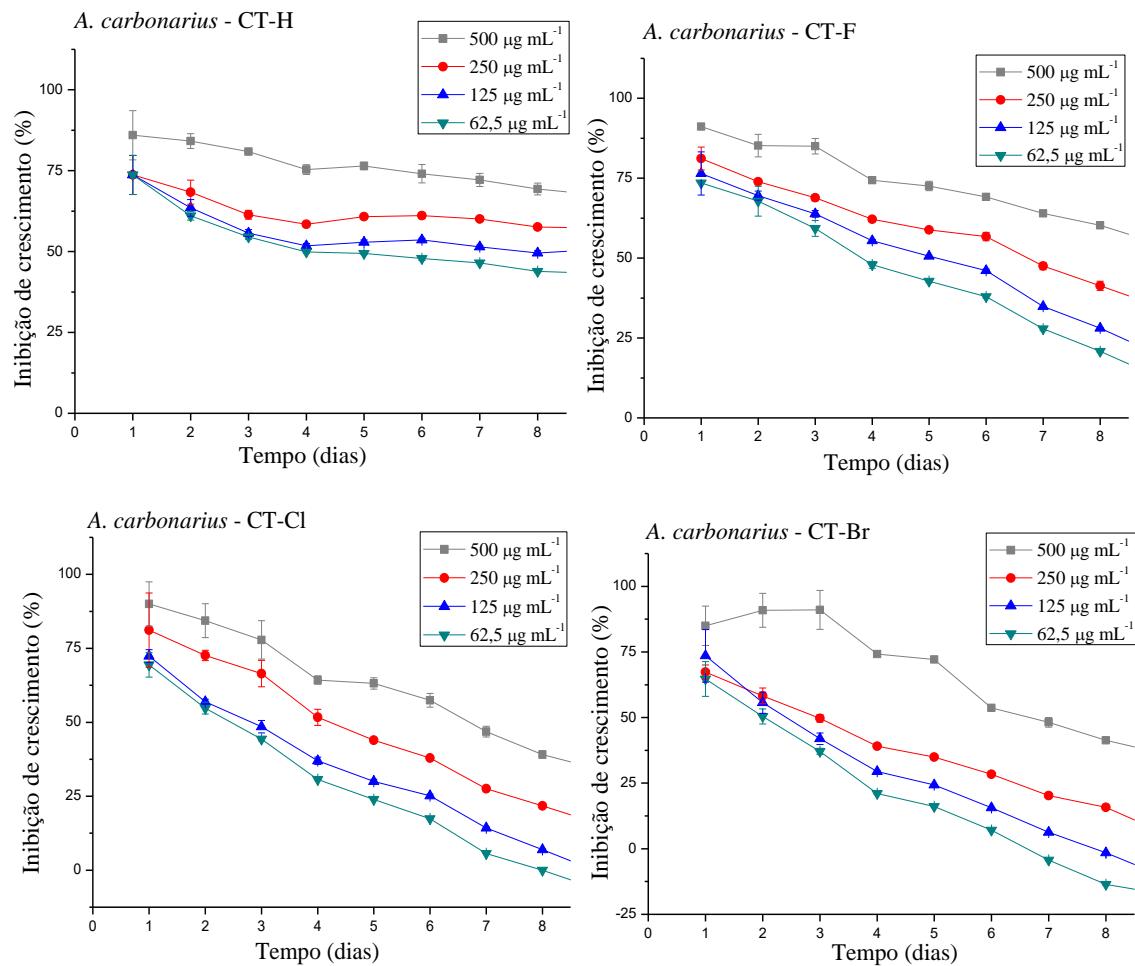




### Avaliações com fenetil-imino-chalconas:

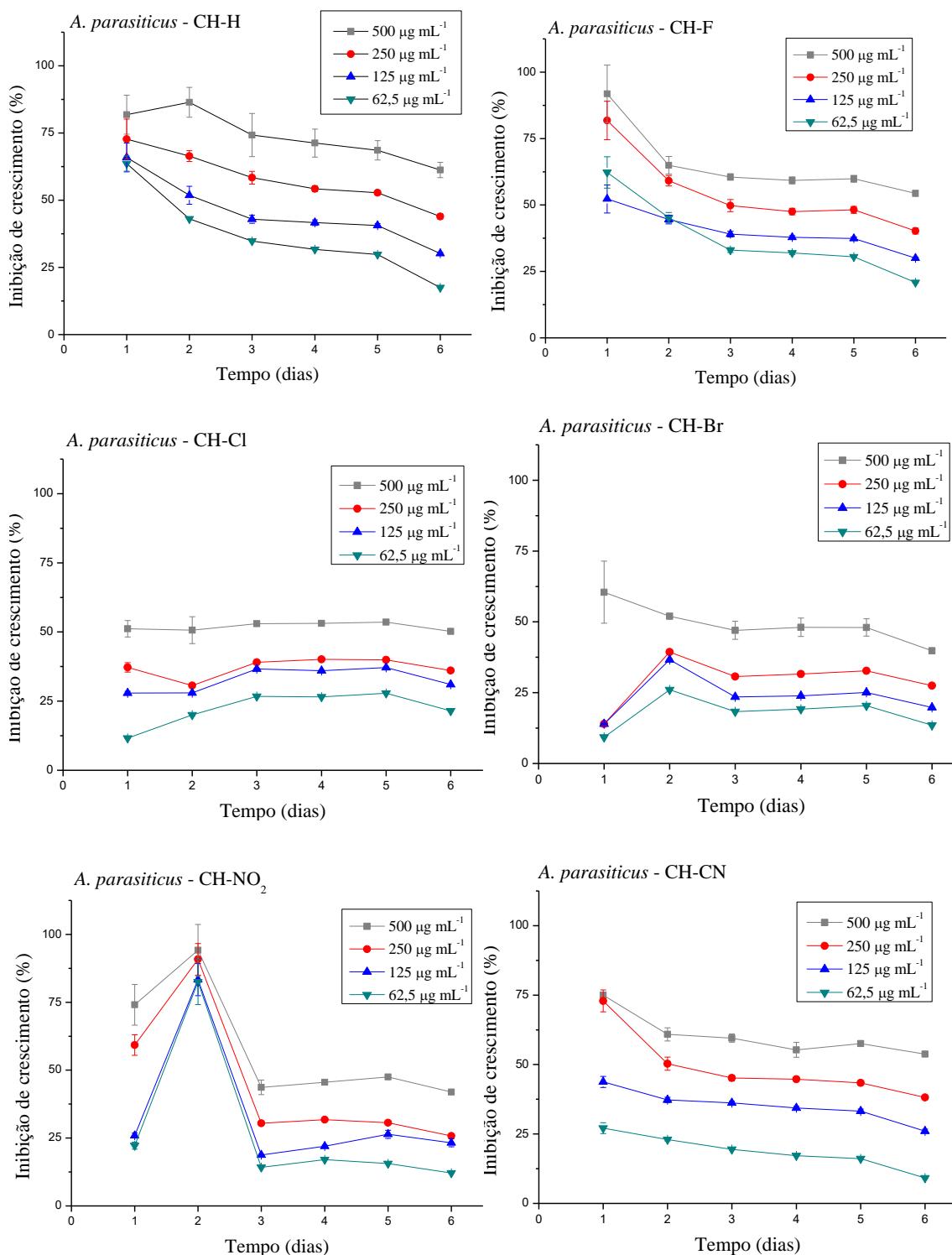


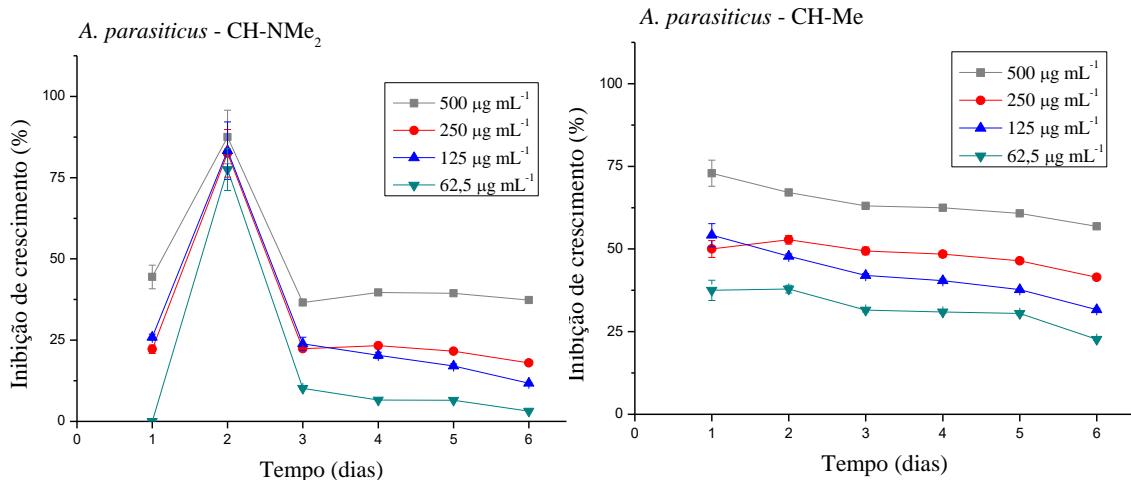
### Avaliações com chalconas-tiossemicarbazonas:



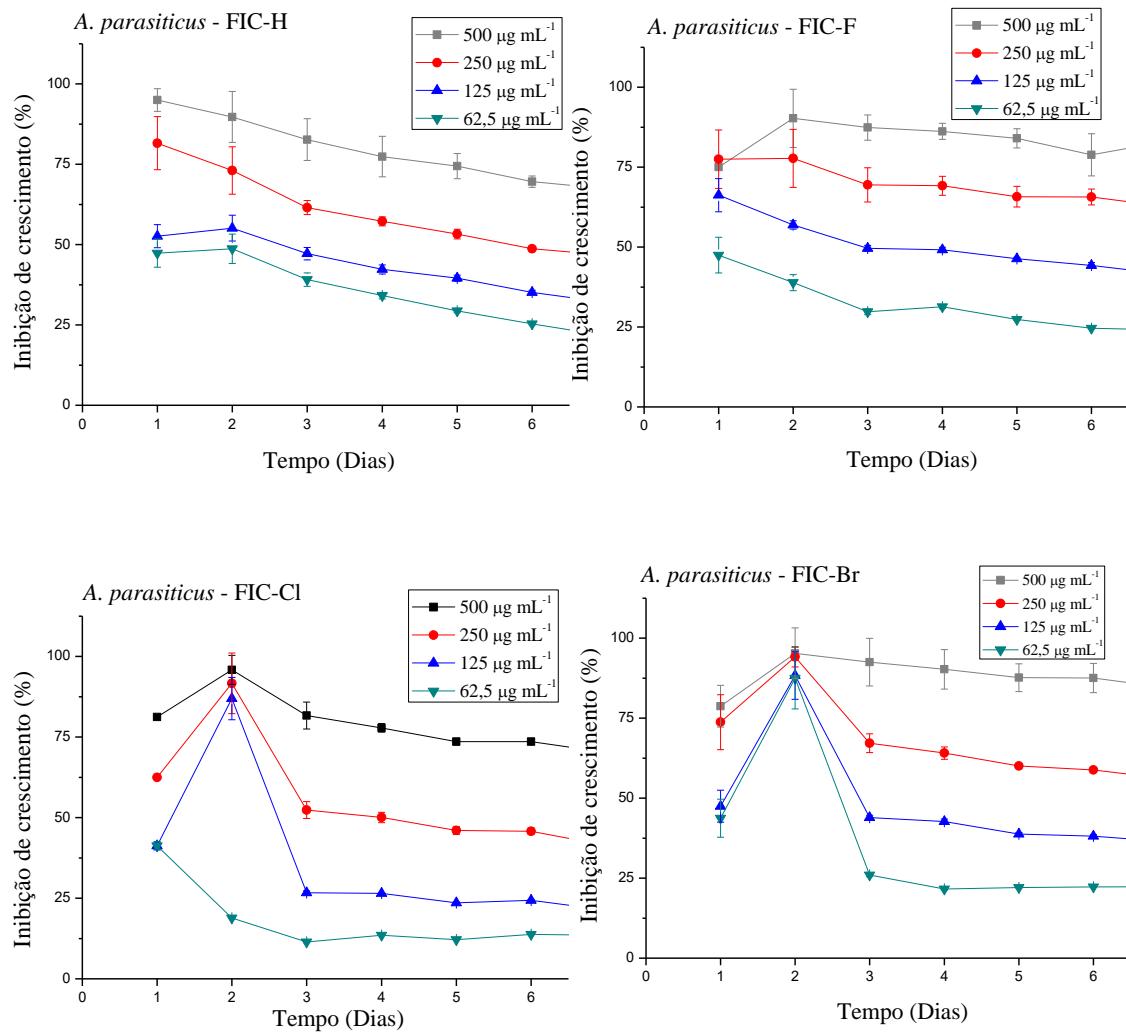
**Gráficos de inibição percentual de crescimento radial de fungos *Aspergillus parasiticus* x Tempo em dias:**

**Avaliações com chalconas:**





### Avaliações com fenetil-imino-chalconas:



### Avaliações com chalconas tiossemicarbazonas:

