



MATHEUS HENRIQUE DA SILVA

**SÍNTESE DE CHALCONAS E *BIS*-CHALCONAS: ESTUDO DE
MODULADORES DE PROTEASES QUE ATUAM NA
MANUTENÇÃO DA HEMOSTASIA**

LAVRAS – MG

2021

MATHEUS HENRIQUE DA SILVA

**SÍNTESE DE CHALCONAS E *BIS*-CHALCONAS: ESTUDO DE MODULADORES
DE PROTEASES QUE ATUAM NA MANUTENÇÃO DA HEMOSTASIA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agroquímica, área de concentração em Química e Bioquímica de produtos naturais e sintéticos, para a obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Silvana Marcussi

Orientadora

Prof. Dr. Sérgio Scherrer Thomasi

Coorientador

LAVRAS – MG

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Silva, Matheus Henrique da.

Síntese de chalconas e *bis*-chalconas: estudo de moduladores de proteases que atuam na manutenção da hemostasia / Matheus Henrique da Silva. - 2021.

54 p.

Orientador(a): Silvana Marcussi.

Coorientador(a): Sérgio Scherrer Thomasi.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Moduladores enzimáticos. 2. Coagulação sanguínea.
3. Inflamação 4. Síntese orgânica. I. Marcussi, Silvana. II. Thomasi, Sérgio Scherrer.

MATHEUS HENRIQUE DA SILVA

**SÍNTESE DE CHALCONAS E *BIS*-CHALCONAS: ESTUDO DE MODULADORES
DE PROTEASES QUE ATUAM NA MANUTENÇÃO DA HEMOSTASIA**

**SYNTHESIS OF CHALCONES AND BIS-CHALCONES: STUDY OF PROTEASE
MODULATORS THAT ACT IN HEMOSTASIS MAINTENANCE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agroquímica, área de concentração em Química e Bioquímica de produtos naturais e sintéticos, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 23 de novembro de 2021.

Dra. Silvana Marcussi UFLA

Dra. Josefina Aparecida de Souza UFLA

Dr. Clayton Zambeli Oliveira UFPB

Profa. Dra. Silvana Marcussi

Orientadora

Prof. Dr. Sérgio Scherrer Thomasi

Coorientador

LAVRAS – MG

2021

Dedico este trabalho a minha família
fonte de amor e inspiração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao universo fonte de vida e energia, e pela possibilidade da existência.

À minha família pelo incentivo e apoio durante toda minha caminhada, em especial, aos meus pais Francisco e Vera por serem exemplos de perseverança e cuidado com os filhos. E aos meus irmãos Izadora e Romerito pelo companheirismo.

Aos meus amigos Larissa, Camila e Mateus por toda a ajuda e amparo no laboratório, no desenvolvimento deste trabalho e pelas palavras de incentivo e apoio.

Aos professores Silvana e Sérgio por toda a orientação e ensinamentos transmitidos durante esse período.

Agradeço ao grupo de pesquisa em síntese orgânica pelas discussões extremamente enriquecedoras e pelos momentos de descontração e amizade proporcionados.

Aos professores e técnicos que participaram e contribuíram com conhecimento e ensinamentos que foram de grande relevância.

À Universidade Federal de Lavras, o departamento de Química e o Laboratório de Bioquímica pela disponibilização da infraestrutura necessária e apoio de toda a equipe para que a realização da pesquisa pudesse ocorrer.

Agradeço também à CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – pelo apoio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho – Código de financiamento 001”.

MUITO OBRIGADO!

RESUMO

As patologias relacionadas a distúrbios da hemostasia e inflamação afligem grande parte da população mundial. Destacam-se, as doenças cardiovasculares como acidente vascular cerebral (AVC), doença isquêmica do coração e insuficiência cardíaca. Logo, compreender o papel e função de cada estrutura nestes mecanismos é de fundamental importância, bem como a busca por moléculas que possam modular de forma eficiente e específica componentes que atuam nestes processos, possibilitando o tratamento ou cura destas doenças. É, portanto, de suma importância a pesquisa e síntese de novas substâncias que apresentem atividade biológica no controle da inflamação e sob o mecanismo da hemostasia. As chalconas e *bis*-chalconas são substâncias que tem demonstrado grande variedade de aplicações farmacológicas como anti-inflamatória, antioxidante, anticonvulsivante, anti-acetilcolinesterase, antituberculose, para tratamento de câncer e diabetes, entre outras. Além disso, algumas características tornam essas moléculas alvos de grande interesse para pesquisadores ao redor do mundo, como por exemplo rotas de síntese relativamente simples, alto rendimento das reações, e a presença de hidrogênios que podem ser substituídos por uma enorme variedade de substituintes, o que possibilita, uma fonte praticamente inesgotável de estruturas. Nesse estudo foram sintetizados 4 compostos, sendo 2 derivados de chalconas e 2 de *bis*-chalconas, a síntese foi realizada por condensação de Claisen-Schmidt e caracterização das estruturas realizada por Ressonância Magnética Nuclear (RMN). O potencial biológico das moléculas foi avaliado em ensaios de atividade fosfolipásica, hemolítica e coagulante. O derivado de *bis*-chalcona, (1E,4E)-1,5-*bis*(2-clorofenil)penta-1,4-dien-3-ona apresentou bons resultados em retardar o processo de coagulação, e modular a degradação de fosfolipídios e eritrócitos humanos. Dessa forma, tal substância apresenta potencial para aplicação em doenças cardiovasculares, todavia é necessário mais testes e outros estudos para uma melhor compreensão de seu mecanismo de ação.

Palavras chave: Moduladores enzimáticos. Coagulação sanguínea. Inflamação. Síntese orgânica.

ABSTRACT

Pathologies related to disturbances of haemostasis and inflammation affect a large part of the world population. Among those illnesses, cardiovascular diseases such as cerebrovasculares diseases (CVD), ischemic heart disease, and cardiac failure are the main ones. Thus, the comprehension of the role and function of each biological structure in these mechanisms is fundamentally important, as well as the search for molecules able to modulate the components that act in these processes in an efficient and specific way, making the treatment and even healing of such diseases possible. Therefore, the research and synthesis of novel substances which show biological activities against inflammation and over haemostasis are of major importance. Chalcones and *bis*-chalcones are compounds that have shown a huge variety of pharmacological applications as anti-inflammatories, antioxidants, anticonvulsants, acetylcholinesterase inhibitors, antituberculosis, for cancer treatment, diabetes, etc. Furthermore, some characteristics of these molecules like simple synthesis pathways and high reaction yields make them targets of high interest for researchers all over the world. Additionally, the presence of hydrogens that can be replaced by several substituents provides an almost endless source of structures. In this work, four compounds were synthesized, which were 2 chalcone derivatives and 2 *bis*-chalcone derivatives. The synthesis were performed through Claisen-Schmidt condensation and the structures were characterized by Nuclear Magnetic Resonance (NMR). The biological properties of the molecules were evaluated by phospholipase, hemolytic, and clotting activities trials. The *bis*-chalcone derivative (1E,4E)-1,5-*bis*(2-chlorophenyl)penta-1,4-dien-3-one showed good results retarding the clotting process and modulating the human phospholipid and erythrocyte degradation. Thus, this substance has the potential for application against cardiovascular diseases. However, more studies are needed to better understand its action mechanism.

Keywords: Enzyme modulators. Blood clotting. Inflammation. Organic synthesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura básica das chalconas: Isômeros Z e E, respectivamente.	14
Figura 2 - Estruturas químicas de diferentes chalconas com atividades farmacológicas.	15
Figura 3 - Estrutura de chalconas sintéticas com atividades biológicas.	16
Figura 4 - Mecanismo de formação de derivados de chalconas em meio básico.	17
Figura 5 – Metodologia sintética para obtenção de chalconas de Suzuki-Miyaura.	18
Figura 6 - Metodologia sintética para obtenção de chalconas de Rueping e colaboradores (2011).	18
Figura 7 - Síntese multicomponente de chalconas proposta por MAHAPATRA et al. (2015).	19
Figura 8 – Estrutura química da curcumina.	20
Figura 9 - Mecanismo de síntese de bis-chalconas a partir do benzaldeído e acetona.	20
Figura 10 – Cascata de coagulação.	22
Figura 11 – Derivados de Chalconas e Bis-chalconas sintetizados no presente trabalho.	29
Figura 12 – Espectro de RMN de ¹ H para a molécula (I).	30
Figura 13 – Espectro de RMN ¹ H. Ampliação da região de aromáticos para a molécula (I). ..	30
Figura 14 – Espectro de RMN ¹³ C para a molécula (I).	31
Figura 15 – Espectro de RMN ¹ H para o composto (IV).	32
Figura 16 – Ampliação da região de aromáticos para o composto (IV).	33
Figura 17 – Espectro de ¹³ C para o composto (IV).	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados do espectro de RMN 13C do composto (1).....	31
Tabela 2 – Valores de δ para o espectro de RMN 13C do composto (4).....	34
Tabela 3 – Atividade enzimática (%) da peçonha de <i>Bothrops moojeni</i> para o ensaio fosfolipásico e efeitos dos compostos sintetizados.	36
Tabela 4 – Atividade hemolítica (%) da peçonha de <i>Bothrops moojeni</i> e efeito dos compostos sintetizados	38
Tabela 5 – Tempo de coagulação de plasma citratado, induzido por peçonha de <i>Bothrops moojeni</i> , e efeito dos compostos sintetizados previamente incubados com a peçonha.....	40

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVO GERAL	13
2.1 Objetivos específicos	13
3 REFERENCIAL TEÓRICO	14
3.1 Chalconas.....	14
3.2 Métodos de síntese de chalconas.....	16
3.2.1 <i>Bis</i> -chalconas	19
3.3 Hemostasia.....	21
3.4 Proteases que atuam na coagulação como alvos de drogas anticoagulantes	23
3.5 Proteases de peçonha de serpentes como ferramenta laboratorial	23
3.6 Fosfolipases A ₂	24
4 METODOLOGIA	25
4.1 Síntese dos compostos: Chalconas e <i>bis</i> -chalconas	25
4.2 Caracterização das estruturas	25
4.2.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	25
4.3 Obtenção de material biológico humano	26
4.4 Peçonhas de serpentes	27
4.5 Ensaios de atividade fosfolipásica e hemolítica	27
4.6 Efeitos sobre a coagulação de plasma humano citratado.....	28
4.7 Análise dos resultados	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	28
5.1 Análise de espectros de RMN para a molécula (I).....	29
5.2 Análise dos espectros de RMN para a molécula (IV)	32
5.3 Atividade fosfolipásica.....	34
5.4 Atividade hemolítica	37
5.5 Atividade coagulante	39
6 CONCLUSÃO	41
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
ANEXOS	47
Anexo A - Parecer do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos.....	47
.....	51
Anexo B – Espectros de RMN das moléculas II e III	52

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares são a principal causa de mortes em todo o mundo, em decorrência do aumento populacional, envelhecimento, e principalmente, diminuição da qualidade de vida (READ; WILD,2020). As principais complicações cardiovasculares incluem doença isquêmica do coração, acidente vascular cerebral (AVC), insuficiência cardíaca, doença arterial periférica e diversas outras cardiopatias e alterações vasculares. Os Distúrbios relacionados a hemostasia e inflamação tem papel importante no surgimento e desenvolvimento de tais patologias (CHATTERJEE et al., 2020). Assim, o estudo e pesquisa de moléculas que possam modular a atividade das biomoléculas que atuam no processo hemostático e na inflamação, sobretudo enzimas, tornam-se de suma relevância.

Os compostos α , β insaturados são uma classe de substâncias que se apresentam como promissores para o tratamento de tais enfermidades, principalmente, as chalconas e *bis*-chalconas. As chalconas, são caracterizadas por um sistema carbonílico α , β -insaturado que une dois anéis aromáticos, enquanto, as *bis*-chalconas possuem uma região dienona conectada a dois anéis aromáticos. A carbonila α , β insaturada é responsável pelas propriedades farmacológicas destes compostos. O potencial dessas substâncias vem sendo explorado para uma grande variedade de aplicações como tratamento de câncer, diabetes, malária e tuberculose. A síntese relativamente simples e a possibilidade de produção de muitos derivados, viabiliza ainda mais seu estudo.

Chalconas naturais como a licochalcona A, já demonstraram atividade anti-inflamatória e sobre o processo de hemostasia (MAHAPATRA et al.,2015). No entanto, há poucos trabalhos relacionados a aplicação destes compostos com essa finalidade, o que possibilita o desenvolvimento de pesquisas com tal propósito. Isto deve-se, a variedade de estruturas que podem ser sintetizadas, incluindo aquelas com a presença de halogênios como cloro, flúor e bromo, que são conhecidos por apresentarem grande interação com biomoléculas e estarem presentes na composição de muitos fármacos. Assim, a pesquisa aplicada ao uso dessas substâncias para tratamento e controle de alterações na hemostasia e inflamação, é de grande relevância.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo, a síntese de derivados de chalconas e *bis*-chalconas e a avaliação sobre a citotoxicidade, influência sobre o processo de coagulação do plasma, e ainda seus efeitos na modulação de enzimas similares a trombina, que, mostram-se de grande relevância médico-científica.

2 OBJETIVO GERAL

Síntese e caracterização de derivados de chalconas e *bis*-chalconas, prospecção de atividade citotóxica/anti-inflamatória, efeitos sobre coagulação de plasma, e estudo da ação moduladora sobre fosfolipases A₂ e proteases que atuam em processos relacionados a hemostasia e resposta inflamatória.

2.1 Objetivos específicos

I - Sintetizar 2 derivados de chalconas, e 2 derivados de *bis*-chalconas utilizando a reação de condensação de Claisen-Schmidt.

II - Caracterizar as moléculas obtidas por meio de ressonância magnética nuclear (RMN)

III - Prospecionar os efeitos das moléculas sintetizadas sobre eritrócitos humanos (citotoxicidade), e seu potencial de inibição sobre a lise de eritrócitos induzida por proteases.

IV - Avaliar os efeitos dos compostos sintetizados sobre a coagulação de plasma citratado (avaliar se os compostos interferem na coagulação normal com adição de cálcio); e sua atividade moduladora sobre proteases coagulantes.

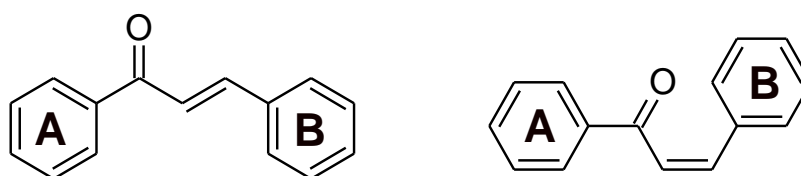
V – Avaliar a atividade moduladora dos compostos sintetizados sobre a atividade de fosfolipases A₂.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Chalconas

Pertencente à família dos flavonóides, as chalconas representam uma classe importante de moléculas com cadeia aberta, servindo como precursoras de outros flavonóides e isoflavonoides para as plantas (SAHU et al., 2012). As chalconas são moléculas pertencentes a um grupo de substâncias que possuem o esqueleto carbônico geral 1,3-difenil-2-propen-1-ona, e contém uma carbonila α , β -insaturada, unindo dois anéis aromáticos (Figura 1). Esta estrutura pode existir na forma dos isômeros *Z* e *E*, no entanto, termodinamicamente o isômero *E* é mais estável. A configuração do isômero *Z* é desestabilizada devido aos efeitos estéricos entre a carbonila e o anel B (AKSÖZ et al., 2011; LEMES et al., 2018). As estruturas básicas dos isômeros de chalconas podem ser observadas na figura 1.

Figura 1 - Estrutura básica das chalconas: Isômeros *Z* e *E*, respectivamente.



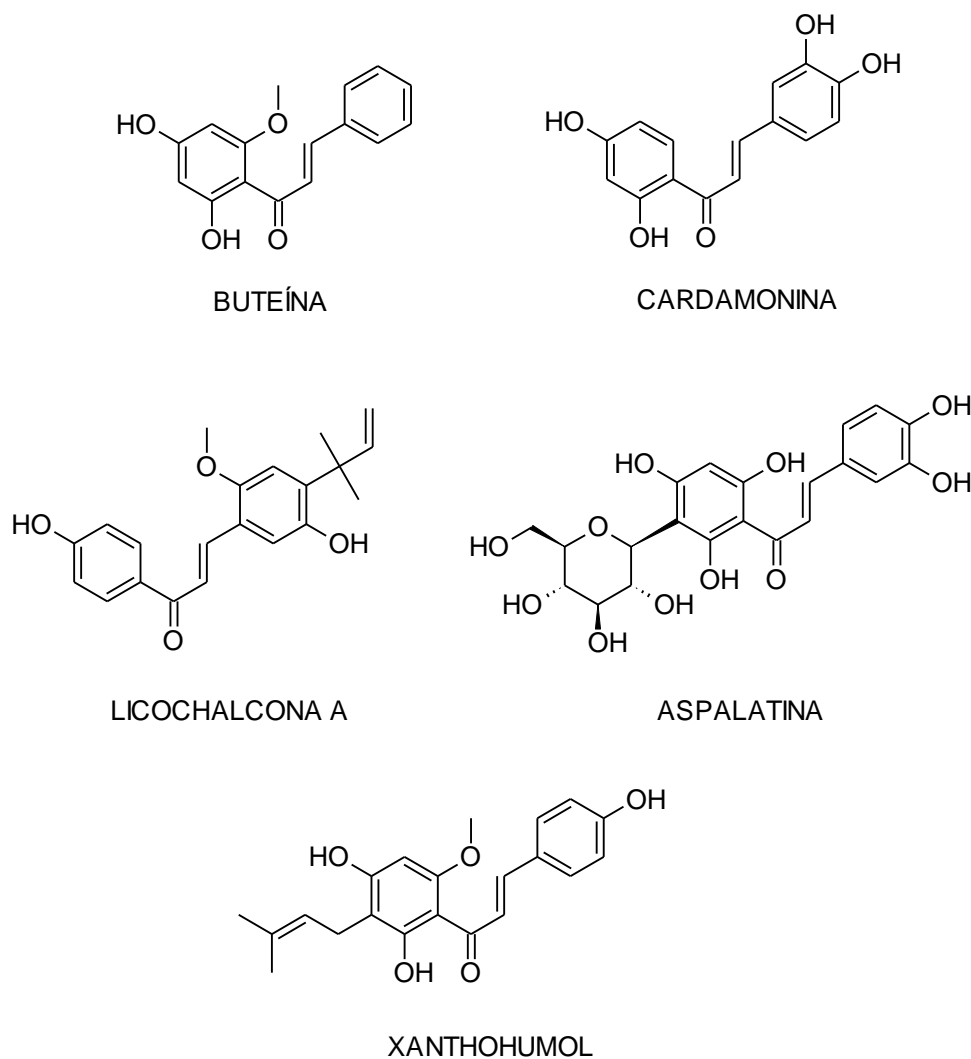
Fonte: Do autor, adaptado de GOMES et al (2017).

Nas plantas as chalconas são encontradas em diferentes regiões como caule, raízes, frutas, sementes e flores (LIMA et al., 2017). Essas substâncias desempenham diferentes funções dependendo do processo em que estão envolvidas, como na filtração dos raios ultravioletas, fixação de nitrogênio, além da pigmentação de flores, permitindo assim, a atração de insetos e pássaros para que a polinização ocorra. Algumas espécies de plantas como *Angelica keiskei*, *Glycyrrhiza inflata* and *Piper aduncum* são fontes abundantes dessa classe de moléculas, que, está associada ao uso medicinal popular dessas plantas (SAHU et al., 2012; RANI et al., 2019).

As propriedades medicinais de uma série de espécies vegetais já foram demonstradas em diversas pesquisas, e estão associadas a presença de chalconas (Figura 2), como a atividade anticâncer da buteína presente nas cascas de *Rhus verniciflua* (JAYASOORIYA et al., 2018); o potencial anti-inflamatório da licochalcona A, extraída da *Glycyrrhiza inflata*

(MAHAPATRA et al., 2015), o efeito cardioprotetor da cardamonina (DÍAZ-TIELAS et al., 2016; KU et al., 2015; YOU et al., 2018); a atividade anti-angiogênica do xanthohumol (NUTI., 2017) e a propriedade antioxidante da aspalatina (JOHNSON et al., 2018). Algumas estruturas de chalconas com atividades farmacológicas comprovadas podem ser observadas na figura 2.

Figura 2 - Estruturas químicas de diferentes chalconas com atividades farmacológicas.



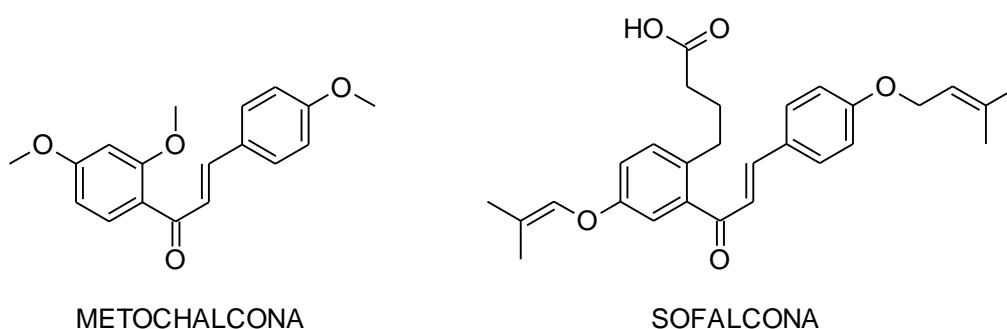
Fonte: Do autor (2021).

A possibilidade de uma vasta gama de aplicações para as chalconas naturais, promoveu também um interesse em produzir essas substâncias de forma sintética, ou semi-sintética. Desse modo, modificações na estrutura básica das chalconas como adição de substituintes alquílicos, a introdução de átomos de halogênios, anéis aromáticos, grupos metoxila, entre outros, já foram estudadas e as estruturas modificadas apresentaram atividade biológica (CAMARGOS et al.,

2016; CUSTÓDIO et al., 2017; CAO et al., 2018). Assim, as chalconas, tanto naturais como sintéticas, vem sendo cada vez mais pesquisadas com o objetivo de desenvolver novos fármacos com aplicação no tratamento de câncer (RIAZ et al., 2019), tuberculose, malária (RANI et al., 2019), diabetes (MAHAPATRA et al., 2015), no controle de processos inflamatórios (CHEN et al., 2018; ÖZDEMIR et al., 2015), e no tratamento de infecções bacterianas e fúngicas (ZHUANG et al., 2017).

A partir de então, uma série de moléculas já foram sintetizadas e testadas abrangendo uma variedade de aplicações. A metochalcona e a sofalcona (Figura 3), são exemplos sintéticos que demonstraram potencial farmacológico, a primeira já se encontra no mercado pelo nome comercial (Vesidryl), e é indicada como fármaco colerético e diurético (GOMES et al., 2017); enquanto a sofalcona foi aprovada para testes clínicos apresentando propriedades anti-úlceras e efeito gastroprotetor (HIGUCHI, 2010). Algumas estruturas de chalconas sintéticas com atividades biológicas podem ser observadas na figura 3.

Figura 3 - Estrutura de chalconas sintéticas com atividades biológicas.



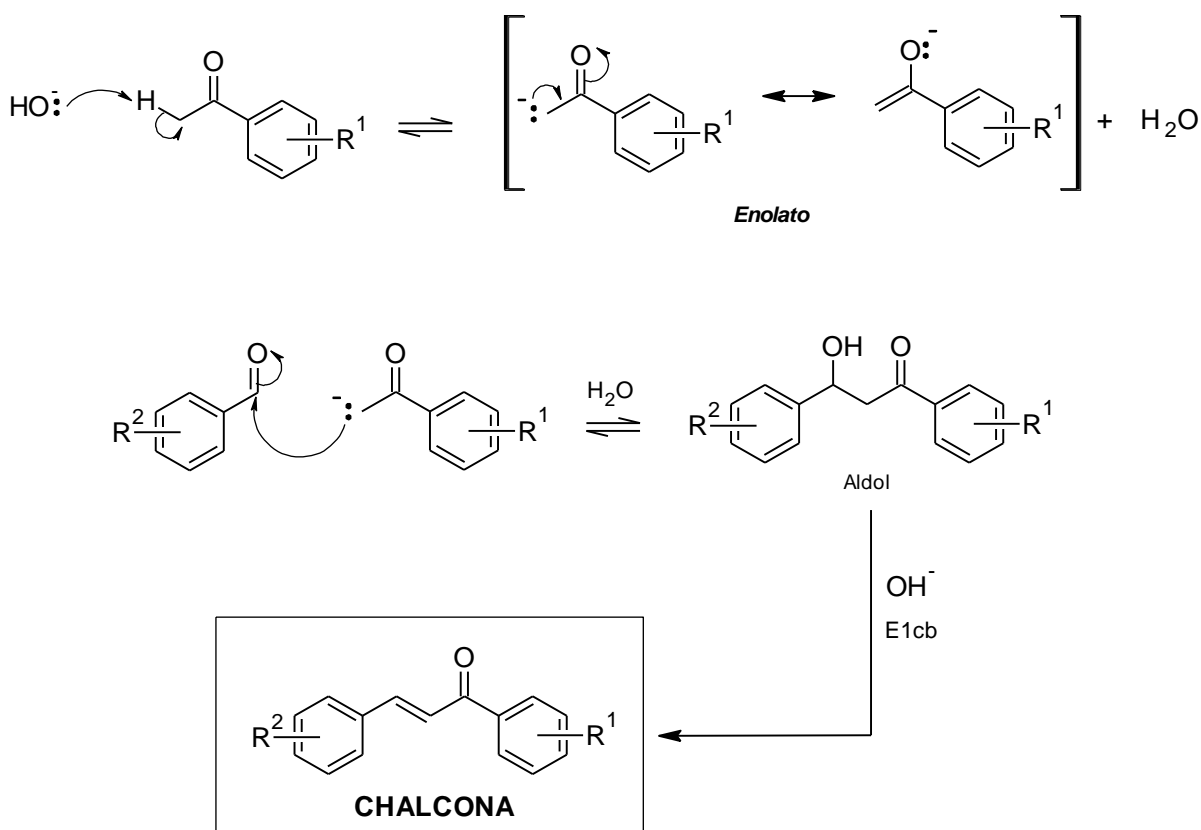
Fonte: Do autor, adaptado de HIGUCHI (2010).

3.2 Métodos de síntese de chalconas

O método clássico de síntese das chalconas é por meio da reação de condensação de Claisen-Schmidt, esse processo pode ser catalisado com o uso de bases ou ácidos fortes, e a reação é feita adicionando-se acetofenona e benzaldeído em quantidades equimolares. Na catálise básica, que, geralmente é a mais empregada para síntese de chalconas, inicialmente, ocorre a perda de um próton no carbono alfa de derivados de acetofenonas e forma-se o ânion enolato, este pode ser estabilizado por ressonância, e em seguida, derivados do benzaldeído sofrem um ataque nucleofílico pelo enolato e forma-se um ânion alcóxido. O íon alcóxido

remove então um hidrogênio da água, produzindo um aldol, e em uma última etapa ocorre uma desidratação por um mecanismo E1cb (que corresponde a saída de um grupo OH, catalisada por base) para gerar o produto conjugado (Figura 4).

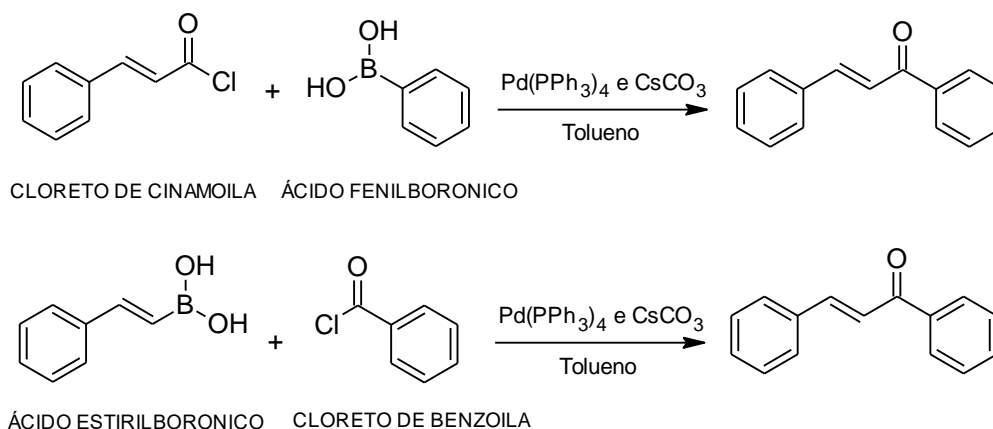
Figura 4 - Mecanismo de formação de derivados de chalconas em meio básico.



Fonte: Do autor (2021).

Outras metodologias já foram reportadas e consolidadas como a reação de acoplamento de Suzuki-Miyaura. A síntese por este método pode ser realizada pela rota A, partindo-se dos reagentes cloreto de cinamoila e ácido fenilborônico, ou pela rota B utilizando-se ácido estirilborônico e cloreto de benzoíla; e é catalisada por Paládio e carbonato de Césio empregando-se tolueno como solvente (Figura 5). Para a primeira reação os rendimentos encontrados são moderados (41 – 51%), já para a rota B os rendimentos variam de bons a excelentes (68- 93%). Essa estratégia de síntese possibilita produzir chalconas metoxiladas nos anéis aromáticos, assim como a maioria das chalconas de fontes naturais (SELEPE; VAN HEERDEN, 2013).

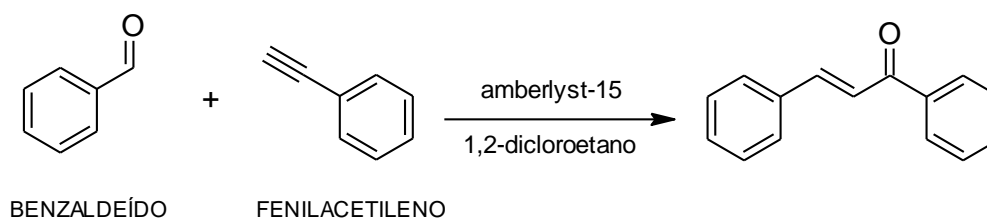
Figura 5 – Metodologia sintética para obtenção de chalconas de Suzuki-Miyaura.



Fonte: Do autor, adaptado de SELEPE & VAN HEERDEN (2013).

Rueping e colaboradores (2011) apresentaram a síntese de chalconas utilizando um catalisador heterogêneo sólido ácido. Tal metodologia de síntese consiste em adicionar de forma estequiométrica (1:1) os seguintes reagentes, benzaldeído e fenilacetileno, usando, desse modo, uma resina amberlyst-15 de troca iônica como catalisador heterogêneo e 1,2-dicloroetano como solvente (Figura 6). Segundo os autores a metodologia empregada apresenta vantagens com relação ao método clássico, pois, permite a síntese a partir de alcinos e benzaldeídos comerciais, um fluxo contínuo de coleta do produto, restrição na produção de subprodutos e além disso possibilita a preparação de chalconas em escala multigramas.

Figura 6 - Metodologia sintética para obtenção de chalconas de Rueping e colaboradores (2011).

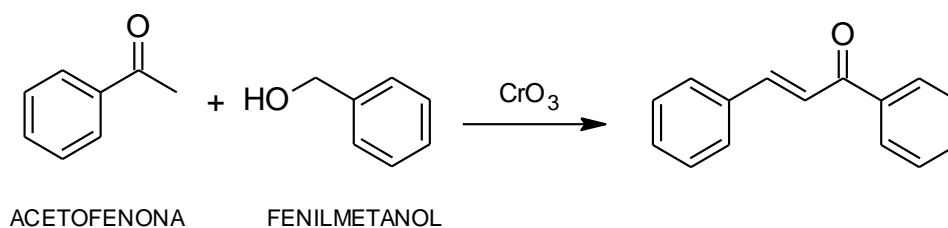


Fonte: Do autor, adaptado de RUEPING et al., (2011).

A síntese multicomponente também tem sido empregada na produção de chalconas. Em contrapartida aos outros métodos já mencionados, este possui algumas vantagens como melhor eficiência da reação, evita processos de purificação, além de utilizar menos recursos e tempo (MAHAPATRA et al., 2015). Ao decorrer da síntese o CrO_3 tem o papel crucial de promover

a oxidação do fenilmetanol em benzaldeído, para que posteriormente ocorra a reação entre acetofenona e benzaldeído dando origem a chalconas de interesse (MAHAPATRA et al., 2015) (Figura 7).

Figura 7 - Síntese multicomponente de chalconas proposta por Mahapatra et al. (2015).



Fonte: Do autor, adaptado de MAHAPATRA et al., (2015).

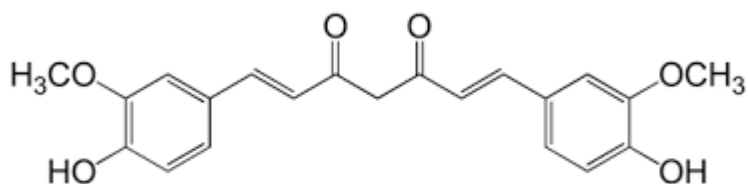
A partir das informações apresentadas, nota-se que, as chalconas caracterizam um importante grupo de substâncias com expressivo potencial para a síntese e desenvolvimento de novos fármacos. Algumas características tornam essas moléculas alvos de grande interesse para pesquisadores ao redor do mundo, como rotas de síntese relativamente simples, baixa toxicidade, alto rendimento das reações, e além disso a presença de hidrogênios que podem ser substituídos por uma enorme variedade de substituintes, o que possibilita, uma fonte praticamente inesgotável de estruturas.

3.2.1 *Bis-chalconas*

As *bis-chalconas* são moléculas que possuem uma região dienona conectada a dois anéis aromáticos, e podem ser simétricas ou assimétricas. A principal característica desse tipo de molécula é sua capacidade de absorver energia na região do visível, devido, a grande conjugação existente em sua estrutura (DOROTEIO, 2016). Do ponto de vista sintético não há grandes diferenças entre a obtenção de *mono-* e *bis-chalconas*, exceto pela necessidade de dois equivalentes de aldeído no caso das *bis-chalconas* (GIACOLETTO; DUMUR, 2021).

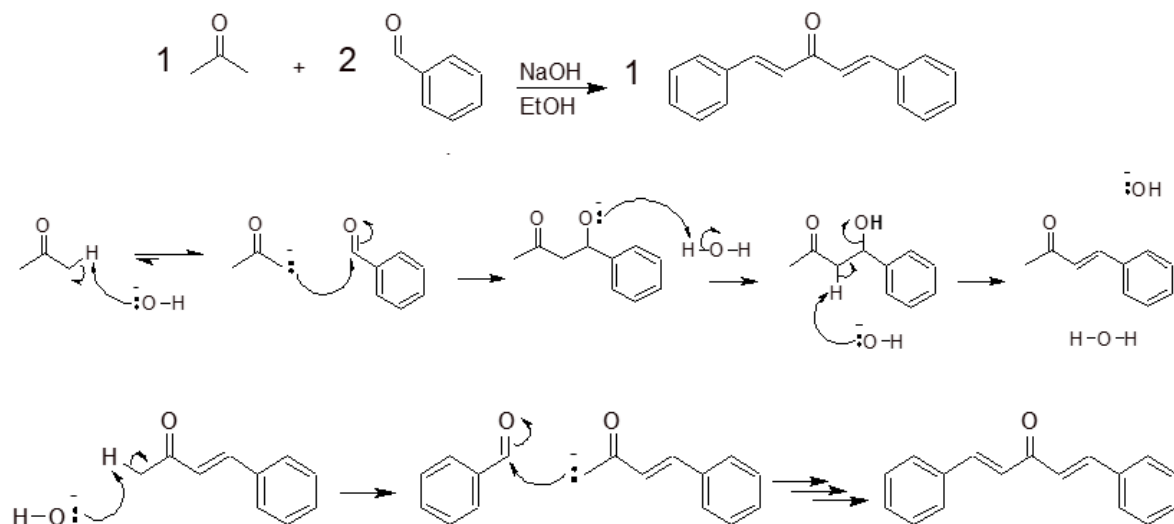
Além das características espectrais, outras propriedades das *bis-chalconas* já foram descritas, especialmente, com interesse fármaco-medicinal. A curcumina (figura 8) por exemplo, representante desta classe de origem natural, apresenta atividade anti-inflamatória, antioxidante, reguladora do Sistema imunológico, entre outras (XU et al., 2018).

Figura 8 – Estrutura química da curcumina.



Fonte: Do autor, adaptado de XU et al (2018).

Muitas outras propriedades farmacológicas foram reportadas para as *bis*-chalconas, como atividade bactericida, fungicida (KUMAR et al., 2014), anticâncer, e possível ação no tratamento de diabetes atuando na inibição de α -amilase (BALE et al., 2018). A obtenção dessas moléculas também é feita por meio da condensação de Claisen-Schmidt e possibilita a síntese de uma grande variedade de estruturas modificando o aldeído e cetona utilizados. A figura 9 demonstra o mecanismo de síntese de *bis*-chalconas a partir do benzaldeído e acetona.

Figura 9 - Mecanismo de síntese de *bis*-chalconas a partir do benzaldeído e acetona.

Fonte: Do autor (2021).

3.3 Hemostasia

O modelo atual para descrever a hemostasia é composto, essencialmente, por duas fases principais, a hemostasia primária e secundária (GALE, 2011). Juntas, as etapas requerem a participação de uma grande variedade de estruturas como tecido endotelial, vasos sanguíneos, plaquetas e proteínas da cascata de coagulação. Então, quando ocorre alguma lesão aos vasos essas fases do mecanismo iniciam-se como resposta imediata para prevenir que o organismo perca grande volume de sangue (BERGER, 2014).

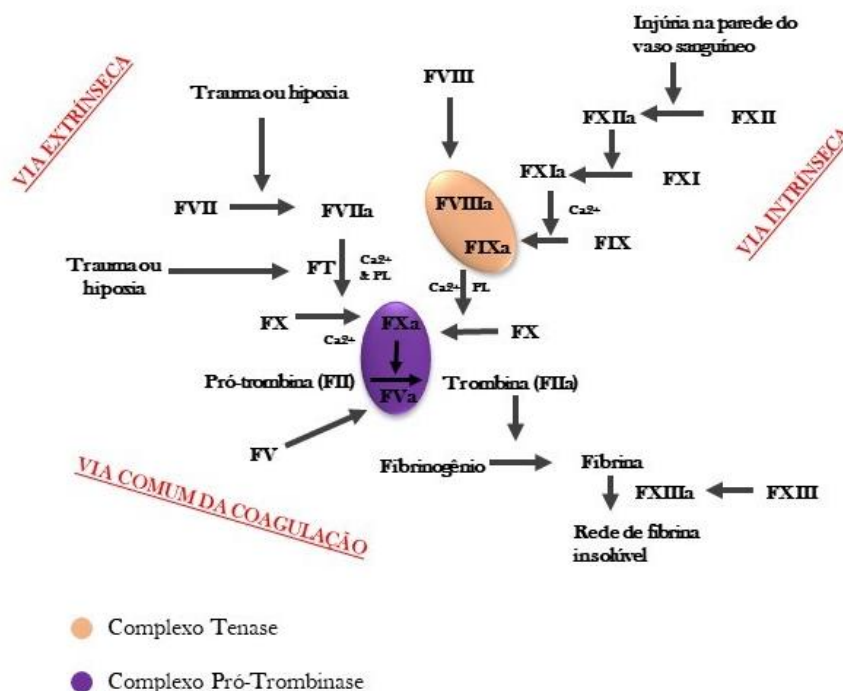
A hemostasia primária consiste na formação de um tampão que veda o extravasamento dos constituintes intravasculares e restaura a integridade do vaso lesado (CONWAY, 2018). Durante esta etapa, ocorre a vasoconstrição e, as plaquetas exercem uma função central, acumulando-se de forma expressiva no local da lesão. Na sequência, há uma modificação e ativação em sua estrutura, para promover adesão ao tecido endotelial circundante ao local danificado (BROOS et al., 2011). A partir de então, prossegue-se uma série de eventos coordenados, podendo-se destacar, a interação do fibrinogênio e do fator de von Willebrand (FvW) com as glicoproteínas IIb/IIIa da superfície de plaquetas, também conhecidas como integrinas α IIb β 3, e glicoproteínas Ib/IX/V (LIPPI; FAVOLORO, 2018). No entanto, o tampão hemostático formado é vulnerável e instável, devido, à rápida dissolução pela corrente sanguínea, além disso, nas artérias está sujeito há maiores pressões.

De forma complementar a hemostasia secundária tem a função de dar resistência e estabilidade ao tampão hemostático formado, através da produção de redes de fibrina (PIETERS; WOLBERG, 2019; RODRIGUES, 2012). O processo de coagulação como é muitas vezes mencionado, é definido como uma série de biotransformações, envolvendo, majoritariamente enzimas proteolíticas, que são sintetizadas em sua forma inativa, ou, zimogênios (AL-HORANI; AFOSAH, 2018). Isto, garante que não ocorra nenhuma ativação ou degradação indesejável de proteínas, possibilitando a modulação espacial e temporal da cascata de coagulação (VERSTEEG, 2013).

Como mencionado anteriormente, ambas as fases da hemostasia agem de modo sinérgico, portanto, após a injúria vascular não decorre somente a agregação plaquetária, mas há também a liberação de muitas substâncias pró-trombóticas, como o Fator Tecidual (FT) que rapidamente forma um complexo com FVII, dando início a cascata de coagulação. Em seguida, FVIIa promove a ativação de FX em FXa, essa etapa anteriormente denominada por via extrínseca é atualmente conhecida como via do Fator Tecidual (MCVEY, 2016). A etapa seguinte (via comum da coagulação) depende da participação de FXa e FVa para a conversão

da pró-trombina (FII) em trombina (FIIa). Então, a trombina catalisa a ativação do fibrinogênio produzindo moléculas de fibrina, que posteriormente são estabilizadas pelo fator XIIIa. Entretanto, a produção de fibrina também acontece por outra via que amplifica, fornece rigidez e estabiliza a formação do coágulo, hoje nomeada de via da arrebentação da trombina (via intrínseca) (SCHROEDER; KHOELER, 2016). Assim, a formação do complexo entre FVIIa-FT, também é responsável por ativar o fator IX (FIX) em FIXa que juntamente com o fator VIIIa (FVIIIa), e na presença de fosfolipídios e íons Ca^{2+} , dão origem ao complexo tenase. Então, o complexo tenase ativa FX em FXa, a partir daí o caminho até a produção de fibrina é análogo ao descrito pela via do fator tecidual, e a parte da cascata de coagulação compartilhada pelas duas vias é designada por via comum da coagulação (AL-HORANI; AFOSAH, 2018; SMITH et al., 2015). O esquema da cascata de coagulação pode ser observado na figura 10.

Figura 10 – Cascata de coagulação.



Fonte: do Autor, Adaptado de AL-HORANI & AFOSAH (2018).

Quando o mecanismo hemostático sofre alterações, originam-se diversas patologias que podem prejudicar o funcionamento normal do organismo, ou até mesmo provocar a morte de indivíduos (ARNETH et al., 2019). Portanto, compreender e elucidar os mecanismos da

hemostasia tornam-se de suma relevância. Assim como o desenvolvimento de fármacos que possam atuar modulando os diferentes processos que compõem a hemostasia.

3.4 Proteases que atuam na coagulação como alvos de drogas anticoagulantes

Os medicamentos antitrombóticos caracterizam um grupo de substâncias particularmente importante no controle e combate às doenças de origem trombo-venosas, podendo atuar em muitos pontos ao longo da hemostasia, e, são classificados como antiplaquetários, anticoagulantes e agentes fibrinolíticos. A aspirina, varfarina e estreptoquinase são representantes, respectivos de cada uma das classes (AL-HORANI; AFOSAH, 2018). A aspirina – princípio ativo ácido acetilsalicílico – representa bem a evolução da humanidade na descoberta e caracterização de moléculas naturais com ação farmacológica, tendo em vista sua origem na salicina, substância encontrada na casca do salgueiro (gênero *Salix*), que atualmente é um medicamento sintético mundialmente conhecido (BRANÑA, 2005).

No entanto, apesar da eficácia clínica dessas substâncias, os efeitos adversos são muitas vezes severos, podendo levar o indivíduo ao desenvolvimento de osteoporose, hemorragias internas e gastrointestinais, e também há casos de hipersensibilidade (EIKELBOOM et al., 2012; WEITZ et al., 2012). Desse modo, o estudo de novos inibidores mais seletivos, de maior potencial terapêutico, com maior tempo de meia-vida e baixo custo de produção é um desafio.

As proteases da coagulação são alvos promissores para a ação de novas drogas sintéticas ou de origem natural. Atualmente, os anticoagulantes produzidos tem tido sucesso apenas na inibição de FIIa e FXa (AL-HORANI & AFOSAH, 2018). Porém, esforços vêm sendo realizados para a avaliação da inibição de outras proteases como FXI e trombina, ampliando os estudos de possíveis inibidores naturais e sintéticos, tais como cumarinas, flavonoides, biflavonas e seus análogos (ZARAGOZÁ et al., 2016; FAGGIO et al., 2017; CHEN et al., 2019).

3.5 Proteases de peçonha de serpentes como ferramenta laboratorial

As peçonhas de serpentes possuem uma composição variada de biomoléculas como carboidratos, lipídeos, íons metálicos, peptídeos e enzimas. Muitas dessas substâncias podem ser de interesse médico-científico, como é o caso das enzimas proteolíticas (MOHAMED ABD EL-AZIZ; GARCIA SOARES; STOCKAND, 2019).

As metaloproteases e serinoproteases representam os dois grandes grupos de enzimas proteolíticas presentes na peçonha de serpentes, e possuem grande efeito sobre o sistema hemostático por meio de diferentes mecanismos. As metaloproteases são cataliticamente dependentes de íons e podem apresentar atividade fibrinogenolítica, fibrinolítica, ativadora de pró-trombina e inibidora sobre a agregação plaquetária. As serinoproteases também afetam a hemostasia, e podem ser subdivididas de acordo com o processo em que atuam, como por exemplo enzimas similares a trombina, ativadoras de plasminogênio, e inibidoras da agregação plaquetária (WANG; SHIH; HUANG, 2005).

Tais características possibilitam que as metaloproteases e serinoproteases sirvam como ferramentas laboratoriais para o desenvolvimento de novas drogas. Sendo assim, essas biomoléculas podem ser aplicadas para a indução de efeitos como a lise de trombos, catálise de fibrinogênio, degradação de fibrina e indução da coagulação.

3.6 Fosfolipases A₂

As fosfolipases A₂ (PLA₂s) são uma classe de enzimas importantes na manutenção e controle da resposta inflamatória. Isso deve-se ao fato destas enzimas serem responsáveis pelo metabolismo de fosfolipídios que compõem a membrana celular. Essas enzimas podem ser classificadas em quatro grupos, sendo I, II e III definidos pela diferença na sequência de aminoácidos, e o grupo IV possui uma sequência distinta dos outros três. Em geral são enzimas dependentes de Ca²⁺ possuem baixo peso molecular (~ 14 kDa) e apresentam grande número de ligações dissulfeto (DENNIS., 1994).

As PLA₂s atuam no topo do processo conhecido como cascata de inflamação, dessa forma, são responsáveis pela lise dos lipídeos de membrana, produzindo o ácido araquidônico. A partir de então, o ácido araquidônico pode ser metabolizado pelas vias COX ou LIPOX, e gerar os lipídeos bioativos como tromboxanos, leucotrienos e prostaglandinas, que, são mediadores pró-inflamatórios e reguladores do metabolismo lipídico (YARLA et al., 2015).

O comprometimento da membrana celular pela degradação dos fosfolipídios, pode provocar alterações na entrada e saída de componentes intra e extracelulares. Portanto, é importante que esse mecanismo seja mantido sempre sob controle, pois, pode levar ao aparecimento de diversas doenças de origem inflamatória (REZENDE et al., 2017). Assim, é importante a pesquisa de inibidores de PLA₂s e elucidação dos mecanismos de ação para o desenvolvimento de novos fármacos anti-inflamatórios (CEDRO et al., 2018).

4 METODOLOGIA

4.1 Síntese dos compostos: Chalconas e *bis*-chalconas

A síntese das chalconas foi realizada pelo método clássico de condensação de Claisen-Schmidt. Adicionou-se 1 mL de NaOH (60%) em 5 mmol de benzofenona, que em seguida foi vertido em um frasco contendo 5 mmol de benzaldeído (ou 2-Clorobenzaldeído). A reação prosseguiu em agitação e banho de gelo por 2h. O precipitado foi lavado em água destilada gelada e recristalizado em etanol.

Para o preparo das *bis*-chalconas adicionou-se 10 mmol do benzaldeído (ou 2-Clorobenzaldeído) em um Erlenmeyer sob agitação magnética. Em outro frasco foi adicionado 5 mmol de acetona e 1 mL de solução de NaOH (60%). Na sequência, verteu-se a solução de acetona ao frasco contendo o aldeído. A reação foi realizada a temperatura ambiente e ficou sob agitação por 1h. O precipitado obtido foi lavado com água destilada em excesso e os cristais foram levados para secagem. O produto da reação passou por recristalização em etanol.

4.2 Caracterização das estruturas

4.2.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram obtidos em um equipamento Bruker Avance III – 14,1 Tesla (600,23 MHz para frequência do hidrogênio) com magneto blindado (Ultra shield Plus®) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). O espectrômetro é equipado com sonda criogênica TCI (Triple Resonance Cryoprobe Inverse) de 5 mm, com bobinas de ^1H e ^{13}C e pré-amplificador refrigerados a uma temperatura de aproximadamente 77K. A sonda possui bobina de gradiente de campo no eixo z (53G/cm) e unidade de ajuste automático de sintonia – ATMA® (Automatic Tuning e Matching). O processamento para os espectros de RMN de ^1H , foi feito aplicando-se uma transformada de Fourier com 65.536 pontos (SI), a fase (apk) e a linha de base (abs) serão corrigidas automaticamente. Para os espectros bidimensionais, os dados foram processados aplicando-se uma transformada de Fourier com 2048 pontos em F2 (SIF2) e 512 em F1 (SIF1), utilizando a função de apodização seno quadrado (QSINE) e o fator SSB igual a 3, em ambos os eixos.

Os espectros de ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ necessários foram realizados com a sequência de pulso zgpg30, sem girar a amostra e numa temperatura de 25°C. Os parâmetros de aquisição padrão são: número de pontos do domínio de tempo (TD) 32.768; janela espectral (SW) 240,0 ppm;

tempo de aquisição (AQ) 0,68 s; número de promediações (ns) 1024; duração do pulso de 30° (13C) 4,95 μ s; frequência central do pulso (O1P) 100,0 ppm; tempo de relaxação (d1) 0,2 s; programa de desacoplamento (CPDPRG) waltz 16; duração do pulso de 90° para desacoplamento 90 μ s. Na sequência, os dados foram processados utilizando uma rotina que o fabricante denomina c13cryo. Esta rotina contempla a realização da transformada de Fourier, que é realizada com 32.768 pontos (SI), e as correções automáticas de fase (apk) e de linha de base (abs). Além dessas correções rotineiras o processamento ainda elimina ruídos eletrônicos típicos da criossonda, uma vez que a bobina transmissora e receptora de sinal é sensível a aplicações de pulsos de mais alta potência, como é o caso dos pulsos no carbono-13.

4.3 Obtenção de material biológico humano

Os protocolos experimentais que necessitaram da utilização e coleta de sangue (testes de coagulação, citotoxicidade sobre eritrócitos) foram submetidos à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos (COEP) da Universidade Federal de Lavras e as análises iniciaram-se após aprovação pelo COEP, sob o número de registro (N° CAAE/34322020.7.0000.5148).

Os voluntários convidados foram pessoas entre 18 e 35 anos, que não faziam uso contínuo de medicamentos, não fumantes e não trabalhavam em condições de risco químico ou biológico. Os voluntários (10 voluntários para todos os testes) também não tinham sido submetidos a qualquer procedimento cirúrgico e/ou administração de medicamentos cuja prescrição médica fosse obrigatória (ex: quimioterápicos e antibióticos) ou outras drogas que possam causar alterações nas células sanguíneas, o que invalidaria os experimentos do projeto proposto. O sangue (10 mL) utilizado nos experimentos foi coletado, apenas uma vez de cada voluntário, com material descartável. Antes das coletas de sangue os voluntários tiveram as informações a respeito dos objetivos e importância da pesquisa. Além disso, sua forma de participação e possíveis riscos e benefícios inerentes à pesquisa também foram esclarecidos e os voluntários assinaram o TCLE (termo de consentimento livre esclarecido).

4.4 Peçonhas de serpentes

A peçonha cristalizada de *Bothrops moojeni* foi adquirida comercialmente do serpentário Bioagents (Batatais-SP). Em temperatura ambiente, a peçonha foi pesada e dissolvida em solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,4), na concentração de 10mg mL⁻¹ e armazenada à -20°C. Ensaios piloto foram realizados para definição das doses mínimas indutoras de cada atividade. O uso dessa peçonha em nossas pesquisas foi registrado no Sisgen sob o número ADF95EA.

Para todas as atividades realizou-se com os compostos sintetizados isoladamente e em seguida os compostos foram pré-incubados com a fonte enzimática (peçonha) em diferentes proporções por período de 30 minutos a 37°C, com posterior avaliação dos testes.

4.5 Ensaios de atividade fosfolipásica e hemolítica

A atividade Fosfolipásica e Hemolítica foi avaliada em meio sólido como descrito por Gutiérrez et al (1988). No preparo do gel para ensaio de atividade fosfolipásica utilizou-se 0,01 mol L⁻¹ de CaCl₂ (50 mL), gema de ovo, PBS 1:3 v/v (pH 7.4); Ágar 1% e 0,1 g de azida de sódio. Ao atingir a temperatura entre 45-50°C, o gel foi vertido nas placas de petri e após a solidificação, foram feitos pequenos orifícios de 0,4 cm de diâmetros. As placas ficaram em incubação por 12h a 37°C em câmara de cultura de células.

Para o ensaio de inibição de atividade das fosfolipases A₂, a peçonha de *Bothrops moojeni* foi utilizada como ferramenta de indução na clivagem de fosfolipídios. Os compostos sintetizados foram incubados previamente com 30 µg de peçonha em diferentes concentrações (8, 40, 100, 500, 1000 e 2000 µg/mL) por 30 minutos a temperatura de 37 °C.

Para a atividade hemolítica o preparo do gel foi realizado substituindo a gema de ovo pelos eritrócitos humanos. A obtenção dos eritrócitos foi realizada pela coleta de 10 mL de sangue de voluntários, centrifugado a 700 rpm por cinco 5 minutos. Removeu-se o plasma e efetuou-se a lavagem em PBS 5 mmol. L⁻¹, pH 7,4. Repetiu-se o procedimento por duas vezes.

As atividades fosfolipásica e citotóxica sobre eritrócitos foram avaliadas pela medida (mm) do halo translúcido formado ao redor dos orifícios nos géis onde as amostras foram adicionadas. Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade enzimática considerando-se a média dos controles contendo somente peçonha como 100% de atividade.

4.6 Efeitos sobre a coagulação de plasma humano citratado

A atividade coagulante foi realizada seguindo-se a metodologia descrita por Mourão et al. (1996). Coletou-se o sangue de 6 voluntários saudáveis, em um mesmo momento, em tubos contendo citrato de sódio, que foram imediatamente centrifugadas à 1500 RPM por 10 minutos e lavadas em PBS. O plasma obtido recebeu ambientação à temperatura de 37°C, e na sequência distribuído em tubos de ensaio (200 µL) para a adição das amostras a serem avaliadas. A contagem do tempo de coagulação, iniciou-se, imediatamente após a adição das amostras, com leve agitação dos tubos de ensaio, até a formação de um coágulo rígido.

O potencial dos compostos em inibir a coagulação induzida por peçonha de *B. moojeni* foi avaliado após incubação destes em diferentes doses com a peçonha, por 10 minutos a 30°C. Os incubados foram adicionados ao plasma citratado, acondicionado em banho de aquecimento em mesma temperatura, e o tempo foi imediatamente cronometrado. Controles contendo apenas os compostos na maior dose e contendo apenas a peçonha (10µg) também foram realizados.

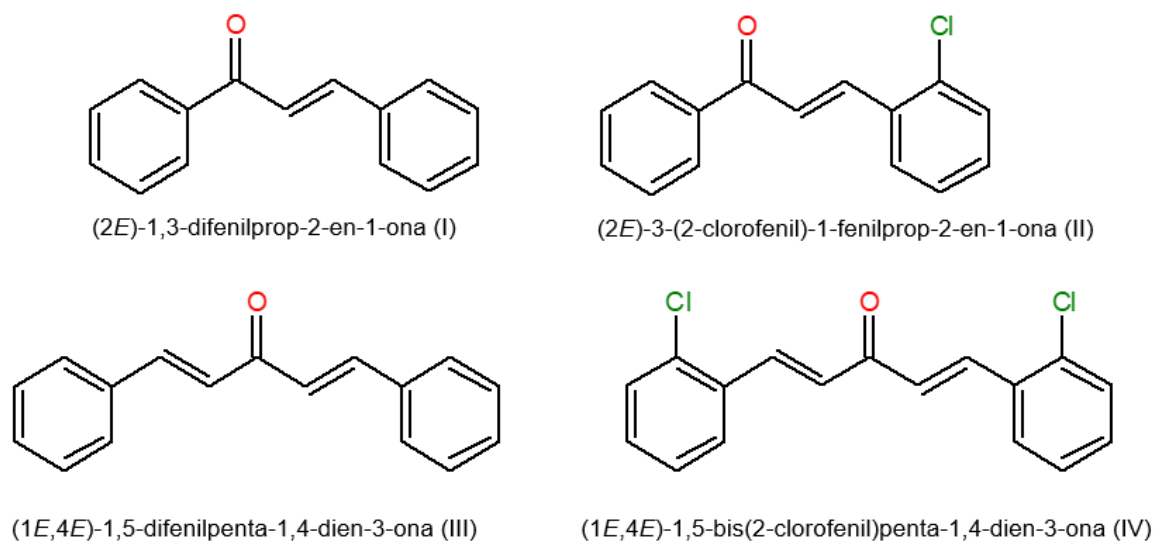
4.7 Análise dos resultados

Todos os compostos nas diferentes doses foram avaliados em triplicata em todos os ensaios descritos. Os resultados estão apresentados como média ± desvio padrão. Para determinação das significâncias entre as médias dos parâmetros analisados nos ensaios, empregou-se o método de análise de variância (ANOVA), seguido do teste Tukey *post-hoc* ($P < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

As estruturas sintetizadas foram decifradas e comprovadas pelas análises de RMN e podem ser observadas na figura 11. As moléculas (I), (II), (III) e (IV), foram obtidas com rendimentos considerados regulares a bons (54% - 86%).

Figura 11 – Derivados de Chalconas e *Bis*-chalconas sintetizados no presente trabalho.



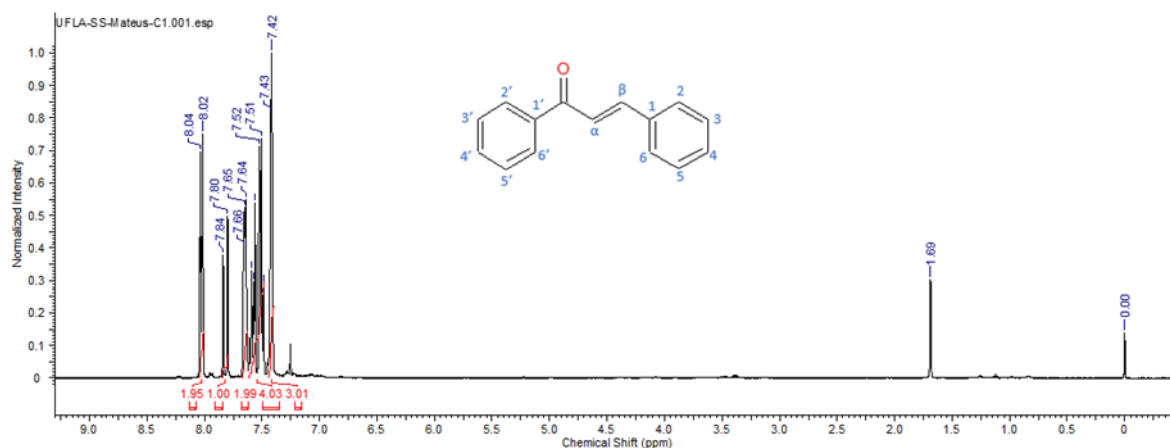
Fonte: Do autor (2021).

5.1 Análise de espectros de RMN para a molécula (I)

A análise de Ressonância Magnética Nuclear foi a técnica escolhida para a elucidação estrutural das moléculas sintetizadas no trabalho. Os espectros de ^1H e de ^{13}C foram obtidos para os 4 compostos em 600 MHz (dms o -d $_6$).

A análise do espectro de ^1H para o composto (I) demonstrou um duplete que integra para um hidrogênio que corresponde a H_β em 7,8 ppm. A constante de acoplamento entre H_α e H_β ($J=15.9$ Hz), confirma a isomeria *trans*, portanto, a estrutura representada corresponde ao isômero *E* (figura 12).

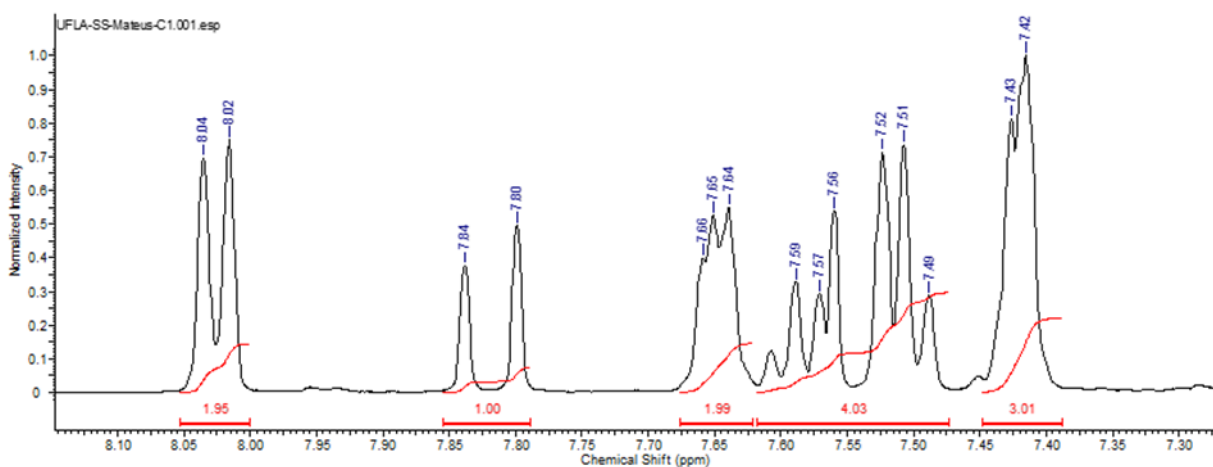
Figura 12 – Espectro de RMN de ^1H para a molécula (I).



Legenda: Espectro de ^1H para os hidrogênios presentes na estrutura (2E)-1,3-difenilprop-2-en-1-ona (I).
Fonte: Do autor (2021).

O sinal referente ao hidrogênio α , encontra-se localizado na região típica de aromáticos δ 7,5 – 7,6 ppm, junto ao multipletto integrado de sinais igual a 9H, correspondente a $\text{H}\alpha$ e os 8 hidrogênios aromáticos H_2 , H_4 , H_6 , H_2' , H_3' , H_4' , H_5' e H_6' . Em 8,03 ppm há a presença de um duplete que integra para (2H), condizente com H_3 e H_5 . As ressonâncias apresentadas podem ser observadas no espectro ampliado para a região de aromáticos (Figura 13).

Figura 13 – Espectro de RMN ^1H . Ampliação da região de aromáticos para a molécula (I).

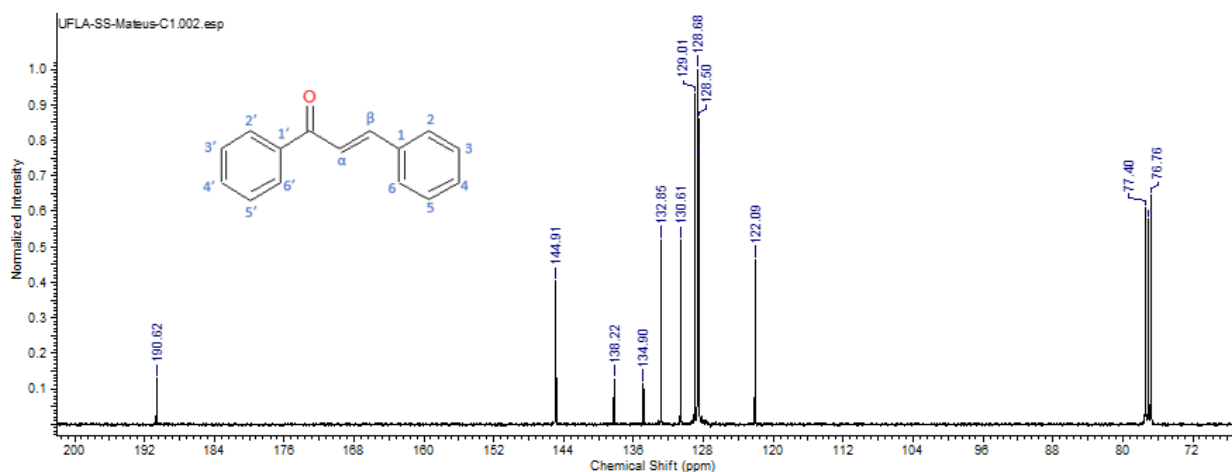


Legenda: Espectro de ^1H ampliado para a molécula (2E)-1,3-difenilprop-2-en-1-ona (I).
Fonte: Do autor (2021).

A partir do espectro de RMN ^{13}C para o composto (I), observou-se 11 sinais que indicam todos os tipos de carbonos presentes na estrutura. O carbono carbonílico possui o sinal em $\delta = 190,62$, devido, a conexão direta com oxigênio que por consequência da eletronegatividade, promove a desblindagem eletrônica. O C_β corresponde ao sinal em 144,91 e o C_α em 122,09,

os sinais para estes carbonos surge na mesma faixa dos carbonos aromáticos devido ao fenômeno de anisotropia diamagnética (figura 14).

Figura 14 – Espectro de RMN ^{13}C para a molécula (I).



Legenda: Espectro de ^{13}C com sinais referentes aos carbonos presentes na estrutura da molécula (2E)-1,3-difenilprop-2-en-1-ona (I).

Fonte: Do autor (2021).

Os carbonos aromáticos correspondem às ressonâncias na faixa de δ 128,60 e 138,22, e podem ser observados com mais detalhes na tabela 1. Pelo fato de as moléculas (I) e (II) possuírem estruturas muito similares os espectros de RMN do composto (II) encontram-se, na seção anexos.

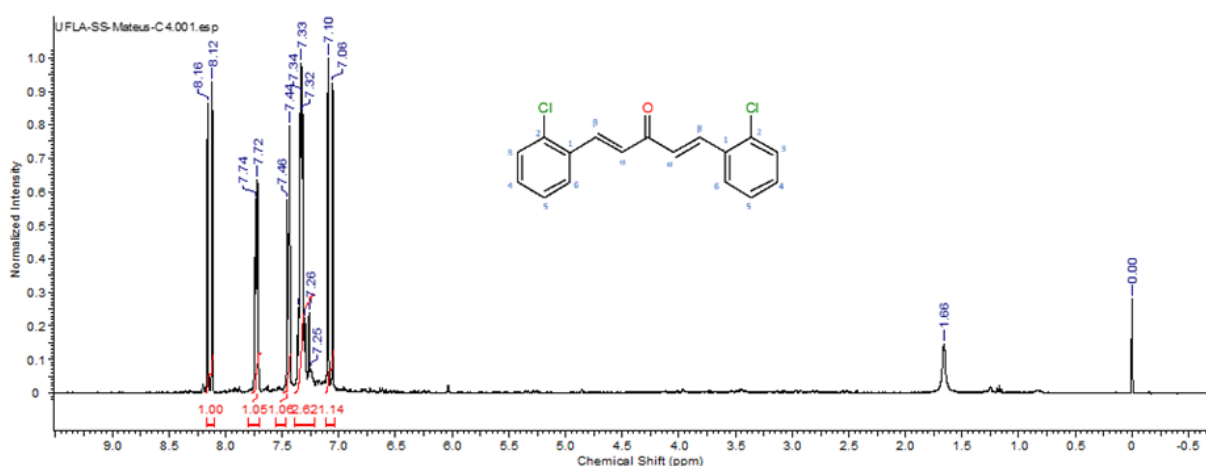
Tabela 1 – Dados do espectro de RMN ^{13}C do composto (I).

Atribuições	δ (ppm)
C α	122,09
C β	144,91
C = O	190,62
C ₁	132,85
C ₂ , C ₆	128,50
C ₃ , C ₅	130,61
C ₄	128,50
C1'	138,22
C ₂ ', C ₆ '	129,01
C ₃ ', C ₅ '	128,68
C ₄ '	134,90

5.2 Análise dos espectros de RMN para a molécula (IV)

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C para o composto (IV) correspondem apenas a metade da molécula, isso deve-se a simetria presente na estrutura. Assim, pode-se observar a presença de 6 sinais referentes aos hidrogênios, todos estes na faixa de δ 7,06 – 8,15 ppm. O hidrogênio β corresponde ao duplete em $\delta = 7,73$. O sinal de $\text{H}\alpha$ encontra-se na região dos aromáticos, em $\delta = 7,32$ ppm, e a constante de acoplamento com $\text{H}\beta$ é de 16,53; de acordo com o esperado para o isômero *E* (figura 15).

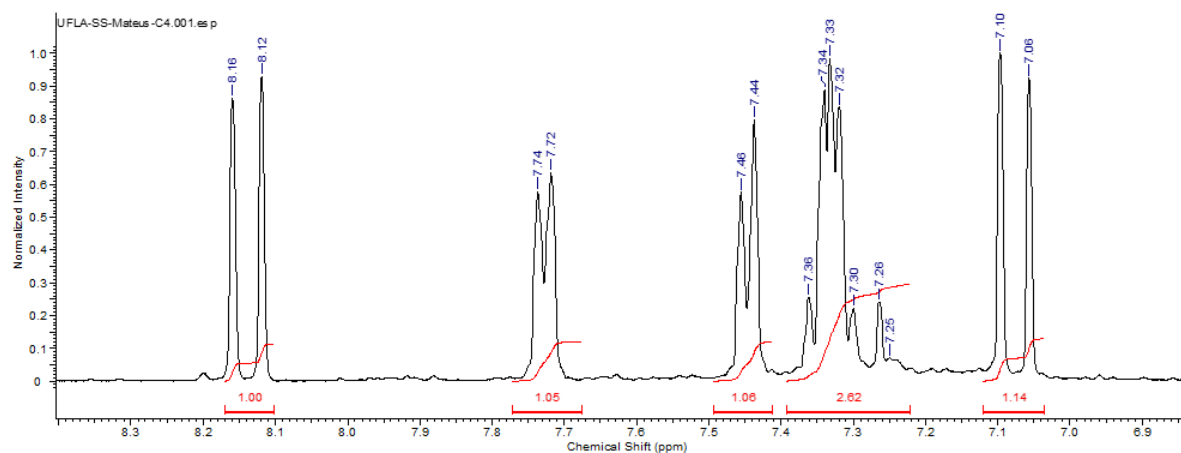
Figura 15 – Espectro de RMN ^1H para o composto (IV).



Legenda: Espectro de ^1H para a molécula de (1E,4E)-1,5-bis(2-clorofenil)penta-1,4-dien-3-ona (IV).
Fonte: Do autor (2021).

O duplete em $\delta = 7,42$ é coerente com H_3 pela proximidade ao carbono conectado ao cloro, que provoca sua desblindagem por efeito indutivo. Os demais sinais do espectro correspondem aos hidrogênios aromáticos H_4 , H_5 e H_6 . A visualização de cada um dos sinais pode ser observada em detalhes na ampliação do espectro para região de H aromáticos (figura 16).

Figura 16 – Ampliação da região de aromáticos para o composto (IV).

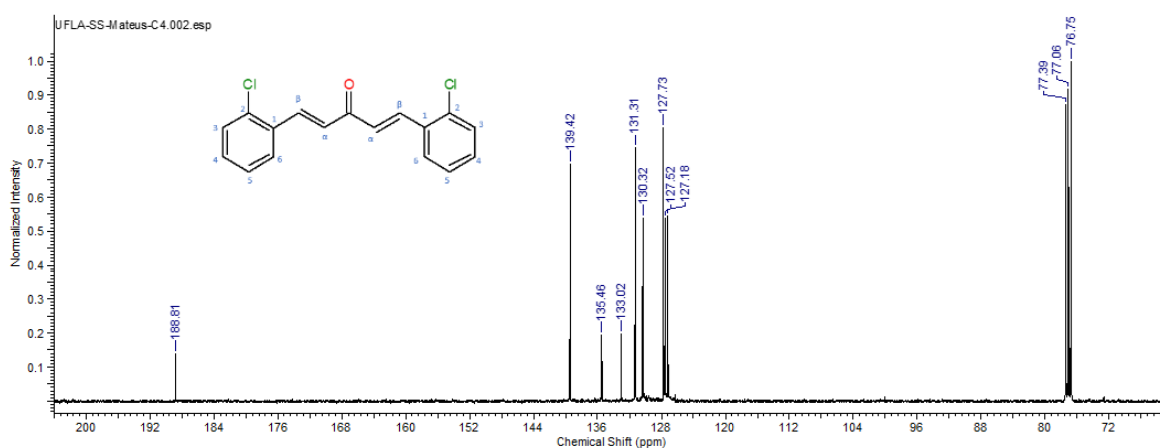


Legenda: Espectro de ^1H ampliado da região de aromáticos para a molécula (1E,4E)-1,5-bis(2-clorofenil)penta-1,4-dien-3-ona (IV).

Fonte: Do autor (2021).

A análise do espectro de ^{13}C revelou a presença de 9 carbonos na estrutura, o que corresponde a molécula sintetizada. O sinal mais desblindado em $\delta = 188,81$ corresponde a região típica de compostos carbonílicos, pertencendo, portanto, ao carbono diretamente ligado ao oxigênio (C=O). Os carbonos C α e C β são os sinais $\delta = 127,18$ e $\delta = 139,42$, respectivamente (figura 17).

Figura 17 – Espectro de ^{13}C para o composto (IV).



Legenda: Espectro contendo os sinais referentes aos carbonos presentes na estrutura da (1E,4E)-1,5-bis(2-clorofenil)penta-1,4-dien-3-ona (IV).

Fonte: Do autor (2021).

Os valores de deslocamento químico podem ser vistos na tabela 2.

Tabela 2 - Valores de δ para espectro de RMN ^{13}C para o composto (IV).

Atribuições	δ (ppm)
C α	127,18
C β	139,42
C = O	188,81
C ₁	131,31
C ₂	135,45
C ₃	133,02
C ₄	130,32
C ₅	127,73
C ₆	127,52

Por se tratarem de moléculas análogas, os compostos (III) e (IV), os espectros de RMN para o composto (3), tanto de ^1H , quanto de ^{13}C , podem ser encontrados na seção anexos.

5.3 Atividade fosfolipásica

Nos ensaios de atividade fosfolipásica e hemólise sólida, a quantidade de peçonha de *B. moojeni* aplicada foi de 10 μg por poço. Os experimentos possibilitaram avaliar a capacidade dos compostos em modular a atividade das enzimas presentes na peçonha durante a lise de fosfolipídios (ensaio fosfolipásico) e de eritrócitos humanos (Hemólise). O estudo avaliou 6 diferentes doses para cada composto sintetizado (0,25; 1,25; 3; 15; 30 e 60 μg).

Os dados obtidos nos experimentos de atividade fosfolipásica podem ser observados na tabela 3. A condução do experimento foi realizada com controles contendo PBS + peçonha e PBS + DMSO + Peçonha. E os resultados obtidos para as moléculas sintetizadas previamente incubadas com a peçonha, foram comparados com dados obtidos para os anti-inflamatórios comerciais, prednisolona (esteroidal) e diclofenaco sódico (não esteroideal), previamente incubados com a peçonha.

Houve redução na atividade das fosfolipases A₂ após incubação com a molécula (I) em todas as doses testadas, além disso, é possível inferir que pequenas doses do composto contenham um número de moléculas adequado para interagir com as unidades de fosfolipases A₂ presentes na quantidade de peçonha avaliada, uma vez que, as doses de 0,25 μg e 60 μg do composto resultaram em valores de atividade muito próximos, 86 e 87%, respectivamente. As inibições obtidas nas doses de 0,25, 1,25 e 60 μg foram estatisticamente significantes (Tabela 3).

O Composto (II) demonstrou baixa capacidade de modular as enzimas fosfolipases A₂ em todas as doses avaliadas. Para a molécula (III) somente a dose de 15 µg (87,82%) apresentou resultado de inibição estatisticamente significante. Já o composto (IV) induziu diminuição significativa da atividade fosfolipásica quando avaliado na dose de 60 µg (87,84%) (tabela 3).

No contexto da busca por compostos com potencial anti-inflamatório, a baixa inibição ou inibição controlada de fosfolipases A₂ é almejada, visto que os produtos da atividade destas enzimas atuam em diversos processos fisiológicos (ex: formação de coágulo sanguíneo, indução de contração do músculo que reveste os pulmões e regulação da síntese de cAMP), sendo fundamentais ao organismo em quantidades adequadas.

Embora poucas doses dos compostos avaliados tenham demonstrado inibições estatisticamente significativas, todos os valores de atividade fosfolipásica obtidos para os compostos foram menores que os observados para as drogas comerciais testadas, os anti-inflamatórios esteroideal (prednisolona) e o não esteroideal (diclofenaco sódico), mesmo quando avaliados em doses menores (tabela 3).

Tabela 3 – Atividade enzimática (%) da peçonha de *Bothrops moojeni* para o ensaio fosfolipásico e efeitos dos compostos sintetizados.

AMOSTRAS	DOSE (μg)	ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA (%)
CONTROLE (PBS)	-	100
CONTROLE (PBS + DMSO 50% (v/v))	-	95,80
PREDINISOLONA	5	97,04
	10	101,79
DICLOFENACO SÓDICO	5	95,80
	10	97,87
COMPOSTO I	0,25	85,82*
	1,25	87,82*
	3	91,81
	15	89,82
	30	91,81
	60	87,82*
COMPOSTO II	0,25	89,82
	1,25	91,82
	3	91,83
	15	89,82
	30	91,81
	60	91,81
COMPOSTO III	0,25	89,82
	1,25	91,81
	3	91,81
	15	87,82*
	30	89,82
	60	95,80
COMPOSTO IV	0,25	98,56
	1,25	101,79
	3	93,81
	15	97,80
	30	95,80
	60	87,84*

As amostras foram previamente incubadas com a peçonha de *Bothrops moojeni* (10 μg), por 30 minutos a 37 °C. * Difere do controle PBS + peçonha a 5% de significância ANOVA - one way, seguido de teste Tukey post-hoc.

As fosfolipases A₂ secretadas (PLA₂s) são enzimas que promovem a catálise de fosfolipídios de membrana e liberação de ácidos graxos como o ácido araquidônico, precursor dos eicosanoides. Isso faz com que as (PLA₂s) desempenhem um papel fundamental na inflamação, e assim têm sido consideradas alvos promissores no tratamento de diversas doenças de origem inflamatória (QUACH, 2014). Os decréscimos observados na porcentagem de

atividade, devem-se, provavelmente por interações de hidrogênio entre carbonila dos compostos α , β insaturados e hidrogênios presentes nos aminoácidos das enzimas. É possível que haja também interações hidrofóbicas, considerando que os compostos possuem baixa polaridade e podem se ligar a regiões hidrofóbicas existentes na estrutura dessas enzimas e/ou interagir com resíduos de aminoácidos encontrados nos sítios catalíticos das fosfolipases A₂ (TEIXEIRA et al., 2019).

5.4 Atividade hemolítica

Um aspecto importante que deve ser considerado no estudo e desenvolvimento de novos fármacos, é a citotoxicidade associada as moléculas estudadas. Por esse motivo, neste trabalho realizou-se também uma avaliação sobre a citotoxicidade dos derivados de chalconas e *bis*-chalconas sintetizados sobre eritrócitos humanos. O ensaio foi conduzido de forma análoga ao teste fosfolipásico, no entanto, a gema de ovo foi substituída pelos eritrócitos no preparo do gel. As mesmas dosagens foram avaliadas para os diferentes compostos (Tabela 4).

Tabela 4 - Atividade hemolítica (%) e efeito dos compostos sintetizados sobre a hemólise induzida por peçonha de *Bothrops moojeni*.

AMOSTRAS	DOSE (μg)	ATIVIDADE HEMOLÍTICA (%)
CONTROLE (PBS + peçonha)	-	100
CONTROLE (PBS + DMSO + peçonha)	-	97,91
CONTROLE (DMSO + peçonha)	-	87,50
PREDINISOLONA + peçonha	5	91,67
	10	97,91
DICLOFENACO SÓDICO + peçonha	5	93,75
	10	91,67
COMPOSTO I	60	79,17
COMPOSTO II	60	0
COMPOSTO III	60	0
COMPOSTO IV	60	0
COMPOSTO I + peçonha	0,25	91,67
	1,25	81,25
	3	104,17
	15	131,25
	30	141,66
	60	137,5
COMPOSTO II + peçonha	0,25	93,75
	1,25	87,5
	3	100
	15	97,91
	30	91,67
	60	93,75
COMPOSTO III + peçonha	0,25	95,83
	1,25	97,91
	3	85,41*
	15	87,50
	30	85,41*
	60	93,75
COMPOSTO IV + peçonha	0,25	91,67
	1,25	83,33*
	3	85,42*
	15	87,50
	30	85,42*
	60	77,08*

Para avaliar a ação inibitória sobre a hemólise induzida pela peçonha, as amostras foram previamente incubadas com a peçonha de *Bothrops moojeni* (10 μg), por 30 minutos a 37 °C. O composto 1 mostrou-se hemolítico sendo observado, portanto, um efeito somatório quando avaliado junto à peçonha. * Difere do controle PBS + peçonha a 5% de significância ANOVA - one way, seguido de teste Tukey post-hoc.

Quando avaliados sozinhos, na dose de 60 µg, apenas o composto I se mostrou hemolítico, entretanto, a citotoxicidade dessa substância já é conhecida e bastante pesquisada para tratamento de câncer (OUYANG et al., 2021). Um dos mecanismos de ação descritos para a citotoxicidade dos compostos α , β insaturados, é sua capacidade de atuar como aceptores de Michael e formarem adutos com o enxofre presente no aminoácido cisteína, ligando-se covalentemente às proteínas (JACKSON et al., 2017).

Os compostos (III) e (IV) demonstraram potencial em inibir a lise dos eritrócitos, com valores estatisticamente significantes para as doses de 3; 15 e 30 µg (composto III) e 1,25, 3, 15, 30 e 60 µg (composto IV), respectivamente. Além disso, para o composto 4 pode-se observar a diminuição da atividade enzimática com o aumento da dose (Tabela 4).

Embora as fosfolipases A_2 possam atuar na quebra de fosfolipídios de membrana, as proteases de diferentes classes apresentam-se em maior proporção na composição das peçonhas botrópicas, sendo as principais responsáveis pela quebra de proteínas das membranas, resultando em desarranjo estrutural, alterações no fluxo de íons e líquidos através das membranas e por fim lise celular (LARRÉCHÉ et al., 2021)

Desta forma, as inibições observadas, sobre a atividade hemolítica induzida por peçonha de *B. moojeni* podem estar associadas a interações com proteases presentes na peçonha.

5.5 Atividade coagulante

Para o ensaio de atividade coagulante selecionou-se as 3 menores dosagens para as moléculas em estudo (0,25, 1,25 e 3µg), tal escolha teve como parâmetro, os melhores resultados nos ensaios fosfolipásico e hemolítico. A dosagem padronizada para a peçonha de *B. moojeni* foi de 10µg, para obtenção de um tempo de coagulação próximo a 60 segundos.

Realizou-se o ensaio com incubação prévia da peçonha com os diferentes compostos nas doses variadas, posterior adição ao plasma e contagem do tempo.

Os tempos de coagulação para as amostras estão na tabela 5. A análise dos resultados, mostrou que, o Composto (I) não apresentou diferença nos tempos de coagulação com relação ao Controle contendo apenas peçonha.

O composto (II) em todas as doses, e composto (III) nas doses de 1,25 e 3µg, induziram decréscimos no tempo de coagulação, no entanto, os valores não diferem estatisticamente do controle. O composto (IV) apresentou os melhores resultados para o ensaio, visto que, o tempo de coagulação foi prolongado para 63,61; 66,26 e 76,48s, nas respectivas doses avaliadas 0,25;

1,25 e 2,5 µg. O efeito da concentração também pode ser observado, pois, o aumento na dosagem resultou em tempos maiores de coagulação.

Tabela 5 – Tempo de coagulação de plasma citratado, induzido por peçonha de *Bothrops moojeni*, e efeito dos compostos sintetizados previamente incubados com a peçonha.

COMPOSTO + peçonha	DOSE (µg)	TEMPO DE COAGULAÇÃO (s)
Controle (+): peçonha	10	56,12 ± 2,81
1	0,25	57,15 ± 5,36
1	1,25	56,46 ± 2,67
1	3	62,49 ± 0,72
2	0,25	52,54 ± 4,73
2	1,25	48,87 ± 4,12
2	3	52,46 ± 3,17
3	0,25	58,96 ± 9,42
3	1,25	50,56 ± 1,29
3	3	52,96 ± 2,12
4	0,25	63,61 ± 3,46*
4	1,25	66,26 ± 1,07*
4	3	76,48 ± 6,04*

Os dados correspondem a médias com seus respectivos desvios padrão (n=3) e $p < 0.05$

*Difere estatisticamente do respectivo controle positivo, $p < 0,05$.

O prolongamento no tempo de coagulação pode ser resultante de interações entre o composto IV e proteases, sobretudo serinoproteases coagulantes, presentes na peçonha. A literatura científica descreve alguns mecanismos de ação para inibidores naturais de proteases, sendo incluídas chalconas e seus derivados (JACKSON et al., 2017; ZHOU, 2015).

Os moduladores de enzimas das classes de fosfolipases A₂ e proteases são também importantes para o controle de distúrbios relacionados ao sistema hemostático. Os flavonoides, por exemplo, são capazes de formar complexos com íons Ca²⁺/ Zn²⁺, cofatores de enzimas ligadas à hemostasia, podendo promover a inibição de PLA₂s e proteases que atuam na cascata de coagulação (DE MOURA et al., 2016; TEN CATE et al., 2017).

Dessa forma, o potencial dessas moléculas pode ser melhor explorado em outras doses e experimentação *in vitro* e *in silico*, possibilitando entender seus mecanismos de ação e prospectar possibilidades de aplicação farmacêutica futura.

6 CONCLUSÃO

As chalconas e *bis*-chalconas obtidas no presente trabalho demonstraram rendimentos considerados entre regulares e bons 54% - 86%, além disso, foram adequadamente caracterizadas pela técnica de RMN. Isso demonstra a viabilidade de síntese e caracterização que os compostos dessa classe possuem, e destaca vantagens em estudar tais estruturas.

Considerando os resultados obtidos nos testes de atividades biológicas realizados, atividade fosfolipásica, hemolítica e coagulante, o composto (IV), apresentou melhor potencial entre a moléculas sintetizadas e avaliadas. Dessa forma, tal composto mostra-se promissor para a continuidade das pesquisas, possibilitando sua ampla caracterização farmacológica/toxicológica, objetivando a prospecção de formulações e doses com potencial de aplicação futura no tratamento de doenças cardiovasculares.

Os mecanismos de ação dos compostos avaliados ainda não estão bem estabelecidos, apesar do conhecimento sobre a reatividade como aceptores de Michael, possivelmente, outras interações intermoleculares podem governar o processo pelo qual a modulação da atividade enzimática ocorre. Assim, estudos *in silico* podem auxiliar na compreensão dos mecanismos de interação dos compostos com as enzimas, assim como direcionar modificações estruturais que ampliem o potencial de uso eficaz e seguro destas moléculas, no contexto da saúde humana.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-HORANI, Rami A.; AFOSAH, Daniel K. Recent advances in the discovery and development of factor XI/XIa inhibitors. **Medicinal research reviews**, v. 38, n. 6, p. 1974-2023, 2018.
- ARNETH, Borros. Coevolution of the coagulation and immune systems. **Inflammation Research**, 2019, 68.2: 117-123.
- AKSÖZ, Begüm EVRANOS; ERTAN, Rahmiye. Chemical and structural properties of chalcones I. **FABAD J Pharm Sci**, v. 36, p. 223-242, 2011.
- BALE, Adebayo Tajudeen et al. Chalcones and *bis*-chalcones: As potential α -amylase inhibitors; synthesis, in vitro screening, and molecular modelling studies. **Bioorganic chemistry**, v. 79, p. 179-189, 2018.
- BRAÑA, Miguel Fernández, et al. La verdadera historia de la Aspirina. In: **Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia**. 2005.
- BROOS, Katleen et al. Platelets at work in primary hemostasis. **Blood reviews**, v. 25, n. 4, p. 155-167, 2011.
- BERGER, Markus, et al. Hemostasia: uma breve revisão. **Revista Caderno Pedagógico**, 2014, 11.1.
- CAMARGOS, Renato Barbosa, et al. Chalcones to control *Alternaria alternata* in murcott tangor fruits. **Bioscience Journal**, 2016, 32.6.
- CEDRO, Raffaella CA et al. Cytotoxic and inflammatory potential of a phospholipase A2 from Bothrops jararaca snake venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 24, 2018.
- CHATTERJEE, Madhumita et al. Molecular drivers of platelet activation: Unraveling novel targets for anti-thrombotic and anti-thrombo-inflammatory therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 21, p. 7906, 2020.
- CHEN, Xiong, et al. An anti-inflammatory chalcone derivative prevents heart and kidney from hyperlipidemia-induced injuries by attenuating inflammation. **Toxicology and applied pharmacology**, 2018, 338: 43-53.
- CHEN, Tian-Ran et al. Biflavones from *Ginkgo biloba* as inhibitors of human thrombin. **Bioorganic chemistry**, v. 92, p. 103199, 2019.
- CAO, Zhongcheng, et al. Design, synthesis and evaluation of 4'-OH-flurbiprofen-chalcone hybrids as potential multifunctional agents for Alzheimer's disease treatment. **Bioorganic & medicinal chemistry**, 2018, 26.5: 1102-1115.
- CONWAY, Edward M. Complement-coagulation connections. **Blood Coagulation & Fibrinolysis**, 2018, 29.3: 243-251.

CUSTODIO, Jean MF, et al. The influence of methoxy and ethoxy groups on supramolecular arrangement of two methoxy-chalcones. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2017, 28.11: 2180-2191.

DE MOURA, Valéria Mourão et al. The inhibitory potential of the condensed-tannin-rich fraction of *Plathymenia reticulata* Benth.(Fabaceae) against *Bothrops atrox* envenomation. **Journal of ethnopharmacology**, v. 183, p. 136-142, 2016.

DENNIS, Edward A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. **The Journal of biological chemistry**, v. 269, n. 18, p. 13057-13060, 1994.

DÍAZ-TIELAS, C., et al. Biological activities and novel applications of chalcones. **Planta daninha**, 2016, 34.3: 607-616.

DOROTEIO, Najla Leão. Síntese de análogos de *bis*-chalconas simétricos e não simétricos. 2016.

EDGAR, W.; Prentice, C.R.M. The proteolytic action of ancrod on human fibrinogen and its polypeptide chains. **Thrombosis Research**, v. 2, p. 85. 1973.

EIKELBOOM, John W. et al. Antiplatelet drugs: antithrombotic therapy and prevention of thrombosis: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. **Chest**, v. 141, n. 2, p. e89S-e119S, 2012.

FAGGIO, Caterina et al. Flavonoids and platelet aggregation: a brief review. **European journal of pharmacology**, v. 807, p. 91-101, 2017.

GALE, Andrew J. Continuing education course# 2: current understanding of hemostasis. **Toxicologic pathology**, v. 39, n. 1, p. 273-280, 2011.

GIACOLETTO, Nicolas; DUMUR, Frédéric. Recent Advances in *bis*-Chalcone-Based Photo initiators of Polymerization: From Mechanistic Investigations to Applications. **Molecules**, v. 26, n. 11, p. 3192, 2021.

GOMES, Marcelo, et al. Chalcone derivatives: promising starting points for drug design. **Molecules**, 2017, 22.8: 1210.

GUTIÉRREZ JM, Avila C, Rojas E and Cerdas L: An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. **Toxicon** 1988; 26:411-413.

HIGUCHI, K.;Watanabe, T.; Tanigawa, T.; Tominaga, K.; Fujiwara, Y.; Arakawa, T. Sofalcone, a gastroprotective drug, promotes gastric ulcer healing following eradication therapy for *Helicobacter pylori*: A randomized controlled comparative trial with cimetidine, an H2-receptor antagonist. **J. Gastroenterol. Hepatol.** 2010, 25, 155–160.

JACKSON, Paul A. et al. Covalent modifiers: A chemical perspective on the reactivity of α , β -unsaturated carbonyls with thiols via hetero-Michael addition reactions. **Journal of medicinal chemistry**, v. 60, n. 3, p. 839-885, 2017.

JAYASOORIYA, Rajapaksha Gedara Prasad Tharanga, et al. Molecular chemotherapeutic potential of butein: A concise review. **Food and chemical toxicology**, 2018, 112: 1-10.

JOHNSON, Rabia, et al. Aspalathin from rooibos (*Aspalathus linearis*): a bioactive C-glucosyl dihydrochalcone with potential to target the metabolic syndrome. **Planta medica**, 2018, 84.09/10: 568-583.

KIM, Seok-Joo; DAVIS, Rachele P.; JENNE, Craig N. Platelets as modulators of inflammation. In: **Seminars in thrombosis and hemostasis**. Thieme Medical Publishers, 2018. p. 091-101.

KUMAR, Dalip et al. Synthesis and identification of α -cyano bis (indolyl) chalcones as novel anticancer agents. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 24, n. 22, p. 5170-5174, 2014.

KU, Sae-Kwang, et al. Antithrombotic activities of aspalathin and nothofagin via inhibiting platelet aggregation and FIIa/FXa. **Archives of pharmacal research**, 2015, 38.6: 1080-1089.

LARRÉCHÉ, Sébastien et al. Bleeding and thrombosis: insights into pathophysiology of bothrops venom-related hemostasis disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 17, p. 9643, 2021.

LEMES, Susy Ricardo, et al. Optical properties and antiangiogenic activity of a chalcone derivate. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 2018, 204: 685-695.

LIMA, D. C. S.; do Vale, C. R.; Vêras, J. H.; Bernardes, A.; Pérez, C. N.; Chen-Chen, L. Absence of genotoxic effects of the chalcone (E)-1-(2-hydroxyphenyl)-3-(4-methylphenyl)-prop-2-en-1-one) and its potential chemoprevention against DNA damage using in vitro and in vivo assays. **Plos one** 2017, 12, e0171224.

LIPPI, Giuseppe; FAVALORO, Emmanuel J. Laboratory hemostasis: from biology to the bench. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, v. 56, n. 7, p. 1035-1045, 2018.

MAHAPATRA, Debarshi Kar; ASATI, Vivek; BHARTI, Sanjay Kumar. Chalcones and their therapeutic targets for the management of diabetes: structural and pharmacological perspectives. **European journal of medicinal chemistry**, 2015, 92: 839-865.

MAHAPATRA, Debarshi Kar; BHARTI, Sanjay Kumar; ASATI, Vivek. Chalcone scaffolds as anti-infective agents: Structural and molecular target perspectives. **European journal of medicinal chemistry**, v. 101, p. 496-524, 2015.

MOURÃO, P. A. S.; Pereira, M. S.; Pavao, M. S. G.; Mulloy, B.; Tollefsen, D. M.; Mowinckel, M. C.; Abildgaard, U. Structure and anticoagulant activity of a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 23973–23984, 1996.

MCVEY, John H. The role of the tissue factor pathway in haemostasis and beyond. **Current opinion in hematology**, v. 23, n. 5, p. 453-461, 2016.

MOHAMED ABD EL-AZIZ, Tarek; GARCIA SOARES, Antonio; STOCKAND, James D. Snake Venoms in Drug Discovery: Valuable Therapeutic Tools for Life Saving. **Toxins**, 2019, 11.10: 564.

NUTI, Elisa, et al. Synthesis and antiangiogenic activity study of new hop chalcone Xanthohumol analogues. **European journal of medicinal chemistry**, 2017, 138: 890-899.

OUYANG, Yang et al. Chalcone Derivatives: Role in Anticancer Therapy. **Biomolecules**, v. 11, n. 6, p. 894, 2021.

ÖZDEMİR, Ahmet, et al. Synthesis and evaluation of new indole-based chalcones as potential antiinflammatory agents. **European journal of medicinal chemistry**, 2015, 89: 304-309.

PIETERS, Marlien; WOLBERG, Alisa S. Fibrinogen and fibrin: An illustrated review. **Research and practice in thrombosis and haemostasis**, 2019, 3.2: 161-172.

SAHU, N.K.; Balbhadra, S.S.; Choudhary, J.; Kohli, D.V. Exploring pharmacological significance of chalcone scaffold: A review. **Curr. Med. Chem.** 2012, 19, 209–225.

SCHROEDER, Verena; KOHLER, Hans P. Factor XIII: structure and function. In: **Seminars in thrombosis and hemostasis**. Thieme Medical Publishers, 2016. p. 422-428.

SELEPE, Mamoalosi; VAN HEERDEN, Fanie. Application of the Suzuki-Miyaura reaction in the synthesis of flavonoids. **Molecules**, v. 18, n. 4, p. 4739-4765, 2013.

SMITH, Stephanie A.; TRAVERS, Richard J.; MORRISSEY, James H. How it all starts: Initiation of the clotting cascade. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, v. 50, n. 4, p. 326-336, 2015.

TEIXEIRA, Maria L. et al. Essential Oil from *Lippia origanoides* (verbenaceae): haemostasis and enzymes activity alterations. **Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 2, p. 207-214, 2019.

TEN CATE, Hugo; HACKENG, Tilman M.; DE FRUTOS, Pablo García. Coagulation factor and protease pathways in thrombosis and cardiovascular disease. **Thrombosis and haemostasis**, v. 117, n. 07, p. 1265-1271, 2017.

VERSTEEG, Henri H. et al. New fundamentals in hemostasis. **Physiological reviews**, v. 93, n. 1, p. 327-358, 2013.

QUACH ND, Arnold RD, Cummings BS. Secretory phospholipase A2 enzymes as pharmacological targets for treatment of disease. **Biochem Pharmacol.** 2014; 90:338–348.

RANI, Anu, et al. Recent developments in biological aspects of chalcones: the odyssey continues. **Expert opinion on drug discovery**, 2019, 14.3: 249-288.

READ, Stephanie H.; WILD, Sarah H. Prevention of premature cardiovascular death worldwide. **The Lancet**, v. 395, n. 10226, p. 758-760, 2020.

RIAZ, Sharon, et al. Synthesis and evaluation of novel α -substituted chalcones with potent anti-cancer activities and ability to overcome multidrug resistance. **Bioorganic chemistry**, 2019.

RUEPING, Magnus et al. Continuous-flow hydration–condensation reaction: Synthesis of α , β -unsaturated ketones from alkynes and aldehydes by using a heterogeneous solid acid catalyst. **Beilstein journal of organic chemistry**, v. 7, n. 1, p. 1680-1687, 2011.

YARLA, N. S. et al. Phospholipase A2: A potential therapeutic target in inflammation and cancer (in silico, in vitro, in vivo and clinical approach). **Journal of Cancer Science & Therapy**, Osaka, v.7, n. 7, p. 249-252, July 2015.

YOU, Wei, et al. Cardamonin protects against adverse cardiac remodeling through mTORC1 inhibition in mice with myocardial infarction. *Die Pharmazie-na International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2018, 73.9: 508-512.

REZENDE, Danubia Aparecida de Carvalho Selvati. Essential Oils from *Mentha piperita*, *Cymbopogon citratus*, *Rosmarinus officinalis*, *Peumus boldus* and *Foeniculum vulgare*: Inhibition of Phospholipase A2 and Cytotoxicity to Human Erythrocytes. **Scientific Research An Academic Publisher**, v. 8, n. 9, 2017.

RODRIGUES, Evandra Straza; CASTILHO-FERNANDES, Andrielle; FONTES, Aparecida Maria. Novos conceitos sobre a fisiologia da hemostasia. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, 2012, 10.1: 218-233.

WANG, Wen-Jeng; SHIH, Chun-Ho; HUANG, Tur-Fu. Primary structure and antiplatelet mechanism of a snake venom metalloproteinase, acurhagin, from *Agkistrodon acutus* venom. **Biochimie**, 2005, 87.12: 1065-1077.

WEITZ, Jeffrey I.; EIKELBOOM, John W.; SAMAMA, Meyer Michel. New antithrombotic drugs: antithrombotic therapy and prevention of thrombosis: American college of chest physicians evidence-based clinical practice guidelines. **Chest**, v. 141, n. 2, p. e120S-e151S, 2012.

XU, Xiao-Yu et al. Bioactivity, health benefits, and related molecular mechanisms of curcumin: Current progress, challenges, and perspectives. **Nutrients**, v. 10, n. 10, p. 1553, 2018.

ZARAGOZÁ, Cristina et al. Antiplatelet activity of flavonoid and coumarin drugs. **Vascular pharmacology**, v. 87, p. 139-149, 2016.

ZHOU, Bo; XING, Chengguo. Diverse molecular targets for chalcones with varied bioactivities. **Medicinal chemistry**, v. 5, n. 8, p. 388, 2015.

ZHUANG, Chunlin, et al. Chalcone: a privileged structure in medicinal chemistry. **Chemical reviews**, 2017, 117.12: 7762-7810.

ANEXOS

Anexo A - Parecer do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
LAVRAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: SÍNTESE DE CHALCONAS: ESTUDO DE MODULADORES DE PROTEASES QUE ATUAM NA MANUTENÇÃO DA HEMOSTASIA

Pesquisador: Silvana Marcussi

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 34322020.7.0000.5148

Instituição Proponente: Universidade Federal de Lavras

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.244.909

Apresentação do Projeto:

As patologias relacionadas a distúrbios da hemostasia como a trombose, hemofilias e doença de von Willebrand, afligem uma parte considerável da população mundial. Desta forma, compreender o papel e função de cada estrutura neste intrincado e complexo mecanismo é de fundamental importância, bem como a busca por moléculas que possam modular de forma eficiente e específica componentes que atuam neste processo, possibilitando o tratamento ou cura destas doenças. É portanto, de suma importância a pesquisa e síntese de novas substâncias que apresentem atividade biológica sob o processo hemostático. As chalconas são substâncias que tem demonstrado grande variedade de aplicações farmacológicas como anti-inflamatória, anti-oxidante, anti-nociceptiva, anti-inflamatória, anticonvulsivante, anti-acetilcolinesterase, anti-tuberculose, para tratamento de enfermidades como câncer e diabetes, dentre outras. Além disso, algumas características tornam essas moléculas alvos de grande interesse para pesquisadores ao redor do mundo, como rotas de síntese relativamente simples, baixa toxicidade, alto rendimento das reações, e também a presença de hidrogênios que podem ser substituídos por uma enorme variedade de substituintes, o que possibilita, uma fonte

Endereço: Campus Universitário Cx Postal 3037

Bairro: PRP/COEP

CEP: 37.200-000

UF: MG

Município: LAVRAS

Telefone: (35)3829-5182

E-mail: coep@nintec.ufla.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
LAVRAS



Continuação do Parecer: 4.244.909

praticamente inesgotável de estruturas. Nessa perspectiva, a avaliação dos efeitos destas moléculas em processos relacionados à hemostasia e sobre a atividade de enzimas que atuam nesses processos, mostra-se de grande importância médico-científica.

Objetivo da Pesquisa:

Síntese e caracterização de derivados de chalconas, prospecção de atividade citotóxica/antiinflamatória e efeitos sobre coagulação de plasma e dissolução de trombos sanguíneos, e estudos de ação moduladora sobre proteases que atuam em processos relacionados a hemostasia e resposta inflamatória

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A coleta de sangue poderá causar algumas pequenas manifestações no local da injeção, como um pequeno inchaço, vermelhidão ou formação de mancha roxa, ou seja, sinais comuns em coletas rotineiras de sangue e de baixo risco à saúde do doador. Alguns voluntários poderão sentir mal estar antes, durante ou após a coleta de sangue, devido à diminuição da pressão sanguínea, e, caso isso ocorra, a coleta do sangue poderá ser suspensa e se necessário o docente responsável solicitará atendimento médico para o voluntário. Espera-se obter o mínimo de situações em que os voluntários sintam mal estar, uma vez que, teoricamente, pessoas que se sentem mal ao ver sangue ou ter seu sangue retirado não irão se voluntariar, além disso, porque as coletas serão feitas na ausência de jejum, a qualquer hora do período da manhã.

Benefícios:

Não haverá qualquer benefício direto ao voluntário nesta pesquisa. No entanto, ele estará contribuindo com a conclusão dos estudos referentes ao projeto do pesquisador colaborador Matheus Henrique da Silva, discente de mestrado, no qual se pretende obter informações sobre os efeitos de chalconas sintéticas sobre moléculas e células humanas, considerando parâmetros fisiológicos e toxicológicos, visando a comprovação de

Endereço: Campus Universitário Cx Postal 3037

Bairro: PRP/COEP

CEP: 37.200-000

UF: MG

Município: LAVRAS

Telefone: (35)3829-5182

E-mail: coep@nintec.ufla.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
LAVRAS



Continuação do Parecer: 4.244.909

indicações de uso popular de plantas que possuem essa classe de substâncias em sua composição, assim como a obtenção de conhecimentos que permitam sugerir novas aplicações com eficácia e segurança.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trabalho nacional, unicêntrico e com caráter acadêmico realizado para a obtenção do título de mestre.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Pendências:

1- No item 8 do comentários éticos, os pesquisadores devem retirar a seguinte frase: "Entretanto, caso ocorra alguma situação não prevista ou inesperada que resulte em danos ou prejuízos à saúde do voluntário de pesquisa, o pesquisador responsável se responsabiliza por buscar imediatamente, auxílio médico ou orientações acerca de auxílio financeiro junto ao COEP/UFLA, verificando, para casos extraordinários as possibilidades de indenização e/ou reparo de danos.", uma vez que a responsabilidade de indenização e/ou reparação de danos é dos pesquisadores.

2- Reformular os critérios de exclusão, pois a exclusão esta apenas retirando os critérios incluídos.

Recomendações:

Pendências:

1- No item 8 do comentários éticos, os pesquisadores devem retirar a seguinte frase: "Entretanto, caso ocorra alguma situação não prevista ou inesperada que resulte em danos ou prejuízos à saúde do voluntário de pesquisa, o pesquisador responsável se responsabiliza por buscar imediatamente, auxílio médico ou orientações acerca de auxílio financeiro junto ao COEP/UFLA, verificando, para casos extraordinários as possibilidades de indenização e/ou reparo de danos.", uma vez que a responsabilidade de indenização e/ou reparação de danos é dos pesquisadores.

2- Reformular os critérios de exclusão, pois a exclusão esta apenas retirando os critérios incluídos.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Trata-se da análise de resposta ao parecer pendente nº 4.159.149 emitido pelo CEP em 16/07/2020:

Pendência 1: No item 8 do comentários éticos, os pesquisadores devem retirar a seguinte frase:

Endereço: Campus Universitário Cx Postal 3037
Bairro: PRP/COEP **CEP:** 37.200-000
UF: MG **Município:** LAVRAS
Telefone: (35)3829-5182 **E-mail:** coep@nintec.ufla.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
LAVRAS



Continuação do Parecer: 4.244.909

"Entretanto, caso ocorra alguma situação não prevista ou inesperada que resulte em danos ou prejuízos à saúde do voluntário de pesquisa, o pesquisador responsável se responsabiliza por buscar imediatamente, auxílio médico ou orientações acerca de auxílio financeiro junto ao COEP/UFLA, verificando, para casos extraordinários as possibilidades de indenização e/ou reparo de danos. ", uma vez que a responsabilidade de indenização e/ou reparação de danos é dos pesquisadores.

Resposta à pendência 1: Conforme solicitado, a referida frase (embora verse sobre solicitar orientações junto ao COEP para que a pesquisadora possa realizar o auxílio financeiro imprevisto ao voluntário - mas, uma vez que gerou entendimento errôneo por parte dos membros do COEP, considero adequado excluir) foi excluída do arquivo "Comentários éticos".

Análise: Atendida

Pendência 2: Reformular os critérios de exclusão, pois a exclusão está apenas retirando os critérios incluídos.

Resposta à pendência 2: Os critérios de exclusão são preenchidos diretamente na Plataforma Brasil, então, eu entrei no sistema e os alterei conforme solicitação. Os mesmos poderão ser visualizados no reenvio dos arquivos.

Análise: Atendida

Considerações Finais a critério do CEP:

Ao Final do experimento o pesquisador deverá enviar relatório final, indicando ocorrências e efeitos adversos quando houver.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1582791.pdf	17/07/2020 08:52:26		Aceito
Outros	cartaRespostaCOEP.doc	17/07/2020 08:51:24	Silvana Marcussi	Aceito
Outros	ComentarioseticosMatheuscorrigido.docx	17/07/2020 08:50:42	Silvana Marcussi	Aceito

Endereço: Campus Universitário Cx Postal 3037

Bairro: PRP/COEP

CEP: 37.200-000

UF: MG

Município: LAVRAS

Telefone: (35)3829-5182

E-mail: coep@nintec.ufla.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
LAVRAS**



Continuação do Parecer: 4.244.909

Declaração de Pesquisadores	DeclaracaopesquisadoraMatheus.docx	30/06/2020 08:18:29	Silvana Marcussi	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AutorizacaoPRGMatheus_ assinado.pdf	30/06/2020 08:15:04	Silvana Marcussi	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEMatheus.docx	30/06/2020 08:14:47	Silvana Marcussi	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCOEPMatheus.docx	30/06/2020 08:13:57	Silvana Marcussi	Aceito
Folha de Rosto	FolhaderostoMatheusSilvaAssinada.pdf	30/06/2020 08:13:38	Silvana Marcussi	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

LAVRAS, 28 de Agosto de 2020

Assinado por:

**Giancarla Aparecida Botelho Santos
(Coordenador(a))**

Endereço: Campus Universitário Cx Postal 3037

Bairro: PROP/COEP

CEP: 37.200-000

UF: MG

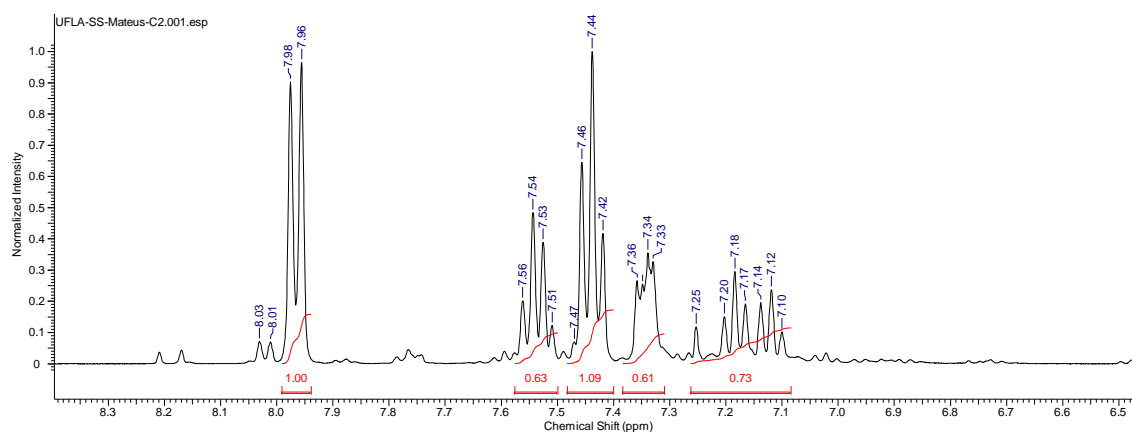
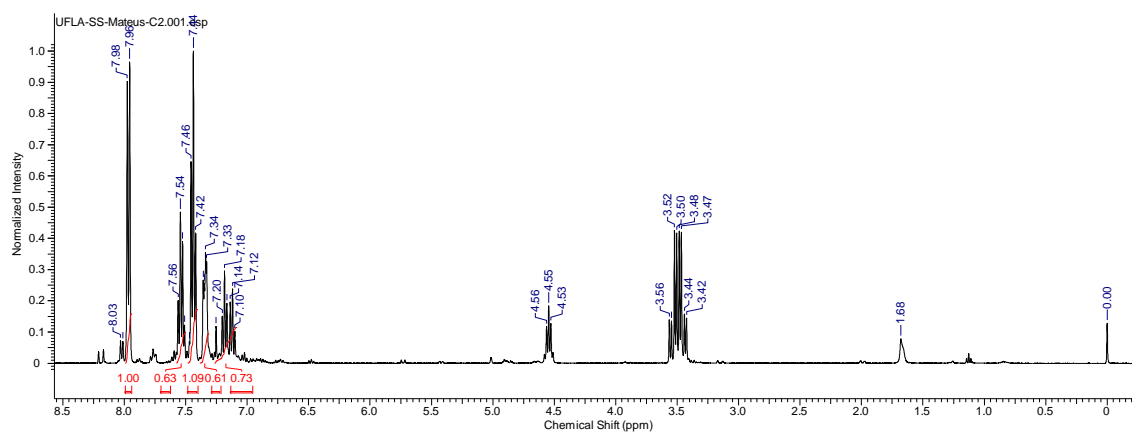
Município: LAVRAS

Telefone: (35)3829-5182

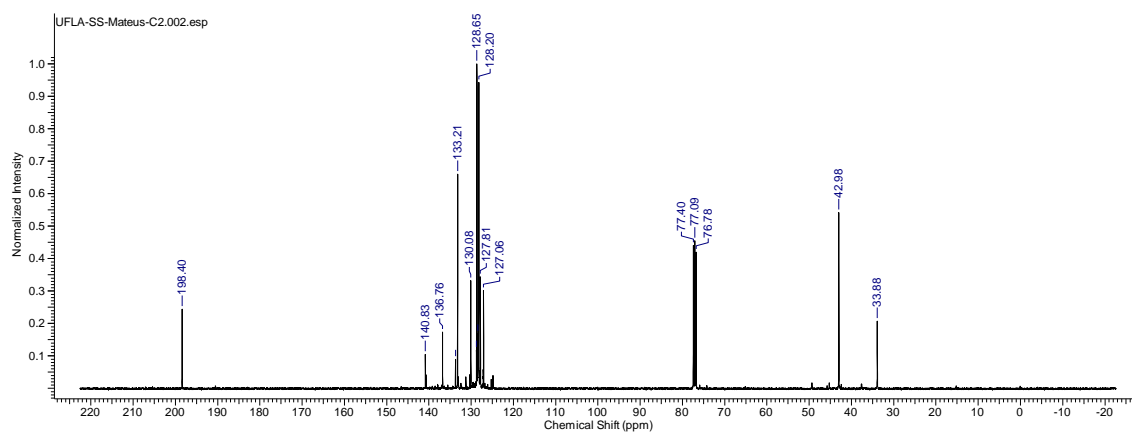
E-mail: coep@nintec.ufla.br

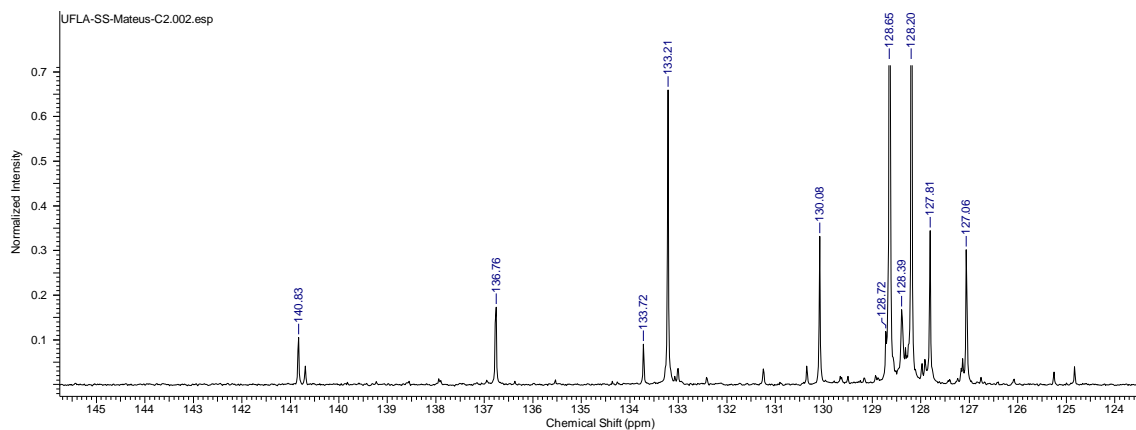
Anexo B – Espectros de RMN das moléculas II e III

Espectro de ^1H para molécula (2E)-3-(2-clorofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (II)

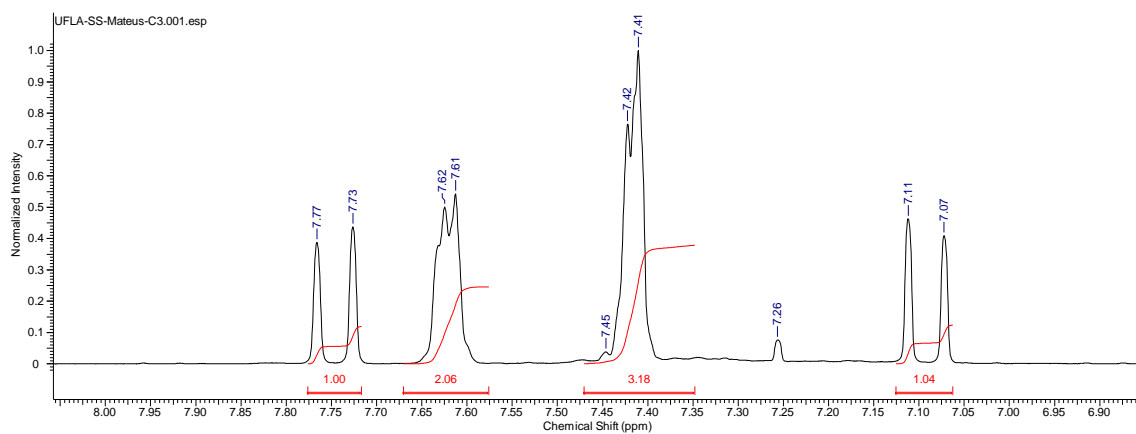
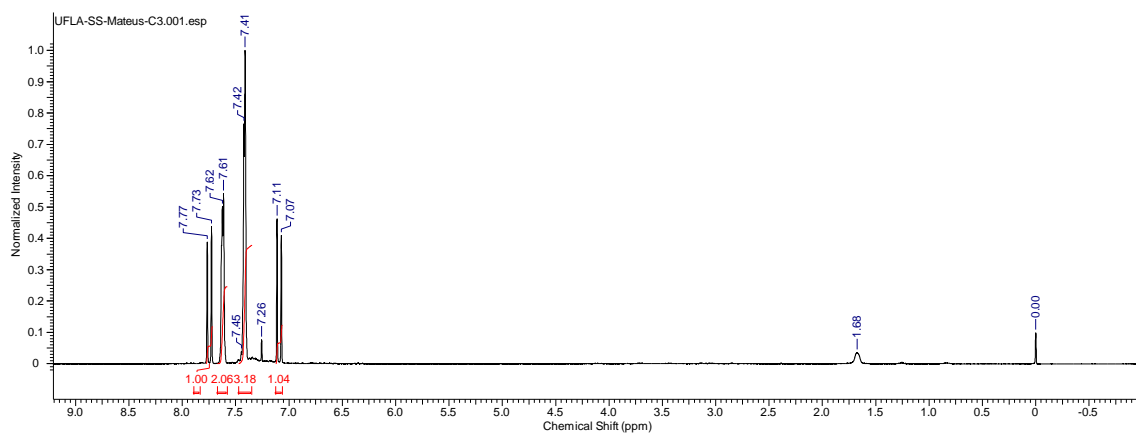


Espectros de ^{13}C para molécula (2E)-3-(2-clorofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (II)





Espectro ^1H para a molécula (1E,4E)-1,5-difenilpenta-1,4-dien-3-ona (III)



Espectro ^1H para a molécula (1E,4E)-1,5-difenilpenta-1,4-dien-3-ona (III)