

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

DALILA JUNQUEIRA ALVARENGA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-*Trypanosoma cruzi* DE NOVOS
DERIVADOS DE LICARINA A: ESTUDOS *in silico*, *in vitro* e *in vivo***

Alfenas/MG

2021

DALILA JUNQUEIRA ALVARENGA

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-*Trypanosoma cruzi* DE NOVOS
DERIVADOS DE LICARINA A: ESTUDOS *in silico*, *in vitro* e *in vivo*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas como parte dos requisitos
do curso de Doutorado em Ciências Farmacêuticas
pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Diogo Teixeira Carvalho

Co-orientador: Prof. Dr. Ivo Santana Caldas

Colaboradora: Profa. Dra. Stefania Neiva Lavorato,
Profa. Dra. Lívia de Figueiredo Diniz.

Alfenas/ MG

2021

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central – Campus Sede

Alvarenga, Dalila Junqueira
A473s Síntese e avaliação da atividade anti-*trypanosoma cruzi* de novos derivados de
Licarina A: estudos *in silico*, *in vitro* e *in vivo* / Dalila Junqueira Alvarenga –
Alfenas, MG, 2022.
265 f.: il. –

Orientador: Diogo Teixeira Carvalho.
Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de
Alfenas, 2021.
Bibliografia.

1. Licarina A. 2. Neolignanas. 3. Doença de Chagas. 4. *Trypanosoma cruzi*.
I. Carvalho, Diogo Teixeira. II. Título.

CDD- 615

DALILA JUNQUEIRA ALVARENGA

"SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-*Trypanosoma cruzi* DE NOVOS DERIVADOS DE LICARINA A: ESTUDOS *in silico*, *in vitro* e *in vivo*"

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 13 de dezembro de 2021

Prof. Dr. Diogo Teixeira Carvalho
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Thiago Belarmino de Souza
Instituição: Universidade Federal de Ouro Preto

Profa. Dra. Daniela Aparecida Chagas de Paula
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Magali Benjamim Araújo
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Marcos José Marques
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **Marcos José Marques, Professor do Magistério Superior**, em 13/12/2021, às 12:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Magali Benjamim de Araújo, Professor do Magistério Superior**, em 13/12/2021, às 12:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Diogo Teixeira Carvalho, Professor do Magistério Superior**, em 13/12/2021, às 12:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thiago Belarmino de Souza, Usuário Externo**, em 13/12/2021, às 12:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniela Aparecida Chagas de Paula, Professor do Magistério Superior**, em 13/12/2021, às 12:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 0650149 e o código CRC A9703AA7.

Dedico este trabalho à minha família, que é minha fonte de inspiração e incentivo constante a nunca desistir.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus pelo dom da vida e pela oportunidade de alcançar mais um objetivo tão especial em minha vida.

A minha família por todo apoio e suporte. Ao meu marido, Alexandre, por todo incentivo, companheirismo e amor em todos os momentos e ao meu filho Lucas que está vindo para somar às nossas vidas.

Aos meus pais, João Pedro e Simone, por serem exemplos em minha vida e sempre estarem ao meu lado.

Às minhas irmãs, Talita e Lara, pela amizade e apoio. A minha afilhada Beatriz por ser mais um motivo de alegria em minha vida.

A todos meus familiares e amigos, por serem motivo para que eu nunca desista dos meus sonhos.

Ao meu orientador, prof. Dr. Diogo Teixeira Carvalho, pela oportunidade, ensinamentos, compreensão, amizade e por sempre estar disposto a auxiliar nas dificuldades que surgiram ao longo desses anos de parceria.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Ivo Santana Caldas, pelo auxílio durante a realização dos ensaios biológicos e, também, a professora Dra. Lívia de Figueiredo Diniz, por todo suporte na avaliação de atividade tripanocida. Aos funcionários do laboratório de Parasitologia Básica que sempre se mostraram tão solícitos.

Aos alunos de iniciação científica Laira e Lucas, pela contribuição e dedicação ao trabalho.

A professora Dra. Stefânia Lavorato pela disponibilidade para direcionamento dos estudos de modelagem molecular e dos parâmetros físico-químicas, farmacocinéticas e metabólicos.

Aos técnicos Gabriel Moraes e Leandro Marcos Santos pelo auxílio na realização das análises de espectroscopia e no laboratório de síntese. E a doutoranda Elda Gonçalves pelo suporte nos ensaios *in vivo*.

A todos os colegas do Laboratório de Pesquisa em Química Farmacêutica (LQFar) por sempre estarem dispostos a ajudar e pelos momentos de descontração.

À Universidade Federal de Alfenas pelo espaço concedido na realização da pesquisa e aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências

Farmacêuticas pelos esforços em prol da pesquisa e do crescimento acadêmico da instituição.

A todos os funcionários da Universidade Federal de Alfenas, que estão sempre fazendo seu melhor e procurando ajudar os alunos.

A todas as pessoas que fizeram e fazem parte dessa caminhada.

Ao CNPq e FAPEMIG pelo financiamento da pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e da Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG.

*As nuvens mudam sempre de posição, mas são
sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia,
mutantes, porém leais com o que pensamos e
sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar,
menos os pensamentos.*

(Paulo Baleki, 2005)

RESUMO

A Doença de Chagas, doença tropical negligenciada, afeta principalmente a América Latina e é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, o qual vive e se reproduz em diversas células e tecidos. Os sinais e sintomas dessa doença são bastante variáveis, sendo caracterizada por possuir uma fase aguda e uma fase crônica, esta última relacionada aos efeitos mais graves da doença, levando a sérias complicações e frequentemente ao óbito. Os fármacos para o tratamento da doença são escassos, sendo o benznidazol o de escolha, o qual atua principalmente na fase aguda e apresenta efeitos adversos significativos. Nesse sentido, a necessidade de descoberta de novos fármacos tripanocidas é imperativa e os produtos naturais são fontes potenciais nesse contexto. Neolignanas são metabólitos secundários encontradas em determinadas espécies vegetais e um de seus representantes, a licarina A, exerce diversas atividades biológicas já bem relatadas, entre elas a tripanocida. Desta forma, representa substância promissora como ponto de partida para o desenvolvimento de agentes tripanocidas otimizados. Tendo isso em vista, objetivou-se com este trabalho a síntese e avaliação biológica de derivados da licarina A, com vistas à descoberta de produtos tripanocidas mais ativos e menos tóxicos que ela, a fim de se colaborar com a descoberta de novo agente contra o *T. cruzi*. A licarina A foi obtida por método biossintético empregando isoeugenol, água de coco (*Cocos nucifera* L.) e peróxido de hidrogênio. Na sequência, realizaram-se modificações estruturais direcionadas majoritariamente à hidroxila fenólica da licarina A (via reações de eterificação) e à sua cadeia propenólica (via reações de oxidação). Os produtos finais foram obtidos com rendimentos adequados aos objetivos do trabalho e foram caracterizados pelos métodos espectroscópicos e espectrométricos usuais. Na sequência, foram submetidos à avaliação *in vitro* de seu potencial tripanocida contra diferentes formas evolutivas do parasita, além de citotoxicidade em células Vero[®]. Apenas a licarina A e os derivados com alteração na cadeia propenólica tiveram resultados relevantes no ensaio anti-epimastigota e, por isso seguiram para a avaliação contra formas amastigotas e tripomastigotas. Nestes ensaios, o destaque foi para o derivado di-hidroxilado **DL07**, o qual apresentou valor de CI₅₀ de 1,23 µg.mL⁻¹ contra as formas amastigotas. Frente a estes resultados, esse composto e a licarina A, a título de comparação, seguiram para ensaios *in vivo* em camundongos

previamente infectados com *T. cruzi*, nos quais foi possível notar importante redução da parasitemia nos animais tratados com **DL07** na dosagem de 100 mg.kg⁻¹. Além desse efeito antiparasitário *in vivo*, observou-se maior sobrevivência dos animais tratados com **DL07** que com aqueles submetidos à licarina A, indicando sua menor toxicidade em relação ao precursor. Adicionalmente, foram realizados estudos de ancoragem molecular das substâncias sintetizadas com a enzima tripanotona redutase, um alvo molecular importante na busca de novos agentes contra o *T. cruzi* e verificou-se que **DL07** foi o composto que apresentou interação mais estável com a enzima. Os resultados computacionais obtidos mostraram que a presença de uma cadeia lateral di-hidroxilada em vez do grupo propenílico e do grupo 4-cloro benzílico como substituinte no fenol da licarina A são pontos importantes para interação com o sítio ativo da enzima em estudo. Estudos computacionais adicionais de previsão de propriedades físico-químicas e farmacocinéticas ainda apontaram que o derivado **DL07** possui uma boa probabilidade de ser absorvido pelo trato gastrointestinal e não atravessar a barreira hematoencefálica, além de não possuir nenhuma região de sua estrutura que tenha impacto negativo para a atividade. Com isso, constatou-se com este estudo que o derivado di-hidroxilado **DL07** é superior à licarina A como agente tripanocida, assim como no quesito segurança. Associado aos bons perfis de interação *in silico* com a tripanotona redutase e de propriedades físico-químicas e farmacocinéticas, defende-se **DL07** como um excelente protótipo para explorações químico-medicinais futuras com vistas à descoberta de novos candidatos a fármacos tripanocidas.

Palavras-chave: Licarina A; neolignanas; doença de Chagas; *Trypanosoma cruzi*.

ABSTRACT

Chagas disease, a neglected tropical disease, affects mainly Latin America and is caused by the flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*, which lives and reproduces in different cells and tissues. The signs and symptoms of this disease are quite variable, being characterized by having an acute phase and a chronic phase, the latter related to the most serious effects of the disease, leading to serious complications and often death. Drugs for the treatment of the disease are scarce, with benznidazole being the one of choice, which acts mainly in the acute phase and has significant adverse effects. In this sense, the need to discover new trypanocidal drugs is imperative and natural products are potential sources in this context. Neolignans are secondary metabolites found in certain plant species and one of their representatives, licarin A, exerts several well-reported biological activities, including trypanocide. Thus, it represents a promising substance as a starting point for the development of optimized trypanocidal agents. With this in mind, the objective of this work was the synthesis and biological evaluation of derivatives of licarin A, with a view to discovering more active and less toxic trypanocidal products, in order to collaborate with the discovery of a new agent against the *T. cruzi*. Licarin A was obtained by a biosynthetic method using isoeugenol, coconut water (*Cocos nucifera* L.) and hydrogen peroxide. Subsequently, structural modifications were carried out, mainly directed to the phenolic hydroxyl of licarin A (via etherification reactions) and its propenyl chain (via oxidation reactions). The final products were obtained in suitable yields to the objectives with this work and were characterized by the usual spectroscopic and spectrometric methods. Afterwards, they were submitted to an *in vitro* evaluation of their trypanocidal potential against different evolutionary forms of the parasite, in addition to cytotoxicity in Vero[®] cells. Only licarin A and derivatives with modifications in the propenyl side chain had good results in the anti-epimastigote assay and, therefore, they both were evaluated against amastigote and trypomastigote forms. In these tests, the dihydroxy derivative **DL07** was the most active compound, which presented an IC₅₀ value of 1.23 µg.mL⁻¹ against amastigote forms. In view of these results, this compound and licarin A, for comparison, were used for *in vivo* tests in mice pre-infected with *T. cruzi*, in which it was possible to notice an important reduction in parasitemia in animals treated with **DL07** at a dose of 100 mg.kg⁻¹. In addition to this *in vivo* antiparasitic effect, a longer survival rate was

observed in animals treated with **DL07** than in those submitted to licarin A, indicating its lower toxicity compared to the precursor. Additionally, molecular docking studies of the substances synthesized with the enzyme trypanothione reductase, an important molecular target in the search for new agents against *T. cruzi*, were carried out, and it was found that **DL07** was the compound that showed the most stable interaction with this enzyme. The computational results obtained showed that the presence of a dihydroxylated side chain instead of the propenyl group and the 4-chloro benzyl group as a substitute in the licarin A phenol are important points for interaction with the active site of the enzyme under study. Additional computational studies to predict physicochemical and pharmacokinetic properties also pointed out that the **DL07** derivative has a good probability of being absorbed by the gastrointestinal tract and not crossing the blood-brain barrier, in addition to not having any region of its structure that has a negative impact on the activity. Thus, it was found in this study that the dihydroxy derivative **DL07** is superior to licarin A as a trypanocidal agent, as well as in terms of safety. Associated with good *in silico* interaction profiles with trypanothione reductase and physicochemical and pharmacokinetic properties, **DL07** is defended as an excellent prototype for future chemical-medicinal studies with a view to discovering new candidates for trypanocidal drugs.

Keywords: Licarin A; neolignans; Chagas disease; *Trypanosoma cruzi*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i>	24
Figura 2 - Estruturas químicas de substâncias tripanocidas.....	25
Figura 3 - Mecanismo de ação do benznidazol e nifurtimox contra <i>T. cruzi</i>	27
Figura 4 - Derivados cumarínicos que atuam sobre a GAPDH de <i>T. cruzi</i>	28
Figura 5 - Derivados imidazólicos inibidores de CYP51 de <i>T. cruzi</i>	29
Figura 6 – Estrutura química do eupomatenóide 5 e da licarina A.....	29
Figura 7 - Produtos naturais inibidores da tripanotiona redutase e demais substâncias capazes de inibir diferentes enzimas do <i>T. cruzi</i>	30
Figura 8 - Estruturas de lignanas e neolignanas.	30
Figura 9 - Estruturas químicas do benzofurano e do di-hidrobenzofurano.....	31
Figura 10 - Benzofuranos com atividade biológica.	32
Figura 11 - Estruturas químicas de diferentes eupomatenóides naturais.	32
Figura 12 - Estruturas químicas das licarinas A, B, C, D e E.....	33
Figura 13 - Estruturas químicas dos enantiômeros da licarina A.....	34
Figura 14 – Estrutura dos derivados sintetizados no trabalho de Oliveira <i>et al.</i> (2019).....	35
Figura 15 – Estrutura dos derivados sintetizados no trabalho de Meleti <i>et al.</i> (2019).....	35
Figura 16 – Estrutura dos derivados de licarina A sintetizados no trabalho de Souza (2012).....	36
Figura 17 – Estrutura dos derivados de licarina A sintetizados no trabalho de Alvarenga <i>et al.</i> (2020).	37
Figura 18 – Estruturas dos derivados de licarina A sintetizados no trabalho de Moraes <i>et al.</i> (2020).	38
Figura 19 – Regiões de modificação propostos para síntese dos derivados a partir do protótipo.	41
Figura 20 – Rota sintética empregada para obtenção dos derivados propostos.....	42
Figura 21 – Mecanismo proposto para hidrólise do acetato de isoeugenol.	43
Figura 22 – Mecanismo proposto para biossíntese da licarina A.....	45
Figura 23 – Mecanismo proposto para hidrogenação catalítica.....	48

Figura 24 – Mecanismo proposto para as reações de eterificação via SN1. ...	49
Figura 25 – Mecanismo proposto para as reações de eterificação via SN2. ...	50
Figura 26 – Mecanismo proposto para a reação de epoxidação.	51
Figura 27 – Mecanismo proposto para a reação de abertura do epóxido.	52
Figura 28 – Mecanismo proposto para reação de redução via NaBH ₄	54
Figura 29 – Redução da resazurina à resorufina.....	55
Figura 30 – Estrutura química da licarina A (DL01), do precursor (DL04) e dos derivados do primeiro grupo mais ativos.	57
Figura 31 – Gráfico da atividade de DL07 sobre amastigotas intracelulares de T. cruzi.	58
Figura 32 – Gráfico da atividade anti-tripomastigota das substâncias DL01, DL04, DL07 e DL22.....	59
Figura 33 – Estrutura química do segundo grupo de derivados.	60
Figura 34 – Gráficos dos ensaios de citotoxicidade e contra a forma amastigota para o segundo grupo de substâncias sintetizadas. .	60
Figura 35 – Gráfico da atividade anti-tripomastigota para o segundo grupo de substâncias sintetizadas.	62
Figura 36 – Curvas de parasitemia realizadas em camundongos experimentalmente infectados por 5000 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y do T. cruzi e tratados com as substâncias DL01 (a) e DL07 (b) nas dosagens de 10, 50 e 100mg/kg.	63
Figura 37 – Variação de peso ao longo de 37 dias dos camundongos experimentalmente infectados por 5000 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y do T.cruzi e tratados com as substâncias DL01 (a) e DL07 (b) nas dosagens de 10, 50 e 100mg/kg.	64
Figura 38 – Percentual de sobrevivência ao longo de 37 dias dos camundongos experimentalmente infectados por 5000 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y do T. cruzi e tratados com as substâncias DL01 (a) e DL07 (b) nas dosagens de 10, 50 e 100mg/kg.	65
Figura 39 – Gráficos de área sob a curva dos ensaios in vivo das substâncias DL01 e DL07.....	65

Figura 40 – Estrutura química dos derivados selecionados para estudo de docking.....	66
Figura 41 – Imagem das estruturas ancoradas no sítio ativo da enzima tripanotiona redutase.....	68
Figura 42 – Grupos das substâncias avaliadas divididos de acordo com sua similaridade de interação com o sítio ativo da enzima tripanotiona redutase.....	68
Figura 43 – Interações das substâncias DL01, DL19, DL22 e DL0301 com os aminoácidos do sítio ativo da enzima tripanotiona redutase.....	69
Figura 44 - Interações das substâncias DL03, DL05 e DL07 com os aminoácidos do sítio ativo da enzima tripanotiona redutase.....	70
Figura 45 – Estrutura química da licarina A.....	75
Figura 46 – Gráfico do $-\log CI_{50}$ em epimastigotas em função do MLog P	77
Figura 47 – Pontos de modificação estrutural do derivado DL07	78
Figura 48 – Reação de Hidrólise do acetato de isoeugenol.....	81
Figura 49 – Reação de síntese da licarina A via água de coco.	82
Figura 50 – Reação de oxidação do carbono alílico da licarina A.....	83
Figura 51 – Reação de redução da licarina A.	85
Figura 52 – Reação de eterificação da licarina A.	86
Figura 53 – Reação de epoxidação da licarina A.	98
Figura 54 – Reação de abertura do epóxido da licarina A.	99
Figura 55 - Reação de oxidação com óxido de prata.	102
Figura 56 - Reação de redução com boridreto de sódio.....	104
Figura 57 – Espectro de absorção na região do IV do derivado DL01	118
Figura 58 – Espectro de RMN de 1H do derivado DL01 ($CDCl_3$, 300 MHz)....	119
Figura 59 – Espectro de RMN de ^{13}C do derivado DL01 ($CDCl_3$, 75 MHz). ...	120
Figura 60 – Subespectro DEPT-135 do derivado DL01 ($CDCl_3$, 75 MHz).	121
Figura 61 – Espectro de massas do derivado DL01	122
Figura 62 – Espectro de absorção na região do IV do derivado DL02	123
Figura 63 – Espectro de RMN de 1H do derivado DL02 ($CDCl_3$, 300 MHz)....	124
Figura 64 – Espectro de RMN de ^{13}C do derivado DL02 ($CDCl_3$, 75 MHz). ...	125
Figura 65 – Subespectro DEPT-135 do derivado DL02 ($CDCl_3$, 75 MHz).	126
Figura 66 – Espectro de massas do derivado DL02	127

Figura 67 – Espectro de absorção na região do IV do derivado DL0102	128
Figura 68 – Espectro de RMN de ^1H do derivado DL0102 (CDCl_3 , 300 MHz).129	
Figura 69 – Espectro de RMN de ^{13}C do derivado DL0102 (CDCl_3 , 75 MHz) 130	
Figura 70 – Subespectro DEPT-135 do derivado DL0102 (CDCl_3 , 75 MHz). . 131	
Figura 71 – Espectro de absorção na região do IV do derivado DL0302	132
Figura 72 – Espectro de RMN de ^1H do derivado DL0302 (CDCl_3 , 300 MHz).133	
Figura 73 – Espectro de RMN de ^{13}C do derivado DL0302 (CDCl_3 , 75 MHz). 134	
Figura 74 – Subespectro DEPT-135 do derivado DL0302 (CDCl_3 , 75 MHz). . 135	
Figura 75 – Espectro de absorção na região do IV do derivado DL03	136
Figura 76 – Espectro de RMN de ^1H do derivado DL03 (CDCl_3 , 300 MHz).... 137	
Figura 77 – Espectro de RMN de ^{13}C do derivado DL03 (CDCl_3 , 75 MHz). ... 138	
Figura 78 – Subespectro DEPT-135 do derivado DL03 (CDCl_3 , 75 MHz).	139
Figura 79 – Espectro de massas do derivado DL03	140
Figura 80 – Espectro de absorção na região do IV do derivado DL04	141
Figura 81 – Espectro de RMN de ^1H do derivado DL04 (CDCl_3 , 300 MHz).... 142	
Figura 82 – Espectro de RMN de ^{13}C do derivado DL04 (CDCl_3 , 75 MHz). ... 143	
Figura 83 – Subespectro DEPT-135 do derivado DL04 (CDCl_3 , 75 MHz).	144
Figura 84 – Espectro de massas do derivado DL04	145
Figura 85 – Espectro de absorção na região do IV do derivado DL05	146
Figura 86 – Espectro de RMN de ^1H do derivado DL05 (CDCl_3 , 300 MHz).... 147	
Figura 87 – Espectro de RMN de ^{13}C do derivado DL05 (CDCl_3 , 75 MHz). ... 148	
Figura 88 – Subespectro DEPT-135 do derivado DL05 (CDCl_3 , 75 MHz).	149
Figura 89 – Espectro de massas do derivado DL05	150
Figura 90 – Espectro de absorção na região do IV do derivado DL06	151
Figura 91 – Espectro de RMN de ^1H do derivado DL06 (CDCl_3 , 300 MHz).... 152	
Figura 92 – Espectro de RMN de ^{13}C do derivado DL06 (CDCl_3 , 75 MHz). ... 153	
Figura 93 – Subespectro DEPT-135 do derivado DL06 (CDCl_3 , 75 MHz).	154
Figura 94 – Espectro de massas do derivado DL06	155
Figura 95 – Espectro de absorção na região do IV do derivado DL08	156
Figura 96 – Espectro de RMN de ^1H do derivado DL08 (CDCl_3 , 300 MHz).... 157	
Figura 97 – Espectro de RMN de ^{13}C do derivado DL08 (CDCl_3 , 75 MHz). ... 158	
Figura 98 – Subespectro DEPT-135 do derivado DL08 (CDCl_3 , 75 MHz).	159
Figura 99 – Espectro de massas do derivado DL08	160

Figura 100 – Espectro de absorção na região do IV do derivado DL10	161
Figura 101 – Espectro de RMN de ^1H do derivado DL10 (CDCl_3 , 300 MHz)..	162
Figura 102 – Espectro de RMN de ^{13}C do derivado DL10 (CDCl_3 , 75 MHz). .	163
Figura 103 – Subespectro DEPT-135 do derivado DL10 (CDCl_3 , 75 MHz)...	164
Figura 104 – Espectro de massas do derivado DL10	165
Figura 105 – Espectro de absorção na região do IV do derivado DL11	166
Figura 106 – Espectro de RMN de ^1H do derivado DL11 (CDCl_3 , 300 MHz)..	167
Figura 107 – Espectro de RMN de ^{13}C do derivado DL11 (CDCl_3 , 75 MHz). .	168
Figura 108 – Subespectro DEPT-135 do derivado DL11 (CDCl_3 , 75 MHz)...	169
Figura 109 – Espectro de massas do derivado DL11	170
Figura 110 – Espectro de absorção na região do IV do derivado DL12	171
Figura 111 – Espectro de RMN de ^1H da substância derivado DL12 (CDCl_3 , 300 MHz).	172
Figura 112 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância derivado DL12 (CDCl_3 , 75 MHz).	173
Figura 113 – Subespectro DEPT-135 da substância derivado DL12 (CDCl_3 , 75 MHz).	174
Figura 114 – Espectro de massas do derivado DL12	175
Figura 115 – Espectro de absorção na região do IV do derivado DL13	176
Figura 116 – Espectro de RMN de ^1H do derivado DL13 (CDCl_3 , 300 MHz)..	177
Figura 117 – Espectro de RMN de ^{13}C do derivado DL13 (CDCl_3 , 75 MHz). .	178
Figura 118 – Subespectro DEPT-135 do derivado DL13 (CDCl_3 , 75 MHz)...	179
Figura 119 – Espectro de massas do derivado DL13	180
Figura 120 – Espectro de absorção na região do IV do derivado DL14	181
Figura 121 – Espectro de RMN de ^1H da substância derivado DL14 (CDCl_3 , 300 MHz).	182
Figura 122 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância derivado DL14 (CDCl_3 , 75 MHz).	183
Figura 123 – Subespectro DEPT-135 da substância derivado DL14 (CDCl_3 , 75 MHz).	184
Figura 124 – Espectro de massas do derivado DL14	185
Figura 125 – Espectro de absorção na região do IV do derivado DL15	186
Figura 126 – Espectro de RMN de ^1H do derivado DL15 (CDCl_3 , 300 MHz)..	187

Figura 127 – Espectro de RMN de ^{13}C do derivado DL15 (CDCl_3 , 75 MHz). .	188
Figura 128 – Subespectro DEPT-135 do derivado DL15 (CDCl_3 , 75 MHz). ...	189
Figura 129 – Espectro de massas do derivado DL15	190
Figura 130 – Espectro de absorção na região do IV do derivado DL16	191
Figura 131 – Espectro de RMN de ^1H do derivado DL16 (CDCl_3 , 300 MHz)..	192
Figura 132 – Espectro de RMN de ^{13}C do derivado DL16 (CDCl_3 , 75 MHz). .	193
Figura 133 – Subespectro DEPT-135 do derivado DL16 (CDCl_3 , 75 MHz). ...	194
Figura 134 – Espectro de massas do derivado DL16	195
Figura 135 – Espectro de absorção na região do IV do derivado DL17	196
Figura 136 – Espectro de RMN de ^1H do derivado DL17 (CDCl_3 , 300 MHz)..	197
Figura 137 – Espectro de RMN de ^{13}C do derivado DL17 (CDCl_3 , 75 MHz). .	198
Figura 138 – Subespectro DEPT-135 do derivado DL17 (CDCl_3 , 75 MHz). ...	199
Figura 139 – Espectro de massas do derivado DL17	200
Figura 140 – Espectro de absorção na região do IV do derivado DL19	201
Figura 141 – Espectro de RMN de ^1H do derivado DL19 (CDCl_3 , 300 MHz)..	202
Figura 142 – Espectro de RMN de ^{13}C do derivado DL19 (CDCl_3 , 75 MHz). .	203
Figura 143 – Subespectro DEPT-135 do derivado DL19 (CDCl_3 , 75 MHz). ...	204
Figura 144 – Espectro de massas do derivado DL19	205
Figura 145 – Espectro de absorção na região do IV do derivado DL21	206
Figura 146 – Espectro de RMN de ^1H do derivado DL21 (CDCl_3 , 300 MHz)..	207
Figura 147 – Espectro de RMN de ^{13}C do derivado DL21 (CDCl_3 , 75 MHz). .	208
Figura 148 – Subespectro DEPT-135 do derivado DL21 (CDCl_3 , 75 MHz). ...	209
Figura 149 – Espectro de massas do derivado DL21	210
Figura 150 – Espectro de absorção na região do IV do derivado DL07	211
Figura 151 – Espectro de RMN de ^1H do derivado DL07 (CDCl_3 , 300 MHz)..	212
Figura 152 – Espectro de RMN de ^{13}C do derivado DL07 (CDCl_3 , 75 MHz). .	213
Figura 153 – Subespectro DEPT-135 do derivado DL07 (CDCl_3 , 75 MHz). ...	214
Figura 154 – Espectro de massas do derivado DL07	215
Figura 155 – Espectro de absorção na região do IV do derivado DL0101	216
Figura 156 – Espectro de RMN de ^1H do derivado DL0101 (CDCl_3 , 300 MHz).	217
Figura 157 – Espectro de RMN de ^{13}C do derivado DL0101 (CDCl_3 , 75 MHz).	218

Figura 158 – Subespectro DEPT-135 do derivado DL0101 (CDCl ₃ , 75 MHz).	219
Figura 159 – Espectro de absorção na região do IV do derivado DL0301	220
Figura 160 – Espectro de RMN de ¹ H do derivado DL0301 (CDCl ₃ , 300 MHz).	221
Figura 161 – Espectro de RMN de ¹³ C do derivado DL0301 (CDCl ₃ , 75 MHz).	222
Figura 162 – Subespectro DEPT-135 do derivado DL0301 (CDCl ₃ , 75 MHz).	223
Figura 163 – Espectro de absorção na região do IV do derivado DL22	224
Figura 164 – Espectro de RMN de ¹ H do derivado DL22 (CDCl ₃ , 300 MHz)..	225
Figura 165 – Espectro de RMN de ¹³ C do derivado DL22 (CDCl ₃ , 75 MHz). .	226
Figura 166 – Subespectro DEPT-135 do derivado DL22 (CDCl ₃ , 75 MHz). ...	227
Figura 167 – Espectro de massas do derivado DL22	228
Figura 168 – Espectro de absorção na região do IV do derivado DL0103	229
Figura 169 – Espectro de RMN de ¹ H do derivado DL0103 (CDCl ₃ , 300 MHz).	230
Figura 170 – Espectro de RMN de ¹³ C do derivado DL0103 (CDCl ₃ , 75 MHz).	231
Figura 171 – Subespectro DEPT-135 do derivado DL0103 (CDCl ₃ , 75 MHz).	232
Figura 172 – Espectro de absorção na região do IV do derivado DL0303	233
Figura 173 – Espectro de RMN de ¹ H do derivado DL0303 (CDCl ₃ , 300 MHz).	234
Figura 174 – Espectro de RMN de ¹³ C do derivado DL0303 (CDCl ₃ , 75 MHz).	235
Figura 175 – Subespectro DEPT-135 do derivado DL0303 (CDCl ₃ , 75 MHz).	236
Figura 176 – Espectro de absorção na região do IV do derivado DL23	237
Figura 177 – Espectro de RMN de ¹ H do derivado DL23 (CDCl ₃ , 300 MHz)..	238
Figura 178 – Espectro de RMN de ¹³ C do derivado DL23 (CDCl ₃ , 75 MHz). .	239
Figura 179 – Subespectro DEPT-135 do derivado DL23 (CDCl ₃ , 75 MHz).	240
Figura 180 – Espectro de massas do derivado DL23	241

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de CI_{50} contra epimastigotas de <i>T. cruzi</i> e CC_{50} para células Vero [®] , em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ($\mu\text{mol.L}^{-1}$).....	56
Tabela 2 – Atividade anti-tripomastigota de <i>T. cruzi</i>	59
Tabela 3 – Energia de ligação entre as substâncias e a enzima tripanotona redutase em kcal.mol^{-1}	67
Tabela 4 – Propriedades estruturais e físico-químicas previstas para os derivados sintetizados.....	71
Tabela 5 – Propriedades farmacocinéticas previstas para os derivados sintetizados.....	73
Tabela 6 – Propriedades metabólicas previstas para os derivados sintetizados.....	74

LISTA DE ABREVIações, SIGLAS E SÍMBOLOS

ATR	- Refletância total atenuada (<i>Attenuated Total Reflectance</i>)
CCD	- Cromatografia em camada delgada
CCS	- Cromatografia em coluna de sílica
CI₅₀	- Concentração capaz de inibir 50% da atividade enzimática
cLogP	- Logaritmo do coeficiente de partição calculado
d	- Duplete
dd	- Duplete duplo
DEPT	- Intensificação sem distorção via transferência de polarização (<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>)
DMSO-d₆	- Dimetilsulfóxido deuterado
EM	- Espectrometria de Massas
eq.	- Equivalente
F.F.	- Faixa de fusão
F.M.	- Fórmula molecular
Hz	- Hertz
IV	- Infravermelho
J	- Constante de acoplamento escalar
m	- Multiplete
mmol	- milimol
MHz	- MegaHertz
M.M.	- Massa molar
p.	- página
ppm	- Partes por milhão
RMN	- Ressonância Magnética Nuclear
s	- Simpleto
sl	- Simpleto largo
S_N1	- Substituição nucleofílica unimolecular
S_N2	- Substituição nucleofílica bimolecular
t	- Triplete
t.a.	- Temperatura ambiente
TMS	- Tetrametilsilano
v/v	- Volume por volume
δ	- Deslocamento químico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	23
2.1	DOENÇA DE CHAGAS.....	23
2.1.1	Farmacoterapia.....	25
2.1.2	Estratégias no desenvolvimento de novos fármacos tripanocidas.....	27
2.2	NEOLIGNANAS: BENZOFURANOS E DI-HIDROBENZOFURANOS...	30
3	OBJETIVOS.....	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1	SÍNTESE DOS DERIVADOS PROPOSTOS.....	41
4.1.1	Obtenção do isoeugenol.....	43
4.1.2	Síntese da licarina A.....	44
4.1.4	Oxidação do carbono alílico da licarina A e da metil-licarina A.....	47
4.1.5	Redução do alceno da licarina a e do seu aldeído por hidrogenação catalítica.....	48
4.1.6	Obtenção dos éteres.....	49
4.1.7	Obtenção do derivado DL07, DL0101 e DL0301.....	51
4.1.8	Obtenção do derivado DL22, DL0103 e DL0303.....	52
4.1.9	Obtenção do derivado DL23.....	53
4.2	AVALIAÇÃO BIOLÓGICA.....	54
4.3	ESTUDOS COMPUTACIONAIS.....	66
4.3.1	Estudos de ancoragem molecular.....	66
4.3.2	Previsão das propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e metabólicas.....	70
4.3.3	Relação estrutura-atividade dos derivados sintetizados.....	75
5	CONCLUSÕES.....	79
6	PARTE EXPERIMENTAL.....	80
6.1	MÉTODOS DE SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL.....	80
6.1.1	Hidrólise do acetato de isoeugenol.....	81
6.1.2	Síntese da licarina A via peroxidase presente em água de coco (Rodrigues <i>et al.</i> , 2017).....	82

6.1.3	Reação de oxidação do carbono alílico da licarina A (Iliefski; Li; Lundquist, 1998).....	83
6.1.4	Reações de redução de alceno da licarina A por hidrogenação catalítica (Davies <i>et al.</i> , 2010).....	85
6.1.5	Reações de formação dos éteres da licarina A (adaptado de Coolen <i>et al.</i> , 1995).....	86
6.1.6	Reação de epoxidação da licarina A (Luo, Qato e Guenther, 1992).....	98
6.1.7	Reação de abertura do epóxido da licarina A (Tyman; Payne, 2006).....	99
6.1.8	Reação de oxidação dos derivados aldeídicos (adaptado de Pearl, 1950).....	102
6.1.9	Reação de redução dos derivados aldeídicos (adaptado de Mochalov <i>et al.</i> , 2016; Ward; Rhee, 1989).....	104
6.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA.....	106
6.2.1	Avaliação da atividade <i>in vitro</i> sobre formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	106
6.2.2	Avaliação da atividade <i>in vitro</i> sobre formas amastigotas intracelulares de <i>T. cruzi</i>	107
6.2.3	Avaliação da atividade <i>in vitro</i> sobre formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	108
6.2.4	Avaliação de citotoxicidade.....	108
6.2.5	Avaliação da atividade tripanocida <i>in vivo</i>	109
6.2.5.1	Avaliação da parasitemia.....	110
6.2.6	Análise estatística.....	110
6.3	ESTUDOS COMPUTACIONAIS.....	111
6.3.1	Estudos de ancoragem molecular.....	111
6.3.2	Estudos de previsão das propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e metabólicas.....	111
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	112
	APÊNDICE A.....	118
	APÊNDICE B.....	242
	APÊNDICE C.....	257

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas ou Tripanossomíase americana é uma doença infecciosa que afeta principalmente a América Latina. É causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* que vive e se reproduz em diversas células e tecidos de hospedeiros mamíferos. O tratamento etiológico disponível, realizado com os fármacos benznidazol ou nifurtimox, é eficaz no tratamento da fase aguda da infecção, mas insuficiente para induzir cura em cerca de 80% dos pacientes na fase crônica. Adicionalmente, induzem muitos efeitos tóxicos (Kratz *et al.*, 2018). Por ser causa de problemas clínicos, principalmente alterações cardíacas debilitantes, que geram um reflexo negativo na economia dos países endêmicos, a doença de Chagas, que faz parte da lista de doenças negligenciadas mundialmente, foi selecionada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para o desenvolvimento de medicamentos e tratamentos novos e mais efetivos (ALVIM JUNIOR *et al.*, 2005; WHO, 2020).

A otimização de substâncias naturais que já possuem atividades biológicas conhecidas é uma estratégia eficaz de abordagem em Química Medicinal, pois fornece um caminho cientificamente embasado para o planejamento racional de novas substâncias bioativas. As neolignananas são uma classe de produtos naturais encontrada em diversas espécies vegetais, formadas a partir do acoplamento de subunidades de fenilpropanoides. Estudos demonstram que estas substâncias apresentam múltiplas atividades biológicas como antimicrobianas, anti-inflamatórias, entre outras. Um de seus representantes é a licarina A, um composto di-hidrobenzofurânico que, dentre várias atividades relatadas, possui ação tripanocida descrita por diferentes estudos (PEREIRA *et al.*, 2011; SOUZA; NAKAMURA; CORRÊA, 2012).

Neste trabalho foram propostas a síntese e a avaliação do potencial tripanocida de derivados da licarina A, a maioria deles inédita, desenvolvidas a partir de estudos de modificação molecular. Além disso, foram desenvolvidos estudos computacionais de previsão farmacocinética e ancoragem molecular com as substâncias mais promissoras.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas foi assim denominada após o médico e pesquisador Carlos Chagas descobrir o parasito *T. cruzi* em infecções humanas no ano de 1909. Foi descoberto que os parasitos eram transmitidos ao homem através da pele, após o vetor depositar suas fezes contaminadas no local. Carlos Chagas foi o primeiro cientista a descobrir todos os aspectos de uma nova doença infecciosa: o protozoário *T. cruzi*, o inseto vetor (triatomíneo, popularmente conhecido como barbeiro), os hospedeiros (humanos e outros mamíferos) e ainda, as manifestações clínicas e a epidemiologia (DAVIS; STÖPPLER, 2015).

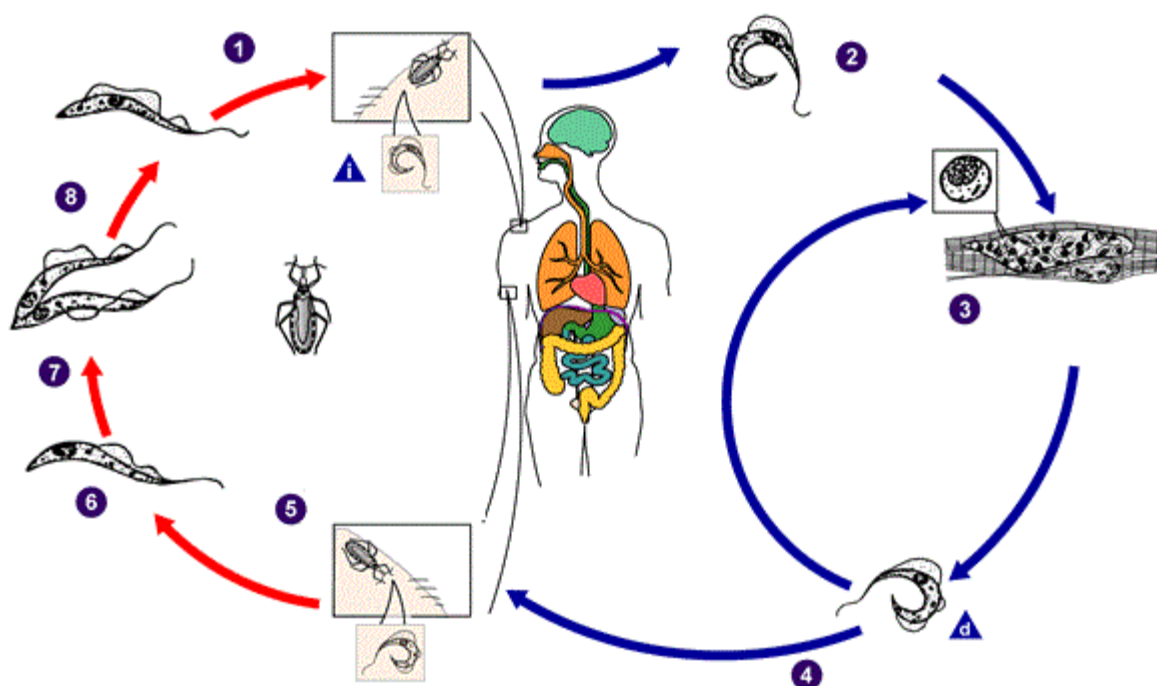
Classificada como uma antropozoonose, a doença de Chagas possui uma fase aguda, que muitas vezes não é identificada e geralmente evolui para fase crônica, a qual pode se apresentar de quatro formas: indeterminada (assintomática), cardíaca, digestiva ou cardiodigestiva. A gravidade da doença se relaciona com a cepa infectante, com o tipo de transmissão e pela existência de outras comorbidades associadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Os sinais e sintomas da doença são bastante variáveis, podendo ir da sua ausência a manifestações graves. Na fase aguda o surgimento de chagomas de inoculação (inchaço e vermelhidão no local da infecção), erupções cutâneas, febre, dor de cabeça e no corpo, náuseas, vômito e diarreia são alguns dos sintomas e sinais que podem estar presentes. Cerca de 8 semanas depois, tem início a fase crônica, a qual frequentemente é assintomática, por isso chamada indeterminada, na qual o indivíduo pode passar grande parte de sua vida sem saber que está infectado. Anos mais tarde, cerca de 40% dos pacientes evoluem para formas clínicas sintomáticas, relacionadas ao órgão mais atingido; na forma cardíaca pode haver alterações de ritmo, desenvolvimento de insuficiência cardíaca e fenômenos tromboembólicos. Já na doença digestiva, esôfago e intestino são as regiões mais afetadas. Tais sintomas são um reflexo da presença persistente do parasito nos tecidos desses órgãos, levando a uma inflamação crônica, que irá causar danos à musculatura e aos neurônios do local e alteração na condução elétrica, ocasionando arritmia e

insuficiência cardíaca, quando no coração, e no tônus muscular, se no trato digestório, intestinos (DAVIS; STÖPPLER, 2015).

T. cruzi é um protozoário flagelado, pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Trypanosoma*. O parasita possui um complexo ciclo biológico, o qual envolve um hospedeiro invertebrado e outro vertebrado, e apresenta três formas distintas: a epimastigota, que é a forma presente no vetor; a tripomastigota; chamada sanguínea quando presente no hospedeiro vertebrado nos quais é a forma sanguínea circulante e infectante, e metacíclica, quando presente no vetor; e a amastigota, que é a forma de replicação intracelular (CDC, 2016; UFRGS, 2010). O ciclo biológico do parasito está apresentado na figura 1.

Figura 1 - Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: Adaptado de CDC (2016).

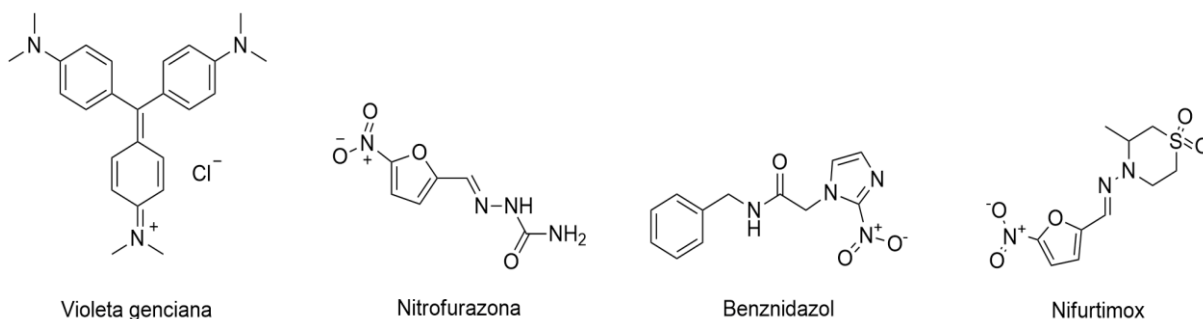
Notas: (1) Infecção do homem durante a hematofagia pelo inseto triatomíneo vetor, que elimina a forma tripomastigota metacíclica (i: forma infectante) em suas fezes, próximo ao local da picada; (2) Tripomastigotas metacíclicas penetram por diversas células, onde irão se transformar em formas amastigotas; (3) Amastigotas se multiplicam por divisão binária, em ciclos de 12 horas; (4) Diferenciação à forma tripomastigota (d: forma de diagnóstico), rompimento da célula infectada e liberação da forma tripomastigota na corrente sanguínea para infecção de novas células; (5) Hospedeiro infectado é picado pelo barbeiro, com consequente infecção do triatomíneo pela ingestão da forma tripomastigota; (6) Transformação à formas epimastigotas no intestino do barbeiro; (7) Multiplicação da forma epimastigota; (8) Formas tripomastigotas metacíclicas formadas na porção terminal do intestino do barbeiro.

Cerca de sete milhões de pessoas no mundo estão infectadas por *T. cruzi*, sendo a maior concentração na América Latina, onde a doença de Chagas é endêmica. Os vetores da doença nos países latinos são os triatomíneos, sendo que a transmissão ocorre também de forma oral, pela presença do protozoário em alimentos crus comuns nessas regiões. Fatores como a migração, transfusão de sangue e transplante de órgãos vem fazendo com que aumente o número de pessoas infectadas em países não endêmicos (WHO, 2020).

2.1.1 Farmacoterapia

Os primeiros estudos relacionados à quimioterapia antichagásica foram realizados entre os anos de 1936 e 1960. Nessa época diversas substâncias foram descobertas e algumas delas mostraram efeito supressivo sobre a infecção por *T. cruzi*, sendo a violeta de genciana a de maior destaque e que ainda hoje é usada como agente profilático em bancos de sangue. A partir de 1960, houve relatos de que a nitrofurazona, em tratamentos prolongados, induzia grande porcentagem de cura em animais, porém em humanos essa taxa caía para 50%. No início da década de 1970 houve o surgimento de dois compostos, o nifurtimox e o benznidazol, que apresentaram grande eficácia na fase aguda da doença e mostraram-se como avanços na terapia contra *T. cruzi* (BAHIA *et al.*, 2014).

Figura 2 - Estruturas químicas de substâncias tripanocidas.



Fonte: Da autora.

Atualmente, estes são os únicos fármacos disponíveis no mercado que possuem eficácia contra esse parasito. O benznidazol, que é um derivado do nitroimidazol, é considerado fármaco de primeira linha de tratamento por possuir menos efeitos

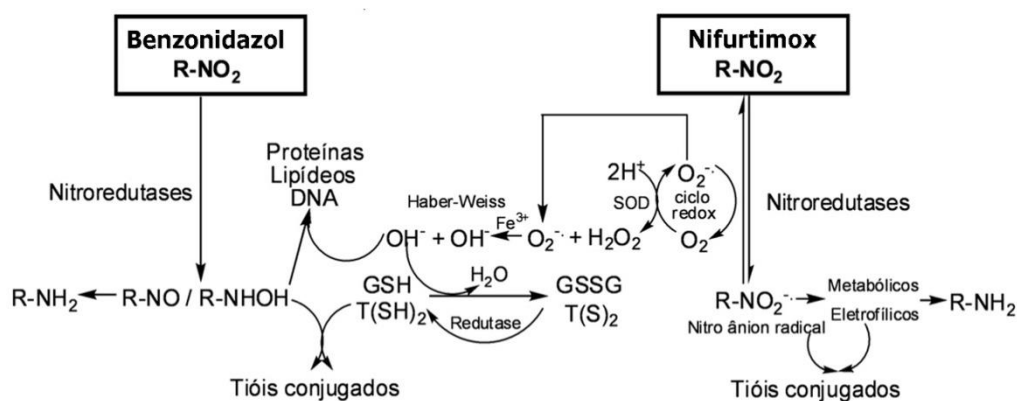
secundários e ter maiores evidências quanto à eficácia em determinadas regiões. Já o nifurtimox é um nitrofurano que apresenta uma série de efeitos secundários frequentes e importantes, como efeitos gastrointestinais e neurotóxicos (BERN, 2015).

Estudos clínicos demonstraram que estes fármacos são mais efetivos em crianças e nas fases iniciais da doença, como na doença congênita, fase aguda e fase crônica recente. Já na fase crônica, a mais prevalente, os índices de cura são muito mais baixos que na fase aguda da doença, visto que durante a fase crônica estes fármacos não conseguem levar a cura do indivíduo, uma vez que o parasita se encontra predominantemente no interior das células. Além disso, a sensibilidade aos fármacos varia com a região geográfica, provavelmente devido à heterogeneidade genética do parasito e dos hospedeiros. A atividade dessas substâncias varia de 50 a 70% na fase aguda, e cerca de 20% na fase crônica (BERMUDEZ *et al.*, 2016; BERN, 2015; URBINA, 2015).

O mecanismo de ação desses fármacos ainda não se encontra completamente elucidado, mas existem evidências que indicam que ambos atuam de forma semelhante por meio da formação de radicais livres e/ou metabólitos eletrofílicos. Além disso, Bern (2015) relata que o nifurtimox ainda pode atuar inibindo a síntese de ácido pirúvico, o que irá prejudicar o metabolismo de carboidratos pelo parasita.

De forma geral, o grupo nitro (NO_2) presente nestas moléculas é reduzido ao grupo amino (NH_2) pela ação de nitrorredutases (FIGURA 3). Este processo, iniciado pela catálise via NADPH citocromo P450 redutase, leva à formação de um intermediário nitro radicalar com subsequente formação de hidroxilamina (R-NHOH). No caso do benznidazol, esse radical reduzirá o oxigênio molecular formando o íon superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e regenerando o grupo NO_2 num processo conhecido como ciclo redox. O íon superóxido formado é captado pela enzima superóxido dismutase gerando peróxido de hidrogênio, o qual formará um radical hidroxila, que está ligada aos efeitos tripanocidas que ocorrerão por diversos mecanismos complexos. Já o nifurtimox atua pela ligação com macromoléculas essenciais ao parasita de forma covalente. Os metabólitos formados através dos mecanismos de ação podem atuar em outros sistemas, como os do hospedeiro, visto que são altamente reativos. Esta baixa seletividade leva aos diversos efeitos citotóxicos observados durante a terapia medicamentosa (BERMUDEZ *et al.*, 2016).

Figura 3 - Mecanismo de ação do benznidazol e nifurtimox contra *T. cruzi*.



Fonte: DIAS *et al.* (2009).

O tratamento com nifurtimox e benznidazol requer um tempo prolongado, cerca de 60 dias, o que aumenta a frequência de efeitos indesejáveis associados ao uso e pode levar a descontinuação do tratamento (Kratz *et al.*, 2018). Além disso, ambos os fármacos são genotóxicos, o que impossibilita o uso em gestantes. Outro fator que impacta negativamente na terapia farmacológica é a baixa solubilidade dessas substâncias, que afeta diretamente na biodisponibilidade, diminuindo o efeito especialmente durante a fase crônica, na qual o acesso dos fármacos ao parasito parece dificultado (WHO, 2020; BERMUDEZ *et al.*, 2016).

2.1.2 Estratégias no desenvolvimento de novos fármacos tripanocidas

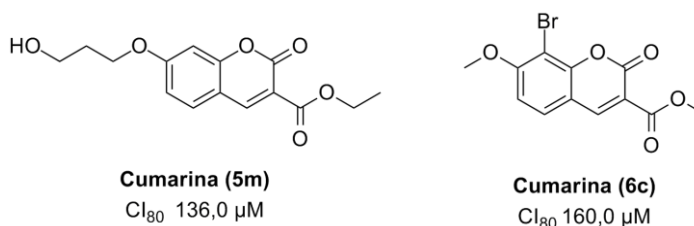
As pesquisas por novos fármacos anti- *T. cruzi* vêm evoluindo nas últimas décadas, destacando-se os progressos obtidos com o sequenciamento dos genomas do *T. cruzi* e *T. brucei*, que possibilitou a identificação de vários genes existentes apenas no parasito. Além disso, diferentes substâncias estão sendo exploradas em programas de Química Medicinal, através do planejamento racional direto de candidatos a fármacos, os quais são baseados na estrutura do receptor (SBDD - *structure-based drug design*), e também no planejamento dito indireto, se baseando na estrutura do ligante (LBDD - *ligand-based drug design*). Uma maneira eficiente de se alcançar um bom resultado na busca de uma substância bioativa é partindo de uma via metabólica específica do parasito, sendo assim tais estudos possibilitaram a identificação de vários alvos biológicos, sendo a maior parte constituída por enzimas, além dos avanços significativos obtidos nos aspectos biológicos, genéticos e

evolucionários do parasita, que auxiliam nesse objetivo (DIAS *et al.*, 2009; SANTOS; PAIXÃO; PITA, 2019).

Muitas enzimas podem ser utilizadas como potenciais pontos de intervenção no combate da infecção por *T. cruzi*, o que aumenta as chances de descobrirem-se substâncias tripanocidas promissoras. Estas enzimas atuam em diferentes vias bioquímicas do parasita, como as enzimas da via glicolítica, aquelas da biossíntese de esteróis, lipídeos e nucleotídeos e também as proteases, entre outras (KEENAN; CHAPLIN, 2015).

A enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), pertencente à via glicolítica do protozoário, é um importante alvo biológico na busca de novos agentes tripanocidas. Como as formas amastigotas provavelmente dependem desta via para produção de ATP, sua inibição causaria um impacto significativo na reprodução e infectividade pelo *T. cruzi*. Estudos demonstraram que certos derivados cumarínicos (FIGURA 4), oriundos de produtos naturais, conseguem atuar sobre essa enzima, inibindo-a de forma significativa com valores de CI_{50} que variam de 80 à 130 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (ALVIM JUNIOR *et al.*, 2005).

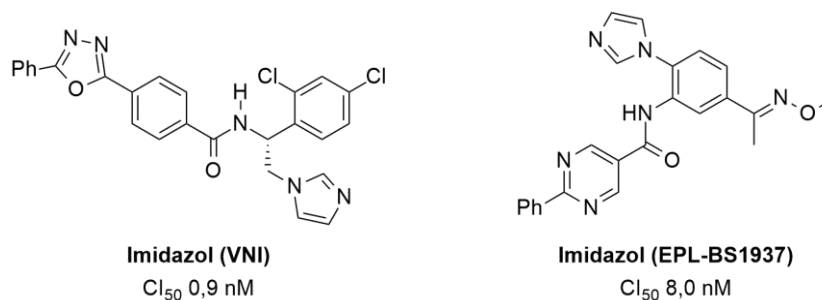
Figura 4 - Derivados cumarínicos que atuam sobre a GAPDH de *T. cruzi*.



Fonte: adaptado de ALVIM JUNIOR *et al.* (2005).

Outra enzima que vem sendo estudada como alvo biológico para inibição de *T. cruzi* é a CYP51 (esterol 14 α -desmetilase), a qual é uma enzima membro da família do citocromo P450, que atua catalisando a remoção oxidativa do grupo 14 α -metila de esteróis cíclicos precursores do ergosterol, importante para a manutenção da integridade da membrana celular do parasita. Devido à incapacidade de utilização do colesterol das células hospedeiras, a inibição dessa enzima culmina na morte do parasito (MORAES; FRANCO, 2016). Lepesheva e colaboradores (2010) avaliaram uma quimioteca frente a esse alvo e chegaram a dois derivados imidazólicos que atuam inibindo de maneira expressiva a CYP51 do *T. cruzi* (FIGURA 5).

Figura 5 - Derivados imidazólicos inibidores de CYP51 de *T. cruzi*.

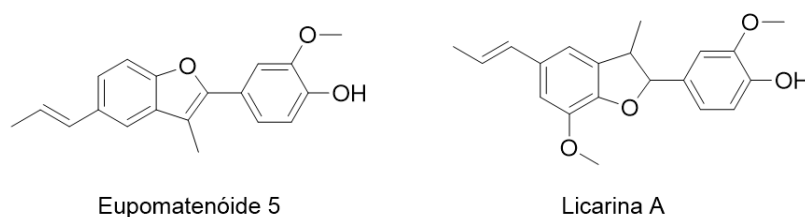


Fonte: adaptado de LEPESHEVA *et al.* (2010).

A tripanotiona redutase é uma enzima presente em tripanossomatídeos que se assemelha a glutationa redutase humana, e está envolvida na redução da tripanotiona dissulfeto em tripanotiona ditiol, sendo responsável por manter um ambiente redutor nesses parasitos, que é de extrema importância para sua sobrevivência. Essa enzima possui características marcantes no seu sítio ativo que podem ser exploradas no desenvolvimento de inibidores seletivos. Alguns produtos naturais já foram descritos como inibidores da tripanotiona redutase, sem atuar na glutationa redutase, como a aspidospermina e conessina, apresentadas na figura 7 (ARGÜELLES; CORDELL; MARUENDA, 2016).

Substâncias naturais conhecidas como eupomatenóides, especialmente o eupomatenóide 5, têm mecanismo de ação relacionado à inibição da atividade da tripanotiona redutase do parasito. Outras substâncias naturais, análogas do eupomatenóide, que têm sua ação antiparasitária resultante de processos relacionados a danos oxidativos são as licarinas, o que levanta a possibilidade de seu envolvimento com a tripanotiona-redutase. Na figura 6 estão apresentadas as estruturas do eupomatenóide 5 e da licarina A (SOUZA; NAKAMURA; CORRÊA, 2012).

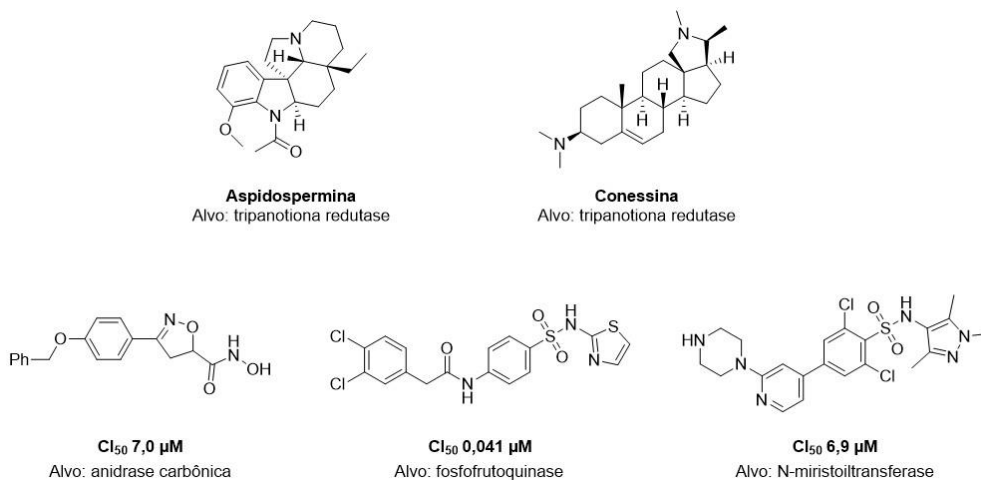
Figura 6 – Estrutura química do eupomatenóide 5 e da licarina A



Fonte: Da autora.

Outras enzimas também têm sido estudadas como alvos para o combate a infecções por *T. cruzi* e algumas substâncias foram apontadas como inibidores em potencial. Algumas delas e as enzimas em que atuam estão apresentadas na figura 7 (KEENAN; CHAPLIN, 2015).

Figura 7 - Produtos naturais inibidores da tripanotona redutase e demais substâncias capazes de inibir diferentes enzimas do *T. cruzi*.

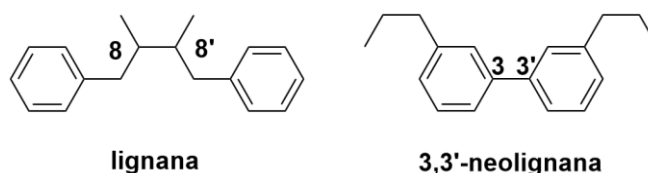


Fonte: adaptado de ARGÜELLES; CORDELL; MARUENDA, 2016;
KEENAN; CHAPLIN (2015).

2.2 NEOLIGNANAS: BENZOFURANOS E DI-HIDROBENZOFURANOS

As neolignanas e lignanas representam uma classe de produtos naturais com grande variedade estrutural e de atividades biológicas. São formadas pelo acoplamento de subunidades de fenilpropanoides, como o eugenol, isoeugenol, álcool coniferílico, dentre outros. A forma como estas subunidades conectam-se umas às outras determinam sua classificação. Quando conectadas pela posição 8 ou β são denominadas lignanas e pelas demais posições como neolignanas (SOUZA; NAKAMURA; CORRÊA, 2012).

Figura 8 - Estruturas de lignanas e neolignanas.



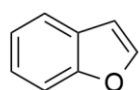
Fonte: Adaptado de SOUZA; NAKAMURA; CORRÊA (2012).

Devido a alguns de seus representantes apresentarem quiralidade, podem ser encontradas na natureza na forma enantiomericamente pura ou como uma mistura de vários isômeros óticos. Dessa forma, é possível encontrar duas formas enantioméricas da mesma lignana em diferentes espécies vegetais (PEREIRA *et al.*, 2011).

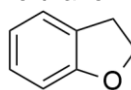
As lignanas e neolignanas são acumuladas em madeiras como resposta a ferimentos mecânicos ou a invasão de fungos ou bactérias, podendo ser encontradas em diversas espécies como, por exemplo, *Krameria cytisoides*, *Viola pavonis*, *Magnolia ovata*, *Forsythia intermedia*, *Myristica fragrans*, *Aristolochia taliscana* e *Milium fragrans* (ABE *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2013; SAWASDEE *et al.*, 2013; SINGH *et al.*, 2005; SOUZA; NAKAMURA; CORRÊA, 2012).

Existem mais de 500 representantes de lignanas e neolignanas relatadas, as quais fornecem pelo menos 40 diferentes esqueletos carbônicos. Estes podem ser denominados ariltetralinas, benzodioxanos, diarilciclobutanos, entre outros, destacando-se os esqueletos constituídos de benzofurano e di-hidrobenzofurano, apresentados na figura 9 (SIMÕES, 2010).

Figura 9 - Estruturas químicas do benzofurano e do di-hidrobenzofurano.



Benzofurano



Diidrobenzofurano

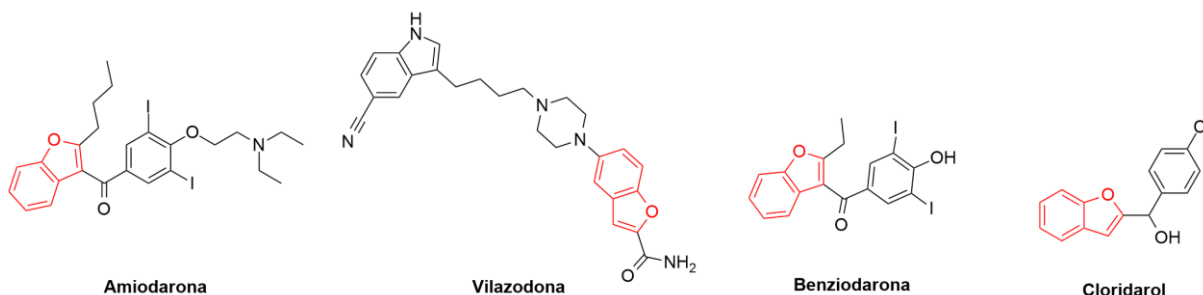
Fonte: Da autora.

Os benzofuranos são heterociclos caracterizados pela fusão dos anéis benzênico e furânico. Estão presentes em diversas substâncias de estruturas mais complexas, as quais apresentam amplas propriedades farmacológicas. A obtenção de benzofuranos pode provir de diferentes rotas sintéticas, principalmente utilizadas para obter benzofuranos substituídos que são usados como materiais de partida para diversas substâncias com atividade biológica (SHAMSUZZAMAN, 2015).

Substâncias derivadas do benzofurano possuem diferentes atividades descritas, atuando, por exemplo, como agentes antiarrítmicos (amiodarona), anti-

hipertensivos (benziodarona), agonista de receptores de serotonina (cloridarol) e como antidepressivos (vilazodona), entre outros (ASIF, 2016).

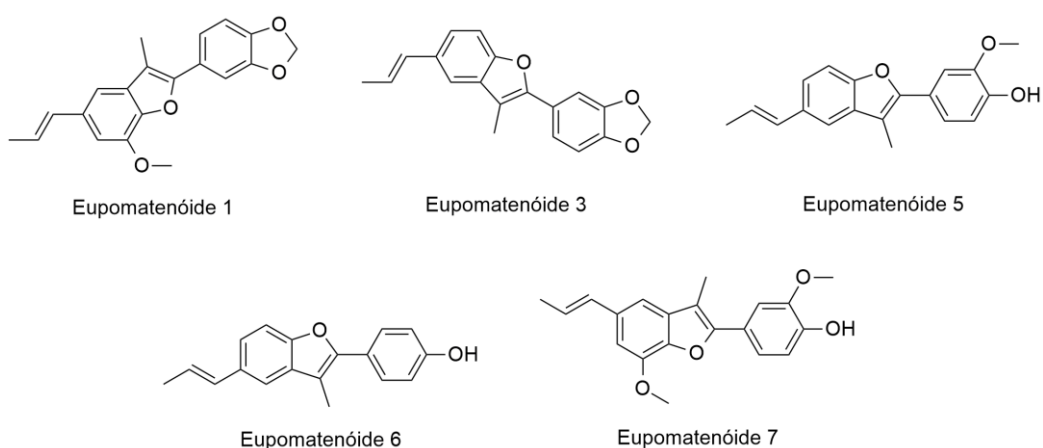
Figura 10 - Benzofuranos com atividade biológica.



Fonte: adaptado de ASIF (2016).

Os eupomatenóides são neolignan benzofurânicas e alguns deles já foram descritos como antichagásicos (ABE *et al.*, 2002), antioxidantes (ARELLANES; CORTÉS; GARCÍA; 2011), antifúngicos (PESSINI *et al.*, 2005) e antimicobacterianos (LEÓN-DÍAZ *et al.*, 2010). A ação tripanocida de eupomatenóides e de derivados foi estabelecida em diversos estudos (ABE *et al.*, 2002; LAZARIN-BIDÓIA *et al.*, 2013; SOUZA; NAKAMURA; CORRÊA, 2012).

Figura 11 - Estruturas químicas de diferentes eupomatenóides naturais.

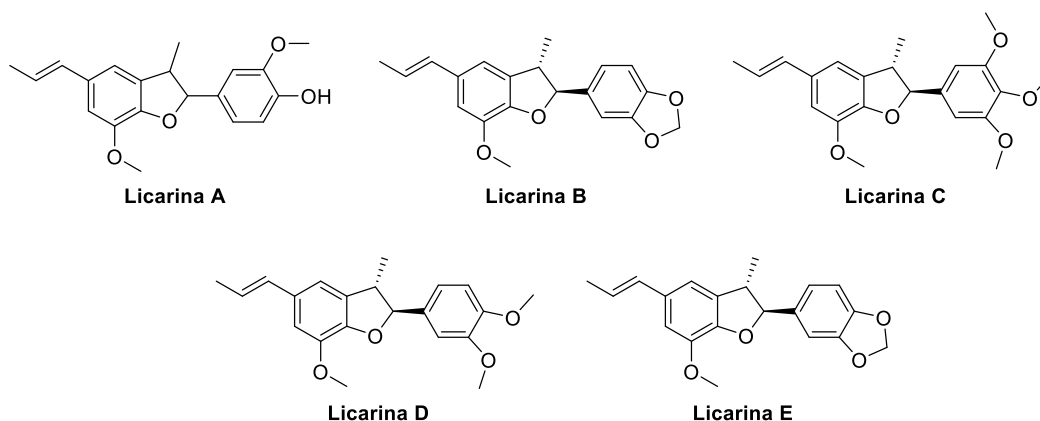


Fonte: Da autora.

Di-hidrobenzofuranos, análogos estruturais reduzidos de benzofuranos, possuem assimetria, geralmente pela presença de dois carbonos quirais (BERTOLINI; PINESCHI, 2009). As neolignanas bioativas conhecidas por licarinas, encontradas em muitas espécies vegetais, apresentam em sua estrutura um esqueleto di-

hidrobenzofurânico. Existem ao menos cinco tipos de licarinas, classificadas como A, B, C, D e E, as quais diferenciam-se pelo padrão de substituição no anel fenílico isolado, conforme apresentado na figura 12. As licarinas A e B são, até o momento, as mais exploradas em estudos científicos envolvendo a avaliação de suas atividades biológicas (LIU *et al.*, 2013; CHIU *et al.*, 2016).

Figura 12 - Estruturas químicas das licarinas A, B, C, D e E.

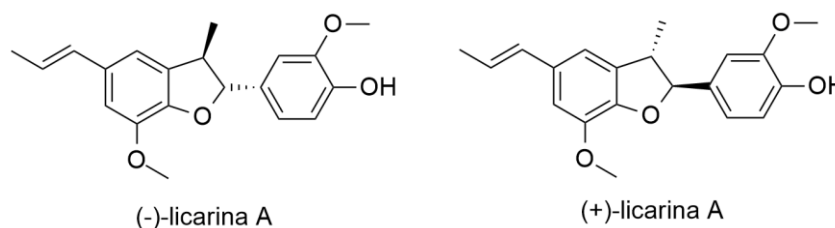


Fonte: Da autora.

Diversas atividades biológicas foram relatadas para a licarina A, como antimicobacteriana (LEÓN-DÍAZ *et al.*, 2010; ALVARENGA *et al.*, 2020), antibacteriana (SINGH *et al.*, 2005), anti-inflamatória (MURAKAMI *et al.*, 2005), antioxidante (ARELLANES; CORTÉS; GARCÍA; 2011), leishmanicida (SOUZA; NAKAMURA; CORRÊA, 2012), anti-herpética (SAWASDEE *et al.*, 2013), entre outras. Evidenciando-se a atividade tripanocida da licarina A, confirmada por diversos estudos (ABE *et al.*, 2002; AMETA *et al.*, 2012; SOUZA; NAKAMURA; CORRÊA, 2012).

Pereira e colaboradores (2011) observaram diferenças na atividade tripanocida da licarina A como uma função de sua estereoquímica. Estes autores destacam que a licarina A na forma racêmica apresenta atividade anti-*T. cruzi* reduzida quando comparada aos enantiômeros isolados. Especificamente, observou-se que a (-)-licarina A apresentou maior potência (CI_{50} 23,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) que a (+)-licarina A (CI_{50} 87,7 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), indicando que a configuração absoluta neste caso interfere claramente na sua capacidade de interação com o alvo molecular de ação (FIGURA 13).

Figura 13 - Estruturas químicas dos enantiômeros da licarina A.



Fonte: Da autora.

Além da avaliação da licarina A inalterada, alguns estudos propuseram a realização de modificações em sua estrutura a fim de avaliar o impacto dessas regiões na atividade observada. De acordo com Tishler (1964), estratégias de modificação molecular já se encontram presentes na natureza desde o surgimento da vida. Em um curto período após o reconhecimento da química como ciência, os químicos têm aprendido com a natureza que pequenas modificações na estrutura das substâncias podem levar a grandes alterações na atividade biológica delas.

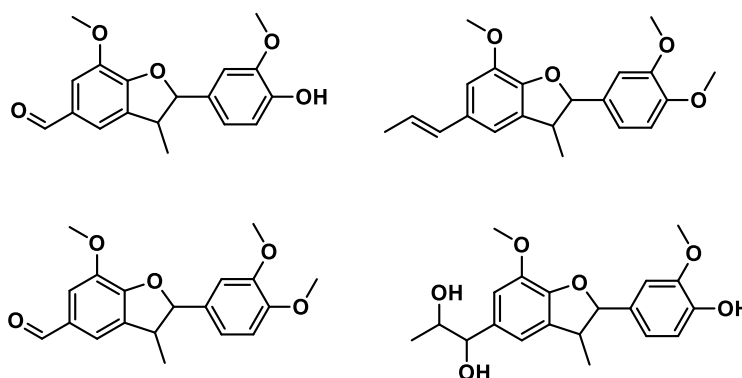
A adição, troca ou remoção de pequenos grupos pode influenciar as características lipofílicas, eletrônicas e estéricas da substância, levando a uma melhoria de suas propriedades físico-químicas e perfil biológico. Existem diversas técnicas de modificação molecular como o bioisosterismo, simplificação molecular, variação dos substituintes, dentre outros, que são empregadas para obter substâncias de diferentes perfis terapêuticos (GOMES *et al.*, 2017).

A obtenção de substâncias análogas ao composto original por variação de substituintes é um método muito comum e acessível, que poderá levar ao refinamento da interação da substância ao alvo biológico, um exemplo é a alteração das cadeias alquílicas em derivados com grupos éster, éter, amina, entre outros. Os bioisósteros são aqueles obtidos a partir de alterações moleculares a fim de modificar tamanho, polaridade, características eletrônicas e de ligação mantendo ou aumentando a atividade biológica, ocorrendo principalmente quando um determinado grupo causa efeitos indesejáveis e é alterado por outro que não possui tais características. Já a simplificação estrutural é uma estratégia para levar a substâncias menores, deixando apenas o essencial para a atividade presente na estrutura e retirando aquelas regiões que não possuem papel significativo (PATRICK, 2013).

Oliveira e colaboradores (2019) sintetizaram quatro derivados com alterações na cadeia propenílica e a hidroxila fenólica da licarina A, conforme demonstrado na

figura 14. Esses derivados foram testados em células tumorais, e o composto tri-hidroxiado foi o mais ativo na concentração de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ contra câncer leucêmico (HL-60) enquanto o derivado trimetoxilado foi o mais promissor contra câncer de mama (MCF-7) na concentração de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Entretanto, apesar de não realizarem os ensaios com o protótipo, trabalhos como os dos grupos de pesquisa de Lin (2015) e Lee (2004), mostraram que a licarina A apresentou melhores resultados em linhagens de câncer de mama quando comparada aos derivados descritos, com valores de CI_{50} de 33,3 e $4,9 \mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente.

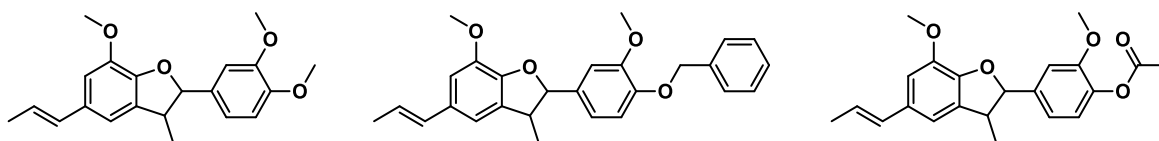
Figura 14 – Estrutura dos derivados sintetizados no trabalho de Oliveira *et al.* (2019).



Fonte: adaptado de Oliveira *et al.* (2019).

No trabalho de Meleti (2019) foi avaliada a atividade esquistossomicida e tripanocida da licarina A e de três derivados, apresentados na figura 15. Nesse caso, foram feitas modificações químicas na hidroxila fenólica do protótipo, com a inserção de um grupo metila, benzila e acetila. Como resultado observou-se que a licarina A mostrou-se a mais ativa contra *Trypanosoma cruzi* e a segunda mais ativa contra *Schistosoma mansoni*, sendo o derivado acilado o mais ativo para o último. Os demais derivados não apresentaram atividade significativa.

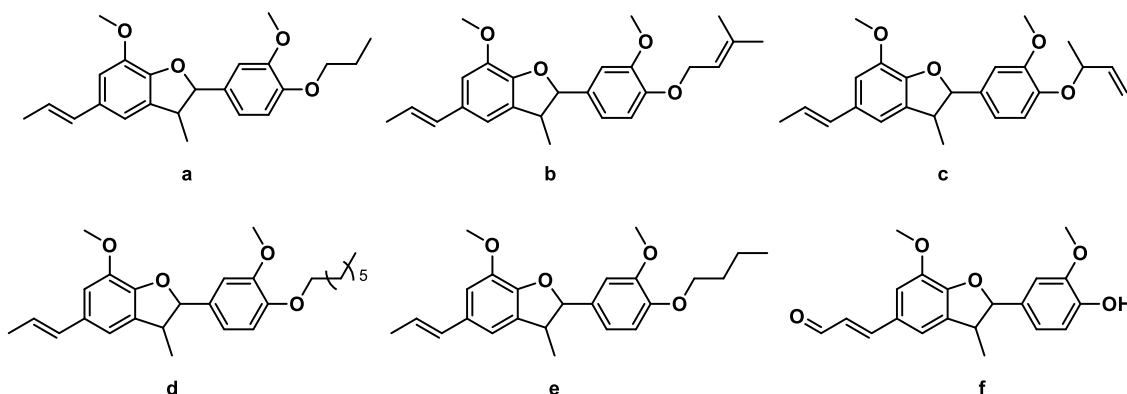
Figura 15 – Estrutura dos derivados sintetizados no trabalho de Meleti *et al.* (2019).



Fonte: adaptado de Meleti *et al.* (2019)

Na tese desenvolvida por Souza (2012) foram sintetizados derivados da licarina A (FIGURA 16) para avaliação do seu potencial leishmanicida, tripanocida e antimicobacteriano. Ao avaliar as substâncias contra a forma epimastigota do *Trypanosoma cruzi* observou-se que **c** e **f** foram os mais ativos, com valores de CI_{50} próximos de $28,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Quanto ao potencial leishmanicida, os derivados **a**, **c** e **f** apresentaram os resultados mais promissores, com CI_{50} de 8,68, 15,0 e $14,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente. Por fim, ao serem avaliadas contra *M. tuberculosis*, as substâncias mais ativas foram **c** e **f**, ambas com valor de concentração inibitória mínima de $31,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Nesse estudo, nota-se que todas as modificações realizadas no protótipo foram promissoras.

Figura 16 – Estrutura dos derivados de licarina A sintetizados no trabalho de Souza (2012).

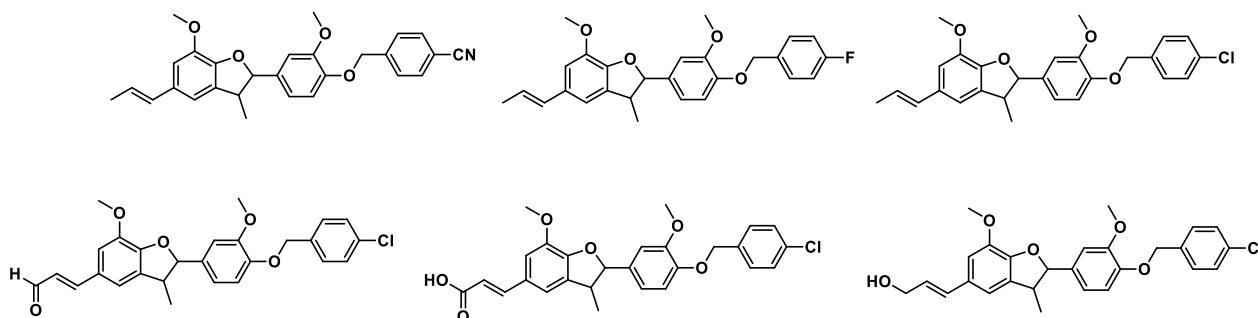


Fonte: adaptado de Souza (2012).

Nosso grupo de pesquisa avaliou a influência de modificações estruturais (compostos apresentados na Figura 17) no potencial antimicobacteriano da licarina A, além de investigar a interferência desta neolignan e dos derivados obtidos em inibir a formação de biofilme por essas micobactérias de rápido crescimento (Alvarenga *et al.*, 2020). Neste estudo foi demonstrado que o derivado alcoólico foi mais ativo que o sulfametoxazol contra *M. abscessus* e *M. fortuitum* e mais ativo que a claritromicina contra *M. massiliense*, com valores de MIC variando entre 9,76 e $19,53 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Este derivado também foi mais ativo que a Licarina A contra as duas últimas espécies citadas. Quanto ao potencial de inibição da formação de biofilme, observou-se que a Licarina A e os derivados alcoólico e ácido carboxílico apresentaram potencial efeito inibitório, sendo os derivados sintéticos mais efetivos em relação ao protótipo Licarina A. Além disso, estudos de citotoxicidade em células VERO apontaram uma baixa

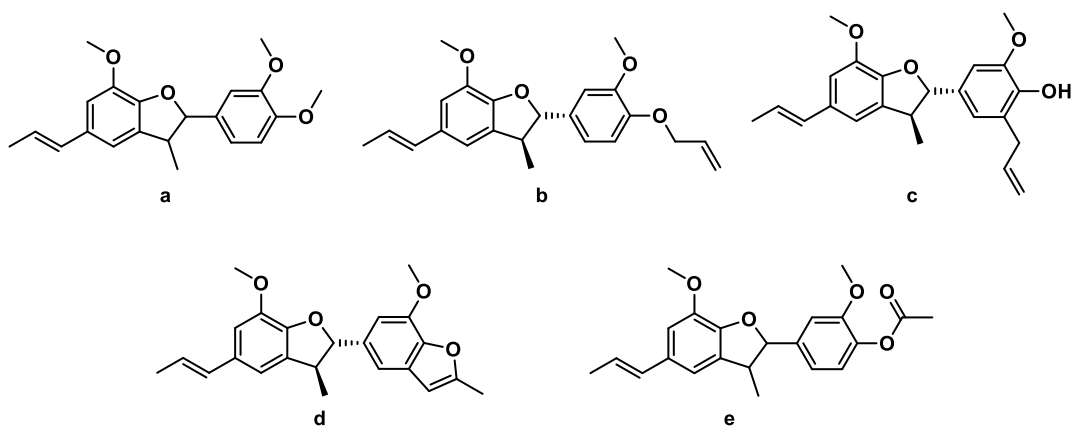
toxicidade destes compostos, comprovando que as modificações químicas realizadas levaram à descoberta de potenciais protótipos para futura otimização.

Figura 17 – Estrutura dos derivados de licarina A sintetizados no trabalho de Alvarenga *et al.* (2020).



Fonte: Da autora.

O grupo de pesquisa de Moraes e colaboradores (2020) avaliou a atividade tripanocida de uma série de derivados semissintéticos (Figura 18) da licarina A, obtidos a partir de uma rota sintética simples e objetiva, contra formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*. As modificações químicas foram realizadas no grupo hidroxila e na posição *orto* a este grupo. Os compostos **a**, **b**, **c** e **d** foram mais ativos (CI_{50} variando entre 5-28 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) que a licarina A ($CI_{50}=54,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$) contra formas tripomastigotas de *T. cruzi*, sugerindo que a acetilação do grupo hidroxila da Licarina A leva a uma redução do seu potencial tripanocida. O derivado alílico **c** foi o mais ativo contra as formas tripomastigotas do *T. cruzi* ($CI_{50}=5 \mu\text{mol.L}^{-1}$) seguido do derivado heterocíclico **d** ($CI_{50}=10,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$), que apresentou menor citotoxicidade que o primeiro. A alta lipofilia das substâncias foi associada à baixa biodisponibilidade oral que os compostos **a**, **b**, **c**, **d** e **e** apresentaram em ensaios de permeabilidade com membrana artificial realizados. Os derivados mais ativos (**c** e **d**) foram selecionados para estudos de mecanismo de ação considerando as formas tripomastigotas, em que se pode observar que as duas substâncias levaram a um aumento dos níveis de EROs nas formas tripomastigotas, sugerindo um mecanismo de ação associado a um estresse oxidativo no parasita.

Figura 18 – Estruturas dos derivados de licarina A sintetizados no trabalho de Morais *et al.* (2020).Fonte: adaptado de Morais *et al.* (2020)

3 OBJETIVOS

Com esse trabalho teve-se por objetivo sintetizar derivados de licarina A como candidatos potenciais a protótipos de fármacos antichagásicos.

De modo específico, pretendeu-se:

- a) Obter a licarina A por biossíntese;
- b) Sintetizar derivados de licarina A por meio de modificações nas regiões da cadeia propenólica, anel di-hidrofurânico e hidroxila fenólica;
- c) Caracterizar os produtos obtidos pelos métodos analíticos convencionais;
- d) Avaliar a atividade *in vitro* dos produtos contra formas epimastigotas de *T. cruzi*;
- e) Avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos produtos contra células do hospedeiro;
- f) Avaliar a atividade *in vitro* dos produtos de toxicidade reduzida frente a formas amastigotas e tripomastigotas do *T. cruzi*;
- g) Avaliar a atividade anti-*T. cruzi in vivo* dos produtos mais promissores;
- h) Realizar estudos de ancoramento molecular para investigar o modo de interação dos produtos frente a enzima tripanotiona redutase;
- i) Prever por estudos computacionais parâmetros físico-químicos, farmacocinéticos e metabólicos para os derivados sintetizados;
- j) Estabelecer as relações estrutura-atividade para os produtos obtidos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A doença de Chagas é considerada uma doença negligenciada, com alta prevalência em países em desenvolvimento, em especial na América Latina. Por possuir uma fase aguda silenciosa, muitas pessoas infectadas não têm o conhecimento da doença, o que leva à evolução para a fase crônica de maior gravidade.

Existem apenas dois medicamentos disponíveis para o tratamento da doença, sendo o benznidazol mais frequentemente prescrito (Kratz *et al.*, 2018). Esses fármacos possuem alta toxicidade e vários efeitos adversos, além de não ser efetivo em todas as fases da doença, o que faz com que a adesão ao tratamento seja prejudicada. Apesar do baixo investimento, a pesquisa para descoberta de novos agentes tripanocidas tem se mostrado de grande importância, tendo em vista a diminuição de efeitos colaterais e o aumento da eficácia.

Diversos estudos relataram atividade tripanocida de neolignanais, dentre eles destaca-se a licarina A, que possui atividade elevada se tornando um bom candidato para modificações estruturais. Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa já confirmaram um relevante efeito tripanocida de um derivado 4-cloro-benzílico da licarina A (dados não publicados). Diante disso, foi proposta a modificação de pontos específicos desse derivado, levando a formação de uma série análogos que dariam informações para realização de estudos de relação estrutura-atividade.

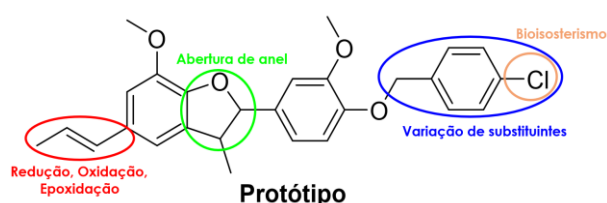
A princípio foi proposta a síntese de derivados da licarina A enantiomericamente puros. Porém, a reação de biossíntese da licarina A não ocorreu conforme descrito na literatura e a separação do racemato por meio de reações para resolução quiral não levou ao resultado esperado. Com isso, optou-se pela obtenção dos derivados propostos a partir da mistura racêmica da licarina A e, posteriormente, realizar a separação da mistura racêmica que vier apresentar o melhor resultado de modo a avaliar os enantiômeros separadamente.

Os produtos finais obtidos tiveram sua estrutura caracterizada pelos métodos de espectrometria de absorção no infravermelho, de ressonância magnética nuclear e de massas. Todas as atribuições foram feitas e encontram-se descritas na parte experimental.

Após a obtenção dos derivados propostos foram realizados os ensaios para verificação do potencial biológico contra as formas epimastigotas do parasito. Infelizmente não houve reprodutibilidade dos resultados obtidos com o protótipo do trabalho, o éter 4-cloro-benzílico da licarina A. Porém, alguns outros derivados apresentaram atividade satisfatória, o que levou ao planejamento de uma outra série de derivados a fim de se observar a necessidade de substituição da hidroxila fenólica com grupos volumosos. Os novos derivados apresentam como alterações aquelas existentes nos derivados mais ativos do primeiro grupo de substâncias, sendo estas modificações realizadas na cadeia propenílica: conversões à diol, aldeído e ácido. Além disso, como os primeiros derivados com a hidroxila fenólica livre foram mais citotóxicos, as alterações relatadas também foram realizadas com derivados que possuíam a hidroxila fenólica bloqueada com um grupo metílico, que é menos volumoso que o grupo 4-cloro-benzílico do protótipo.

Com a avaliação da atividade tripanocida *in vitro* desse novo grupo de derivados, foi constatado que o derivado **DL07**, do primeiro grupo proposto, foi o que apresentou a melhor atividade *in vitro*, seguindo para estudos *in vivo*. Também foram realizados estudos de ancoragem molecular e de previsão de parâmetros farmacocinéticos para os derivados sintetizados.

Figura 19 – Regiões de modificação propostas para síntese dos derivados a partir do protótipo.



Fonte: Da autora.

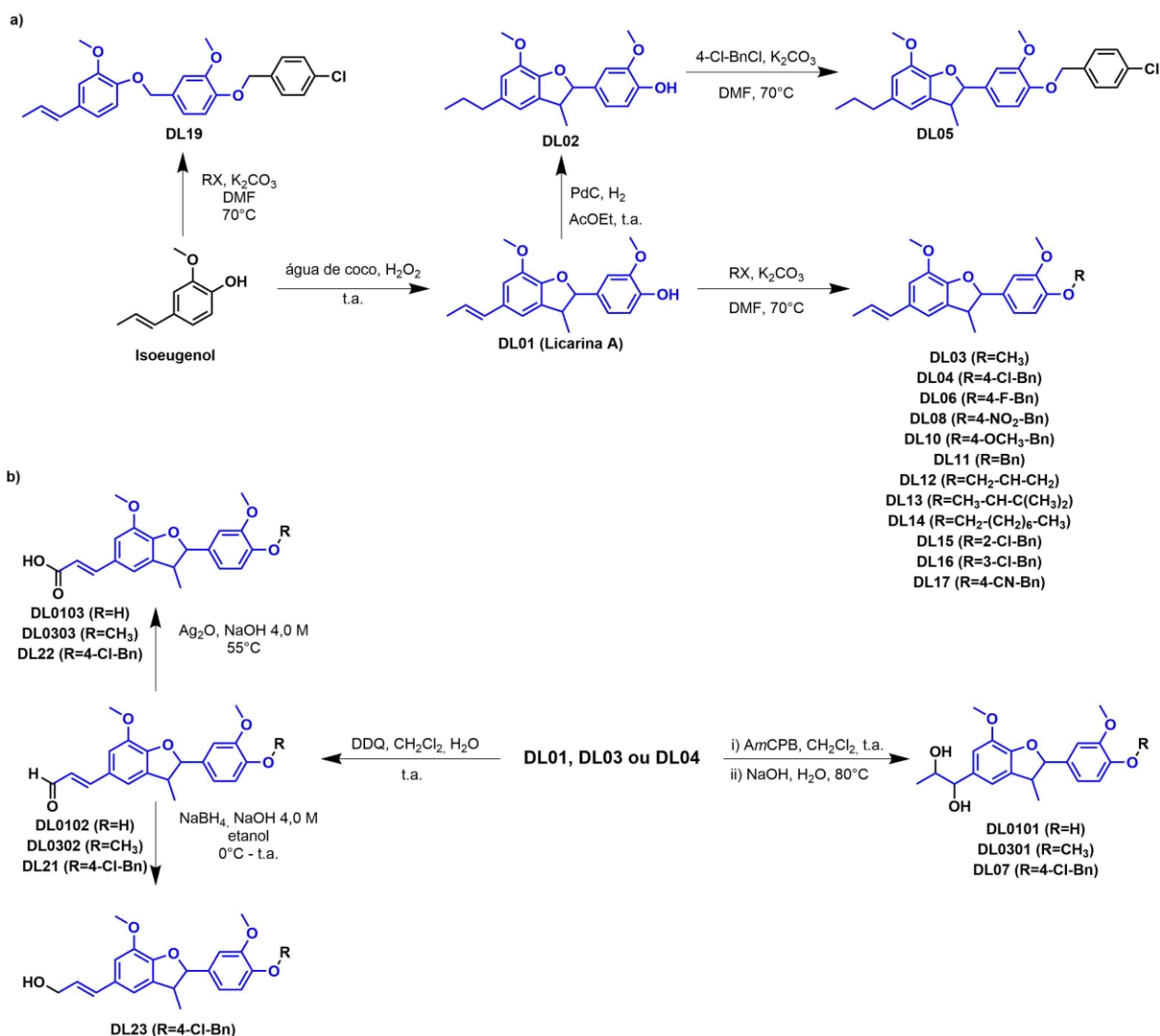
4.1 SÍNTESE DOS DERIVADOS PROPOSTOS

Para a obtenção dos derivados propostos foi idealizada a rota sintética mostrada na figura adiante (FIGURA 20). Como ponto inicial da síntese têm-se o isoeugenol, como visto na figura 20a, que foi utilizado como material de partida para a síntese da licarina A (**DL01**) e do derivado **DL19**. A partir da licarina A, foram

realizadas reações de eterificação levando a formação de doze derivados com diferentes grupos inseridos à hidroxila fenólica. Esta mesma substância (**DL01**) também foi empregada em reação de redução para formação do derivado com cadeia propílica (**DL02**) e, subsequentemente, eterificação para formação do derivado **DL05**.

Na figura 20b está apresentado o esquema sintético para obtenção dos derivados oxidados na cadeia propenilica. Neste caso, o ponto de partida são as substâncias **DL01**, **DL03** ou **DL04**, as quais foram submetidas à reação de epoxidação e abertura de epóxido, para formação dos derivados di-hidroxilados, ou reação de oxidação do carbono alílico, para formação dos derivados aldeídicos. Por fim, os aldeídos obtidos passaram por reações de oxidação e de redução, para obtenção dos derivados carboxilados e alcoólicos, respectivamente.

Figura 20 – Rota sintética empregada para obtenção dos derivados propostos.



Fonte: Da autora.

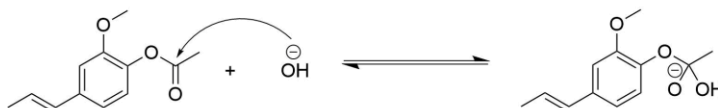
4.1.1 Obtenção do isoeugenol

A primeira etapa da rota sintética consistiu na hidrólise do acetato de isoeugenol para obtenção do fenol livre que será utilizado nas demais reações, como a síntese da licarina A. Para isso foi empregado um método clássico de hidrólise básica. Originalmente essa reação ocorreria a temperatura ambiente, porém observou-se resíduos de material de partida, o que prejudicaria sua purificação. Portanto optou-se por aumentar a temperatura da reação para auxiliar no processo de hidrólise. Os melhores rendimentos foram alcançados aumentando a temperatura do meio após 15 horas à temperatura ambiente.

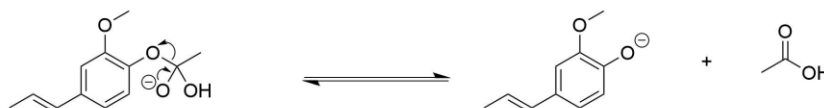
Na figura 21, encontra-se demonstrado o mecanismo proposto para a hidrólise do acetato de isoeugenol. Em uma primeira etapa ocorreria um ataque nucleofílico a carbonila pela base presente no meio, levando a formação de um intermediário que, na segunda etapa, após um rearranjo, forma o fenóxido e libera do ácido acético. Por fim, ocorre a protonação do fenóxido pela desprotonação do ácido presente no meio (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012).

Figura 21 – Mecanismo proposto para hidrólise do acetato de isoeugenol.

Etapa 1:



Etapa 2:



Etapa 3:



Fonte: Da autora.

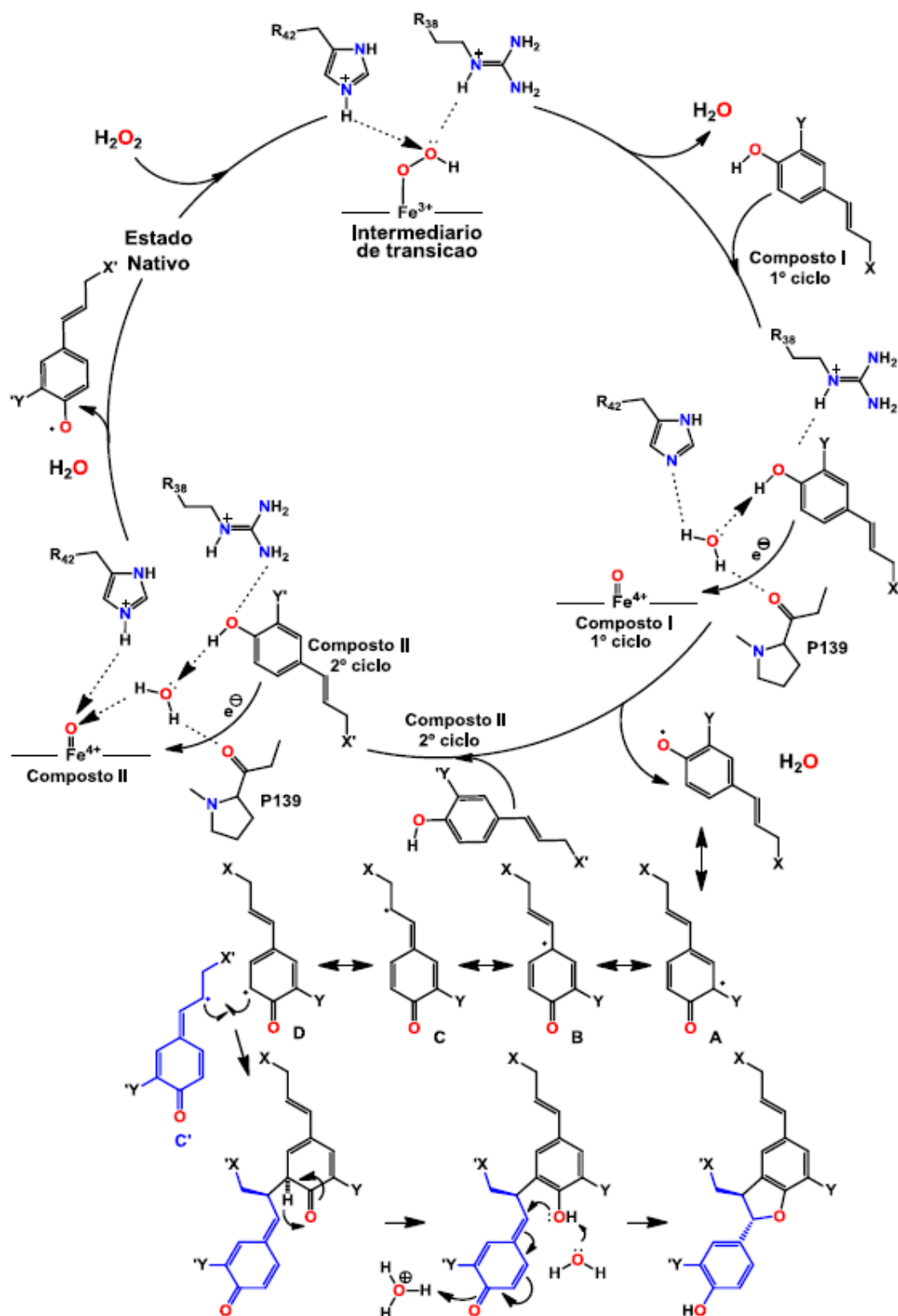
O isoeugenol obtido passou por processo de purificação por cromatografia em coluna de sílica (CCS) e foi armazenado sob refrigeração devido à sua alta instabilidade.

4.1.2 Síntese da licarina A

Para a obtenção da licarina A (**DL01**) foi empregada a metodologia biossintética descrita por Rodrigues e colaboradores (2017), na qual utiliza água de coco fresco para a obtenção da licarina A. Por esse método a oxidação do isoeugenol à licarina A ocorre devido à ação catalítica da peroxidase presente na água de coco, conforme apresentado na figura 22. Essa enzima possui um núcleo ferroporfirínico, onde o ferro é oxidado de Fe^{3+} à Fe^{4+} pelo peróxido de hidrogênio. A forma Fe^{3+} é restituída quando recebe um elétron do isoeugenol. Em cada ciclo catalítico uma molécula de isoeugenol é utilizada, no ciclo seguinte, o processo se repete com a mesma molécula ou uma diferente. Durante esse processo são formados diversos radicais, que são estabilizados por ressonância, quando estes se encontram no meio reacional há a formação da substância dimérica correspondente, no caso, a licarina A (MARQUES, 2014). Esse procedimento mostrou-se vantajoso, pois, além de condições reacionais brandas, a obtenção e purificação da licarina A ocorreu de forma satisfatória. Esse método foi descrito como enantiomericamente específico, que levaria a formação somente do enantiômero (-)-licarina A.

Após a obtenção do produto de interesse fez-se a análise do desvio da luz polarizada para verificação da presença de apenas um enantiômero. Diferente do descrito pelos autores, que afirmavam obter apenas o derivado levorotatório, com um valor de $[\alpha]_D -20,0$ (c 1,0, $CHCl_3$), foi obtida a mistura racêmica do produto, visto que o valor de $[\alpha]_D$ obtido foi igual a zero. Diante disso, seria necessário empregar técnicas de separação do racemato para obter os enantiômeros puros que, por sua vez, não se mostraram viáveis. Dessa forma, optou-se por seguir a síntese dos derivados propostos com a mistura racêmica da licarina A.

Figura 22 – Mecanismo proposto para biossíntese da licarina A.



Fonte: MARQUES, 2014.

Foi realizada a análise por espectroscopia de RMN, massas, e infravermelho para confirmar a obtenção da licarina A. Para exemplificar a análise, será feita uma descrição detalhada para este derivado.

No espectro de absorção na região do infravermelho, figura 57, foi possível observar uma banda característica de estiramento O-H em 3421 cm^{-1} referente à hidroxila fenólica. Entre $1120\text{-}1280\text{ cm}^{-1}$ notam-se bandas relativas ao estiramento C-O. Em 1517 cm^{-1} encontram-se bandas referentes a C=C de anel aromático, e em 1612 cm^{-1} de C=C de alceno.

Na figura 58, encontra-se demonstrado o espectro de RMN de ^1H dessa substância. Na região de $6,96\text{-}6,76\text{ ppm}$ encontram-se os sinais referentes aos 5 hidrogênios aromáticos, H6, H10, H3, H5 e H12, respectivamente. Em $\delta\ 6,35$ têm-se um duplete relativo ao H15, seguido do multiplete entre $\delta\ 6,15\text{-}6,03$ referente ao H16, ambos hidrogênios estão ligados à carbonos sp^2 , o que faz com que estejam mais desblindados, próximos a região de aromáticos. O simpleto localizado a $5,63\text{ ppm}$ refere-se ao hidrogênio da hidroxila, que não possui acoplamento com hidrogênios vizinhos. A seguir, encontra-se um sinal a $\delta\ 5,09$ referente ao H7, o qual se acopla com o H14, desdobrando em um duplete. Os sinais dos hidrogênios das metoxilas encontram-se à $3,87\text{ ppm}$, referente aos seis hidrogênios. O multiplete entre $\delta\ 3,49\text{-}3,39$ é relativo ao H14, que por sua vez acopla-se com os hidrogênios da metila ligada a este carbono e ao H7. Por fim, na região de hidrogênios mais blindados encontram-se os sinais das metilas presentes na estrutura, a $\delta\ 1,86$ um duplete referente ao H17 e a $\delta\ 1,37$ outro duplete relativo a metila ligada ao C14.

No espectro de RMN de ^{13}C , demonstrado na figura 59, pode-se verificar os sinais aos carbonos sp^2 na região de maior desblindagem, sendo estes os carbonos envolvidos em ligação dupla e anéis aromáticos. Dessa forma têm-se primeiramente os sinais dos carbonos sp^2 ligados a átomos eletronegativos, a $\delta\ 146,6$ o C8, a $\delta\ 146,5$ o C2, a $\delta\ 145,7$ o C1, e a $\delta\ 144,1$ o C9. Em seguida, encontram-se os sinais dos demais carbonos sp^2 , os carbonos aromáticos C4, C13, C11, C5, C6, C12, C3 e C10 referem-se aos sinais a $\delta\ 133,2$, $\delta\ 132,1$, $\delta\ 123,4$, $\delta\ 119,9$, $\delta\ 114,0$, $\delta\ 113,2$, $\delta\ 109,2$ e $\delta\ 108,9$, respectivamente, sendo os mais deslocados os carbonos mais substituídos. Os carbonos C15 e C16, que formam a ligação dupla, referem-se aos sinais à $132,0\text{ ppm}$ e à $130,9\text{ ppm}$, nessa ordem. O sinal com deslocamento de $93,7\text{ ppm}$ é relativo ao C7, por estar ligado a um átomo eletronegativo. Os carbonos das metoxilas

possuem seus sinais a δ 55,9, seguido do sinal do C14 a δ 45,5. Os sinais das metilas encontram-se na região de maior blindagem do espectro, sendo a δ 18,3 o C17 e a δ 17,5 a metila ligada ao C14.

Pelo subspectro DEPT-135 (FIGURA 60), as atribuições feitas podem ser confirmadas, evidenciando a ausência de sinais na fase oposta devido a inexistência de carbonos metilênicos na substância.

No espectro de massas, apresentado na figura 61, nota-se o pico base com valor de razão m/z $[M+H]^+=327,1589$, o qual refere-se a massa molar da substância acrescido de um próton, pela operação do equipamento em modo positivo.

4.1.4 Oxidação do carbono alílico da licarina A e da metil-licarina A

Para a reação de oxidação foi utilizada uma metodologia descrita por Iliefski, Li e Lundquist (1998), que emprega como agente oxidante o reagente 2,3-dicloro-5,6-dicianobenzoquinona - DDQ. Essa reação permite a oxidação do carbono alílico da cadeia propenólica e formação de um aldeído. O mecanismo para a oxidação do carbono alílico via DDQ não foi completamente elucidado, porém os autores relatam que para que a reação ocorra é necessária a presença de quantidades controladas de água e temperatura ambiente.

Após a reação foi feita análise por espectroscopia de RMN, a qual pode ser confirmada a identidade da substância. Para o primeiro grupo de substâncias essa síntese foi realizada e o produto obtido, o aldeído da licarina A, usado como precursor em reações subseqüentes. No segundo grupo de substâncias o aldeído da licarina A (**DL0102**) tornou-se o produto de interesse, assim como o aldeído da licarina A metilada (**DL0302**). Nos espectros de RMN de 1H , apresentados nas figuras 68 e 72, a formação dos aldeídos pode ser confirmada pelos sinais a δ 9,64, referente ao hidrogênio do aldeído, de alto deslocamento químico. Já os espectros de RMN de ^{13}C (FIGURAS 69 e 73), a presença do sinal na região de δ 193,6, confirma a formação dos produtos. Nos subspectros DEPT-135 (FIGURAS 70 e 74), o qual apresenta somente os carbonos hidrogenados, pode-se observar o sinal a δ 193,6 da carbonila hidrogenada dos aldeídos.

4.1.5 Redução do alceno da licarina a e do seu aldeído por hidrogenação catalítica

A reação de redução da dupla ligação da licarina A para formação de um derivado saturado, foi seguida conforme o descrito por Davies e colaboradores (2010). Tal reação segue uma hidrogenação catalítica empregando paládio carvão e gás hidrogênio, onde os átomos de hidrogênio atacam a superfície do metal, assim como posteriormente os elétrons π da dupla ligação. Com isso tanto o produto como os hidrogênios estarão ligados à superfície do paládio carvão. Em seguida, acontece a transferência dos átomos de hidrogênio para os carbonos pertencentes à dupla ligação (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012). Essa reação teve duração de 24 horas, levando a formação do produto puro, derivado **DL02**, quando utilizada a licarina A.

Figura 23 – Mecanismo proposto para hidrogenação catalítica.

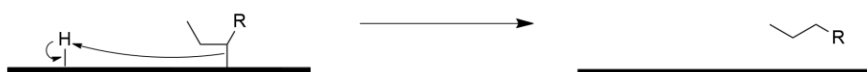
Etapa 1:



Etapa 2:



Etapa 3:



Fonte: Da autora.

O derivado **DL02** obtido foi caracterizado pelos métodos de espectrometria, onde é possível confirmar sua formação pelos sinais da cadeia propílica nos espectros de RMN de ^1H (δ 2,54 H15; δ 1,67-1,57 H16; δ 0,97 H17 – FIGURA 63) e ^{13}C (δ 38,1 C15; δ 25,1 C16; δ 13,9 C17 – FIGURA 64) e, no espectro de massas, pela presença do pico base com o valor da razão m/z esperado (FIGURA 66).

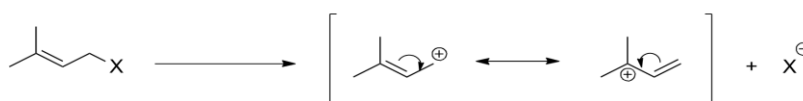
4.1.6 Obtenção dos éteres

As reações de eterificação foram realizadas a fim de obter-se os derivados **DL03, DL04, DL05, DL06, DL08, DL10, DL11, DL12, DL13, DL14, DL15, DL16, DL17, DL19 e DL21**. Tais derivados tiveram como precursores o isoeugenol, a licarina A ou seus derivados. O método empregado foi adaptado de Coolen e colaboradores (1995), usando como solvente dimetilformamida no lugar de acetona, o que, por ter uma maior constante dielétrica, favorece a reação. A duração média da reação foi de três horas.

Existem dois mecanismos possíveis para a reação de eterificação, o que irá depender do haleto empregado. Para os haletos que levam a formação de carbocátions estáveis, como os haletos de alila, prenila, 4-metóxi-benzila, a reação pode passar por um mecanismo de substituição nucleofílica unimolecular (S_N1). Esse mecanismo está demonstrado na figura 24, o qual consiste na formação do carbocátion, que passará por estabilização por ressonância. Após a formação do fenóxido pela ação da base presente no meio, ocorre um ataque nucleofílico deste ao carbocátion resultando na formação do éter esperado.

Figura 24 – Mecanismo proposto para as reações de eterificação via S_N1 .

Etapa 1:



Etapa 2:



Etapa 3:



Fonte: Da autora.

Para os haletos onde a formação do carbocátion estável não é possível, a reação segue uma substituição nucleofílica bimolecular (S_N2). Isso ocorre para os haletos de metila, octila, 4-nitrobenzila, dentre outros. O mecanismo para essa reação está demonstrado na figura 25. Primeiramente ocorrerá a desprotonação da hidroxila

fenólica pela base presente no meio, o carbonato de potássio, auxiliado pelo solvente polar aprótico presente. O fenóxido formado faz um ataque nucleofílico ao haleto, ocorrendo uma heterólise da ligação entre carbono e heteroátomo (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012).

Figura 25 – Mecanismo proposto para as reações de eterificação via S_N2.

Etapa 1:



Etapa 2:



Fonte: Da autora.

Dessa forma, esses fenóis têm bloqueadas suas hidroxilas com diferentes subunidades que levará a distintos impactos na atividade biológica. Os éteres obtidos foram caracterizados por espectroscopia de RMN, massas e infravermelho, os quais possuem suas atribuições detalhadas na seção relativa à parte experimental.

Pode-se afirmar a obtenção dos derivados propostos pela presença, na maioria dos casos, do sinal referente ao grupo CH₂ do substituinte inserido na estrutura que se liga diretamente ao oxigênio da hidroxila fenólica precursora, nas análises dos espectros de RMN de ¹H e de ¹³C. Tais sinais encontram-se com um deslocamento químico de aproximadamente 5,0 ppm, para os espectros de hidrogênios, e de aproximadamente 70 ppm, para o espectro de carbono. Além disso, os sinais relativos as demais partes dos substituintes confirmam sua obtenção. Para o **derivado 03**, em vez do sinal acima descrito, nota-se a presença de mais uma metoxila, devido à inserção de um grupo CH₃ ligado diretamente ao oxigênio.

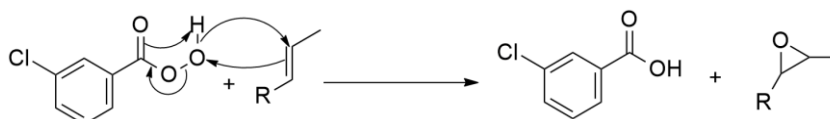
Nos espectros de massas, nota-se o pico base com valor da razão m/z com os valores esperados, sendo que, em alguns casos, houve a formação de adutos com sódio e potássio.

4.1.7 Obtenção do derivado DL07, DL0101 e DL0301

Para obtenção do derivado **DL07** primeiramente é necessário fazer uma epoxidação do derivado **DL04**, seguido de uma reação para abertura do epóxido e formação do diol esperado. Para reação de epoxidação foi seguido o método descrito por Luo, Qato e Guenther (1992), utilizando o ácido *meta*-cloro-perbenzóico como reagente.

O mecanismo proposto para a reação de epoxidação, que está representado na figura 26, demonstra o ataque dos elétrons π da dupla ligação ao último oxigênio do per ácido e, simultaneamente, os elétrons da ligação do oxigênio com o hidrogênio atacam o carbono terminal da cadeia propenilica. Segue-se, então, com os elétrons π da carbonila captando o hidrogênio que foi liberado e forma-se uma dupla ligação com os elétrons que ligavam os dois oxigênios, gerando novamente uma carbonila. Esse processo resultará na formação de um epóxido na região onde havia a insaturação na cadeia do derivado **DL04** e do ácido *meta*-clorobenzóico.

Figura 26 – Mecanismo proposto para a reação de epoxidação.



Fonte: Da autora.

A reação durou cerca de 5 horas, tendo consumo total do material de partida, derivado **DL04**. Não foram feitas a purificação e caracterização do produto, devido a instabilidade inerente de epóxidos. Partindo, assim, para a reação seguinte, de abertura e formação do diol, utilizando o método descrito por Tyman e Payne (2006).

Na figura 27 encontra-se demonstrado o mecanismo proposto para a reação de abertura do epóxido, que consiste em duas etapas. Na primeira etapa observa-se um ataque nucleofílico da base presente no meio ao carbono ligado diretamente ao oxigênio, levando a abertura do epóxido. A etapa seguinte consiste na protonação do alcóxido através da adição de ácido, formando, assim, o diol esperado (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012).

Figura 27 – Mecanismo proposto para a reação de abertura do epóxido.

Etapa 1:



Etapa 2:



Fonte: Da autora.

Para o segundo grupo de substâncias propostas as reações acima descritas foram realizadas tendo como material de partida os derivados **DL01** e **DL03** para a obtenção dos derivados **DL0101** e **DL0301**, respectivamente.

A identidade dos dióis obtidos foram confirmadas por espectroscopia de RMN, o que indica também que a formação do epóxido foi bem sucedida. Nas figuras 151, 156 e 150 encontram-se os espectros de RMN de ^1H , no qual a formação do diol é confirmada pela presença dos sinais a δ 1,06 dos hidrogênios H17, o duplete a δ 4,29 referente a H15 e, também, um sinal sobreposto dos hidrogênios de H16 e metoxilas. Além disso, no espectro do derivado **DL07** (FIGURA 151), observam-se sinais entre 3,29-2,01 ppm relativos aos hidrogênios das hidroxilas do diol.

No espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 152, 157, 161), notam-se os sinais a δ 18,8 relativo a C17, a δ 72,3 relativo a C16 e a δ 79,6 relativo a C15, e ausência dos sinais propenílicos.

4.1.8 Obtenção do derivado **DL22**, **DL0103** e **DL0303**

O derivado **DL22** foi obtido a partir da oxidação do derivado DL21, que possui um grupo aldeído em sua estrutura. Da mesma forma que, para o segundo grupo de substâncias, os derivados **DL0103** e **DL0303** foram obtidos a partir dos aldeídos **DL0102** e **DL0302**. O método usado foi descrito por Pearl (1950) e se trata do emprego de óxido de prata em meio básico. Essa reação envolve um agente oxidante relativamente brando e seletivo, não afetando outros grupos oxidáveis. Possivelmente, a reação ocorre por formação, em meio alcalino, dos hidratos dos

aldeídos e subsequente oxidação dos mesmos (JAMES, 2015). O mecanismo exato pelo qual ocorre essa reação não foi encontrado durante as pesquisas bibliográficas realizadas.

A confirmação da obtenção dos produtos pode ser feita através de métodos de espectrometria. Pelos espectros de absorção na região do infravermelho (FIGURAS 163, 168, 172), notam-se bandas características de estiramento O-H e de carbonila de ácidos carboxílicos. Pelos espectros de RMN de ^1H , apresentado nas figuras 164, 169 e 173, observa-se um maior deslocamento dos hidrogênios próximos a carboxila devido a efeitos de ressonância, e nos espectros de RMN de ^{13}C , o sinal referente à carbonila de ácido carboxílico em 172,3 ppm (FIGURAS 165, 170, 174). No espectro de massas do derivado **DL22** (FIGURA 167), o valor da razão m/z do pico base está de acordo com o esperado

4.1.9 Obtenção do derivado DL23

A reação de redução via boridreto de sódio foi adaptada dos estudos feitos por Ward e Rhee (1989) e Mochalov e colaboradores (2016). Foi utilizada para obter o derivado **DL23** a partir da redução do grupo aldeído presente no derivado DL21. A escolha desse método deve-se a utilização de condições mais brandas para que a reação ocorra, visto que o boridreto de sódio é um agente redutor menos reativo que o hidreto de alumínio e lítio, o qual também é empregado para conversão de aldeídos à alcoóis. Isso permite, por exemplo, o uso de mistura bifásica de solventes, como etanol-água ou mesmo solvente orgânico isolado, sem secagem prévia. A duração média para término da reação foi de 30 minutos.

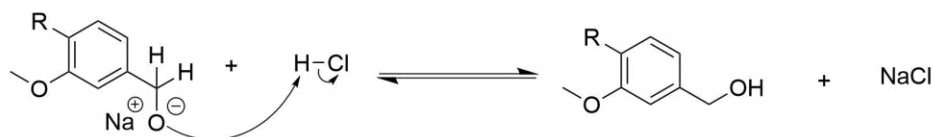
O mecanismo envolvido nesta reação está demonstrado na figura 28. O boridreto de sódio funciona como um doador de hidreto para a carbonila do aldeído. Primeiramente, um hidreto do NaBH_4 é doado ao carbono carbonílico, gerando um alcóxido. Este, ao ser tratado com o ácido, na segunda etapa, protona-o, conduzindo ao álcool primário esperado. As etapas descritas são repetidas até que todos os hidrogênios do boro sejam transferidos às demais moléculas de aldeído (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012).

Figura 28 – Mecanismo proposto para reação de redução via NaBH₄.

Etapa 1:



Etapa 2:



Fonte: Da autora.

A obtenção do derivado **DL23** pode ser confirmada através do espectro de RMN de ¹H, pelos sinais dos hidrogênios ligados ao C17, com deslocamento de 4,27 ppm, e pelo sinal do hidrogênio da hidroxila em 2,02 ppm. Pelo espectro de RMN de ¹³C, pelo sinal de C17 em 63,6 ppm. Pelo espectro de absorção na região do infravermelho, onde nota-se banda características de estiramento O-H de álcool. E, por fim, pelo espectro de massas, onde o valor da razão m/z do pico base está de acordo com o esperado (FIGURAS 176 a 180).

4.2 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

Após os derivados terem sido obtidos e caracterizados, eles foram submetidos à avaliação biológica *in vitro* contra formas epimastigotas do parasito *T. cruzi*. Também foram feitos estudos quanto à toxicidade dessas substâncias frente a células sadias, sendo utilizadas células Vero. O método empregado em ambas as análises foi o colorimétrico, empregando resazurina como o reagente de cor.

Cada substância foi incubada por 72 horas com a forma epimastigota do parasito ou com a célula Vero. Em seguida, a resazurina foi adicionada a fim de se observar a viabilidade tanto dos parasitos, no caso dos ensaios contra as formas epimastigotas, como com as células sadias, no caso dos ensaios de citotoxicidade.

A resazurina é um indicador amplamente utilizado, possui coloração azul que, quando reduzida à resorufina pelas células, vai a uma coloração rosa, que é altamente fluorescente (PAUL *et al.*, 2018). Essa redução indica que as células do parasito ou as sadias estão viáveis. No caso do ensaio contra a forma epimastigota, a coloração

rosa indica que as substâncias não tiveram efeito tripanocida, enquanto nos ensaios de citotoxicidade essa coloração indica que as substâncias não foram tóxicas às células Vero.

Figura 29 – Redução da resazurina à resorufina.



Fonte: Da autora.

Já para a análise contra as formas amastigotas, que são intracelulares, a determinação da atividade das substâncias foi feita a partir quantificação do percentual de células infectadas, comparativamente às células controle. A quantificação foi feita em microscópio óptico, após as técnicas de fixação e coloração por Giemsa.

Os resultados obtidos das análises de atividade tripanocida e de citotoxicidade para o primeiro conjunto de substâncias estão apresentados na tabela 1 em valores de concentração inibitória da substância avaliada que induz a 50% do efeito analisado (CI₅₀) e de concentração da substância que reduz a viabilidade celular em 50% (CC₅₀).

Com a análise dos resultados foi possível observar que os derivados **DL01**, **DL02**, **DL07** e **DL 22** foram os mais ativos, com valores de CI₅₀ abaixo de 50,0 µg.mL⁻¹. Dentre estes, a própria licarina A (**DL01**) e o derivado **DL02**, com a cadeia propílica, foram os que manifestaram os melhores resultados. Porém, estas substâncias também demonstraram um maior perfil de toxicidade, o que pode estar relacionado a ausência de grupos ligados à hidroxila fenólica, fazendo com que esta esteja desbloqueada.

Outro fato importante a ser observado quanto à citotoxicidade das substâncias é que, ao converter a unidade de µg.mL⁻¹ para µmol.L⁻¹, observamos que o **DL22**, na verdade, apresenta maior caráter citotóxico que a licarina A (**DL01**), com valores de 995,7 e 1189,0 µmol.L⁻¹, respectivamente.

Tabela 1 – Valores de CI_{50} contra epimastigotas de *T. cruzi* e CC_{50} para células Vero®, em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ($\mu\text{mol.L}^{-1}$).

Derivado	CI_{50}	CC_{50}
DL01	11,1 ± 0,8 (34,0)	388,04 (1189,0)
DL02	14,1 ± 1,4 (42,9)	123,47 (376,0)
DL03	136,1 ± 35,9 (399,8)	>500 (>1468,8)
DL04	127,6 ± 14,1 (283,0)	>500 (>1108,8)
DL05	80,3 ± 14,4 (177,3)	>500 (>1103,8)
DL06	146,9 ± 6,5 (338,1)	>500 (>1150,7)
DL07	33,7 ± 6,6 (69,5)	>500 (>1031,0)
DL08	>200 (>433,4)	>500 (>1083,4)
DL10	161,9 ± 5,8 (362,6)	>500 (>1119,8)
DL11	80,9 ± 8,2 (194,2)	>500 (>1200,5)
DL12	74,1 ± 21,6 (202,2)	>500 (>1364,4)
DL13	74,7 ± 3,6 (189,4)	>500 (>1267,4)
DL14	>200 (>456,0)	>500 (>1140,0)
DL15	97,6 ± 3,8 (216,4)	>500 (>1108,8)
DL16	109,1 ± 4,6 (241,9)	>500 (>1108,8)
DL17	135,6 ± 4,9 (307,1)	>500 (>1132,5)
DL19	>200 (>470,7)	>500 (>1176,7)
DL21	58,2 ± 0,3 (125,2)	>500 (>1075,4)
DL22	46,3 ± 6,1 (96,3)	478,89 (995,7)
DL23	63,2 ± 11,6 (135,3)	>500 (>1070,8)
BZ	4,8 ± 0,5 (18,4)	250,0 (960,6)

Fonte: Da autora.

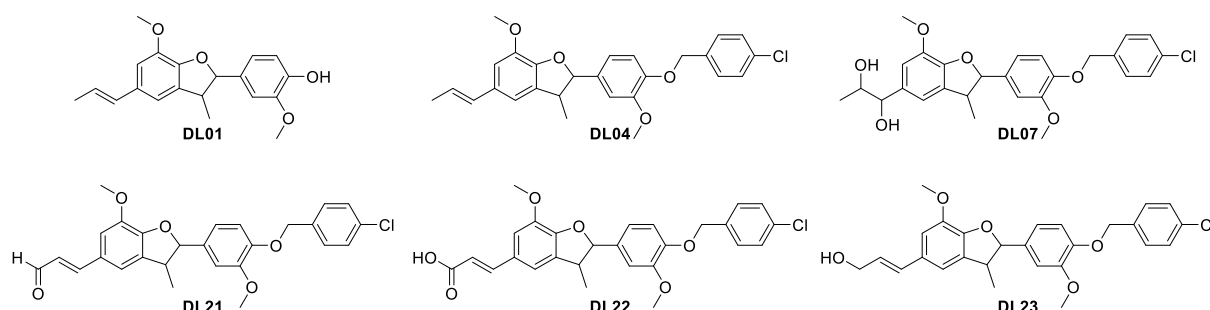
O derivado **DL04**, que foi utilizado como protótipo para o trabalho, não apresentou atividade significativa durante os ensaios agora realizados. Em avaliações anteriores de um trabalho do nosso grupo de pesquisa, esta substância apresentou um valor de CI_{50} de $6,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$, o que não foi reproduzido neste estudo. Do mesmo modo, diversas substâncias análogas ao derivado **DL04**, com a hidroxila fenólica benzilada, também não apresentaram atividade tripanocida considerável. Fato também observado para aqueles derivados que possuem uma cadeia alquílica ligada à hidroxila fenólica da licarina A.

Contudo, o derivado **DL07**, mesmo apresentando a hidroxila fenólica benzilada, mostrou uma boa atividade, com valor de CI_{50} igual a $33,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Possivelmente relacionada à sua cadeia propílica di-hidroxilada. Apesar do mecanismo de ação

dessa substância não estar elucidado, estudos como de Fernandez-Pastor e colaboradores (2018) mostram a atividade de substâncias poliidroxiladas contra tripanossomatídeos da espécie *T. brucei*, relacionando a presença de diversas hidroxilas na estrutura à atividade desempenhada por esse tipo de substância frente a diferentes alvos biológicos, como se confirma em dados da literatura.

Os derivados oriundos da oxidação da cadeia alílica da licarina A, sendo eles os derivados **DL21**, **DL22** e **DL23**, apesar da hidroxila substituída, também apresentaram considerável atividade tripanocida. Dessa forma, pode-se considerar que a presença de grupos oxigenados na estrutura, como hidroxila e carbonila, auxiliam na atividade contra *T. cruzi*.

Figura 30 – Estrutura química da licarina A (**DL01**), do precursor (**DL04**) e dos derivados mais ativos do primeiro grupo.

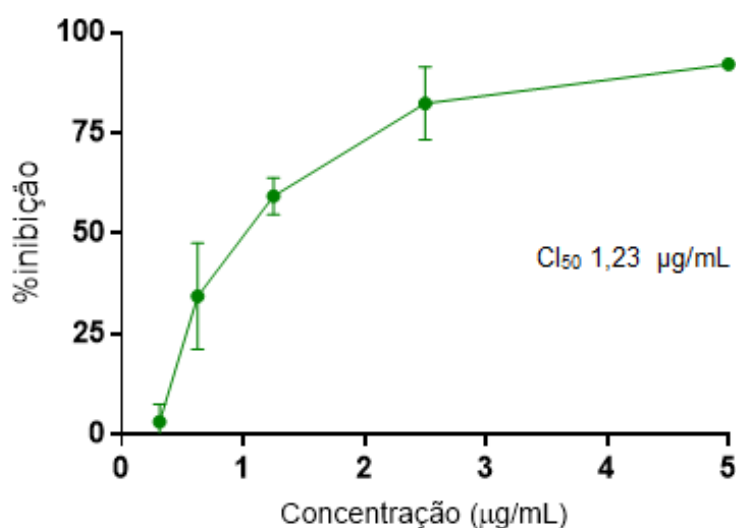


Fonte: Da autora.

No estudo de Moraes e colaboradores (2020), também foram avaliadas a atividade da licarina A e alguns derivados como agentes tripanocidas. Um dos derivados por eles sintetizados foi a licarina A com a hidroxila fenólica alilada, mesma substituição realizada no derivado **DL12**. Assim como neste trabalho, os autores não observaram atividade com essa substituição, porém, ao realizar um rearranjo de Fries, fazendo com que o grupo alílico se posicionasse *orto* a hidroxila fenólica, observou-se uma ótima atividade contra as formas tripomastigotas do parasito (CI_{50} 5.0 ± 0.8 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). Tal fato reforça a importância da hidroxila fenólica na estrutura, e pode indicar um possível efeito estérico que levou a obtenção do menor efeito citotóxico e melhor índice de seletividade (IS 9,0) apresentado por essa substância.

Em adição aos estudos acima relatados, foi realizada uma triagem em concentração única de $5,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para a forma amastigota com aqueles derivados que manifestaram uma maior atividade contra a forma epimastigota. O derivado **DL07** mostrou ser o mais promissor e, portanto, deu continuidade para os ensaios com curva de concentração para determinação do CI_{50} . Na figura 31 encontra-se apresentado o gráfico da atividade do derivado em questão sobre amastigotas intracelulares de *T. cruzi*, onde observamos que o valor de CI_{50} encontrado foi de $1,23 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, o que demonstra o alto potencial tripanocida da substância, sendo um bom candidato para continuidade dos estudos, como os ensaios *in vivo* e estudos bioquímicos de mecanismo de ação.

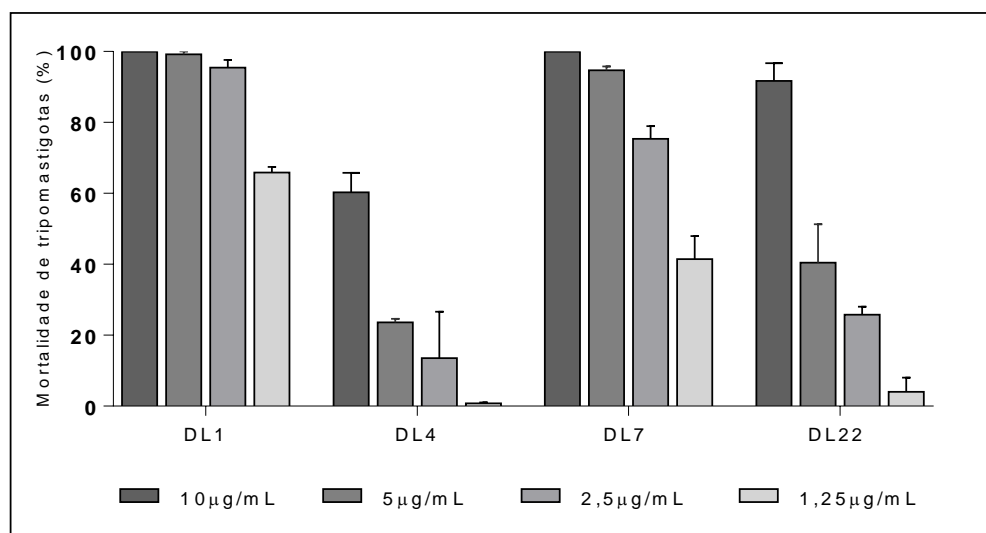
Figura 31 – Gráfico da atividade de DL07 sobre amastigotas intracelulares de *T. cruzi*.



Fonte: Da autora.

Por fim, foi realizado um ensaio de atividade anti-tripomastigota com quatro derivados, a licarina A (**DL01**), o protótipo (**DL04**), e os derivados **DL07** e **DL22**. Os resultados obtidos nessa análise são observados na figura 32. Assim como visto nos ensaios anteriores, a licarina A é a substância com maior efeito também contra a forma tripomastigota do *T. cruzi*, seguido do derivado **DL07**, que até em baixas concentrações consegue uma alta mortalidade dos parasitos.

Figura 32 – Gráfico da atividade anti-tripomastigota das substâncias DL01, DL04, DL07 e DL22.



Fonte: Da autora.

Notas: Tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* foram incubados por 24 horas com concentrações decrescentes das substâncias (1,25 a 10 µg/mL). A quantificação dos parasitos vivos foi feita em câmara de Neubauer.

Na tabela abaixo (TABELA 2) encontram-se os valores de concentração das substâncias efetivas para a morte de 50% e de 90% dos parasitos. Analisando esses dados podemos observar que as substâncias **DL01** e **DL07** apresentaram valores próximos de concentração anti-tripomastigota, sendo as mais promissoras. Diante disso, e com base nos resultados de toxicidade em células saudias, o derivado **DL07** foi um bom candidato para seguir com os estudos de atividade *in vivo*.

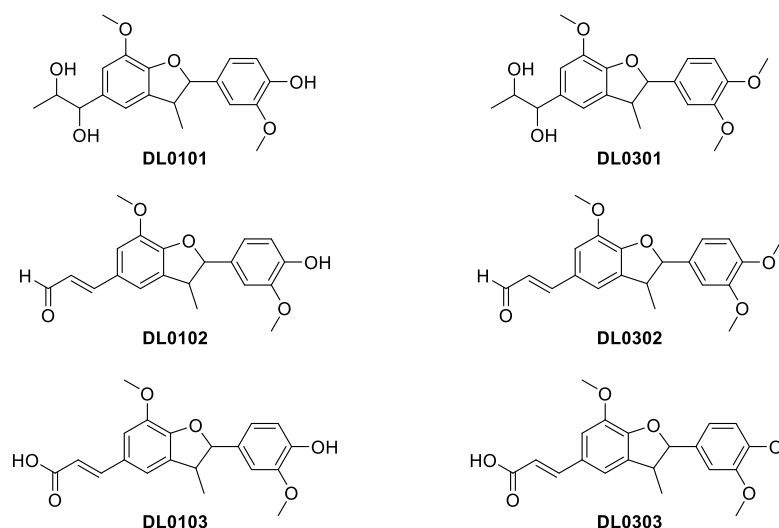
Tabela 2 – Atividade anti-tripomastigota de *T. cruzi*.

Substância	EC-50 (µg/mL)	EC-50 (µmol.L ⁻¹)	EC-90 (µg/mL)	EC-90 (µmol.L ⁻¹)
DL01	0,77	2,36	2,45	7,51
DL07	1,47	2,97	3,79	7,81
DL22	5,05	10,50	22,48	46,74

Fonte: Da autora.

Além desse primeiro grupo de vinte derivados, foram avaliados outros seis novos derivados (FIGURA 33) que não apresentam em sua estrutura o substituinte 4-cloro-benzílico do protótipo, mas possuem as outras modificações estruturais que se mostraram mais ativas, a fim de analisar a influência desse substituinte na hidroxila fenólica. Essas substâncias foram analisadas contra as formas amastigotas e tripomastigotas do parasito, que são as formas evolutivas presentes no homem.

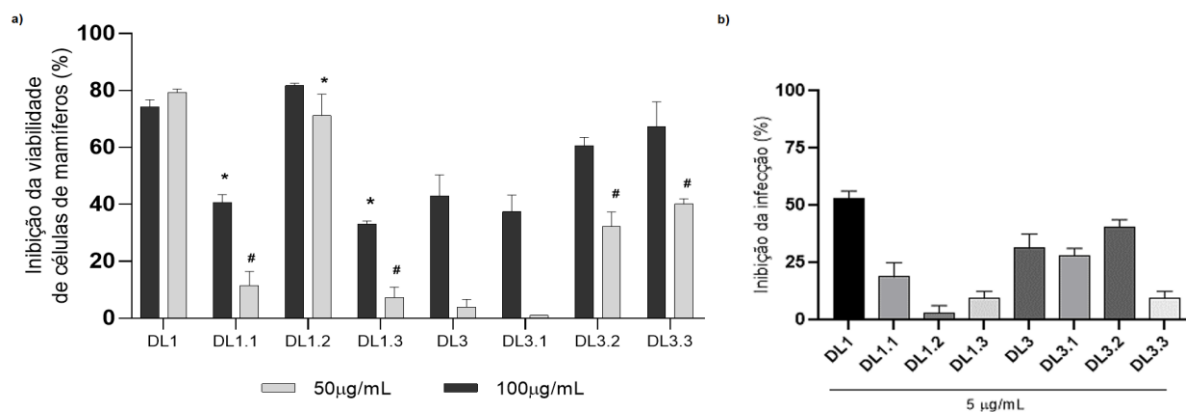
Figura 33 – Estrutura química do segundo grupo de derivados.



Fonte: Da autora.

Na figura 34a, encontra-se apresentado o gráfico da porcentagem de inibição da viabilidade celular quando em contato com as substâncias de estudo. De forma geral, observa-se que as substâncias com a hidroxila livre apresentaram uma maior citotoxicidade do que aquelas que possuem essa hidroxila bloqueada por um grupo metila. Fato este que apenas não é observado para os derivados contendo ácido carboxílico em sua estrutura, no qual aquele com a hidroxila fenólica livre mostrou-se menos tóxico.

Figura 34 – Gráficos dos ensaios de citotoxicidade e contra a forma amastigota para o segundo grupo de substâncias sintetizadas.



Fonte: Da autora.

Notas: (a) gráfico da porcentagem de inibição da viabilidade celular para células de mamíferos. As barras representam média e SD de dois experimentos independentes. Os símbolos indicam diferença significativa ($p < 0,05$) comparativamente à substância precursora na concentração de 100 µg/mL (*) ou 50 µg/mL (#) utilizando o teste *Dunnett's multiple comparisons.*, (b) gráfico da porcentagem de inibição da infecção de células tratadas.

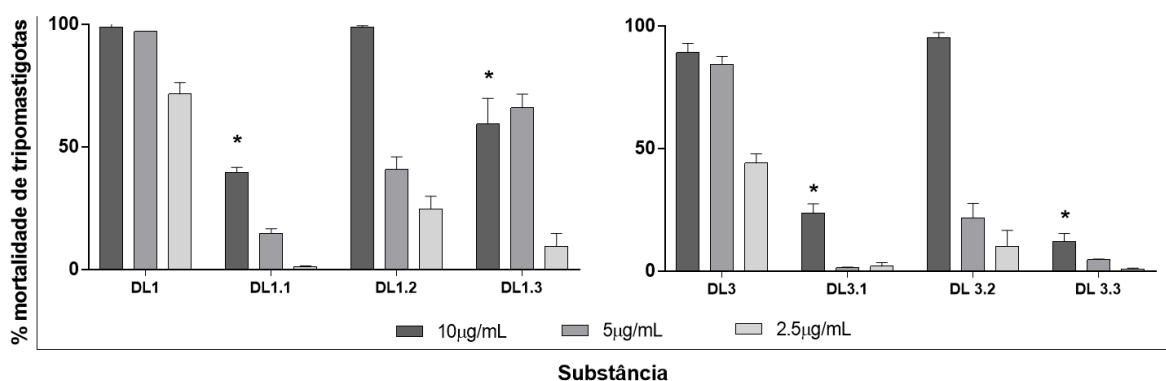
A presença do grupo aldeído na estrutura mostrou ser a modificação que ocasiona maior efeito tóxico. Esta alteração somada à hidroxila fenólica livre, presente no derivado **DL0102**, levou ao resultado de maior efeito citotóxico, juntamente ao do precursor, licarina A (**DL01**). Neste caso, mesmo a diminuição da concentração utilizada não levou a diminuição significativa do efeito observado.

Os resultados obtidos no ensaio contra formas amastigotas encontram-se apresentados na figura 34b. Neste gráfico observa-se que todos os derivados avaliados não obtiveram uma porcentagem de inibição da infecção superior a 50%, valor esse inferior ao encontrado para o benznidazol que na concentração de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ inibe cerca de 80% da infecção pelo parasito. A substância com maior atividade foi a licarina A (**DL01**), seguida dos derivados metilados **DL0302**, **DL03** e **DL0301**. A maior atividade dos derivados metilados pode estar associada ao fato de possuírem um maior logP, o que facilitaria a passagem pela membrana celular.

No gráfico 35 estão apresentados os resultados da atividade desse segundo grupo de derivados contra a forma tripomastigota do parasito. De forma geral, esse grupo não apresentou atividade significativa quando avaliado a porcentagem de mortalidade dos parasitos. A licarina A (**DL01**) foi a substância com maior atividade contra a forma tripomastigota em todas as concentrações, com mortalidade superior a 70% quando utilizada a menor concentração de 2,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, em seguida o derivado **DL03**, precursor do grupo metilado, apresentou alta mortalidade dos parasitos, especialmente nas concentrações mais altas. Dos novos derivados propostos, apenas aqueles com o grupo aldeído em sua estrutura (**DL0102** e **DL0302**) conseguiram alcançar uma elevada mortalidade dos parasitos quando tratados com 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de substância.

Ao correlacionar os dados apresentados, nota-se que, de forma geral, as substâncias mais ativas apresentam, também, uma maior citotoxicidade. Os resultados frente as formas amastigotas e tripomastigotas do parasito foram distintos, sobretudo para **DL0102**, que não apresentou atividade significativa para amastigota, podendo estar relacionado a sua capacidade de alcançar o interior celular e, com isso, o parasito.

Figura 35 – Gráfico da atividade anti-tripomastigota para o segundo grupo de substâncias sintetizadas.



Fonte: Da autora.

Nota: Tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* foram incubados por 24 horas com concentrações decrescentes das substâncias (2,5; 5,0 a 10 µg/mL). A quantificação dos parasitos vivos foi feita em câmara de Neubauer. Os símbolos indicam diferença significativa ($p < 0,05$) comparativamente à substância precursora utilizando teste *T*.

O derivado mais promissor deste segundo grupo de substâncias, mediante os resultados apresentados, foi **DL0302**, que apresentou significativa atividade tanto contra as formas amastigotas quanto com as formas tripomastigotas do parasito. Porém, esse resultado ainda é inferior ao encontrado para o derivado **DL07**, do primeiro grupo de substâncias e, portando, o seguimento dos estudos foi realizado com a licarina A (**DL01**), precursora dos derivados, e com **DL07**, que foi o de melhor atividade tripanocida contra todas as formas evolutivas do parasito.

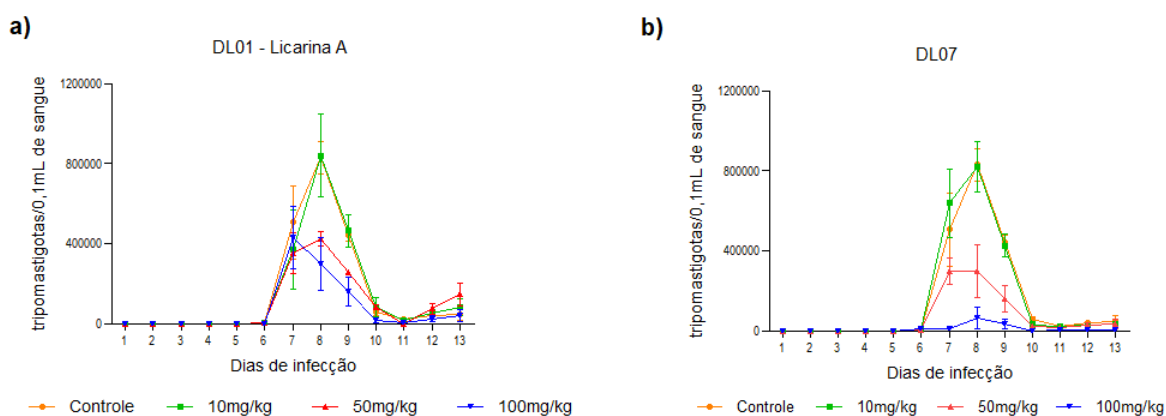
As substâncias selecionadas, **DL01** e **DL07**, foram encaminhadas para a realização dos estudos de atividade *in vivo* para avaliação do potencial em reduzir a parasitemia. A partir do quinto dia de infecção foi confirmada a infecção e iniciado o tratamento. A confirmação da infecção e a avaliação da parasitemia foi realizada através do exame de sangue fresco, onde o sangue foi coletado da veia caudal, seguindo à análise das lâminas e contagem dos parasitos de acordo com o método de Brener (1962). Essa contagem foi realizada até o décimo terceiro dia de infecção, após esse período permaneceu apenas a avaliação do peso dos animais e acompanhamento da mortalidade.

Na figura 36 tem-se apresentados os gráficos de parasitemia dos camundongos tratados com a substância **DL01**, em a), e com a **DL07**, em b). Para **DL01** observa-se que o grupo tratado com a dosagem de 10 mg.kg⁻¹ apresentou um perfil similar ao grupo controle positivo, indicando que nessa dosagem não houve uma redução do número de parasitos pela substância administrada. Nas concentrações de 50 e 100 mg.kg⁻¹, o perfil de redução da parasitemia foi maior quando comparado ao controle

positivo, podendo ser observado o número máximo de cerca de quatrocentos mil parasitos no pico da parasitemia, e mínimo de cerca de três mil parasitos no décimo primeiro dia, com ligeiro aumento subsequente. Tais dados mostram que **DL01** não foi tão efetiva na redução da parasitemia, mesmo quando administrado na maior dosagem.

Analisando a parasitemia dos camundongos tratados com **DL07** (FIGURA 36b), observa-se um padrão diferente do visto para **DL01**, com maior redução do número de parasitos. Apesar do grupo tratado com 10 mg.kg^{-1} ter apresentado um perfil similar ao grupo controle, o aumento da dosagem levou a uma redução significativa no número de parasitos encontrados. Observa-se essa redução especialmente nos animais que foram tratados na maior concentração, de 100 mg.kg^{-1} , onde no oitavo dia, pico da parasitemia, foram encontrados cerca de sessenta mil parasitos, número este que foi diminuindo chegando a próximo de zero no décimo dia. Com isso, podemos verificar que o uso da substância **DL07** nas concentrações de 50 e, principalmente, na de 100 mg.kg^{-1} teve um efeito positivo na redução da carga parasitária nos animais tratados.

Figura 36 – Curvas de parasitemia realizadas em camundongos experimentalmente infectados por 5000 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y do *T. cruzi* e tratados com as substâncias DL01 (a) e DL07 (b) nas dosagens de 10, 50 e 100 mg/kg .

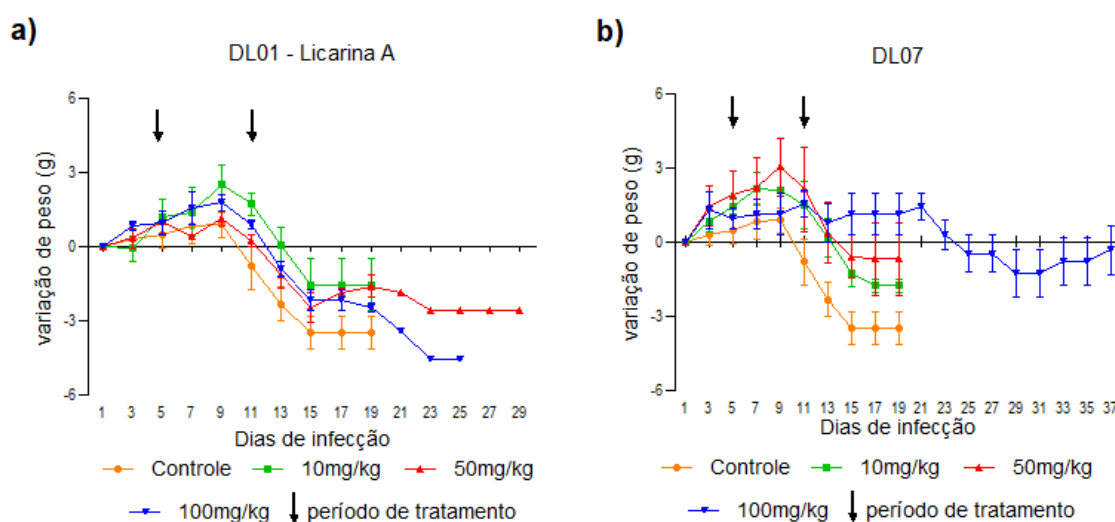


Fonte: Da autora.

A variação de peso dos camundongos também é um quesito importante para verificar se as substâncias utilizadas possuem algum potencial protetor, visto que o aumento da parasitemia leva a debilidade do animal. Além disso, a perda de peso pode ser um indicativo de toxicidade do tratamento. Ao analisar a figura 37, podemos observar que nos animais sem tratamento houve uma redução significativa do peso

dos animais a medida em que a infecção avançava. Esse mesmo comportamento foi notado para os animais tratados com a substância **DL01**, em todas as dosagens. Para aqueles tratados com **DL07** notou-se um ligeiro aumento de peso no início do tratamento com queda após o término nos animais tratados com 10 e 50 mg.kg⁻¹ da substância. Já para o tratado com 100 mg.kg⁻¹ de **DL07** notou-se uma maior constância do peso dos animais, com pequenas variações positivas e negativas, mas dentro de um perfil de normalidade.

Figura 37 – Variação de peso ao longo de 37 dias dos camundongos experimentalmente infectados por 5000 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y do *T. cruzi* e tratados com as substâncias DL01 (a) e DL07 (b) nas dosagens de 10, 50 e 100mg/kg.



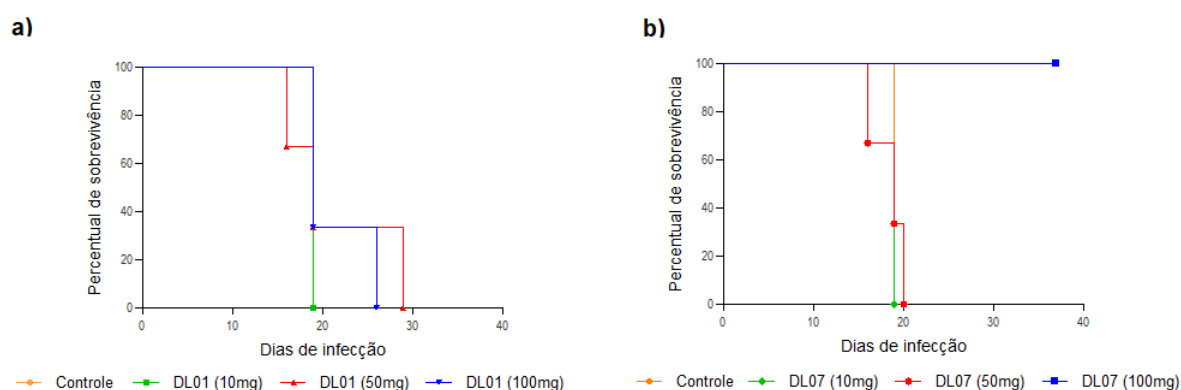
Fonte: Da autora.

Ao verificar os gráficos de percentual de sobrevivência dos camundongos utilizados no estudo (FIGURA 38), podemos afirmar que a maioria dos animais vieram à óbito por volta do vigésimo dia de acompanhamento, o que coincide com um período prévio de redução de peso. Os animais que tiveram uma maior sobrevida foram os tratados com **DL01** em 50 e 100 mg.kg⁻¹, com taxa de sobrevivência de 33%, ou seja, um animal, ambos vindo à óbito antes do trigésimo dia de acompanhamento. Além desses, os animais tratados com 100 mg.kg⁻¹ da substância **DL07** foram acompanhados durante 37 dias, apresentando comportamento, além da variação de peso, dentro da normalidade. Após esse período esses animais foram sacrificados.

Por essa análise podemos constatar que a substância **DL07** apresentou um perfil de proteção dos animais e redução da parasitemia, pois além de diminuir o

número de parasitos no organismo do camundongo, permitiu sua sobrevivência. Outro fato que pode ser ressaltado é que tal substância apresenta baixa toxicidade, visto que os animais tratados com a maior dosagem permaneceram estáveis, enquanto os tratados com as dosagens mais baixas morreram em menos dias, indicando ser um efeito do parasito e não da substância.

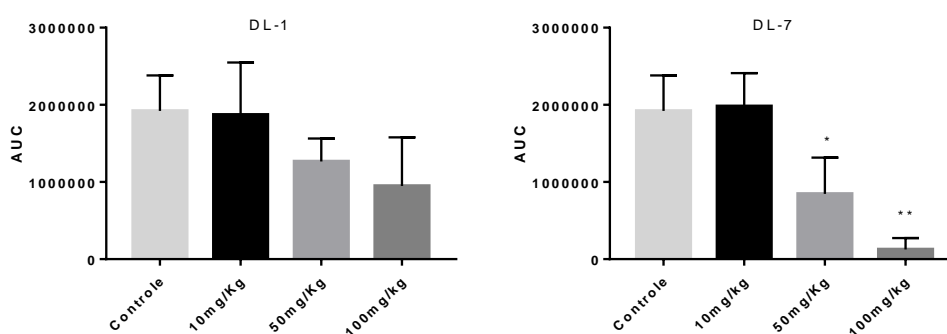
Figura 38 – Percentual de sobrevivência ao longo de 37 dias dos camundongos experimentalmente infectados por 5000 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y do *T. cruzi* e tratados com as substâncias DL01 (a) e DL07 (b) nas dosagens de 10, 50 e 100mg/kg.



Fonte: Da autora.

A atividade observada para o derivado **DL07** pode ser confirmada pelo gráfico apresentado na figura 39, onde podemos verificar que nos camundongos tratados com 50 e 100 mg.kg⁻¹ dessa substância houve uma diminuição significativa da parasitemia. Essa significância é comprovada pela diferença estatística observada nessas duas concentrações.

Figura 39 – Gráficos de área sob a curva dos ensaios *in vivo* das substâncias DL01 e DL07.



Fonte: Da autora.

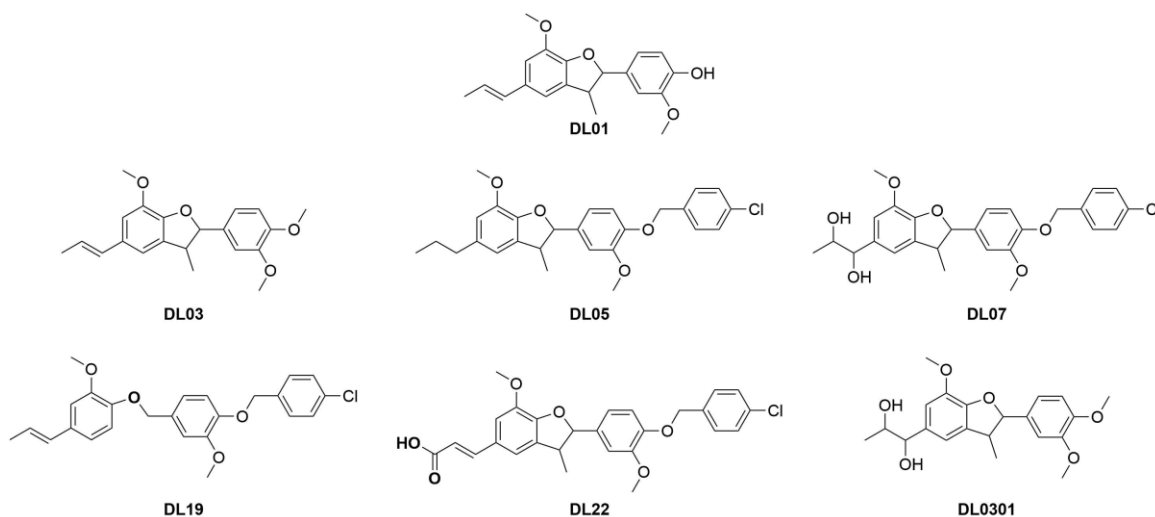
Nota: Os símbolos indicam diferença significativa ($p < 0,05$) comparativamente do grupo controle à substância avaliada na concentração de 50 mg.kg⁻¹ (*) e 100 mg.kg⁻¹ (**) utilizando o teste *Dunnnett's multiple comparisons*.

4.3 ESTUDOS COMPUTACIONAIS

4.3.1 Estudos de ancoragem molecular

Para os estudos de ancoragem molecular foram selecionados alguns dos derivados sintetizados juntamente com aquele de maior atividade, suas estruturas encontram-se apresentadas na figura abaixo (FIGURA 40). A escolha foi realizada com base nos resultados de atividade obtidos e, principalmente, nas diferenças estruturais dos derivados, a fim de reunir representantes de cada grupo de modificação estrutural para que se obtivesse uma coleção de derivados com maior ou menor flexibilidade, mais ou menos grupos polares, maior ou menor tamanho e, portanto, com uma diversidade estrutural capaz de auxiliar na análise do potencial de inibição dessa enzima.

Figura 40 – Estrutura química dos derivados selecionados para estudo de ancoragem molecular.



Fonte: Da autora.

Primeiramente, antes da realização da ancoragem molecular em si, foi feito o preparo da enzima e dos ligantes. A estrutura da enzima tripanotona redutase foi obtida a partir do *Protein Data Bank*, sendo utilizada uma estrutura oriunda do parasito *T. cruzi*, complexada com o substrato natural (tripanotona) e com seu cofator (FAD), sob o código 1BLZ, obtida por cristalografia por Bond e colaboradores (1999).

Após esse processo os estudos de ancoragem da enzima com os ligantes foram realizados utilizando o programa AutoDock Vina 1.1.2, foram gerados os valores

de energia de ligação dos complexos enzima-ligante e, para cada ligante, uma série de conformações assumidas pelos ligantes em complexos de baixa energia com a enzima. Para análise, foram selecionados apenas os complexos mais estáveis obtidos para cada ligante. Esses resultados obtidos nos estudos de ancoragem molecular foram analisados por meio dos programas PyMOL e BIOVIA Discovery Studio Visualizer.

Os dados obtidos da energia de ligação entre as substâncias e a enzima, apresentados na tabela 3, nos mostram quais complexos possuem maior estabilidade. Essa correlação é feita avaliando quais substâncias apresentaram menor energia de ligação, ou seja, quais substâncias possuem um menor gasto energético ao interagir com a tripanotona redutase. Quanto menor o gasto energético, maior a estabilidade e, conseqüentemente, maior a afinidade na ligação enzima-substância. Dessa forma, para as substâncias avaliadas, **DL07** apresentou a menor energia de ligação, de $-8,4 \text{ kcal.mol}^{-1}$, indicando ser a de maior afinidade com o sítio ativo da enzima, o que está de acordo com os resultados biológicos obtidos.

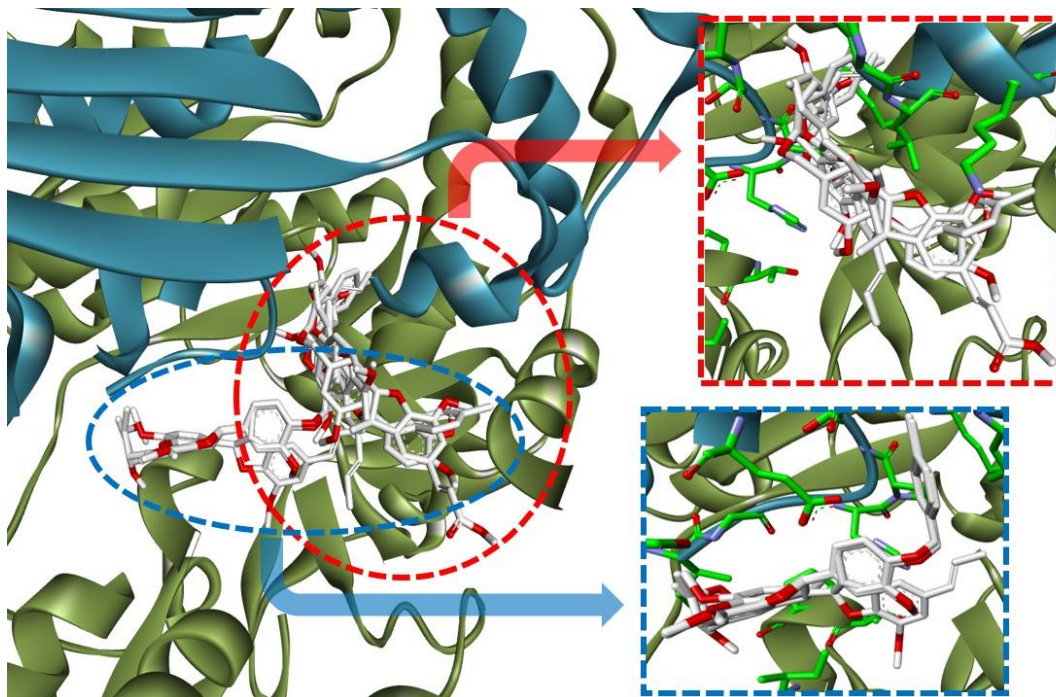
Tabela 3 – Energia de ligação entre as substâncias e a enzima tripanotona redutase em kcal.mol^{-1}

Substância	Energia de ligação (kcal/mol)
DL01	-7,2
DL03	-6,8
DL05	-8,0
DL07	-8,4
DL19	-7,6
DL22	-8,1
DL0301	-7,0

Fonte: Da autora.

Na figura 41 encontra-se apresentada a imagem das estruturas avaliadas ancoradas, de forma sobreposta, ao sítio ativo da tripanotona redutase. Essa enzima é dimérica, ou seja, é constituída por duas cadeias proteicas iguais, que são observadas na imagem nas cores azul e verde. O sítio ativo está localizado na interface das cadeias proteicas, sendo, portanto, formado por aminoácidos de ambas as partes. Nota-se que as substâncias se diferem na forma como ancoram no sítio ativo, subdividindo-as em dois subgrupos, em vermelho o **grupo 01** e em azul o **grupo 02**.

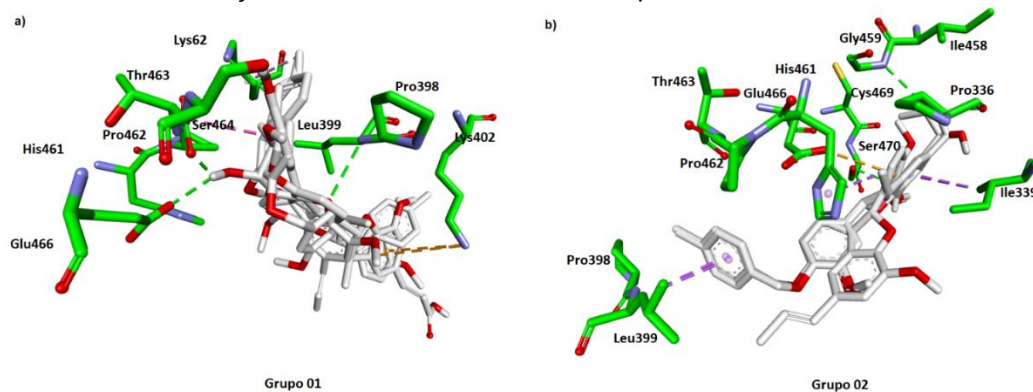
Figura 41 – Imagem das estruturas ancoradas no sítio ativo da enzima tripanotona redutase.



Fonte: Da autora.

Essa diferença de interação desses grupos é observada com mais detalhes na figura 42, onde podemos notar que seis resíduos de aminoácidos permanecem na região de interação de ambos os grupos, sendo eles Glu466, His461, Pro462, Thr463, Leu399 e Pro398. No **grupo 01**, em vermelho, existem três resíduos de aminoácidos diferentes, sendo eles Ser464, Lys62 e Lys402, enquanto no **grupo 02**, em azul, seis resíduos de aminoácidos distintos estão presentes na região de interação, Gly459, Cys469, Ser470, Pro336, Ile339 e Ile458.

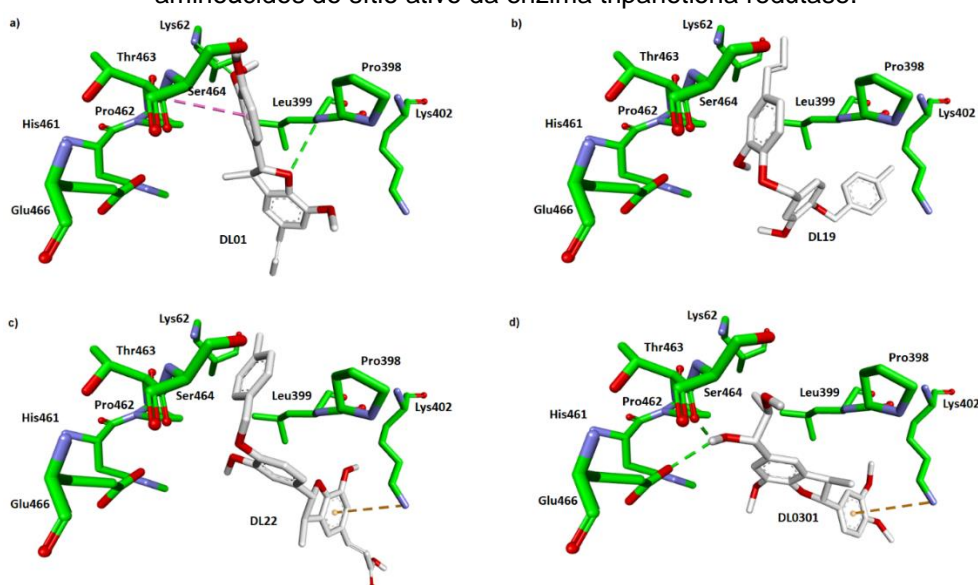
Figura 42 – Grupos das substâncias avaliadas divididos de acordo com sua similaridade de interação com o sítio ativo da enzima tripanotona redutase.



Fonte: Da autora.

Esses grupos foram analisados separadamente, observando as principais interações entre cada uma das substâncias e o sítio ativo da tripanotona redutase. O **grupo 01** é composto pelas substâncias **DL01**, **DL19**, **DL22** e **DL0301**, e as suas interações com a enzima estão demonstrada na figura 43. Em **DL01** observam-se interações do tipo ligação de hidrogênio com o aminoácido Leu399 e interação do tipo amida- π com participação dos aminoácidos Pro462 e Thr463. Para a substância **DL22** destaca-se a interação cátion- π com Lys402 e, por fim, para **DL0301** interações do tipo ligação de hidrogênio com Glu466 e Thr463 e cátion- π com Lys402. As interações de **DL19** e as demais interações das outras substâncias são interações do tipo hidrofóbicas, como as Van der Waals, e não estão apresentadas nas figuras.

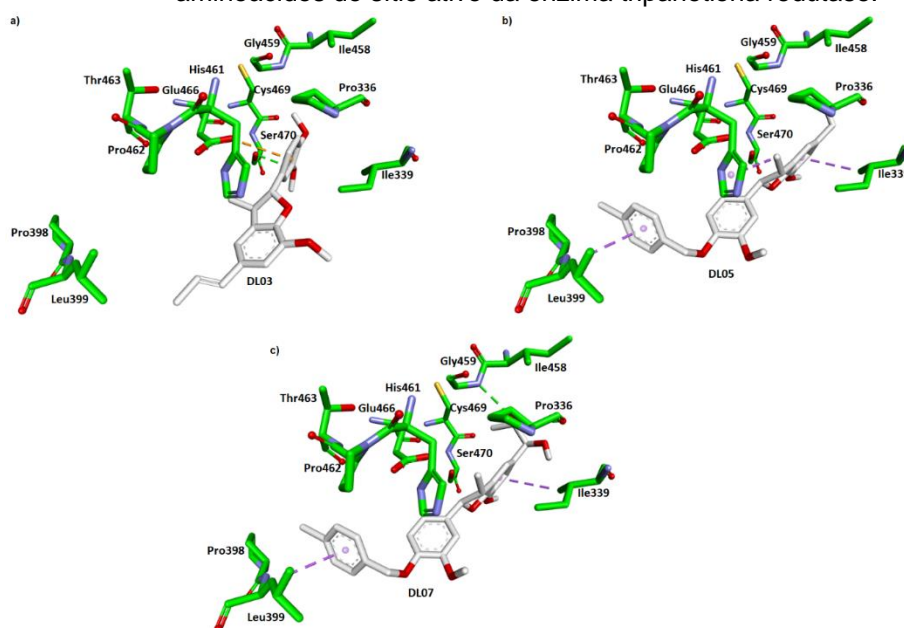
Figura 43 – Interações das substâncias **DL01**, **DL19**, **DL22** e **DL0301** com os aminoácidos do sítio ativo da enzima tripanotona redutase.



Fonte: Da autora.

As substâncias **DL03**, **DL05** e **DL07** possuem forma similar de ancoragem à enzima e, por isso, constituem o **grupo 02**. Analisando as principais interações dessas substâncias temos que **DL03** interage com Glu466 por interação do tipo ânion- π e com Ser470 por ligação de hidrogênio. **DL05** tem interações do tipo sigma- π com os aminoácidos Leu399, His461 e Ile339. Por fim, a substância **DL07** também interage com Ile339 e Leu399 por interação do tipo sigma- π e com o aminoácido Gly459 por ligação de hidrogênio (FIGURA 44).

Figura 44 - Interações das substâncias **DL03**, **DL05** e **DL07** com os aminoácidos do sítio ativo da enzima tripanotona redutase.



Fonte: Da autora.

O fato de **DL07** assumir uma conformação estendida no sítio ativo da tripanotona redutase possibilita com que ele faça um maior número de interações, o que pode ser responsável por essa substância apresentar a menor energia de ligação com a enzima e, além disso, sugere-se que esses fatores se relacionem com a maior atividade de diminuição de parasitemia *in vivo*.

4.3.2 Previsão das propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e metabólicas

O servidor online SwissADME é uma ferramenta online gratuita que permite avaliar parâmetros farmacocinéticos, físico-químicos e metabólicos de diversas substâncias comparando-as com as características de substâncias já conhecidas. Sendo, dessa forma, possível avaliar se as substâncias obtidas apresentam características necessárias para serem utilizadas como um possível fármaco (SHWETA; RASHMI, 2019).

Na tabela 4 encontram-se apresentados dados de propriedades físico-químicas previstas usando o servidor acima mencionado para cálculo, sendo eles a fórmula e massa moleculares, área de superfície polar topológica (TPSA) e o coeficiente de partição (Mlog P).

O parâmetro TPSA está relacionado com a área de superfície de contribuição de grupos polares presentes nas substâncias, interferindo na lipofilia e na permeabilidade de um composto pelas membranas biológicas, onde valores mais baixos de TPSA podem estar relacionados ao acesso facilitado ao sistema nervoso central, e valores muito altos a absorção limitada pelo trato gastrointestinal.

O Mlog P foi obtido a partir do método de Moriguchi e colaboradores (2011), onde são contabilizados os átomos com caráter lipofílico e hidrofílico, de acordo com uma base de dados de mais de 1200 substâncias. Os valores de Mlog P encontrados para os derivados sintetizados encontram-se entre 1,17 e 4,52.

Tabela 4 – Propriedades estruturais e físico-químicas previstas para os derivados sintetizados.

Derivado	Fórmula molecular	Massa molecular (g.mol ⁻¹)	TPSA (Å ²)	MLog P
DL01	C ₂₀ H ₂₂ O ₄	326,39	47,96	2,73
DL02	C ₂₀ H ₂₄ O ₄	328,40	47,92	2,81
DL03	C ₂₁ H ₂₄ O ₄	340,41	36,92	2,95
DL04	C ₂₇ H ₂₇ ClO ₄	450,95	36,92	4,45
DL05	C ₂₇ H ₂₉ ClO ₄	452,97	36,92	4,52
DL06	C ₂₇ H ₂₇ FO ₄	434,50	36,92	4,35
DL07	C ₂₇ H ₂₉ ClO ₄	484,97	77,36	2,88
DL08	C ₂₇ H ₂₇ NO ₆	461,51	82,74	3,02
DL10	C ₂₈ H ₃₀ O ₅	446,53	46,15	3,62
DL11	C ₂₇ H ₂₈ O ₄	416,51	36,92	3,98
DL12	C ₂₃ H ₂₆ O ₄	366,45	36,92	3,31
DL13	C ₂₅ H ₃₀ O ₄	394,50	36,92	3,73
DL14	C ₂₈ H ₃₈ O ₄	438,60	36,92	4,41
DL15	C ₂₇ H ₂₇ ClO ₄	450,95	39,92	4,45
DL16	C ₂₇ H ₂₇ ClO ₄	450,95	36,92	4,45
DL17	C ₂₈ H ₂₇ NO ₄	441,52	60,71	3,28
DL19	C ₂₅ H ₂₅ ClO ₄	424,92	36,92	4,44
DL21	C ₂₇ H ₂₅ ClO ₅	464,94	53,99	3,55
DL22	C ₂₇ H ₂₅ ClO ₆	480,94	74,22	3,55
DL23	C ₂₇ H ₂₇ ClO ₅	466,95	57,15	3,62
DL0101	C ₂₀ H ₂₄ O ₆	360,40	88,36	1,17
DL0102	C ₂₀ H ₂₀ O ₅	340,37	64,99	1,82
DL0103	C ₂₀ H ₂₀ O ₆	356,37	85,22	1,82
DL0301	C ₂₁ H ₂₆ O ₆	374,43	77,38	1,39
DL0302	C ₂₁ H ₂₂ O ₅	354,40	53,99	2,04
DL0303	C ₂₁ H ₂₂ O ₆	370,40	74,22	2,04

Fonte: Da autora.

As propriedades farmacocinéticas previstas para os derivados (tabela 5) englobam dados sobre a probabilidade de serem absorvidos no trato gastrointestinal, a permeabilidade deles pela barreira hematoencefálica, se podem ser substrato da glicoproteína P, a permeabilidade cutânea ($\log K_p$), obediência as regras de Lipinski e a possibilidade de se comportarem como PAINS, previsto pela análise de grupos presentes nas substâncias que podem levar a ocorrência de falsos resultados durante ensaios biológicos.

Com exceção do derivado **DL14**, que possui grupo hidrofóbico volumoso, todos os derivados sintetizados possuem alta permeabilidade no trato gastrointestinal, característica positiva pois indica que essas substâncias podem ser administradas por via oral. Em relação a possibilidade de ultrapassar a barreira hematoencefálica, a maioria das substâncias não possui essa capacidade, sendo uma característica positiva, visto que se busca uma ação periférica dos compostos, considerando que os parasitos alvos se encontram presentes na corrente sanguínea e em células do tecido cardíaco. O fato de alguns derivados ultrapassarem a barreira hematoencefálica pode se relacionar a um aumento dos efeitos adversos relacionados ao sistema nervoso central, o que é um fator negativo.

A glicoproteína P é uma macromolécula que possui diversas funções, como atuar como bomba de efluxo e, desta forma, pode estar relacionada a casos de desenvolvimento de resistência por parasitos à fármacos. Sendo assim, as substâncias que foram preditas como substrato dessa macromolécula possuem uma maior probabilidade do parasito, caso expresse essa proteína, desenvolver resistência a essas substâncias (HUANG et al, 2007). A maioria dos derivados sintetizados possui a característica de ser substrato da glicoproteína P, o que exige atenção com relação a sua utilização.

O parâmetro $\log K_p$ consiste no coeficiente de permeabilidade cutânea das substâncias analisadas, sendo que quanto mais negativo for o valor obtido, menor a permeabilidade cutânea dessa substância (PELOZO et al, 2021). Ao avaliar os valores obtidos podemos observar que as substâncias com menor permeabilidade cutânea são aquelas que possuem um menor $MLog P$, ou seja, substâncias com características mais hidrofílicas e, portanto, com menor propensão a atravessar as barreiras biológicas.

O próximo parâmetro a ser analisado é a obediência das substâncias analisadas à Regra de Lipinski. Para uma substância ser considerada adequada a ter boa biodisponibilidade oral, ela deve apresentar massa molecular igual ou abaixo de 500 Da, número de grupos doadores de ligação de hidrogênio (HBD) menor ou igual a 5, número de grupos aceptores de ligação de hidrogênio (HBA) igual ou menor que 10 e logaritmo do coeficiente de partição (log P) menor ou igual a 5 (ou MLog P menor ou igual a 4,15) (LIPINSKI *et al.*, 2001). Apenas sete substâncias analisadas violaram um dos parâmetros da regra de Lipinski, em todos os casos por possuírem um valor de MLog P maior que 4,15, porém, por se tratar da violação de apenas um dos quesitos englobados na regra, todas as substâncias ainda estão aptas a possuírem uma boa biodisponibilidade oral.

Já em relação à presença de grupos que podem alterar a confiabilidade dos resultados obtidos em ensaios biológicos, gerando resultados falsos, conhecido como PAINS, nenhuma substância avaliada apresentou algum alerta nesse sentido.

Tabela 5 – Propriedades farmacocinéticas previstas para os derivados sintetizados.

(continua)

Derivado	Absorção TGI	Permeabilidade BHE	Substrato glicoproteína P	Log Kp (cm.s ⁻¹)	Violação – Regra de Lipinski	PAINS
DL01	Alta	Sim	Não	-5,18	0	0
DL02	Alta	Sim	Não	-4,96	0	0
DL03	Alta	Sim	Não	-5,03	0	0
DL04	Alta	Não	Sim	-4,20	1*	0
DL05	Alta	Não	Sim	-3,96	1*	0
DL06	Alta	Não	Sim	-4,48	1*	0
DL07	Alta	Não	Sim	-5,91	0	0
DL08	Alta	Não	Não	-4,83	0	0
DL10	Alta	Não	Sim	-4,64	0	0
DL11	Alta	Não	Sim	-4,44	0	0
DL12	Alta	Sim	Não	-4,74	0	0
DL13	Alta	Sim	Não	-4,30	0	0
DL14	Baixa	Não	Sim	-3,21	1*	0
DL15	Alta	Não	Sim	-4,20	1*	0
DL16	Alta	Não	Sim	-4,20	1*	0
DL17	Alta	Não	Sim	-4,79	0	0
DL19	Alta	Não	Sim	-4,33	1*	0
DL21	Alta	Não	Sim	-5,08	0	0
DL22	Alta	Não	Sim	-5,14	0	0

(conclusão)						
Derivado	Absorção TGI	Permeabilidade BHE	Substrato glicoproteína P	Log Kp (cm.s ⁻¹)	Violação – Regra de Lipinski	PAINS
DL23	Alta	Não	Sim	-5,19	0	0
DL0101	Alta	Não	Sim	-6,89	0	0
DL0102	Alta	Sim	Não	-6,06	0	0
DL0103	Alta	Não	Não	-6,12	0	0
DL0301	Alta	Sim	Sim	-6,74	0	0
DL0302	Alta	Sim	Não	-5,91	0	0
DL0303	Alta	Sim	Não	-5,97	0	0

Fonte: Da autora.

Notas: TGI: trato gastrointestinal; BHE: barreira hematoencefálica; log Kp: permeabilidade cutânea; PAINS: (*pan-assay interference compounds*) grupos presentes nas substâncias que interferem nos resultados biológicos; (*) violação referente à MLogP maior ou igual que 4,15.

Por fim, foram avaliadas as propriedades metabólicas dos derivados sintetizados (TABELA 6). Essa avaliação foi realizada com as isoformas CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A4 da enzima citocromo P450 (CYP450), através da predição da interferência do metabolismo de xenobióticos processados por elas (PELOZO et al, 2021). Dentre as substâncias analisadas, nenhuma teve interação com a isoforma CYP1A2, por outro lado a maioria dos derivados foram previstos como inibidores da CYP2D6, indicando que poderá haver uma alteração no metabolismo de substâncias que são processadas por essa via.

Tabela 6 – Propriedades metabólicas previstas para os derivados sintetizados.

(continua)					
Derivado	Inibidor CYP1A2	Inibidor CYP2C19	Inibidor CYP2C9	Inibidor CYP2D6	Inibidor CYP3A4
DL01	Não	Sim	Sim	Sim	Não
DL02	Não	Sim	Não	Sim	Sim
DL03	Não	Sim	Sim	Sim	Sim
DL04	Não	Não	Sim	Sim	Não
DL05	Não	Não	Não	Sim	Não
DL06	Não	Não	Sim	Sim	Sim
DL07	Não	Não	Não	Sim	Sim
DL08	Não	Sim	Sim	Não	Sim
DL10	Não	Não	Sim	Sim	Não
DL11	Não	Não	Sim	Sim	Sim
DL12	Não	Sim	Sim	Sim	Sim
DL13	Não	Não	Sim	Sim	Sim

(conclusão)					
Derivado	Inibidor CYP1A2	Inibidor CYP2C19	Inibidor CYP2C9	Inibidor CYP2D6	Inibidor CYP3A4
DL14	Não	Não	Não	Sim	Não
DL15	Não	Não	Sim	Sim	Não
DL16	Não	Não	Sim	Sim	Não
DL17	Não	Sim	Sim	Não	Sim
DL19	Não	Não	Sim	Sim	Não
DL21	Não	Sim	Sim	Não	Sim
DL22	Não	Sim	Sim	Não	Sim
DL23	Não	Sim	Sim	Sim	Sim
DL0101	Não	Não	Não	Sim	Não
DL0102	Não	Sim	Sim	Sim	Sim
DL0103	Não	Não	Sim	Não	Não
DL0301	Não	Não	Não	Sim	Sim
DL0302	Não	Sim	Sim	Sim	Sim
DL0303	Não	Sim	Sim	Não	Sim

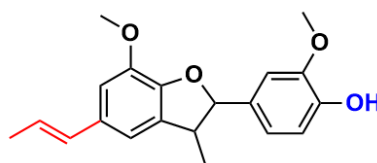
Fonte: Da autora.

4.3.3 Relação estrutura-atividade dos derivados sintetizados

O estudo das relações estrutura-atividade tem como objetivo definir, de forma mais exata possível, os limites da variação estrutural em uma determinada substância na qual permaneça a atividade biológica esperada e, também, a forma como as alterações realizadas influenciam na potência dessa atividade biológica (Lipnick, 1995).

Durante este trabalho foram propostas alterações estruturais na neolignana licarina A, com o intuito de otimizar sua atividade tripanocida. Os vinte e cinco derivados sintetizados têm como pontos principais de modificação a cadeia propenílica, destacada em vermelho, e a hidroxila fenólica, destacada em azul (figura 45).

Figura 45 – Estrutura química da licarina A



Fonte: Da autora.

A partir dos dados de atividade biológica obtidos e apresentados anteriormente, alguns pontos importantes relacionados às estruturas desses derivados podem ser destacados. Primeiramente, ao observar o efeito citotóxico dessas substâncias pode-se inferir que a permanência da hidroxila fenólica livre está relacionada a maior toxicidade, como foi visto para os derivados **DL01** e **DL02** do primeiro grupo, e para os derivados **DL0101**, **DL0102** e **DL0103** do segundo grupo. Assim, o bloqueio dessa região por meio de reações de esterificação mostrou ser uma boa estratégia para a diminuição da citotoxicidade.

Apesar de o bloqueio da hidroxila fenólica ser uma importante estratégia, essa ação também levou a diminuição da atividade tripanocida dos derivados da licarina A ou, até mesmo, à extinção por completo de sua atividade. Esse fato pode ser observado na maioria dos derivados avaliados, nos quais foi realizado apenas esse tipo de modificação e, diante disso, os valores de CI_{50} obtidos ficaram acima de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ nos ensaios contra a forma epimastigota do parasito, valor muito acima do encontrado para o fármaco de referência, o benznidazol ($CI_{50} 18,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e para a própria licarina A ($CI_{50} 34,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$).

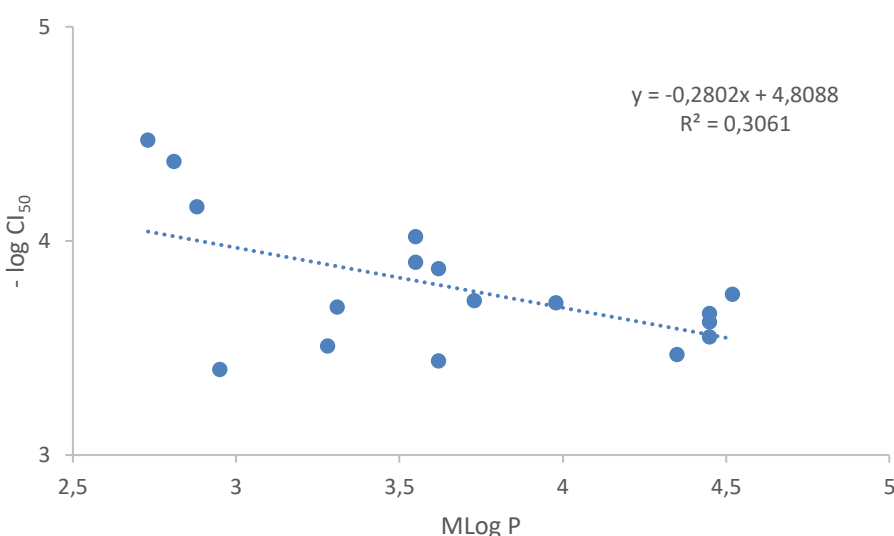
Os demais derivados, que possuem também alteração na cadeia propenólica, demonstraram um melhor perfil de atividade do que aqueles apenas com a hidroxila fenólica bloqueada. Essas substâncias possuem em sua estrutura grupos oxigenados, seja aldeído (**DL21**), ácido carboxílico (**DL22**), álcool primário (**DL23**) ou diol oriundo de abertura de epóxido (**DL07**), além do grupo 4-cloro benzila bloqueando a hidroxila fenólica.

Mesmo que as alterações realizadas apenas na hidroxila fenólica não tenham tido um impacto positivo na atividade dos derivados, essa alteração somada as realizadas na cadeia propenólica levaram a resultados promissores. Isto pode ser comprovado com os estudos de atividade biológica do segundo grupo de derivados propostos, onde as alterações apenas da cadeia propenólica não geraram resultados consideráveis de atividade, bem como a inserção de apenas um grupo metila à hidroxila fenólica também não levou ao impacto esperado. Com isso, conclui-se que a presença de um grupo volumoso na região da hidroxila fenólica é importante para a interação com o sítio de ligação, como visto nos estudos de ancoragem molecular, onde o grupo 4-cloro benzila interage

com a tripanotona redutase por meio de interações do tipo sigma, ânion ou cátion- π .

As propriedades físico-químicas dos derivados também são um parâmetro importante a ser avaliado, especialmente quanto a questão do caráter lipofílico. Na figura 46, está apresentado um gráfico do logaritmo de CI_{50} encontrado para o primeiro grupo de substâncias contra a forma epimastigota do parasito em função da lipofilicidade determinada para cada uma dessas substâncias (MLog P). De acordo com Barreiro e Fraga (2008), os fármacos que apresentam maior coeficiente de partição possuem uma tendência a ultrapassar as barreiras biológicas, que possuem um caráter hidrofóbico, com maior facilidade e, com isso, apresentar um melhor perfil farmacológico. Porém, ao analisarmos o gráfico abaixo, percebe-se que não há uma relação direta entre a lipofilicidade das substâncias com a atividade tripanocida, visto que os dados se encontram bastante dispersos e levando a uma equação com um baixo valor de R^2 , indicando alta variabilidade e ausência de tendência. Além disso, as substâncias com maior atividade possuem um menor valor de MLog P, contrariando o que é observado na literatura.

Figura 46 – Gráfico do $-\log CI_{50}$ em epimastigotas em função do MLog P

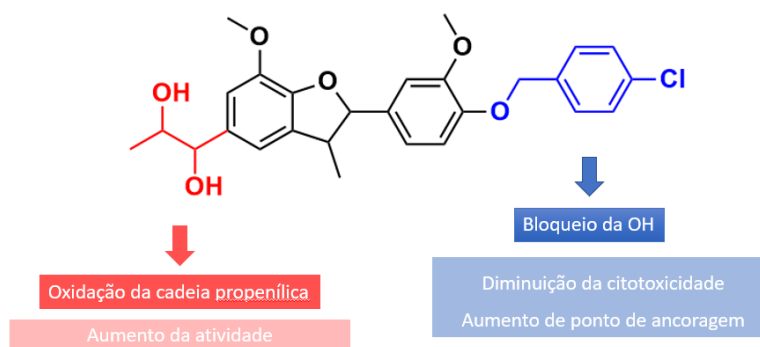


Fonte: Da autora.

Por fim, pode-se concluir que a oxidação da cadeia propenólica da licarina A, a qual levou a formação de um derivado di-hidroxiado, somado a presença de um grupo

éter 4-cloro benzílico, resultou em uma substância com boa atividade tripanocida e baixa citotoxicidade, comprovado pelos estudos *in vitro* e *in vivo*. Pelos estudos de ancoragem molecular observou-se que a presença das hidroxilas auxilia na ligação à tripanotiona redutase, bem como o grupo 4-cloro benzílico, levando a uma maior estabilidade na interação com a enzima, com conseqüente diminuição da energia de ligação necessária.

Figura 47 – Pontos de modificação estrutural do derivado **DL07**.



Fonte: Da autora.

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho, foram sintetizados vinte e cinco derivados da Licarina A, dos quais os produtos **DL05**, **DL07**, **DL08**, **DL10**, **DL13**, **DL14**, **DL15**, **DL16**, **DL0103**, **DL0302** e **DL0303** são inéditos. Os derivados **DL04**, **DL06**, **DL17**, **DL19**, **DL21**, **DL22** e **DL23** foram publicados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa, paralelamente à execução deste trabalho. Ao se avaliar os resultados obtidos em ensaios preliminares contra a forma epimastigota de *T. cruzi*, notou-se que a atividade encontrada era menor do que a esperada. Dessa forma, optou-se por sintetizar um pequeno grupo adicional de seis novos derivados, a fim de se obter resultados mais completos sobre a influência do grupo 4-cloro-benzílico na atividade tripanocida. Pelos resultados obtidos da avaliação de atividade tripanocida *in vitro* de todos os derivados sintetizados, os derivados **DL07**, **DL21**, **DL22** e **DL23**, do primeiro grupo e **DL0302**, do segundo grupo, foram as mais promissoras, sendo que apenas o derivado **DL07** apresentou resultado significativo para ser encaminhado para os ensaios *in vivo*, no qual mostrou ser uma substância com capacidade tripanocida importante na concentração de 100 mg.kg⁻¹, gerando menor mortalidade que a licarina A aos animais de experimentação.

Pelos estudos computacionais foi possível observar que o grupo 4-cloro-benzílico tem papel importante como um ponto extra de ancoragem à tripanotona redutase, sendo o derivado **DL07** o que apresentou menor energia de ligação, indicando possuir a interação mais estável com a enzima. Além disso, foi possível observar pela previsão dos parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos que essa é uma substância com boa capacidade de ser absorvida por via oral, sem atingir o sistema nervoso central.

Diante disso, pode-se concluir que a inserção do grupo 4-cloro benzílico e a cadeia propenólica di-hidroxilada levaram a formação do derivado com melhor atividade tripanocida, o **DL07**, tanto quando analisamos os ensaios biológicos quanto os computacionais, superando o observado para o precursor (licarina A – **DL01**). Sendo assim, **DL07** é um bom candidato para seguir com estudos aprofundados de atividade tripanocida *in vivo*, incluindo análises histológicas. Referente a parte estrutural, podem ser pesquisadas técnicas mais efetivas de separação quiral para analisar a atividade dos enantiômeros isoladamente.

6 PARTE EXPERIMENTAL

6.1 MÉTODOS DE SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

As etapas sintéticas foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Química Farmacêutica (LQFar) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNIFAL-MG. Os derivados propostos são majoritariamente inéditos, e foram obtidos a partir de diversas etapas sintéticas empregando metodologias atuais e clássicas. O planejamento sintético seguido teve como ponto de partida o acetato de isoeugenol (Sigma-Aldrich®) adquirido comercialmente, devido a sua maior estabilidade.

A evolução das reações de síntese foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando placas de sílica gel em suporte de alumínio com detector de fluorescência (Macherey-Nagel, DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra Sil G/UV254). As purificações por cromatografia em coluna de sílica (CCS) foram realizadas com sílica gel 60, 70-230 mesh (Sorblin). Os eluentes empregados estão descritos em cada procedimento. As reações realizadas sob irradiação de ultrassom foram efetuadas em banho ultrassônico Cristófoli, operando na faixa de 50-60 Hz.

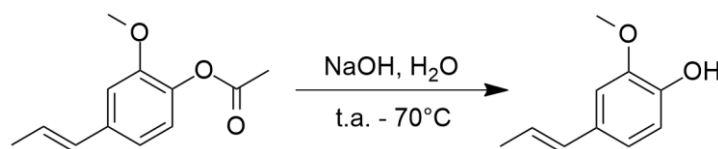
As determinações de faixa de fusão foram realizadas em aparelho Bücher 535 (0-300 °C), calibrado com vanilina P.A. Merck® (P.F.: 80–81 °C, LAYEK *et al.*, 2011). Os valores de logP foram calculados utilizando-se o software ACD/Log P DB, desenvolvido pela Advanced Chemistry Development® (versão 6.0; 2002). O poder rotatório das substâncias quirais foi avaliado em polarímetro Quimis® (modelo Q760M2).

As análises de espectroscopia na região do infravermelho (IV) foram realizadas no Laboratório de Análise Química de Fármacos da UNIFAL-MG, e obtidas em espectrômetros Thermo Scientific Nicolet-iS50, com dispositivo ATR, e os valores foram descritos em número de onda ($\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm^{-1}). Os espectros de massas de alta resolução foram adquiridos em um equipamento Bruker Daltonics micrOTOF QII/ESI-TOF (sistema de ionização por *eletronspray*/ESI). As amostras foram submetidas para análise através de bomba de infusão, com fluxo de 1,0 $\mu\text{L}/\text{min}$ operando no modo positivo. Tais análises foram realizadas no Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos, da Universidade de São Paulo, sede de Ribeirão Preto.

As análises de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C foram realizadas no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da UNIFAL-MG, obtidas em espectrômetro Bruker AC-300. Os resultados foram processados com o programa MestReNova, desenvolvido pela Mestrelab Research S.L.® (versão 14.1.2; 2019). Foi empregado como padrão interno o tetrametilsilano (TMS) e como solventes clorofórmio deuterado (CDCl_3) ou dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO}-d_6$). Os valores de deslocamento químico são dados em partes por milhão (δ , ppm). A numeração representada nas figuras não condiz com a numeração associada ao seu nome químico, mas foi empregada para se efetuar a atribuição dos sinais de RMN.

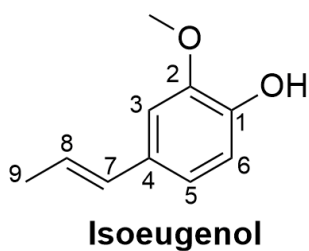
6.1.1 Hidrólise do acetato de isoeugenol

Figura 48 – Reação de Hidrólise do acetato de isoeugenol.



Fonte: Da autora.

Foi adicionado em um balão de fundo redondo 48,5 mmol de acetato de isoeugenol (10,0 g) e 100,0 mL de água destilada. A suspensão foi colocada em agitação magnética a temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 121,3 mmol de NaOH (4,85 g) solubilizados em 50,0 mL de água destilada. Após 15 horas de reação, a mesma foi colocada em aquecimento a 70°C. O término da reação foi identificado por CCD, usando como eluente clorofórmio e metanol (9,75:0,25; v/v), após 3 horas de aquecimento. A mistura reagente foi resfriada em banho de gelo e o pH ajustado para 1,0 com HCl concentrado. O produto foi extraído da fase aquosa com diclorometano. As frações foram reunidas e secas com sulfato de sódio anidro, removeu-se o sal por filtração simples. O filtrado, contendo o produto, foi concentrado em rotaevaporador. O produto foi purificado por CCS, usando como eluente hexano e acetato de etila (9,0:1,0; v/v).



(*E*)-2-metoxi-4-(prop-1-en-1-il)fenol

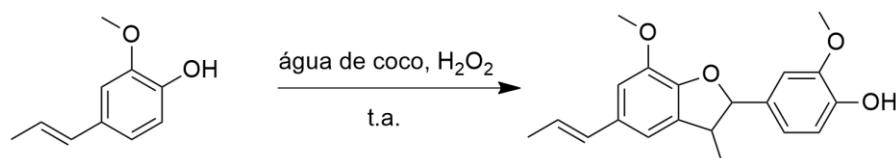
Líquido amarelo claro

Rendimento: 75% - 6,0 g (36,5 mmol) a partir de 10,0 g (48,5 mmol)

F.M.: C₁₀H₁₂O₂ **M.M.:** 164,2 g.mol⁻¹

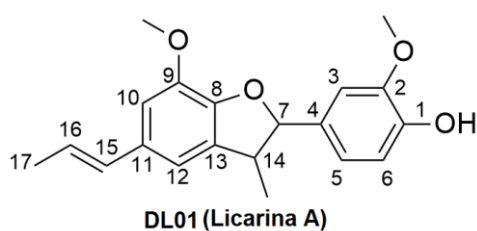
6.1.2 Síntese da licarina A via peroxidase presente em água de coco (Rodrigues *et al.*, 2017)

Figura 49 – Reação de síntese da licarina A via água de coco.



Fonte: Da autora.

Em um balão de fundo redondo adicionou-se 1,0 L de água de coco fresco, filtrada, e 6,1 mmol de isoeugenol (1,0 mL). Deixou-se a mistura reacional sob agitação magnética à temperatura ambiente. Após a homogeneização, foram adicionados 3,7 mmol de peróxido de hidrogênio 30,0% v/v, (0,5 mL). A reação foi acompanhada por CCD usando como eluente hexano e acetato de etila (8,0:2,0; v/v). Após 20 horas de reação foi identificado o término da mesma, fez-se, então, uma extração líquido-líquido com diclorometano a fim de retirar o produto da fase aquosa. As fases orgânicas foram reunidas, secas com sulfato de sódio anidro, e o sal foi removido por filtração simples. O filtrado, contendo o produto, foi concentrado em evaporador rotatório. O produto foi purificado por CCS, usando como eluente hexano e acetato de etila (8,0:2,0; v/v).



(*E*)-2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-(propenil)-2,3-dihidrobenzofuran-2-il)fenol

Sólido branco

F.F.: 125-133°C

Rendimento: 40% - 0,4 g (1,23 mmol) a partir de 1,08 g (6,1 mmol)

F.M.: C₂₀H₂₂O₄ **M.M.:** 326,4 g.mol⁻¹

Rf: 0,41 (hexano e acetato de etila, 8,0:2,0 v/v)

clogP: 4,19 ± 0,36

IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 3421 (O-H), 2949 (C-H), 1612 (C=C ar), 1219 (C-O-C).

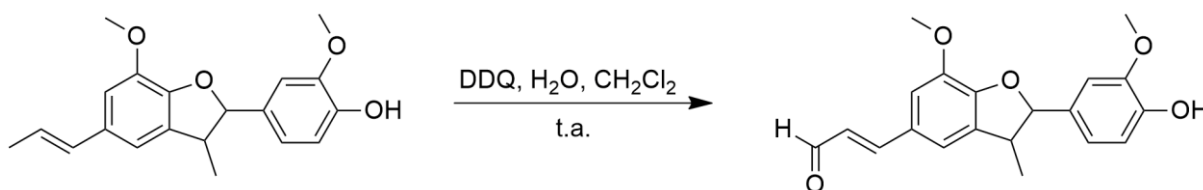
RMN de ^1H (δ ; DMSO- d_6 ; 300 MHz): 6,96 (s; 1H; H12), 6,88 (s; 2H; H3, H10), 6,76 (d; 2H; J = 6,24 Hz; H5, H6), 6,35 (d; 1H; J=15,72 Hz; H15), 6,13-6,06 (m; 1H; H16), 5,63 (s; 1H; OH), 5,09 (d; 2H; $J_{\text{H7,H14}}=9,39$ Hz; H7) 3,88 (s; 3H; C1-OCH₃), 3,86 (s; 3H; C9-OCH₃), 3,49-3,39 (m, 1H, H14), 1,86 (d; 3H; J=6,54 Hz; H17), 1,37 (d; 3H; J=6,75 Hz; H14-CH₃).

RMN de ^{13}C (δ ; DMSO- d_6 ; 75 MHz): 146,6 (C8), 146,5 (C2), 145,7 (C1), 144,1 (C9), 133,2 (C4), 132,1 (C13), 132,0 (C15), 130,9 (C16), 123,4 (C11), 119,9 (C5), 114,0 (C6), 113,2 (C12), 109,2 (C3), 108,9 (C10), 93,7 (C7), 55,9 (C1-OCH₃, C9-OCH₃), 45,5 (C14), 18,3 (C17), 17,5 (C14-CH₃).

EM-ESI/Q-TOF (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₀H₂₂O₄ 327,1591; encontrado 327,1589, erro -0,6113 ppm.

6.1.3 Reação de oxidação do carbono alílico da licarina A (Iliefski; Li; Lundquist, 1998)

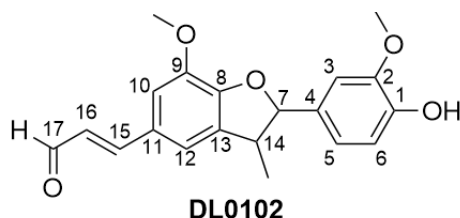
Figura 50 – Reação de oxidação do carbono alílico da licarina A.



Fonte: Da autora.

Foi adicionado em um balão de fundo redondo 0,5 mL de água destilada e 0,22 mmol de 2,3-dicloro-5,6-dicianobenzoquinona - DDQ (0,05 g). A suspensão foi deixada em agitação magnética a temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 0,1 mmol de licarina A (0,03 g) solubilizada em 2,0 mL de diclorometano. A reação foi acompanhada por CCD, usando como eluente hexano e acetato de etila (7,0:3,0; v/v). O término da reação foi identificado após 30 minutos, e adicionou-se 0,22 mmol de ácido ascórbico (0,04 g). Após 10 minutos de agitação, o sólido foi removido por filtração simples. Lavou-se o filtrado com uma solução saturada de NaHCO₃, a fase

orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o sal removido por filtração simples. O produto foi concentrado em rotaevaporador. A purificação do produto foi feita por CCD preparativa, usando como eluente hexano e acetato de etila (7,0:3,0; v/v).



(*E*)-3-(2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-7-metoxi-3-metil-2,3-dihidrobenzofuran-5-il)acrilaldeído
Sólido amarelo amorfo

Rendimento: 31% - 0,16 g (0,47 mmol) a partir de 0,5 g (1,5 mmol)

F.M.: C₂₀H₂₀O₅ **M.M.:** 340,38 g.mol⁻¹

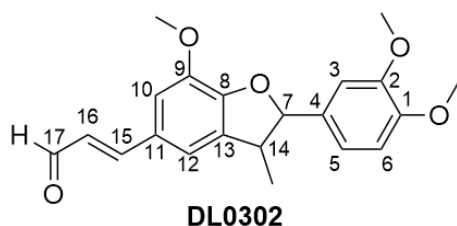
Rf: 0,43 (hexano e acetato de etila, 7,0:3,0 v/v)

clogP: 3,09±0,41

IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm⁻¹): 3418 (O-H), 2931 (C-H), 1667 (C=O), 1592 (C=C ar), 1219 (C-O-C).

RMN de ¹H (δ ; DMSO-d₆; 300 MHz): 9,64 (d; 1H; J=7,77 Hz; H17), 7,42 (d; 1H; J=15,75 Hz; H15), 7,03-6,89 (m; 5H; H3, H5, H6, H10, H12), 6,65-6,57 (m; 1H; H16), 5,18 (d; 1H; J=9,30 Hz; H7), 3,91 (s; 3H; OCH₃), 3,87 (s; 3H; OCH₃), 3,57-3,46 (m, 1H, H14), 1,40 (d; 3H; J=6,81 Hz; C14-CH₃).

RMN de ¹³C (δ ; DMSO-d₆; 75 MHz): 193,7 (C17), 153,4 (C15), 150,6 (C2), 146,7 (C8), 146,0 (C1), 144,6 (C9), 134,0 (C4), 131,1 (C13), 128,1 (C11), 126,2 (C16), 120,0 (C5), 117,3 (C12), 114,2 (C6), 111,7 (C10), 108,9 (C3), 94,5 (C7), 56,0 (C2-OCH₃), 55,9 (C9-OCH₃), 45,0 (C14), 17,6 (C14-CH₃).



(*E*)-3-(2-(3,4-dimetoxifenil)-7-metoxi-3-metil-2,3-dihidrobenzofuran-5-il)acrilaldeído
Sólido amarelo

F.F.: 141-146°C

Rendimento: 20% - 0,1 g (0,3 mmol) a partir de 0,5 g (1,47 mmol)

F.M.: C₂₁H₂₂O₅ **M.M.:** 354,40 g.mol⁻¹

Rf: 0,53 (hexano e acetato de etila, 7,0:3,0 v/v)

clogP: 3,86±0,41

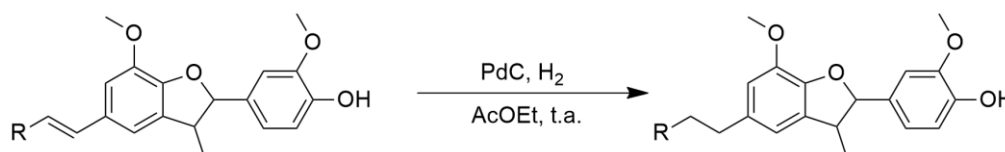
IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 2969 (C-H), 1672 (C=O), 1590 (C=C ar), 1223 (C-O-C).

RMN de ^1H (δ ; DMSO- d_6 ; 300 MHz): 9,64 (d; 1H; J=7,71 Hz; H17), 7,42 (d; 1H; J=15,78 Hz; H15), 7,02-6,83 (m; 5H; H3, H5, H6, H10, H12), 6,65-6,57 (m; 1H; H16), 5,20 (d; 1H; J=9,24 Hz; H7), 3,92 (s; 3H; OCH₃), 3,87 (s; 3H; OCH₃), 3,86 (s; 3H; OCH₃), 3,55-3,49 (m, 1H, H14), 1,41 (d; 3H; J=6,81 Hz; C14-CH₃).

RMN de ^{13}C (δ ; DMSO- d_6 ; 75 MHz): 193,6 (C17), 153,2 (C15), 150,6 (C2), 149,3 (C8), 149,2 (C1), 144,6 (C9), 134,0 (C4), 131,8 (C13), 128,1 (C11), 126,3 (C16), 119,2 (C5), 117,3 (C12), 111,7 (C6), 110,8 (C10), 109,6 (C3), 94,4 (C7), 56,0 (C1-OCH₃), 55,9 (C2-OCH₃, C9-OCH₃), 45,1 (C14), 17,7 (C14-CH₃).

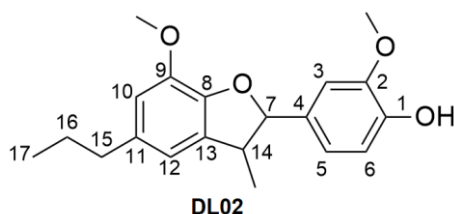
6.1.4 Reações de redução de alceno da licarina A por hidrogenação catalítica (Davies *et al.*, 2010)

Figura 51 – Reação de redução da licarina A.



Fonte: Da autora.

Em um balão de fundo redondo adicionou-se 0,15 mmol de licarina A (50,0 mg) e 10,0 mL de acetato de etila. A reação foi colocada em agitação magnética e adicionou-se 10,0% de paládio em carvão (5,0 mg). O balão de reação foi vedado e fez-se atmosfera de hidrogênio, mantendo fornecimento do gás durante todo o período reacional. A reação foi finalizada após 24 horas. O PdC foi removido por filtração em sílica, e o produto foi concentrado em evaporador rotatório. A formação do produto foi identificada por CCD, usando como eluente hexano e acetato de etila (8,0:2,0; v/v), na qual observou-se que o mesmo encontrava-se puro.



2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-propil-2,3-dihidrobenzofuran-2-il)fenol

Sólido branco

F.F.: 75-78°C

Rendimento: 100% - 0,05 g (0,15 mmol) a partir de 0,05 g (0,15 mmol)

F.M.: C₂₀H₂₄O₄ **M.M.:** 328,4 g.mol⁻¹

Rf: 0,46 (hexano e acetato de etila, 8,0:2,0 v/v)

clogP: 4,62±0,36

IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm⁻¹): 3439 (O-H), 2952 (C-H), 1603 (C=C ar), 1269 (C-O).

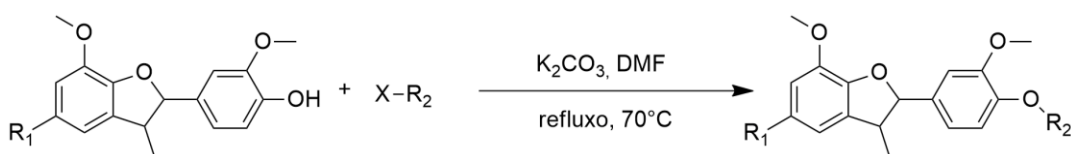
RMN de ¹H (δ ; DMSO-d₆; 300 MHz): 6,98 (s; 1H; H12), 6,92-6.85 (m; 2H; H3, H10), 6,61 (s; 1H; H5), 6,58 (s; 1H; H6), 5,62 (s, 1H, OH), 5,06 (d; 1H; J=9,69 Hz; H7), 3,87 (s; 6H; C1-OCH₃, C9-OCH₃), 3,48-3,38 (m, 1H, H14), 2,54 (t; 2H; J=6,59 Hz; H15), 1,67-1,57 (m, 2H, H16), 1,36 (d; 3H; J=6,78 Hz; H17), 0,98-0,95 (m; 3H; C14-CH₃).

RMN de ¹³C (δ ; DMSO-d₆; 75 MHz): 146,6 (C2), 145,6 (C8), 145,3 (C1), 143,8 (C9), 136,3 (C4), 132,9 (C13), 132,2 (C11), 119,9 (C5), 115,3 (C12), 113,9 (C6), 111,7 (C10), 108,9 (C3), 93,6 (C7), 55,9 (C1-OCH₃, C9-OCH₃), 45,7 (C14), 38,0 (C15), 25,0 (C16), 17,3 (C14-CH₃), 13,8 (C17).

EM-ESI/Q-TOF (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₀H₂₄O₄ 329,1748; encontrado 329,1747, erro -0,3038 ppm.

6.1.5 Reações de formação dos éteres da licarina A (adaptado de Coolen *et al.*, 1995)

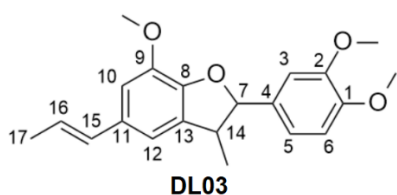
Figura 52 – Reação de eterificação da licarina A.



Fonte: Da autora.

Em um balão de fundo redondo foi adicionado 0,31 mmol de licarina A ou o derivado a ser eterificado, 1,0 mL de dimetilformamida e 2,45 mmol de carbonato de

potássio (339,0 mg). A mistura reagente foi colocada sob agitação magnética, em sistema de refluxo a 70°C. Após 30 minutos, adicionou-se 1,23 mmol do haleto de interesse. A reação foi acompanhada por CCD, usando como eluente hexano e acetato de etila (8,0:2,0; v/v). O término da reação foi identificado após 3 horas. Após a eliminação do DMF por evaporação, o resíduo foi ressuspenso com acetato de etila e lavou-se com solução de NaOH 0,5 molL⁻¹. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, e o sal foi removido por filtração simples. O filtrado foi concentrado em evaporador rotatório. O produto foi purificado por CCS, usando como eluente hexano e acetato de etila (8,0:2,0; v/v).



(E)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)-7-methoxy-3-methyl-5-(prop-1-en-1-yl)-2,3-dihydrobenzofuran

Sólido branco

F.F.: 109-112°C

Rendimento: 77% - 0,08 g (0,24 mmol) a partir de 0,1 g (0,31 mmol)

F.M.: C₂₁H₂₄O₄ **M.M.:** 340,41 g.mol⁻¹

Rf: 0,46 (hexano e acetato de etila, 8,0:2,0 v/v)

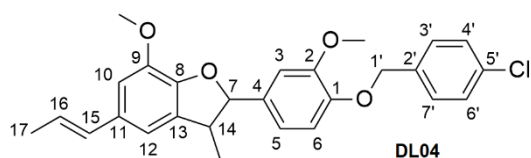
clogP: 4,96±0,37

IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm⁻¹): 2959 (C-H), 1594 (C=C ar), 1263 (C-O-C).

RMN de ¹H (δ ; DMSO-d₆; 300 MHz): 6,97 (d; 1H; J_{H5,H6}=1,92 Hz; H5), 6,94 (dd; 1H; J_{H6,H5}=1,95 Hz; J_{H6,H3}= 8,175 Hz; H6), 6,83-6,77 (m; 3H; H3, H10, H12), 6,34 (dd; 1H; J=1,59 Hz; J=15,69 Hz; H15), 6,13-6,05 (m; 1H; H16), 5,10 (d; 1H; J_{H7,H14}=9,48 Hz; H7), 3,87 (s; 3H; -OCH₃), 3,86 (s; 3H; -OCH₃), 3,85 (s, 3H, -OCH₃), 3,47-3,42 (m, 1H, H14), 1,85 (dd; 3H; J=1,53 Hz; J=6,59 Hz; H17), 1,36 (d; 3H; J=6,78 Hz; C14-CH₃).

RMN de ¹³C (δ ; DMSO-d₆; 75 MHz): 148,9 (C1 e C8), 146,4 (C2), 144,0 (C9), 133,0 (C4), 132,4 (C13), 132,0 (C11), 130,7 (C15), 123,3 (C16), 119,0 (C5), 113,1 (C12), 110,6 (C6), 109,2 (C3), 109,0 (10), 93,5 (C7), 55,7 (C1-OCH₃, C2-OCH₃, C9-OCH₃), 45,4 (C14), 18,2 (C17), 17,4 (C14-CH₃).

EM-ESI/Q-TOF (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₁H₂₄O₄ 341,1748; encontrado 341,1748, erro 0 ppm.



(*E*)-2-(4-((4-clorobenzil)oxi)-3-metoxifenil)-7-metoxi-3-metil-5-(propenil)-2,3-dihidrobenzofurano

Sólido branco

F.F.: 86-90°C

Rendimento: 78% - 0,11 g (0,24 mmol) a partir de 0,1 g (0,31 mmol)

F.M.: C₂₇H₂₇ClO₄ **M.M.:** 450,95 g.mol⁻¹

Rf: 0,47 (hexano e acetato de etila, 8,0:2,0 v/v)

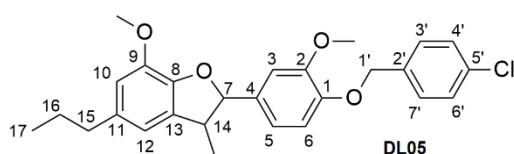
clogP: 7,21±0,38

IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm⁻¹): 2935 (C-H), 1594 (C=C ar), 1262 (C-O-C), 486 (C-Cl).

RMN de ¹H (δ ; DMSO-d₆; 300 MHz): 7,37-7,30 (m; 4H; H3', H4', H6', H7'), 7,00 (d; 1H; J_{H5,H6}=1,89 Hz; H5), 6,88 (dd; 2H; J_{H6,H5}=1,96 Hz; J_{H6,H3}=6,58 Hz; H6), 6,82-6,75 (m; 3H; H3, H10, H12), 6,35 (dd; 1H; J=1,59 Hz; J=15,69 Hz; H15), 6,13-6,06 (m; 1H; H16), 5,09 (m; 3H; H7, H1'), 3,88 (s; 3H; -OCH₃), 3,86 (s; 3H; -OCH₃), 3,49-3,39 (m, 1H, H14), 1,86 (dd; 3H; J=1,56 Hz; J= 6,55 Hz; H17), 1,37 (d; 3H; J=6,78 Hz; C14-CH₃).

RMN de ¹³C (δ ; DMSO-d₆; 75 MHz): 149,7 (C2), 147,8 (C8), 146,4 (C1), 144,0 (C9), 135,5 (C2'), 133,5 (C4), 133,1 (C5'), 132,1 (C13), 130,8 (C11), 128,6 (C3', C7'), 128,5 (C4', C6'), 128,1 (C15), 123,4 (C16), 119,0 (C5), 113,7 (C12), 113,2 (C6), 110,0 (C3), 109,2 (C10), 93,4 (C7), 70,2 (C1'), 55,9 (OCH₃), 55,8 (OCH₃), 45,5 (C14), 18,3 (C17), 17,6 (C14-CH₃).

EM-ESI/Q-TOF (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₇H₂₇ClO₄ 451,1671; encontrado 451,1672, erro 0,2216 ppm.



2-(4-((4-clorobenzil)oxi)-3-metoxifenil)-7-metoxi-3-metil-5-propil-2,3-dihidrobenzofurano

Sólido branco amorfo

Rendimento: 50% - 0,07 g (0,15 mmol) a partir de 0,1 g (0,31 mmol)

F.M.: C₂₇H₂₉ClO₄ **M.M.:** 452,97 g.mol⁻¹

Rf: 0,67 (hexano e acetato de etila, 8,0:2,0 v/v)

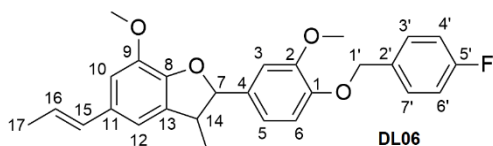
clogP: 7,64±0,38

IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 2955 (C-H), 1602 (C=C ar), 1260 (C-O-C), 734 (C-Cl).

RMN de ^1H (δ ; DMSO- d_6 ; 300 MHz): 7,37-7,30 (m; 4H; H3', H4', H6', H7'), 7,02 (d; 1H; $J_{\text{H}_5, \text{H}_6}=1,89$ Hz; H5), 6,88 (dd; 1H; $J_{\text{H}_6, \text{H}_5}=1,95$ Hz; $J_{\text{H}_6, \text{H}_3}=8,32$; H6), 6,80 (d; 1H; $J_{\text{H}_6, \text{H}_3}=8,25$ Hz; H3), 6,61 (s; 1H; H10), 6,58 (s; 1H; H12), 5,09-5,04 (m; 3H; H7, H1'), 3,87 (s; 3H; OCH_3), 3,86 (s; 3H; OCH_3), 3,49-3,39 (m; 1H; H14), 2,54 (t; 2H; $J=7,66$ Hz; H15), 1,67-1,59 (m; 2H; H16), 1,36 (d; 3H; $J=6,78$ Hz; C14- CH_3), 0,95 (t; 3H; $J=7,32$ Hz; H17).

RMN de ^{13}C (δ ; DMSO- d_6 ; 75 MHz): 149,8 (C2), 147,8 (C1), 145,3 (C8), 143,8 (C9), 136,3 (C2'), 135,6 (C5'), 133,7 (C4), 133,5 (C11), 132,8 (C12), 128,7 (C3', C7'), 128,6 (C4', C6'), 119,0 (C5), 115,3 (C12), 113,7 (C10), 111,7 (C6), 110,1 (C3), 93,3 (C7), 70,3 (C1'), 56,0 ($-\text{OCH}_3$), 55,9 ($-\text{OCH}_3$), 45,7 (C14), 38,0 (C15), 25,0 (C16), 17,4 (C14- CH_3), 13,8 (C17).

EM-ESI/Q-TOF (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{ClO}_4$ 453,1827; encontrado 453,1826, erro -0,2207 ppm.



(E)-2-(4-((4-fluorobenzil)oxi)-3-metoxifenil)-7-metoxi-3-metil-5-(propenil)-2,3-dihidrobenzofurano

Sólido branco

F.F.: 105-108°C

Rendimento: 74% - 0,1 g (0,23 mmol) a partir de 0,1 g (0,31 mmol)

F.M.: $\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{FO}_4$ **M.M.:** 434,5 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rf: 0,56 (hexano e acetato de etila, 8,0:2,0 v/v)

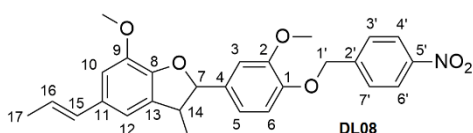
clogP: 6,66 \pm 0,42

IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 2929 (C-H), 1602 (C=C ar), 1220 (C-O-C), 1136 (C-F).

RMN de ^1H (δ ; DMSO- d_6 ; 300 MHz): 7,39-7,37 (m; 2H; H3', H7'), 7,06-7,00 (m; 2H; H4', H6'), 6,99 (d; 1H; $J_{\text{H}_5, \text{H}_6}=1,86$ Hz; H5), 6,88 (dd; 1H; $J_{\text{H}_6, \text{H}_5}=1,89$ Hz; $J_{\text{H}_6, \text{H}_3}=8,28$ Hz; H6), 6,82 (d; 1H; $J_{\text{H}_3, \text{H}_6}=8,22$ Hz; H3), 6,77 (s; 1H; H10), 6,75 (s; 1H; H12), 6,35 (dd; 1H; $J=1,62$ Hz; $J=15,67$ Hz; H15), 6,15-6,03 (m; 1H; H16), 5,11-5,08 (m; 3H; H7, H1'), 3,88 (s; 3H; OCH_3), 3,86 (s; 3H; OCH_3), 3,49-3,39 (m; 1H; H14), 1,86 (dd; 3H; $J=1,53$ Hz; $J=6,57$ Hz; H17), 1,37 (d; 3H; $J=6,78$ Hz; C14- CH_3).

RMN de ^{13}C (δ ; DMSO- d_6 ; 75 MHz): 162,4 (C5'; $J_{\text{C5',F}} = 244,5$ Hz), 149,8 (C2), 148,0 (C8), 146,5 (C1), 144,1 (C9), 133,5 (C4), 133,1 (C13), 132,8 (C11), 132,2 (C15), 130,8 (C2'), 129,2 (C3'), 129,1 (C7'), 123,4 (C16), 119,0 (C5), 115,5 (C4'), 115,2 (C6'), 113,8 (C12), 113,2 (C6), 110,0 (C3), 109,2 (C10), 93,5 (C7), 70,4 (C1'), 56,0 (OCH₃), 55,9 (OCH₃), 45,5 (C14), 18,3 (C17), 17,6 (C14-CH₂).

EM-ESI/Q-TOF (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₇H₂₇FO₄ 435,1966; encontrado 435,1967, erro 0,2298 ppm.



(*E*)-7-metoxi-2-(3-metoxi-4-((4-nitrobenzil)oxi)fenil)-3-metil-5-(propenil)-2,3-dihidrobenzofurano

Sólido amarelo

F.F.: 72-76°C

Rendimento: 90% - 0,13 g (0,28 mmol) a partir de 0,1 g (0,31 mmol)

F.M.: C₂₇H₂₇NO₆ **M.M.:** 461,51 g.mol⁻¹

Rf: 0,33 (hexano e acetato de etila, 8,0:2,0 v/v)

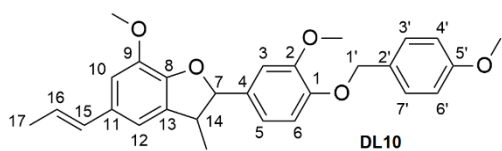
clogP: 6,34±0,38

IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm⁻¹): 2961 (C-H), 1604 (C=C ar), 1509 (N=O), 1267 (C-O-C).

RMN de ^1H (δ ; DMSO- d_6 ; 300 MHz): 8,21 (d; 2H; $J = 8,82$ Hz; H4', H6'), 7,59 (d; 2H; $J = 8,88$ Hz; H3', H7'), 7,01 (d; 1H; $J_{\text{H5,H6}} = 1,89$ Hz; H5), 6,88 (dd; 1H; $J_{\text{H6,H5}} = 1,89$ Hz; $J_{\text{H6,H3}} = 8,28$ Hz; H6), 6,89-6,75 (m; 3H; H3, H10, H12), 6,35 (dd; 1H; $J = 1,62$ Hz; $J = 11,17$ Hz; H15), 6,15-6,03 (m; 1H; H16), 5,22 (s; 2H; H1'), 5,10 (d; 1H; $J_{\text{H7,H14}} = 9,27$ Hz; H7), 3,88 (s; 6H; C2-OCH₃, C9-OCH₃), 3,48-3,38 (m; 1H; H14), 1,85 (dd; 3H; $J = 1,53$ Hz; $J = 6,58$ Hz; H17), 1,37 (d; 3H; $J_{\text{C14-CH}_3, \text{H14}} = 6,78$ Hz; C14-CH₃).

RMN de ^{13}C (δ ; DMSO- d_6 ; 75 MHz): 149,8 (C2), 147,4 (C1, C5'), 146,4 (C8), 144,6 (C9), 144,1 (C2'), 134,2 (C4), 133,0 (C13), 132,2 (C11), 130,8 (C15), 127,5 (C3', C7'), 123,7 (C4', C6'), 123,5 (C16), 119,0 (C5), 113,9 (C12), 113,2 (C6), 110,1 (C3), 109,1 (C10), 93,3 (C7), 69,9 (C1'), 55,9 (OCH₃), 55,8 (OCH₃), 45,5 (C14), 18,3 (C17), 17,6 (C14-CH₃).

EM-ESI/Q-TOF (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₇H₂₇NO₆ 462,1911; encontrado 462,1909, erro -0,4327 ppm.



(*E*)-7-metoxi-2-(3-metoxi-4-((4-metoxibenzil)oxi)fenil)-3-metil-5-(propenil)-2,3-dihidrobenzofurano

Sólido amarelo claro

F.F.: 105-109°C

Rendimento: 51% - 0,07 g (0,16 mmol) a partir de 0,1 g (0,31 mmol)

F.M.: C₂₈H₃₀O₅ **M.M.:** 446,5 g.mol⁻¹

Rf: 0,48 (hexano e acetato de etila, 8,0:2,0 v/v)

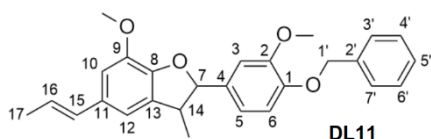
clogP: 6,53±0,38

IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm⁻¹): 2959 (C-H, 1608 (C=C ar), 1242 (C-O).

RMN de ¹H (δ ; DMSO-d₆; 300 MHz): 7,34 (d; 2H; J=8,76 Hz; H3', H7'), 6,98-6,86 (m; 5H; H3, H10, H12, H4', H6'), 6,76 (d; 2H; J=6,72 Hz; H5, H6), 5,10-5,06 (m; 3H; H7, H1'), 3,88 (s; 3H; OCH₃), 3,85 (s; 3H; OCH₃), 3,79 (s; 3H; OCH₃), 3,49-3,39 (m; 1H; H14), 1,86 (dd; 3H; J=1,53 Hz; J=6,57 Hz; H17), 1,36 (d; 3H; J_{C14-CH₃,H14}=6,75 Hz; C14-CH₃).

RMN de ¹³C (δ ; DMSO-d₆; 75 MHz): 159,3 (C5'), 149,8 (C2), 148,2 (C8), 146,5 (C1), 144,1 (C9), 133,2 (C4), 133,1 (C13), 132,1 (C11), 130,9 (C15), 129,1 (C2'), 128,9 (C3', C7'), 123,4 (C16), 119,1 (C5), 113,9 (C4', C6'), 113,8 (C12), 113,2 (C6), 110,0 (C3), 109,2 (C10), 93,6 (C7), 70,8 (C1'), 56,0 (OCH₃), 55,9 (OCH₃), 55,2 (OCH₃), 45,5 (C14), 18,3 (C17), 17,6 (C14-CH₃).

EM-ESI/Q-TOF (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₈H₃₀O₅ 447,2166; encontrado 447,2166, erro 0 ppm.



2-(4-(benzyloxy)-3-methoxyphenyl)-7-metoxi-3-metil-5-propil-2,3-dihidrobenzofuran

Sólido amarelo claro

F.F.: 80-85°C

Rendimento: 58% - 0,075 g (0,18 mmol) a partir de 0,1 g (0,31 mmol)

F.M.: C₂₇H₂₈O₄ **M.M.:** 416,51 g.mol⁻¹

Rf: 0,59 (hexano e acetato de etila, 8,0:2,0 v/v)

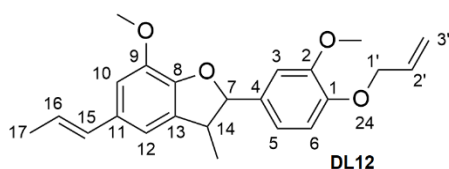
clogP: 6,61±0,37

IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 2959 (C-H), 1592 (C=C ar), 1219 (C-O-C).

RMN de ^1H (δ ; DMSO- d_6 ; 300 MHz): 7,43-7,25 (m; 5H; H3', H4', H5', H6', H7'), 6,99 (d; $J_{\text{H5},\text{H6}}=1,65$ Hz; H5), 6,98-6,82 (m; 2H; H3, H6), 6,76 (d; 2H; $J=6,6$ Hz; H10, H12), 6,35 (dd; 1H; $J=1,59$ Hz; $J=15,69$ Hz; H15), 6,16-6,03 (m; 1H; H16), 5,14 (s; 2H; H1'), 5,09 (d; 1H; $J_{\text{H7},\text{H14}}=9,33$ Hz; H7), 3,88 (s; 3H; OCH_3), 3,87 (s; 3H; OCH_3), 3,47-3,39 (m; 1H; H14), 1,86 (dd; 3H; $J=1,53$; $J=6,55$, H17), 1,37 (d; 3H; $J_{\text{C14-CH}_3,\text{H14}}=6,78$ Hz; C14- CH_3).

RMN de ^{13}C (δ ; DMSO- d_6 ; 75 MHz): 149,7 (C2), 148,2 (C8), 146,5 (C1), 144,1 (C9), 137,0 (C2'), 133,2 (C4), 133,2 (C13), 132,1 (C11), 130,8 (C15), 128,4 (C4', C6'), 127,7 (C5'), 127,2 (C3', C7'), 123,4 (C16), 119,1 (C5), 113,6 (C12), 113,2 (C6), 110,0 (C3), 109,2 (C10), 93,5 (C7), 70,9 (C1'), 56,0 (OCH_3), 55,8 (OCH_3), 45,4 (C14), 18,3 (C17), 17,6 (C14- CH_3).

EM-ESI/Q-TOF (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{O}_4$ 417,2061; encontrado 417,2060, erro .0,2397 ppm.



(*E*)-2-(4-(alilóxi)-3-metóxiifenil)-7-metóxi-3-metil-5-propenil-2,3-dihidrobenzofurano

Sólido verde claro

F.F.: 81-85°C

Rendimento: 79% - 0,09 g (0,25 mmol) a partir de 0,1 g (0,31 mmol)

F.M.: $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{O}_4$ **M.M.:** 366,45 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rf: 0,60 (hexano e acetato de etila, 8,0:2,0 v/v)

clogP: 5,76 \pm 0,38

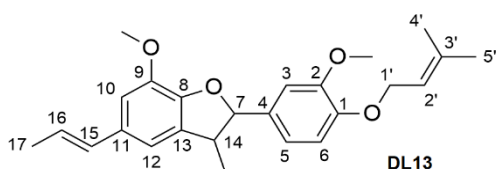
IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 2923 (C-H), 1592 (C=C ar), 1258 (C-O-C).

RMN de ^1H (δ ; DMSO- d_6 ; 300 MHz): 6,97 (d; 1H; $J_{\text{H5},\text{H6}}=1,92$ Hz; H5), 6,91 (dd; 1H; $J_{\text{H6},\text{H5}}=1,86$ Hz; $J_{\text{H6},\text{H3}}=8,31$ Hz; H6); 6,83 (d; 1H; $J_{\text{H3},\text{H6}}=8,22$ Hz, H3), 6,76 (d; 2H; $J=6,15$ Hz; H10, H12), 6,35 (dd; 1H; $J=1,62$ Hz; $J=15,67$ Hz; H15), 6,15-6,00 (m; 2H; H16, H2'), 5,39 (qd; 1H; $J_{\text{H3}'\text{b},\text{H3}'\text{a}}=1,54$ Hz; $J_{\text{H3}'\text{b},\text{H2}'}=21,76$ Hz; H3'b), 5,27 (qd; 1H; $J_{\text{H3}'\text{a},\text{H3}'\text{b}}=1,35$ Hz; $J_{\text{H3}'\text{a},\text{H2}'}=10,47$ Hz; H3'a), 5,10 (d; 1H; $J_{\text{H7},\text{H14}}=9,33$ Hz; H7), 4,60 (td; 2H; $J=1,47$ Hz; $J=5,42$ Hz; H1'), 3,88 (s; 3H; OCH_3), 3,85 (s; 3H; OCH_3), 3,48-3,40 (m;

1H; H14), 1,86 (dd; 3H; J=1,59 Hz; J=6,55 Hz; H17), 1,37 (d; 3H; J_{C14-CH₃},H14=6,78 Hz; C14-CH₃).

RMN de ¹³C (δ; DMSO-d₆; 75 MHz): 149,5 (C2), 148,0 (C1), 146,5 (C8), 144,1 (C9), 133,2 (C2'), 133,0 (C4), 132,1 (C13), 130,9 (C11, C15), 123,4 (C16), 119,0 (C5), 117,9 (C3'), 113,2 (C12), 113,0 (C6), 109,9 (C3), 109,2 (C10), 93,6 (C7), 69,8 (C1'), 56,0 (OCH₃), 55,9 (OCH₃), 45,5 (C14), 18,3 (C17), 17,6 (C14-CH₃).

EM-ESI/Q-TOF (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₃H₂₆O₄ 367,1904; encontrado 367,1903, erro -0,2723 ppm.



(*E*)-7-metóxi-2-(3-metóxi-4-((3-metil-2-butenil)oxi)fenil)-3-metil-5-propenil-2,3-dihidrobenzofurano

Óleo claro

Rendimento: 79% - 0,097 g (0,25 mmol) a partir de 0,1 g (0,31 mmol)

F.M.: C₂₅H₃₀O₄ **M.M.:** 394,5 g.mol⁻¹

Rf: 0,64 (hexano e acetato de etila, 8,0:2,0 v/v)

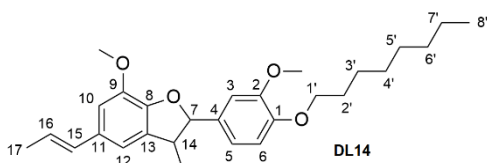
clogP: 6,84±0,39

IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm⁻¹): 2924 (C-H), 1590 (C=C ar), 1259 (C-O-C).

RMN de ¹H (δ; DMSO-d₆; 300 MHz): 6,96 (d; 1H; J_{H5,H6}= 1,92 Hz; H5), 6,91 (dd; 1H; J_{H6,H5}=1,98 Hz; J_{H6,H3}=8,4 Hz; H6); 6,83 (d; 1H; J_{H3,H6}=8,19 Hz, H3), 6,76 (d; 2H; J=5,73 Hz; H10, H12), 6,35 (dd; 1H; J=1,62 Hz; J=15,69 Hz; H15), 6,15-6,02 (m; 1H; H16), 5,53-5,47 (m; 1H; H3'), 5,10 (d; 1H; J_{H7,H14}=9,39 Hz; H7), 4,57 (d; 2H; J=6,66 Hz; H1'), 3,88 (s; 3H; OCH₃), 3,84 (s; 3H; OCH₃), 3,50-3,40 (m; 1H; H14), 1,86 (dd; 3H; J=1,59 Hz; J=6,58 Hz; H17), 1,76 (s; 3H; H5'); 1,71 (s; 3H; H4'), 1,37 (d; 3H; J_{C14-CH₃},H14=6,78, C14-CH₃).

RMN de ¹³C (δ; DMSO-d₆; 75 MHz): 149,5 (C2), 148,3 (C1), 146,5 (C8), 144,1 (C9), 137,5 (C3'), 133,2 (C4), 132,6 (C13), 132,1 (C11), 130,9 (C15), 123,4 (C16), 119,9 (C5), 119,0 (C2'), 113,2 (C12), 112,6 (C6), 109,7 (C3), 109,2 (C10), 93,6 (C7), 65,7 (C1'), 55,9 (C2-OCH₃, C9-OCH₃), 45,5 (C14), 25,7 (C5'), 18,3 (C17), 18,1 (C4'), 17,6 (C14-CH₃).

EM-ESI/Q-TOF (m/z): [M+Na]⁺ calculado para C₂₅H₃₀O₄ 417,2036; encontrado 417,2036, erro 0 ppm.



(*E*)-7-metoxi-2-(3-metoxi-4-(oxtiloxi)fenil)-3-metil-5-(propenil)-2,3-dihidrobenzofurano

Sólido branco

F.F.: 85-87°C

Rendimento: 73% - 0,1 g (0,2 mmol) a partir de 0,1 g (0,31 mmol)

F.M.: C₂₈H₃₈O₄ **M.M.:** 438,6 g.mol⁻¹

Rf: 0,76 (hexano e acetato de etila, 8,0:2,0 v/v)

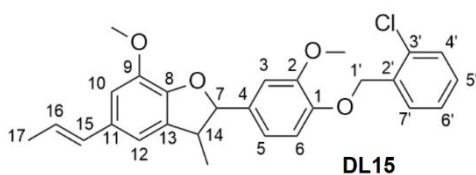
clogP: 8,68±0,37

IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm⁻¹): 2913 (C-H), 1592 (C=C ar), 1222 (C-O-C).

RMN de ¹H (δ ; DMSO-d₆; 300 MHz): 6,96 (d; 1H; J_{H5,H6}= 1,92 Hz; H5), 6,92 (dd; 1H; J_{H6,H5}=1,98 Hz; J_{H6,H3}=8,23 Hz; H6); 6,82 (d; 1H; J_{H3,H6}=8,22 Hz; H3), 6,76 (d; 2H; J=6,00 Hz; H10, H12), 6,35 (dd; 1H; J=1,59 Hz; J=15,67 Hz; H15), 6,15-6,03 (m; 1H; H16), 5,09 (d; 1H; J_{H7,H14}=9,39 Hz; H7), 3,99 (t; 2H; J=6,9 Hz; H1'), 1,87-1,22 (m; 20H; H17, C14-CH₃, C2', C3', C4', C5', C6', C7'), 0,89-0,83 (m; 1H; H8').

RMN de ¹³C (δ ; DMSO-d₆; 75 MHz): 149,4 (C2), 148,6 (C1), 146,5 (C8), 144,1 (C9), 133,2 (C4), 132,5 (C13), 132,1 (C11), 130,8 (C15), 123,4 (C16), 119,2 (C5), 113,2 (C12), 112,4 (C6), 110,0 (C3), 109,2 (C10), 93,6 (C7), 69,0 (C1'), 56,0 (OCH₃), 55,9 (OCH₃), 45,4 (C14), 31,7 (C6'), 29,3 (C2'), 29,2 (C4'), 29,1 (C5'), 25,9 (C3'), 22,6 (C7'), 18,3 (C17), 17,5 (C14-CH₃), 14,0 (C8').

EM-ESI/Q-TOF (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₈H₃₈O₄ 439,2843; encontrado 439,2840, erro -0,6829 ppm.



(*E*)-2-(4-((2-chlorobenzil)oxy)-3-metoxifenil)-7-metoxi-3-metil-5-(prop-1-en-1-yl)-2,3-dihidrobenzofurano

Sólido bege

F.F.: 81-86°C

Rendimento: 70% - 0,1 g (0,22 mmol) a partir de 0,1 g (0,31 mmol)

F.M.: C₂₇H₂₇ClO₄ **M.M.:** 450,95 g.mol⁻¹

Rf: 0,66 (hexano e acetato de etila, 8,0:2,0 v/v)

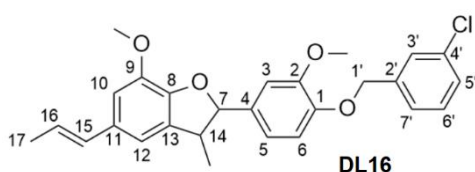
clogP: 7,21±0,38

IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm⁻¹): 2956 (C-H), 1595 (C=C ar), 1260 (C-O-C), 745 (C-Cl).

RMN de ¹H (δ ; DMSO-d₆; 300 MHz): 7,55 (d; 1H; J=6,72 Hz; H4'), 7,39-7,20 (m; 3H; H5', H6', H7'), 7,02 (s; 1H; H5), 6,90 (d; 1H; J_{H6,H3}=7,65 Hz; H6), 6,84-6,76 (m; 3H; H3, H10, H12), 6,36 (d; 1H; J=15,33 Hz; H15), 6,16-6,04 (m; 1H; H16), 5,25 (s; 2H; H1'), 5,11 (d; 1H; J_{H7,H14}=9,3 Hz; H7) 3,89 (s; 6H; C2-OCH₃, C9-OCH₃), 3,51-3,41 (m, 1H, H14), 1,87 (d; 3H; J= 6,54 Hz; H17), 1,38 (d; 3H; J=6,75 Hz; C14-CH₃).

RMN de ¹³C (δ ; DMSO-d₆; 75 MHz): 149,7 (C2), 147,9 (C8), 146,5 (C1), 144,1 (C9), 134,7 (C2'), 133,5 (C4), 133,1 (C13), 132,1 (C11), 130,8 (C15), 129,2 (C3'), 128,7 (C4', C5'), 128,5 (C7'), 126,9 (C6'), 123,2 (C16), 119,2 (C5), 113,6 (C12), 113,2 (C6), 110,1 (C3), 109,2 (C10), 93,5 (C7), 68,0 (C1'), 56,0 (-OCH₃), 55,9 (-OCH₃), 45,5 (C14), 18,3 (C17), 17,6 (C14-CH₃).

EM-ESI/Q-TOF (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₇H₂₇ClO₄ 451,1671; encontrado 451,1670, erro -0,2216 ppm.



(E)-2-(4-((3-chlorobenzyl)oxy)-3-methoxyphenyl)-7-methoxy-3-methyl-5-(prop-1-en-1-yl)-2,3-dihydrobenzofuran

Óleo amarelo claro

Rendimento: 87% - 0,12 g (0,27 mmol) a partir de 0,1 g (0,31 mmol)

F.M.: C₂₇H₂₇ClO₄ **M.M.:** 450,95 g.mol⁻¹

Rf: 0,52 (hexano e acetato de etila, 8,0:2,0 v/v)

clogP: 7,21±0,38

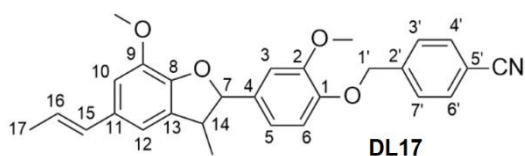
IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm⁻¹): 2926 (C-H), 1598 (C=C ar), 1262 (C-O-C), 733 (C-Cl).

RMN de ¹H (δ ; DMSO-d₆; 300 MHz): 7,43 (s; 1H; H3'), 7,30-7,25 (m; 3H; H5', H6', H7'), 7,00 (d; 1H; J_{H5,H6}=1,8 Hz; H5), 6,88 (dd; 1H; J_{H6,H5}=1,86 Hz; J_{H6,H3}=8,17 Hz; H6),

6,82-6,75 (m; 3H; H3, H10, H12), 6,35 (dd; 1H; J=1,53 Hz; J=15,72 Hz; H15), 6,15-6,03 (m; 1H; H16), 5,11-5,08 (m; 3H; H1', H7), 3,88 (s; 3H; OCH₃), 3,87 (s; 3H; OCH₃), 3,49-3,42 (m, 1H, H14), 1,86 (dd; 3H; J=1,26 Hz; J= 6,54 Hz; H17), 1,37 (d; 3H; J=6,78 Hz; C14-CH₃).

RMN de ¹³C (δ; DMSO-d₆; 75 MHz): 149,8 (C2), 147,8 (C8), 146,5 (C1), 144,1 (C9), 139,1 (C2'), 134,4 (C4'), 133,6 (C4), 133,1 (C13), 132,2 (C11), 130,8 (C15), 129,8 (C6'), 127,9 (C5'), 127,1 (C3'), 125,2 (C7'), 123,4 (C16), 119,0 (C5), 113,8 (C12), 113,2 (C6), 110,0 (C3), 109,2 (C10), 93,4 (C7), 70,3 (C1'), 56,0 (-OCH₃), 55,9 (-OCH₃), 45,5 (C14), 18,3 (C17), 17,6 (C14-CH₃).

EM-ESI/Q-TOF (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₇H₂₇ClO₄ 451,1671; encontrado 451,1670, erro -0,2216 ppm.



(E)-4-((2-methoxy-4-(7-methoxy-3-methyl-5-(prop-1-en-1-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-2-yl)phenoxy)methyl)benzonitrile

Sólido amarelo

F.F.: 72-78°C

Rendimento: 55% - 0,075 g (0,17 mmol) a partir de 0,1 g (0,31 mmol)

F.M.: C₂₈H₂₇NO₄ **M.M.:** 441,52 g.mol⁻¹

Rf: 0,38 (hexano e acetato de etila, 8,0:2,0 v/v)

clogP: 6,05±0,40

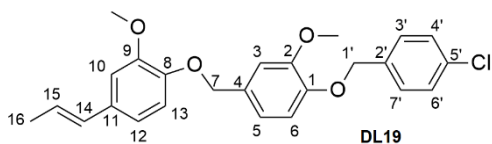
IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm⁻¹): 2961 (C-H), 2225 (C≡N), 1596 (C=C ar), 1220 (C-O-C).

RMN de ¹H (δ; DMSO-d₆; 300 MHz): 7,64 (d; 2H; J= 8,28 Hz; H4', H6'), 7,53 (d; 2H; J=8,16 Hz; H3', H7'), 7,00 (d; 1H; J_{H5,H6}=1,83 Hz; H5), 6,87 (dd; 1H; J_{H6,H5}=1,83 Hz; J_{H6,H3}=8,25 Hz; H6), 6,78-6,75 (m; 3H; H3, H10, H12), 6,34 (dd; 1H; J=1,5 Hz; J=15,7 Hz; H15), 6,15-6,03 (m; 1H; H16), 5,18 (s; 2H; H1'), 5,09 (d; 1H; J=9,33 Hz; H7), 3,88 (s; 3H; OCH₃), 3,87 (s; 3H; OCH₃), 3,48-3,38 (m, 1H, H14), 1,85 (dd; 3H; J=1,38 Hz; J= 6,54 Hz; H17), 1,36 (d; 3H; J=6,78 Hz; C14-CH₃).

RMN de ¹³C (δ; DMSO-d₆; 75 MHz): 149,7 (C2), 147,4 (C8), 146,2 (C1), 144,0 (C9), 142,5 (C2'), 134,0 (C4), 133,0 (C11), 132,3 (C4', C6'), 132,2 (C13), 130,8 (C15), 127,4

(C3', C7'), 123,5 (C16), 119,0 (C5), 118,7 (CN), 113,7 (C12), 113,2 (C6), 111,5 (C5'), 110,0 (C3), 109,0 (C10), 93,3 (C7), 70,0 (C1'), 55,9 (-OCH₃), 55,8 (-OCH₃), 45,5 (C14), 18,3 (C17), 17,6 (C14-CH₃).

EM-ESI/Q-TOF (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₁H₂₄O₄ 442,2013; encontrado 442,2011, erro -0,4523 ppm.



(*E*)-1-((4-clorobenzil)oxi)-2-metoxi-4-((2-metoxi-4-(propenil)fenoxi)metil)benzeno

Sólido branco

F.F.: 120-123°C

Rendimento: 53% - 0,07 g (0,03 mmol) a partir de 0,05 g (0,31 mmol)

F.M.: C₂₅H₂₅ClO₄ **M.M.:** 424,92 g.mol⁻¹

Rf: 0,48 (hexano e acetato de etila, 8,0:2,0 v/v)

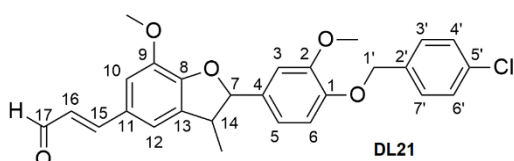
clogP: 6,69±0,37

IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm⁻¹): 2937 (C-H), 1596 (C=C ar), 1221 (C-O-C), 486 (C-Cl).

RMN de ¹H (δ ; DMSO-d₆; 300 MHz): 7,37-7,29 (m; 4H; H3', H4', H6', H7'), 7,01 (d; 1H; J_{H5,H6}=1,77 Hz; H5), 6,89-6,76 (m; 5H; H3, H6, H10, H12, H13), 6,31 (dd; 1H; J=1,53 Hz; J=15,72 Hz; H15), 6,15-6,03 (m; 1H; H16), 5,08 (s; 2H; H1'), 5,03 (s; 2H; H7), 3,87 (s; 3H; OCH₃), 3,87 (s; 3H; OCH₃), 1,85 (dd; 3H; J=1,53 Hz; J= 6,55 Hz; H17).

RMN de ¹³C (δ ; DMSO-d₆; 75 MHz): 149,8 (C2), 149,7 (C9), 147,5 (C1), 147,2 (C8), 135,6 (C2'), 133,5 (C4), 131,7 (C5'), 130,7 (C11), 130,5 (C15), 128,6 (C3', C7'), 128,5 (C4', C6'), 124,0 (C16), 119,8 (C5), 118,5 (C12), 114,4 (C13), 114,0 (C3), 111,3 (C6), 109,0 (C10), 71,2 (C7), 70,3 (C1'), 55,9 (-OCH₃), 55,8 (-OCH₃), 18,3 (C17).

EM-ESI/Q-TOF (m/z): [M+K]⁺ calculado para C₂₅H₂₅ClO₄ 463,1073; encontrado 463,1089, erro 3,4549 ppm.



(*E*)-3-(2-(4-((4-clorobenzil)oxi)-3-metoxifenil)-7-metoxi-3-metil-2,3-dihidrobenzofuran-5-il)acrilaldeído

Sólido laranja

F.F.: 126-128°C

Rendimento: 87% - 0,12 g (0,26 mmol) a partir de 0,1 g (0,3 mmol)

F.M.: C₂₇H₂₅ClO₅ **M.M.:** 464,94 g.mol⁻¹

Rf: 0,39 (hexano e acetato de etila, 7,0:3,0 v/v)

clogP: 6,11±0,43

IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm⁻¹): 2963 (C-H), 1673 (C=O), 1590 (C=C ar), 1225 (C-O-C), 808 (C-Cl).

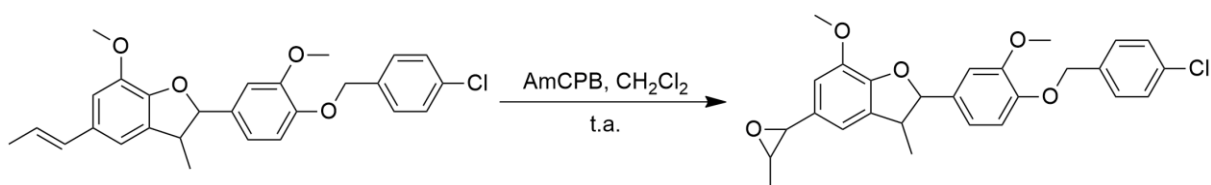
RMN de ¹H (δ ; DMSO-d₆; 300 MHz): 9,64 (d; 1H; J=7,71 Hz; H17), 7,44-7,27 (m; 5H; H3', H4', H6', H7', H15), 7,02 (s; 1H; H10), 7,00 (s; 1H; H3), 6,96 (d; 1H; J_{H5,H6}= 1,89 Hz; H5), 6,88 (dd; 1H; J_{H6,H5}=1,95 Hz; J_{H6,H3}=8,23 Hz; H6), 6,84-6,79 (m; 1H; H12), 6,64-6,56 (m; 1H; H16), 5,19 (d; 1H; J=9,12 Hz; H7), 5,10 (s; 2H; H1'), 3,91 (s; 3H; OCH₃), 3,87 (s; 3H; OCH₃), 3,55-3,46 (m, 1H, H14), 1,41 (d; 3H; J=6,81 Hz; C14-CH₃).

RMN de ¹³C (δ ; DMSO-d₆; 75 MHz): 193,5 (C17), 153,1 (C15), 150,6 (C2), 149,9 (C8), 148,1 (C1), 144,6 (C9), 135,4 (C2'), 133,9 (C4), 133,6 (C13), 132,6 (C5'), 128,7 (C3', C7'), 128,5 (C4', C6'), 128,1 (C11), 126,3 (C16), 119,0 (C5), 117,3 (C12), 113,9 (C6), 111,7 (C10), 110,0 (C3), 94,2 (C7), 70,3 (C1'), 56,0 (C2-OCH₃, C9-OCH₃), 45,0 (C14), 17,8 (C14-CH₃).

EM-ESI/Q-TOF (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₇H₂₅ClO₅ 465,1464; encontrado 465,1465, erro 0,2150 ppm.

6.1.6 Reação de epoxidação da licarina A (Luo, Qato e Guenther, 1992)

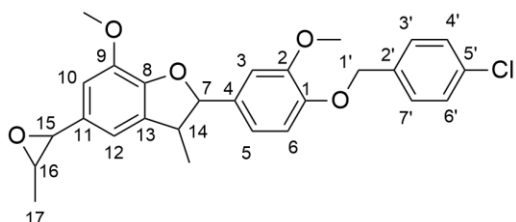
Figura 53 – Reação de epoxidação da licarina A.



Fonte: Da autora.

Foi adicionado em um balão de fundo redondo 0,36 mmol do derivado 1 (0,160 g), 10,0 mL de diclorometano seco e 0,7 mmol do ácido metacloroperbenzóico (0,126 g). A mistura reacional foi deixada em agitação magnética a temperatura ambiente. O acompanhamento da reação foi feito por CCD, usando como eluente hexano e acetato

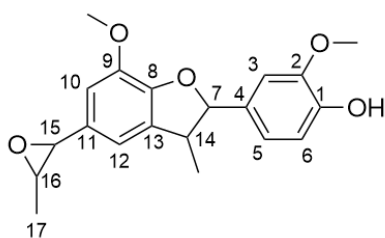
de etila (7,0:3,0; v/v). Após 4 horas foi identificado o término da reação. Foi, então, adicionado 0,9 mmol de fluoreto de potássio (0,053 g) e foi deixado em agitação por mais 1 hora, até formação de um precipitado. A suspensão foi filtrada a vácuo, e o filtrado, contendo o produto, foi concentrado em evaporador rotatório.



2-(4-((4-clorobenzil)oxi)-3-metoxifenil)-7-metoxi-3-metil-5-(3-meilloxiran-2-il)-2,3-dihidrobenzofurano

Óleo amarelo

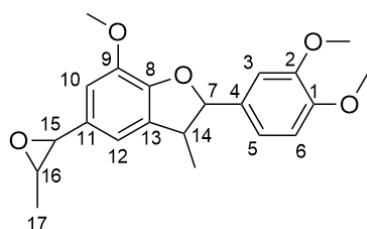
F.M.: C₂₇H₂₇ClO₅ **M.M.:** 466,95 g.mol⁻¹



2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-(3-metiloxiran-2-il)-2,3-dihidrobenzofuran-2-il)fenol

Óleo amarelo

F.M.: C₂₀H₂₂O₅ **M.M.:** 342,39 g.mol⁻¹



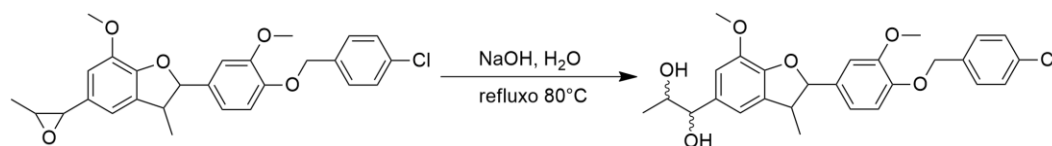
2-(3,4-dimetoxifenil)-7-metoxi-3-metil-5-(3-metiloxiran-2-il)-2,3-dihidrobenzofurano

Óleo amarelo

F.M.: C₂₁H₂₄O₅ **M.M.:** 356,42 g.mol⁻¹

6.1.7 Reação de abertura do epóxido da licarina A (Tyman; Payne, 2006)

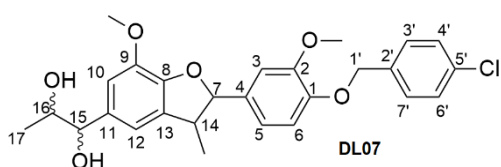
Figura 54 – Reação de abertura do epóxido da licarina A.



Fonte: Da autora.

Em um balão de fundo redondo foi adicionado 0,5 mmol do epóxido sintetizado (0,228 g - bruto), 10,0 mL de água destilada e 1,5 mmol de NaOH (0,06 g). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética em sistema de refluxo a 80°C. O andamento da reação foi acompanhado por CCD, usando com eluente hexano e

acetato de etila (6,0:4,0; v/v). Após o término da reação, a solução foi resfriada e acidificada até pH 1,0 com HCl concentrado. Transferiu-se a solução para um funil de separação e a mesma foi extraída com diclorometano. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio de anidro, o sal removido por filtração simples e o produto concentrado em evaporador rotatório. O produto foi purificado por CCD preparativa, tendo hexano e acetato de etila (1,0:1,0; v/v) como eluente.



1-(2-(4-((4-clorobenzil)oxi)-3-metoxifenil)-7-metoxi-3-metil-2,3-dihidrobenzofuran-5-yl)propano-1,2-diol

Sólido bege

F.F.: 89-85°C

Rendimento: 17% - 0,03 g (0,06 mmol) a partir de 0,16 g (0,36 mmol)

F.M.: C₂₇H₂₉ClO₆ **M.M.:** 484,97 g.mol⁻¹

Rf: 0,48 (hexano e acetato de etila, 4,0:6,0 v/v)

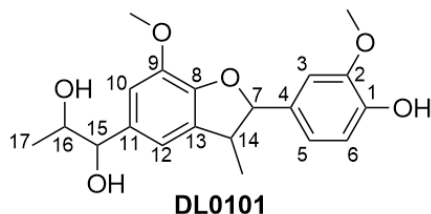
clogP: 4,28±0,40

IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm⁻¹): 3384 (O-H), 2929 (C-H), 1602 (C=C ar), 1262 (C-O-C).

RMN de ¹H (δ ; DMSO-d₆; 300 MHz): 7,35-7,28 (m; 4H; H3', H4', H6', H7'), 6,98 (d; 1H; J_{H5,H6}=1,83 Hz; H5), 6,86 (dd; 1H; J_{H6,H5}=1,83 Hz; J_{H6,H3}=8,26 Hz; H6), 6,81-6,72 (m; 3H; H3, H10, H12), 5,10-5,07 (m; 3H; H1', H7), 4,29 (d; 1H; J=7,26; H15), 3,88-3,83 (m; 7H; C2-OCH₃, C9-OCH₃, H16), 3,46-3,39 (m, 1H, H14), 3,29 (sl; 1H; C15-OH), 2,01 (s; 1H; C16-OH), 1,35 (d; 3H; J=6,78 Hz; C14-CH₃), 1,06 (d; 3H; J= 6,25 Hz; H17).

RMN de ¹³C (δ ; DMSO-d₆; 75 MHz): 149,7 (C2), 147,8 (C9), 147,0 (C1), 144,0 (C8), 135,4 (C2'), 134,6 (C4), 133,5 (C5'), 133,3 (C13), 133,0 (C11), 128,6 (C3', C7'), 128,5 (C4', C6'), 119,0 (C5), 114,2 (C12), 113,8 (C6), 110,2 (C3), 110,0 (C10), 93,4 (C7), 79,5 (C15), 72,2 (C16), 70,2 (C1'), 55,9 (C2-OCH₃, C9-OCH₃), 45,4 (C14), 18,8 (C17), 17,5 (C14-CH₃).

EM-ESI/Q-TOF (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₇H₂₇ClO₅ 485,1726; encontrado 485,1730, erro 0,8244 ppm.



1-(2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-7-metoxi-3-metil-2,3-dihidrobenzofuran-5-il)propano-1,2-diol
Óleo amarelo

Rendimento: 21% - 0,1 g (0,3 mmol) a partir de 0,5 g (1,46 mmol)

F.M.: C₂₀H₂₄O₆ **M.M.:** 360,41 g.mol⁻¹

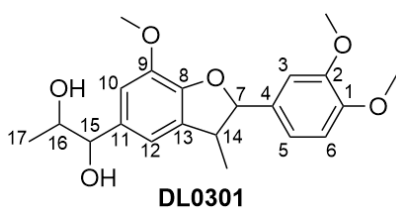
Rf: 0,24 (hexano e acetato de etila, 1,0:1,0 v/v)

clogP: 1,26±0,38

IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm⁻¹): 3396 (O-H), 2963 (C-H), 1604 (C=C ar), 1268 (C-O-C).

RMN de ¹H (δ ; DMSO-d₆; 300 MHz): 6,95-6,72 (m; 5H; H3, H5, H6, H10, H12), 5,10-5,09 (d; 1H; J=9,63 Hz; H7), 4,31 (d; 1H; J=7,53 Hz; H15), 3,90-3,85 (m; 7H; C2-OCH₃, C9-OCH₃, H16), 3,47-3,42 (m, 1H, H14), 1,35 (d; 3H; J=6,81 Hz; C14-CH₃), 1,07 (d; 3H; J= 6,27 Hz; H17).

RMN de ¹³C (δ ; DMSO-d₆; 75 MHz): 147,1 (C2), 146,7 (C9), 145,8 (C1), 144,0 (C8), 134,6 (C4), 133,3 (C13), 131,8 (C11), 119,9 (C5), 114,2 (C12), 114,1 (C6), 110,2 (C3), 108,9 (C10), 93,8 (C7), 79,7 (C15), 72,3 (C16), 56,0 (C2-OCH₃), 55,9 (C9-OCH₃), 45,6 (C14), 18,9 (C17), 17,4 (C14-CH₃).



1-(2-(3,4-dimetoxifenil)-7-metoxi-3-metil-2,3-dihidrobenzofuran-5-il)propano-1,2-diol
Sólido branco

F.F.: 118-122°C

Rendimento: 30% - 0,14 g (0,4 mmol) a partir de 0,48 g (1,35 mmol)

F.M.: C₂₁H₂₆O₆ **M.M.:** 374,43 g.mol⁻¹

Rf: 0,31 (hexano e acetato de etila, 1,0:1,0 v/v)

clogP: 2,03±0,39

IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm⁻¹): 3413 (O-H), 2959 (C-H), 1604 (C=C ar), 1262 (C-O-C).

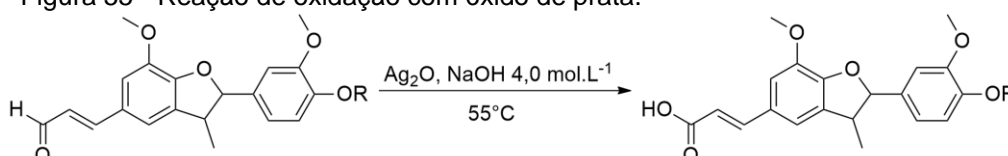
RMN de ¹H (δ ; DMSO-d₆; 300 MHz): 6,97-6,93 (m; 2H; H5 e H6), 6,84-6,73 (3; 3H; H3, H10, H12), 5,11 (d; 1H; J=9,63 Hz; H7), 4,31 (d; 1H; J=6,81 Hz; H15), 3,88-3,86

(m; 7H; C2-OCH₃, C9-OCH₃, H16), 3,49-3,43 (m, 1H, H14), 1,37 (d; 3H; J=6,75 Hz; C14-CH₃), 1,07 (d; 3H; J= 6,27 Hz; H17).

RMN de ¹³C (δ; DMSO-d₆; 75 MHz): 149,1 (C2 e C9), 147,2 (C1), 144,1 (C8), 134,6 (C4), 133,2 (C13), 132,3 (C11), 119,2 (C5), 114,2 (C12), 110,7 (C6), 110,1 (C3), 109,4 (C10), 93,7 (C7), 79,7 (C15), 72,3 (C16), 55,9 (C1-OCH₃), 55,8 (C2-OCH₃, C9-OCH₃), 45,5 (C14), 18,9 (C17), 17,4 (C14-CH₃).

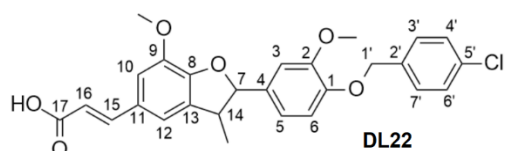
6.1.8 Reação de oxidação dos derivados aldeídicos (adaptado de Pearl, 1950)

Figura 55 - Reação de oxidação com óxido de prata.



Fonte: Da autora.

Em um balão de fundo redondo de 50,0 mL adicionou-se o derivado 16 (1,0 eq.) e NaOH 4,0 mol.L⁻¹ (20,2 mL). Deixou-se em agitação magnética até solubilização do aldeído. Em seguida foi adicionado óxido de prata (0,85 eq.) e colocou-se a mistura sob aquecimento a 55°C. A reação foi acompanhada por CCD com hexano e acetato de etila (7,0;3,0; v/v) como eluente. Após o término e resfriamento, a mistura reagente foi filtrada a vácuo para remover os resíduos de prata presentes. O filtrado foi acidificado até pH 2,0, seguindo com a extração do produto da fase aquosa com acetato de etila. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, o sal removido por filtração simples e o produto concentrado em rotaevaporador.



(E)-3-(2-(4-((4-chlorobenzyl)oxy)-3-methoxyphenyl)-7-methoxy-3-methyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-yl)acrylic acid

Sólido amarelo

F.F.: 148-152°C

Rendimento: 41% - 0,11 g (0,23 mmol) a partir de 0,26 g (0,56 mmol)

F.M.: C₂₇H₂₅ClO₆ **M.M.:** 480,94 g.mol⁻¹

Rf: 0,27 (hexano e acetato de etila, 6,0:4,0 v/v)

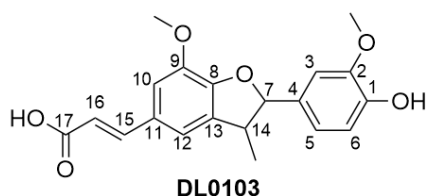
clogP: 6,40±0,40

IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 2920 (C-H), 1680 (C=O), 1602 (C=C ar), 1261 (C-O-C), 806 (C-Cl).

RMN de ^1H (δ ; DMSO- d_6 ; 300 MHz): 7,74 (d; 1H; $J=15,78$ Hz; H15), 7,37-7,30 (m; 4H; H3', H4', H6', H7'), 6,98 (dd; 3H; $J_{\text{H5,H6}}=1,77$ Hz; $J_{\text{H10,H12}}=9,61$; H5, H10, H12), 6,88 (dd; 1H; $J_{\text{H6,H5}}=1,85$ Hz; $J_{\text{H6,H3}}=8,29$ Hz; H6), 6,81 (d; 1H; $J_{\text{H3,H6}}=8,25$ Hz; H3), 6,31 (d; 1H; $J=15,84$ Hz; H16), 5,17 (d; 1H; $J=9,21$ Hz; H7), 5,10 (s; 2H; H1'), 3,91 (s; 3H; OCH₃), 3,87 (s; 3H; OCH₃), 3,54-3,44 (m, 1H, H14), 1,40 (d; 3H; $J=6,78$ Hz; C14-CH₃).

RMN de ^{13}C (δ ; DMSO- d_6 ; 75 MHz): 172,4 (C17), 150,2 (C2), 149,9 (C8), 148,1 (C15), 147,2 (C1), 144,5 (C9), 135,4 (C2'), 133,7 (C4), 133,6 (C5'), 132,9 (C13), 128,7 (C3', C7'), 128,6 (C4', C6'), 128,1 (C11), 119,0 (C5), 116,9 (C16), 114,4 (C12), 114,0 (C6), 111,6 (C10), 110,0 (C3), 94,1 (C7), 70,3 (C1'), 56,0 (C2-OCH₃, C9-OCH₃), 45,1 (C14), 17,7 (C14-CH₃).

EM-ESI/Q-TOF (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₇H₂₅ClO₆ 481,1413; encontrado 481,1410, erro -0,6235 ppm.



ácido (*E*)-3-(2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-7-metoxi-3-metil-2,3-dihidrobenzofuran-5-il)acrílico

Sólido amarelo claro

F.F.: 120-125°C

Rendimento: 49% - 0,06 g (0,17 mmol) a partir de 0,12 g (0,35 mmol)

F.M.: C₂₀H₂₀O₆ **M.M.:** 356,37 g.mol⁻¹

Rf: 0,23 (hexano e acetato de etila, 6,0:4,0 v/v)

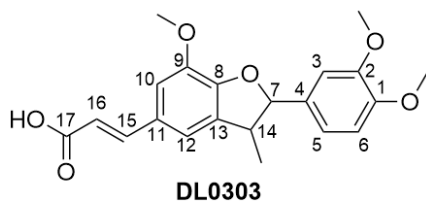
clogP: 3,38±0,39

IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 3505 (O-H), 2963 (C-H), 1679 (C=O), 1601 (C=C ar), 1272 (C-O-C).

RMN de ^1H (δ ; DMSO- d_6 ; 300 MHz): 7,75 (d; 1H; $J=15,84$ Hz; H15), 7,02-6,99 (m; 2H; H10, H12), 6,98-6,93 (m; 1H; H5), 6,90-6,89 (m; 2H; H3, H6), 6,32 (d; 1H; $J=15,84$ Hz; H16), 5,17 (d; 1H; $J=9,36$ Hz; H7), 3,91 (s; 3H; OCH₃), 3,88 (s; 3H; OCH₃), 3,53-3,47 (m, 1H, H14), 1,40 (d; 3H; $J=6,75$ Hz; C14-CH₃).

RMN de ^{13}C (δ ; DMSO- d_6 ; 75 MHz): 172,3 (C17), 150,1 (C2), 147,3 (C8), 146,7 (C15), 146,0 (C1), 144,5 (C9), 133,8 (C4), 131,3 (C13), 128,1 (C11), 120,0 (C5), 117,0 (C16),

114,3 (C12), 114,2 (C6), 111,5 (C10), 108,8 (C3), 94,4 (C7), 56,0 (C2-OCH₃, C9-OCH₃), 45,2 (C14), 17,6 (C14-CH₃).



ácido (*E*)-3-(2-(3,4-dimetoxifenil)-7-metoxi-3-metil-2,3-dihidrobenzofuran-5-il)acrílico

Sólido amarelo

F.F.: 78-81°C

Rendimento: 38% - 0,05 g (0,13 mmol) a partir de 0,12 g (0,34 mmol)

F.M.: C₂₁H₂₂O₆ **M.M.:** 370,4 g.mol⁻¹

Rf: 0,27 (hexano e acetato de etila, 6,0:4,0 v/v)

clogP: 4,15±0,39

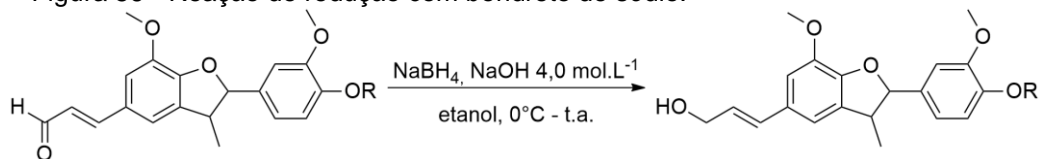
IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm⁻¹): 2960 (C-H), 1683 (C=O), 1601 (C=C ar), 1263 (C-O-C).

RMN de ¹H (δ ; DMSO-d₆; 300 MHz): 7,74 (d; 1H; J=15,81 Hz; H15), 7,05-6,82 (m; 5H; H3, H5, H6, H10, H12), 6,32 (d; 1H; J=15,81 Hz; H16), 5,19 (d; 1H; J=9,30 Hz; H7), 3,91 (s; 3H; OCH₃), 3,87 (s; 3H; OCH₃), 3,86 (s; 3H; OCH₃), 3,56-3,46 (m, 1H, H14), 1,41 (d; 3H; J=6,81 Hz; C14-CH₃).

RMN de ¹³C (δ ; DMSO-d₆; 75 MHz): 172,3 (C17), 150,1 (C2), 149,3 (C8), 149,2 (C15), 147,2 (C1), 144,5 (C9), 133,8 (C4), 132,0 (C13), 128,1 (C11), 119,2 (C5), 117,0 (C16), 114,3 (C12), 111,6 (C6), 111,0 (C10), 109,3 (C3), 94,3 (C7), 56,0 (C2-OCH₃), 55,9 (C9-OCH₃), 45,1 (C14), 17,6 (C14-CH₃).

6.1.9 Reação de redução dos derivados aldeídicos (adaptado de Mochalov *et al.*, 2016; Ward; Rhee, 1989)

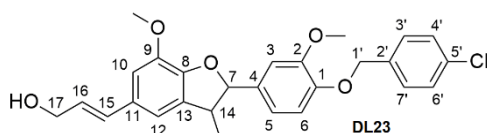
Figura 56 - Reação de redução com boridreto de sódio.



Fonte: Da autora.

Em um balão de fundo redondo de 50,0 mL adicionou-se o derivado a ser reduzido (1,0 eq.) e etanol (2,0 mL). Deixou-se em agitação magnética até

solubilização do aldeído, sob banho de gelo. Em seguida, foi adicionado boroidreto de sódio (1,0 eq.) solubilizado em NaOH 1,0 mol.L⁻¹ (1,0 mL), gota a gota, durante 10 minutos. Após esse tempo a reação foi deixada a temperatura ambiente e foi acompanhada por CCD com hexano e acetato de etila (7,0;3,0; v/v) como eluente. Após o término da reação, colocou-se novamente o balão em banho de gelo e adicionou-se HCl 20% (v/v) gota a gota, até pH 2,0. A reação foi deixada sob agitação magnética em banho de gelo por mais 10 minutos. Em seguida, quando houve a formação de um sólido, filtrou-se a vácuo a mistura reacional lavando-se o sólido com água gelada e o produto foi mantido em dessecador. Quando não foi formado o sólido, o solvente da reação foi eliminado em evaporador rotatório, o resíduo foi ressuspensionado em água destilada e extraído com diclorometano e, logo após, lavou-se a fase orgânica com uma solução saturada de cloreto de sódio. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, o sal retirado por filtração simples e o produto final obtido após eliminação do solvente em rotaevaporador.



(E)-3-(2-(4-((4-chlorobenzyl)oxy)-3-methoxyphenyl)-7-methoxy-3-methyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-yl)prop-2-en-1-ol

Sólido amarelo escuro

F.F.: 118-120°C

Rendimento: 70% - 0,1 g (0,21 mmol) a partir de 0,14 g (0,3 mmol)

F.M.: C₂₇H₂₇ClO₅ **M.M.:** 466,95 g.mol⁻¹

Rf: 0,35 (hexano e acetato de etila, 6,0:4,0 v/v)

clogP: 5,68±0,39

IV (ATR, $\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm⁻¹): 3517 (O-H), 2954 (C-H), 1598 (C=C ar), 1217 (C-O-C), 808 (C-Cl).

RMN de ¹H (δ ; DMSO-d₆; 300 MHz): 7,36-7,28 (m; 4H; H3', H4', H6', H7'), 6,98 (d; 1H; J_{H5,H6}= 1,8 Hz; H5), 6,86 (dd; 1H; J_{H6,H5}=1,86 Hz; J_{H6,H3}=8,26 Hz; H6), 6,82-6,78 (m; 3H; H3, H10, H12), 6,54 (d; 1H; J= 15,84 Hz; H15), 6,27-6,17 (m; 1H; H16), 5,11-5,09 (m; 3H; H7, H1'), 4,27 (dd; 2H; J=1,2 Hz; J=5,88 Hz; H17), 3,87 (s; 3H; OCH₃), 3,85

(s; 3H; OCH₃), 3,49-3,42 (m, 1H, H₁₄), 2,02 (s; 1H; OH), 1,36 (d; 3H; J=6,78 Hz; C14-CH₃).

RMN de ¹³C (δ; DMSO-d₆; 75 MHz): 149,6 (C2), 147,8 (C8), 147,1 (C1), 144,0 (C9), 135,4 (C2'), 133,4 (C4), 133,2 (C5'), 133,2 (C13), 131,2 (C11), 130,7 (C15), 128,6 (C3', C7'), 128,5 (C4', C6'), 126,2 (C16), 118,9 (C5), 114,0 (C12), 113,5 (C6), 109,8 (C3), 109,6 (C10), 93,5 (C7), 70,1 (C1'), 63,6 (C17), 55,9 (OCH₃), 55,8 (OCH₃), 45,3 (C14), 17,5 (C14-CH₃).

EM-ESI/Q-TOF (m/z): [M+H]⁺ calculado para C₂₇H₂₇ClO₅ 467,1620; encontrado 467,1614, erro -1,2844 ppm.

6.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA

As avaliações biológicas foram supervisionadas pelo Prof. Ivo Santana Caldas, no Laboratório de Parasitologia do Departamento de Patologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da UNIFAL-MG. As avaliações de citotoxicidade e sobre a forma amastigota intracelular do parasito, foram realizadas pela Prof. Livia Figueiredo Diniz, do mesmo departamento acima citado.

6.2.1 Avaliação da atividade *in vitro* sobre formas epimastigotas de *T. cruzi*

Para a avaliação do efeito anti-epimastigota dos derivados da (-)-licarina A foi utilizada a cepa Y de *T. cruzi* e o fármaco benznidazol (Bz) foi usado como fármaco de referência nos ensaios. As formas epimastigotas foram mantidas em laboratório em meio LIT por intermédio de repiques semanais. Para quantificar a atividade de cada substância sobre o parasita, foi utilizada reação colorimétrica previamente padronizada.

Foram adicionados, em uma placa de 96 poços, 150,0 µL das substâncias à 200,0 µg/mL, em triplicata. Realizando, logo após, diluições seriadas a fim de se obter 7 concentrações finais (200-3,12 µg/mL). Em seguida, foi adicionado 50,0 µL de uma suspensão de parasitos na concentração de 1,5x10⁶ parasitas/mL, após contagem em câmara de Neubauer. As placas foram incubadas em estufa BOD, a 28°C, por 72 horas. Após esse período foram adicionados 20,0 µL de resazurina/poço e após 10

horas foi realizada a leitura da reação a 570 nm e 600 nm, utilizando um leitor de microplacas.

Foram organizados, em cada placa, poços com o controle negativo (meio), controle positivo (meio+parasitos), controle com derivados e fármaco padrão (meio+droga, na ausência de parasitos) e controle de solvente (meio + DMSO). Dessa forma foi possível verificar o potencial de qualquer constituinte em efetuar redução do corante resazurina.

A porcentagem de inibição da proliferação de epimastigotas foi calculada a partir da fórmula:

$$\% \text{ inibição} = 100 - [A_{570} - (A_{600} \times R_0)_{\text{Tratado}} / A_{570} - (A_{600} \times R_0)_{\text{Controle+}}] \times 100.$$

Nessa fórmula, A_{570} = absorvância a 570nm, A_{600} = absorvância a 600nm e R_0 é o fator de correção, calculado a partir dos valores de absorvância do controle negativo, ou seja, apenas meio de cultura e resazurina na ausência de parasitos [$R_0 = (A_{570} / A_{600})$].

A partir do percentual de inibição de cada concentração das substâncias foi calculada a CI_{50} (concentração inibitória do composto avaliado que induz a 50% do efeito analisado), utilizando o programa *CompuSyn*[®].

6.2.2 Avaliação da atividade *in vitro* sobre formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi*

A metodologia empregada para a avaliação da atividade *in vitro* sobre as formas amastigotas segue o descrito no trabalho de Machado e colaboradores (2020). Células Vero foram quantificadas em câmara de Neubauer e plaqueadas na concentração de 1×10^4 células.mL⁻¹, sobre lamínulas de vidro em placas de cultura de 24 poços. Após 24 horas em estufa a 37°C, 5% CO₂, as células foram infectadas, na proporção de 10 parasitos por célula, com formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, obtidas de cultivo celular. Decorridas 24 horas, o meio de cultura foi removido e os poços lavados com meio fresco para remover os parasitos não internalizados. A seguir foi adicionado meio de cultura contendo 5,0 µg.mL⁻¹ das substâncias, sendo incluídos controles positivos (células infectadas, na ausência de fármacos) e negativos (células e meio).

As placas foram novamente incubadas por 72 horas; após o período de incubação as lamínulas foram removidas, lavadas em PBS, fixadas por 5 minutos em metanol e finalmente coradas pelo Giemsa (10% v/v em água destilada). A determinação do número de células infectadas (contendo amastigotas viáveis) foi feita por meio de leitura em microscópio óptico de 200 células. A partir dos valores de percentual de infecção das células submetidas ou não à incubação com as substâncias foram calculados os valores de inibição da infecção. Todos os gráficos foram feitos no software *Prism* 8.0 e os valores de IC-50 foram determinados utilizando o programa *CompuSyn*.

6.2.3 Avaliação da atividade *in vitro* sobre formas tripomastigotas de *T. cruzi*

Para avaliação da atividade anti-tripomastigota foram utilizadas formas tripomastigotas da cepa Y, obtidas a partir do sobrenadante de culturas de células Vero previamente infectadas. Cem microlitros de uma suspensão de DMEM 5% SFB contendo $1,5 \times 10^6$ parasitos.mL⁻¹ foram pipetados, em triplicata, em placas de 96 poços. Os parasitos foram incubados com as substâncias em concentrações decrescentes (2,5, 5,0 e 10 µg.mL⁻¹) utilizando diluições seriadas 1:2, sendo a concentração inicial de 10 µg.mL⁻¹. Foram incluídos como controles parasitos apenas em meio de cultura e em meio+ DMSO (na mesma concentração utilizada nos poços incubados com as substâncias). Após 24 horas em estufa a 37°C em atmosfera 5% CO₂, os parasitos foram quantificados em câmara de Neubauer. Utilizando os valores de percentual de mortalidade dos parasitos incubados ou não com as substâncias foram calculados os valores de CI₅₀. Para esse cálculo foi utilizado o programa *CompuSyn*. Os gráficos foram construídos no *Graphpad Prism 7.0* (MACHADO et al, 2020).

6.2.4 Avaliação de citotoxicidade

A avaliação de citotoxicidade das substâncias foi realizada conforme descrito por Machado e colaboradores (2020). Para avaliar os efeitos tóxicos das substâncias sobre as células hospedeiras, foram utilizadas culturas de células Vero não infectadas, incubadas com as substâncias por 72 horas. Posteriormente a viabilidade celular foi

quantificada por meio da reação da resazurina. Duzentos microlitros de suspensão das células Vero, na concentração de $4,5 \times 10^4$ células/mL, foram pipetados em placas de 96 poços e incubados a 37°C, 5% CO₂, por 24 horas. O meio de cultura foi removido e substituído por 200 µL de meio contendo ou não as substâncias em concentrações decrescentes. Após 72 horas a 37°C, o sobrenadante foi removido e então adicionados, em cada poço, 200 µL de meio de cultura fresco contendo 20 µL de resazurina 1mM, um indicador de proliferação celular. Decorridas 3 horas de incubação, a 37°C, a placa foi lida em leitor de microplacas (570 nm e 600 nm). No ensaio foram incluídos controles negativos (meio+resazurina); positivos (meio+células) e ainda controle de morte celular (DMSO). O percentual de inibição da proliferação celular induzida pelos fármacos foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left[\frac{A_{570} - (A_{600} \times R_0) \text{ Tratado}}{A_{570} - (A_{600} \times R_0) \text{ Controle}} \right] \times 100$$

Nesta fórmula, A₅₇₀= Absorbância a 570nm, A₆₀₀= Absorbância a 600 nm, Controle + é o poço contendo células, meio e resazurina, na ausência do fármaco. R₀ é o fator de correção, calculado a partir dos valores de absorbância do controle negativo (C-), ou seja, apenas meio de cultura e resazurina na ausência de células [R₀ = (A₅₇₀/A₆₀₀)C-]. A absorbância do meio de cultura foi subtraída de todas as amostras (meio na ausência de resazurina). Todas as avaliações *in vitro* foram realizadas no mínimo duas vezes e utilizando duplicatas.

6.2.5 Avaliação da atividade tripanocida *in vivo*

Camundongos *Swiss* foram infectados, por via intraperitoneal, com 5×10^3 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi*, obtidos por punção do plexo venoso retro-orbital de camundongos infectados, no dia do pico de parasitemia.

Os camundongos utilizados no estudo foram selecionados aleatoriamente e devidamente identificados com ácido pícrico, conforme padrão estabelecido no laboratório. Os animais foram divididos em três grupos: o grupo controle positivo, os tratados com **DL01**, substância protótipo, e os tratados com **DL07**, substância que apresentou atividade satisfatória nos ensaios *in vitro*. Assim, para cada substância foram utilizados nove animais, sendo que eles foram subdivididos em três subgrupos nos quais receberam diferentes dosagens das substâncias. O grupo tratado com o

fármaco de referência, o benznidazol, não foi utilizado nesses estudos pois já é de amplo conhecimento que o tratamento com esse fármaco na concentração de 100 mg/kg leva a supressão total da parasitemia no terceiro dia de tratamento.

O experimento teve início com a infecção de todos os camundongos com o parasito em sua forma tripomastigota por injeção intraperitoneal, sendo este o dia 1 de infecção. No quinto dia iniciou-se o tratamento com as substâncias previamente preparadas. Os grupos de camundongos tratados com as substâncias escolhidas receberam o tratamento durante sete dias consecutivos, após a confirmação da infecção. As substâncias foram preparadas como suspensão aquosa contendo 5,0% de cremophor para auxiliar a solubilização e foram administradas aos camundongos por gavagem, nas concentrações de 10, 50 e 100 mg/kg de peso corporal.

6.2.5.1 Avaliação da parasitemia

O exame de sangue a fresco foi realizado diariamente desde a detecção da parasitemia, a fim de determinar a supressão e/ou a reativação natural da parasitemia. Cinco microlitros de sangue foram coletados da veia caudal dos camundongos, sendo a quantificação dos parasitos realizada segundo a técnica descrita por Brener (1962).

Foi considerada supressão da parasitemia a ausência de parasitos, detectados no exame de sangue a fresco durante o período de tratamento. O exame foi realizado em todos os camundongos de cada grupo, comparando-se a média de supressão dos grupos tratados ou do grupo controle infectado.

6.2.6 Análise estatística

Diferenças estatísticas foram determinadas de acordo com a análise de variância *one-way* ANOVA, seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Dunnett ou teste T, tendo como nível de confiança 95% e de significância 0,05.

6.3 ESTUDOS COMPUTACIONAIS

6.3.1 Estudos de ancoragem molecular

Os estudos de ancoragem molecular envolvendo os derivados da licarina A propostos e a enzima tripanotiona redutase foram realizados utilizando-se o programa AutoDock Vina 1.1.2 (TROTT & OLSON, 2010). O desenho e otimização da geometria dos ligantes foram realizados utilizando-se o programa BIOVIA Discovery Studio v16.1.0.15350 (DASSAULT SYSTÈMES, 2016). As coordenadas referentes à estrutura cristalográfica da tripanotiona redutase foi obtida a partir do banco de dados *Protein Data Bank* (PDB ID 1BZL) (<http://www.rcsb.org/pdb>). Os arquivos da macromolécula e dos ligantes foram convertidos ao formato *.pdbqt e a região de busca conformacional foi definida utilizando o programa AutoDockTools 1.5.6 (MORRIS *et al.*, 2009). A região de busca conformacional foi definida com as dimensões 22 Å x 22 Å x 22 Å, centralizada no ponto de coordenada 24.033x7.354x-7.128. Os resultados referentes aos estudos de ancoragem molecular foram analisados por meio dos programas PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Versão 1.3, Schrödinger, LLC) e BIOVIA Discovery Studio Visualizer v16.1.0.15350.

6.3.2 Estudos de previsão das propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e metabólicas

As propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e metabólicas das substâncias sintetizadas foram previstas usando o servidor online gratuito SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, F. *et al.* Trypanocidal constituents in plants 1. Evaluation of some mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in Guaco, Roots of *Aristolochia taliscana*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, p. 1188-1191, 2002.
- ALVARENGA, D.J. *et al.* Exploring how structural changes to new licarin A derivatives effects their bioactive properties against rapid growing Mycobacteria and biofilm formation. **Microbial Pathogenesis**, v. 144, 2020.
- ALVIM JUNIOR, J. *et al.* Preparation and Evaluation of a Coumarin Library Towards the Inhibitory Activity of the Enzyme gGAPDH from *Trypanosoma cruzi*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, v. 4, p. 763-773, 2005.
- AMETA, K. L. *et al.* Synstehsis and trypanocinal evaluation of some novel 2-(substituted benzylidene)-5,7-dibromo-6-hydroxy-1-benzofuran-3(2H)-ones. **International Journal of Organic Chemistry**, v. 2, p. 295,301, 2012.
- ARELLANES, M. A. J.; CORTÉS, N. R. R.; GARCÍA, I. Actividad antioxidante y antimicrobiana del extracto hexánico y compuestos puros del rizoma de *Aristolochia taliscana*. **Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas**, v. 42, n. 3, 2011.
- ARGÜELLES, A. J.; CORDELL, G. A.; MARUENDA, H. Molecular docking and binding mode analysis of plant alkaloids as *in vitro* and *in sílico* inhibitors of trypanothione reductase from *Trypanosona cruzi*. **Natural Product Communications**, vol 11, n. 1, p. 57-62, 2016.
- ASIF, M. Mini review on important biological properties of benzofuran derivatives. **Journal of analytical and pharmaceutical research**, v. 3, n. 2, p. 1-4, 2016.
- BAHIA, M. T.; DINIZ, L. F.; MOSQUEIRA, V. C. F. Therapeutical approaches under investigation for treatment of Chagas disease. **Expert Opinion Investigational Drugs**, v. 23, n. 9, 2014.
- BALEKI, P. **A Magia do Pensamento**: reflexões para a busca da felicidade. São Paulo: Editora Navegar, 2005.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal**: as bases moleculares da ação dos fármacos. Porto Alegre: Artmed, 2008.
- BERMUDEZ, J. *et al.* Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Tropica**, v. 156, p. 1–16, 2016.
- BERN, C. Chagas' Disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 5, p. 456-466, 2015.
- BERTOLINI, F.; PINESCHI, M. Recent progress in the synthesis of 2,3-dihydrobenzofurans. **Organic Preparations and procedures international**, v. 41, p. 385-418, 2009.

BOND, C. S. *et al.* Crystal structure of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase in complex with trypanothione, and the structure-based discovery of new natural product inhibitors. **Structure**, v. 7, p. 81-89, 1999.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 4, p. 389-396, 1962.

CDC - Center for Disease Control and Prevention. **Parasites - American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease)**. Publicado em: 24 de maio de 2016. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>. Acesso em: 28 de set. de 2017.

CHIU, S. *et al.* HPLC-Guided Isolation, Purification and Characterization of Phenylpropanoid and Phenolic Constituents of Nutmeg Kernel (*Myristica fragrans*). **Natural Product Communications**, v. 11, n. 4, p. 483-488, 2016.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. **Organic Chemistry**. USA: Oxford University Press, ed. 2, 2012.

COOLEN, H.K.A.C. *et al.* Substrate Selective Catalysis by Rhodium Metallohosts. **Journal of the American Chemical Society**: v. 117, p. 11906-11913, 1995.

DASSAULT SYSTÈMES. BIOVIA, **Discovery Studio Modeling Environment**, Release 2017, San Diego: Dassault Systèmes, 2016.

DAVIES, S. G. *et al.* The stereodivergent asymmetric synthesis of a range of 2-(1'-hydroxyalkyl)-phenols. **Tetrahedron**, v.66, p. 8076-8088, 2010.

DAVIS, C .O.; STÖPPLER, M.C. **Chagas Disease (American Trypanosomiasis or Kissing Bug Disease)**. MedicineNet.com: 12 de fevereiro de 2015. Disponível em: http://www.medicinenet.com/chagas_disease/article.htm. Acesso em: 26 de jul. de 2016.

DIAS, L. C. *et al.* Quimioterapia da doença de chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2444-2457, 2009.

FERNANDEZ-PASTOR, I. *et al.* Semisynthesis of ω -Hydroxyalkylcarbonate derivatives of hydroxytyrosol as antitrypanosome agentes. **Journal of Natural Products**, v. 81, p. 2075-2082, 2018.

GOMES, M. N. *et al.* Chalcone derivatives: promising starting points for drug design. **Molecules**, v. 22, n. 1210, p. 1-25, 2017.

HUANG, J. *et al.* Identifying P-glycoprotein substrates using a support vector machine optimized by a particle swarm. **Journal of Chemical Information and Modeling**: v. 47, p. 1638-1647, 2007.

ILIEFSKI, T.; LI, S.; LUNDQUIST, K. Synthesis of Cinnamaldehydes, Esters of Cinnamic Acids and Acylals of Cinnamaldehydes by Oxidation of Arylpropenes with

2,3-Dicyano-5,6-dichlorobenzoquinone (DDQ). **Tetrahedron Letters**, n. 39, p. 2413-2416, 1998.

JAMES. **Demystifying alcohol oxidations**. Master Organic Chemistry, 2015. Disponível em: <http://www.masterorganicchemistry.com/2015/05/21/demystifying-alcohol-oxidations/>. Acesso em: 31 jan. 2017.

KRATZ, J. M. *et al.* Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, vol. 11, n. 10, p. 943-957, 2018.

KEENAN, M.; CHAPLIN, J. H. A new era for Chagas disease drug discovery? **Progress in Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 185-230, 2015.

LAZARIN-BIDÓIA, D. *et al.* Further evidence of the trypanocidal action of eupomatenoid-5 - confirmation of involvement of reactive oxygen species and mitochondria owing to a reduction in trypanothione reductase activity. **Free radical biology and medicine**, v. 60, p. 17-28, 2013.

LEE, J.S. *et al.* Inhibition of Phospholipase C γ 1 and Cancer Cell Proliferation by Lignans and Flavans from *Machilus thunbergii*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 27, n. 10, p. 1043-1047, 2004.

LÉON-DÍAZ, R. *et al.* Antimycobacterial neolignans isolated from *Aristolochia taliscana*. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 1, p. 45-51, 2010.

LEPESHEVA, G. I. *et al.* Structural insights into inhibition of sterol 14 α -demethylase in the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, p. 25582–25590, 2010.

LIN, S. *et al.* Biological evaluation of secondary metabolites from the root of *Machilus obovatifolia*. **Chemistry and Biodiversity**, v. 12, n. 7, p. 1057-1067, 2015.

LIPNICK, R. L. Structure-activity relationships. In: RAND, G. M. **Fundamentals of aquatic toxicology**. Flórida: CRC Press, cap 20, p. 603-650, 1995.

LIU, S. *et al.* Synthesis of dihydrobenzofuran neolignans licarin A and dihydrocarinatin as well as related triazolylglycosides. **Chemical Research in Chinese Universities**, v. 29, n. 6, p. 1119-1124, 2013.

LUO, G.; QATO, M.; GUENTHNER, T.M. Hydrolysis of the 2',3'-allylic epoxides of allylbenzene, estragole, eugenol, and safrole by both microsomal and cytosolic epoxide hydrolases. **Drug metabolism and disposition**, v. 20, p. 440–445, 1992.

LIPINSKI, C. A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug Discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**: v. 46, p. 3-26, 2001.

MACHADO, Y.A. *et al.* Amlodipine increases the therapeutic potential of ravuconazole upon *Trypanosoma cruzi* infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2020.

MARQUES, S.D.G. **Síntese de lignanas por acoplamento oxidativo de fenilpropanoides**. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos): Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014.

MELETI, V.R.; *et al.* (\pm)-licarin A and its semi-synthetic derivatives: in vitro and in silico evaluation of trypanocidal and schistosomicidal activities. **Acta tropica**, v. 202, 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de vigilância em saúde. **Boletim epidemiológico**, v. 46, n. 21, 2015.

MOCHALOV, S. S. *et al.* Direct synthesis of ethers from aldehydes and ketones. One-Pot reductive etherification of benzaldehydes, alkyl ketones, and benzophenones. **Russian Journal of Organic Chemistry**, n. 4, v. 52, p. 503-512, 2016.

MORAES, C. B.; FRANCO, C. H. Novel drug discovery for Chagas disease. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 11, p. 447-455, 2016.

MORAIS, T. R. *et al.* Improving the drug-likeness of inspiring natural products – evaluation of the antiparasitic activity against *Trypanosoma cruzi* through semi-synthetic and simplified analogues of licarin A. **Nature Research – Scientific Reports**, v. 10, n. 5467, 2020.

MURAKAMI, Y. *et al.* Dehydrodiisoeugenol, an isoeugenol dimer, inhibits lipopolysaccharide-stimulated nuclear factor kappa β activation and cyclooxygenase-2 expression in macrophages. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 434, p. 326-332, 2005.

MORIGUCHI, I. *et al.* Simple method of calculating octanol/water partition coefficient. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**: v. 40, p. 127–130, 1992.

MORRIS, G. M. *et al.* Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 16, p. 2785-2791, 2009.

Oliveira, B.H.M. *et al.* Synthesis and tumoral test of (\pm)-4-O-demethylKadsurenin M a natural compound and analogues. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 10, p. 19109-19123. 2019.

PATRICK, G. L. An introduction to Medicinal Chemistry. **Oxford University Press**, ed. 5, 2013.

PAUL, M. *et al.* Reaction systems for bubbly flows. **European Journal of Inorganic Chemistry**, 2018.

PEARL, I. A. Vanillic acid silver oxide method. **Organic Syntheses**: v. 4, p. 972, 1950.

PELOSO, M. F. *et al.* Synthesis of new hybrid derivatives from metronidazole and eugenol analogues as trypanocidal agentes. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 24, p. 421-434, 2021

PEREIRA, A. C. *et al.* Schistosomicidal and trypanocidal structure-activity relationships for (±)-licarin A and its (-)- and (+)-enantiomers. **Phytochemistry**, v. 72, p. 1424-1430, 2011.

PESSINI, G. L. *et al.* Antifungal activity of the extracts and neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6a, p. 1130-1133, 2005.

RODRIGUES, L. C. *et al.* Formation of bioactive benzofuran via oxidative coupling, using coconut water (*Cocos nucifera* L.) as biocatalyst. **Organic Community**, v. 10, n. 2, p. 72-78, 2017.

SANTOS, N. C.; PAIXÃO, V. G.; PITA, S. S. R. New *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase inhibitors identification using the virtual screening in database of Nucleus Bioassay, Biosynthesis and Ecophysiology (NuBBE). **Anti-Infective Agents**, vol. 17, p. 138-149, 2019.

SAWASDEE, K. *et al.* New neolignans and a lignan from *Milium fragrans*, and their anti-herpetic and cytotoxic activities. **Tetrahedron letters**, v. 53, p. 4259-4263, 2013.

SHAMSUZZAMAN, H. K. Bioactive benzofuran derivatives: a review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 483-504, 2015.

SHWETA, M.; RASHMI, D. *In-vitro* ADME studies of TUG-891, a GPR-120 inhibitor using Swiss ADME predictor. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 9, n. 2, p. 366-369, 2019.

SIMÕES, C. M. O. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: **Editora UFRGS**, ed. 6, 2010.

SINGH, G. *et al.* Antimicrobial and antioxidant potentials of essential oil and acetone extract of *Myristica fragrans* Houtt. (AriI Part). **Journal of food science**, v. 70, n. 2, p. 141-148, 2005.

Souza, V. A. **Síntese e avaliação da atividade biológica de neolignanas e análogos**. Tese (Doutorado): Universidade Federal de São Carlos, 2012.

SOUZA, V. A.; NAKAMURA, C. V.; CORRÊA, A. G. Atividade antichagásica de lignanas e neolignanas. **Revista virtual de Química**, v. 4, n. 3, p. 197-207, 2012.

TISHLER, M. Molecular modification in modern drug research. **American Chemical Society** – Advances in Chemistry, cap. 1, p. 1-14, 1964.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading, **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, p. 455-461, 2010.

TYMAN, J. H. P.; PAYNE, P. B. The synthesis of phenolic propane-1, 2- and 1, 3-diols as intermediates in immobilized chelantants for the borate anion. **Journal of Chemical Research**, nov., p. 691-695, 2006.

UFRGS - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. **Atlas eletrônico de parasitologia**. Instituto de Ciências Básicas da Saúde, 2010. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/para-site/siteantigo/Imagensatlas/Protozoa/Trypanosomacruzi.htm>. Acessado em: 28 de jun. de 2016.

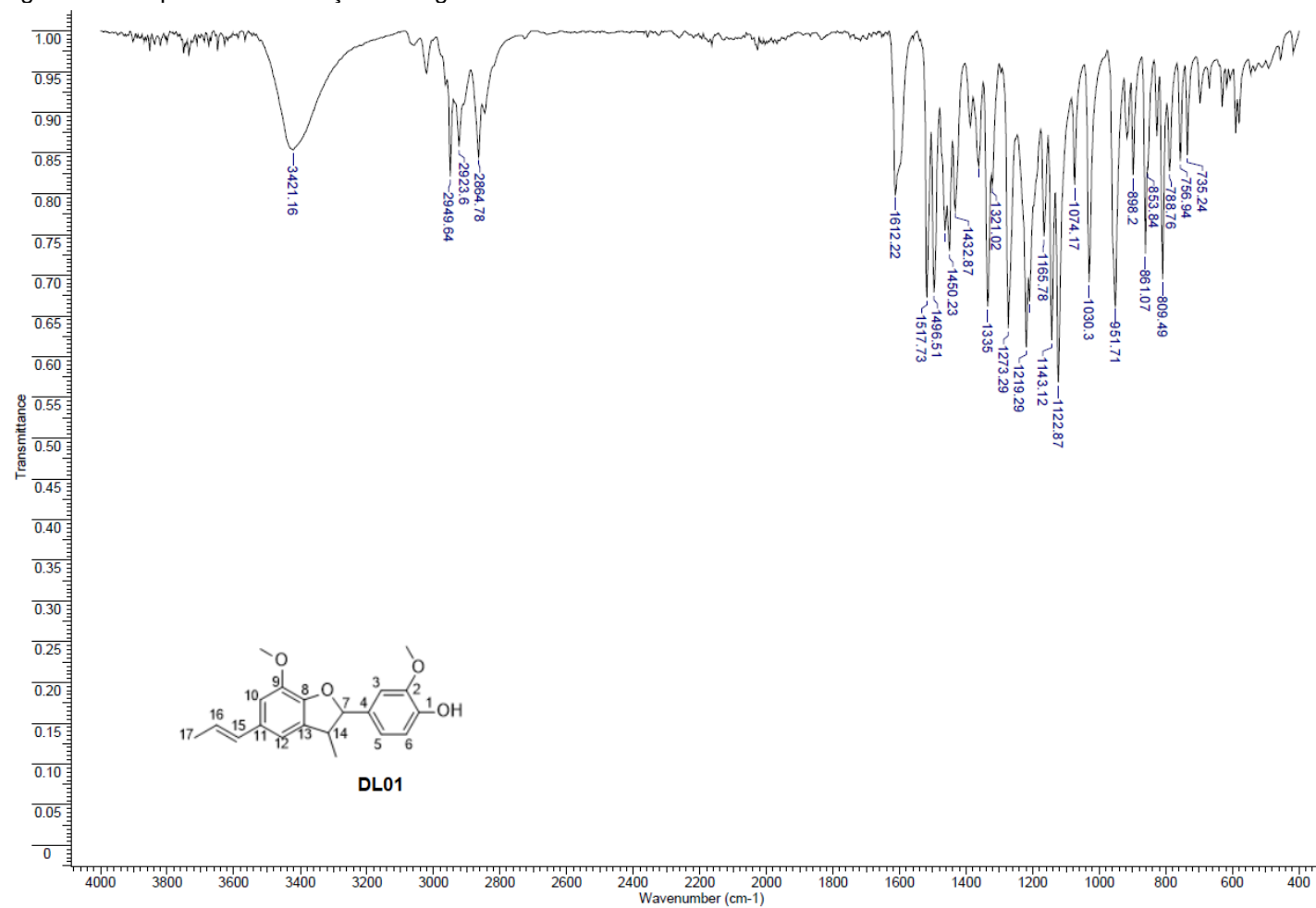
URBINA, J. A. Recent Clinical Trials for the Etiological Treatment of Chronic Chagas Disease: Advances, Challenges and Perspectives. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 149-146. 2015.

WARD, D. E.; RHEE, C. K. Chemoselective reductions with sodium borohydride. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 67, p. 1206-1211, 1989.

WHO - World Health Organization. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Publicado em: março de 2020. Disponível em: [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Acesso em: 21 de jul. de 2020.

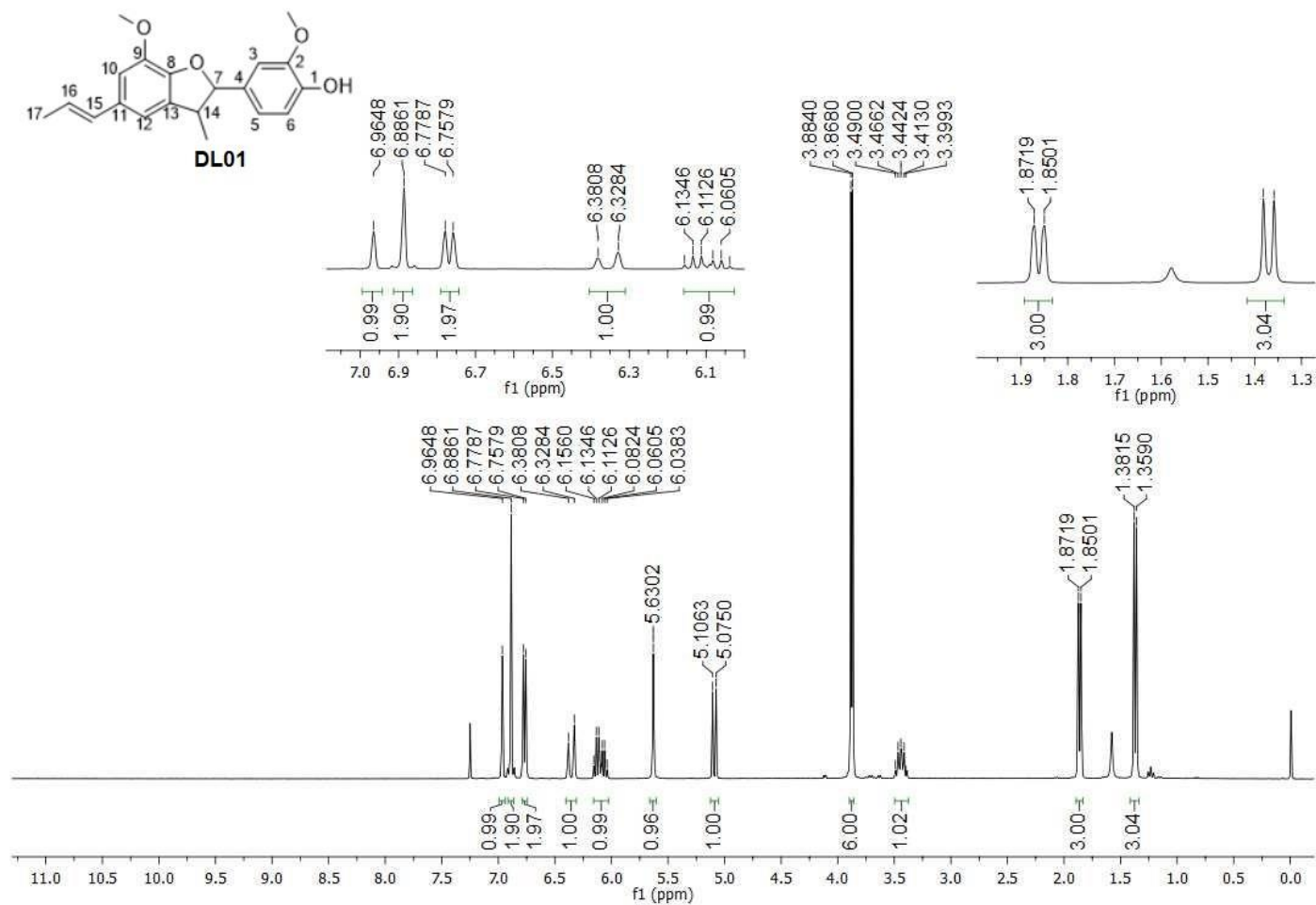
APÊNDICE A

Figura 57 – Espectro de absorção na região do IV do derivado DL01.

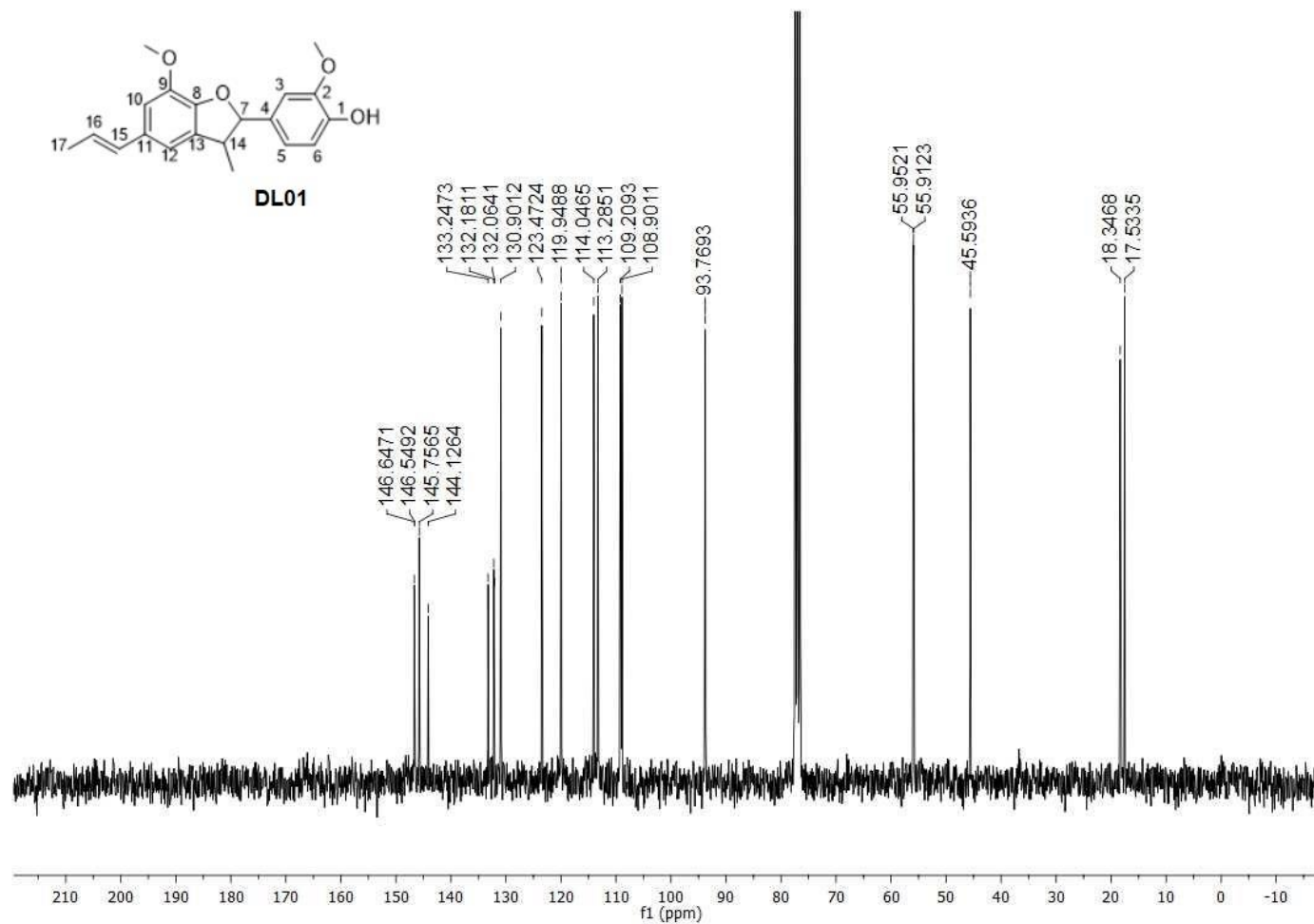


Fonte: Da autora.

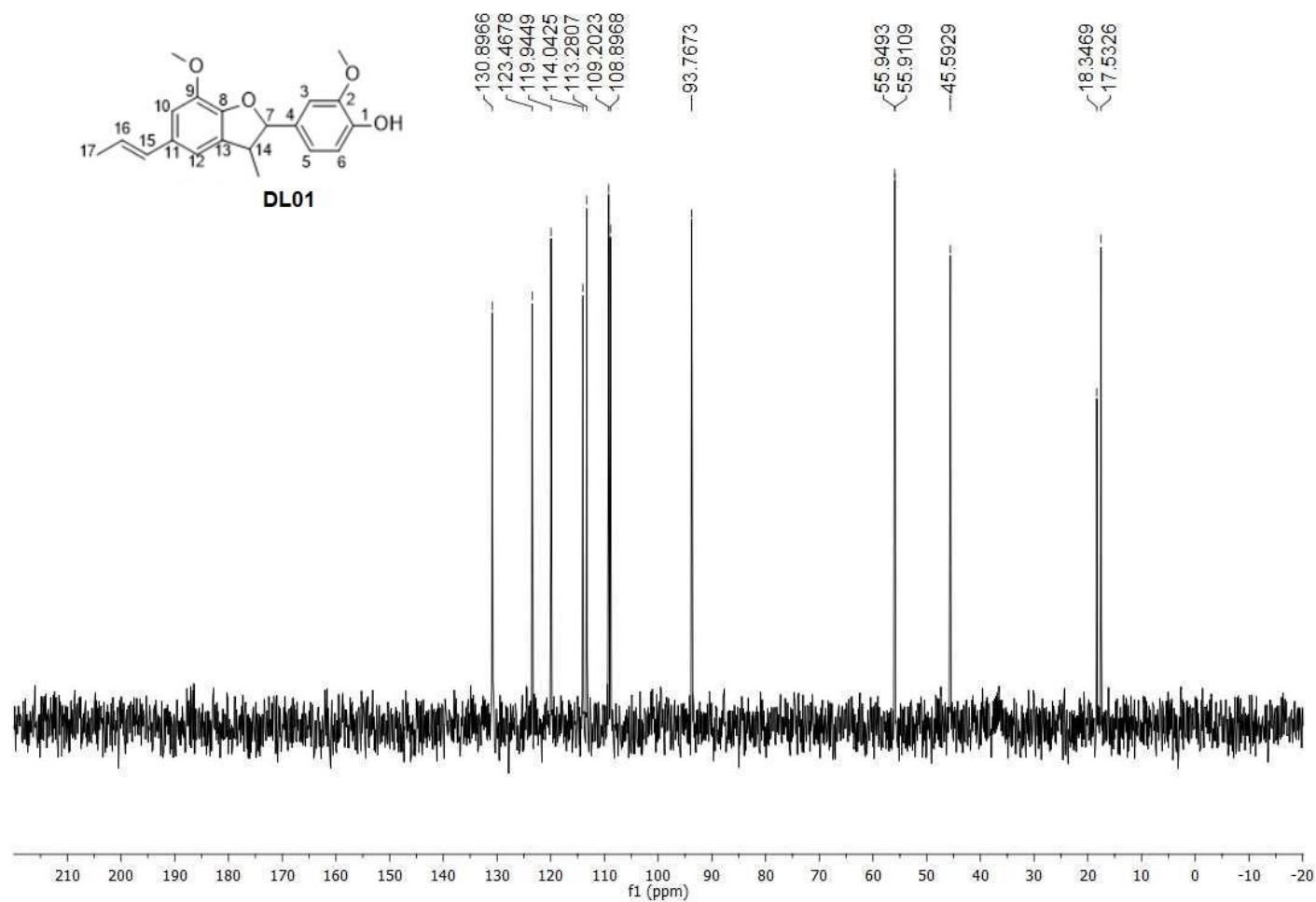
Figura 58 – Espectro de RMN de ^1H do derivado DL01 (CDCl_3 , 300 MHz).



xzFonte: Da autora.

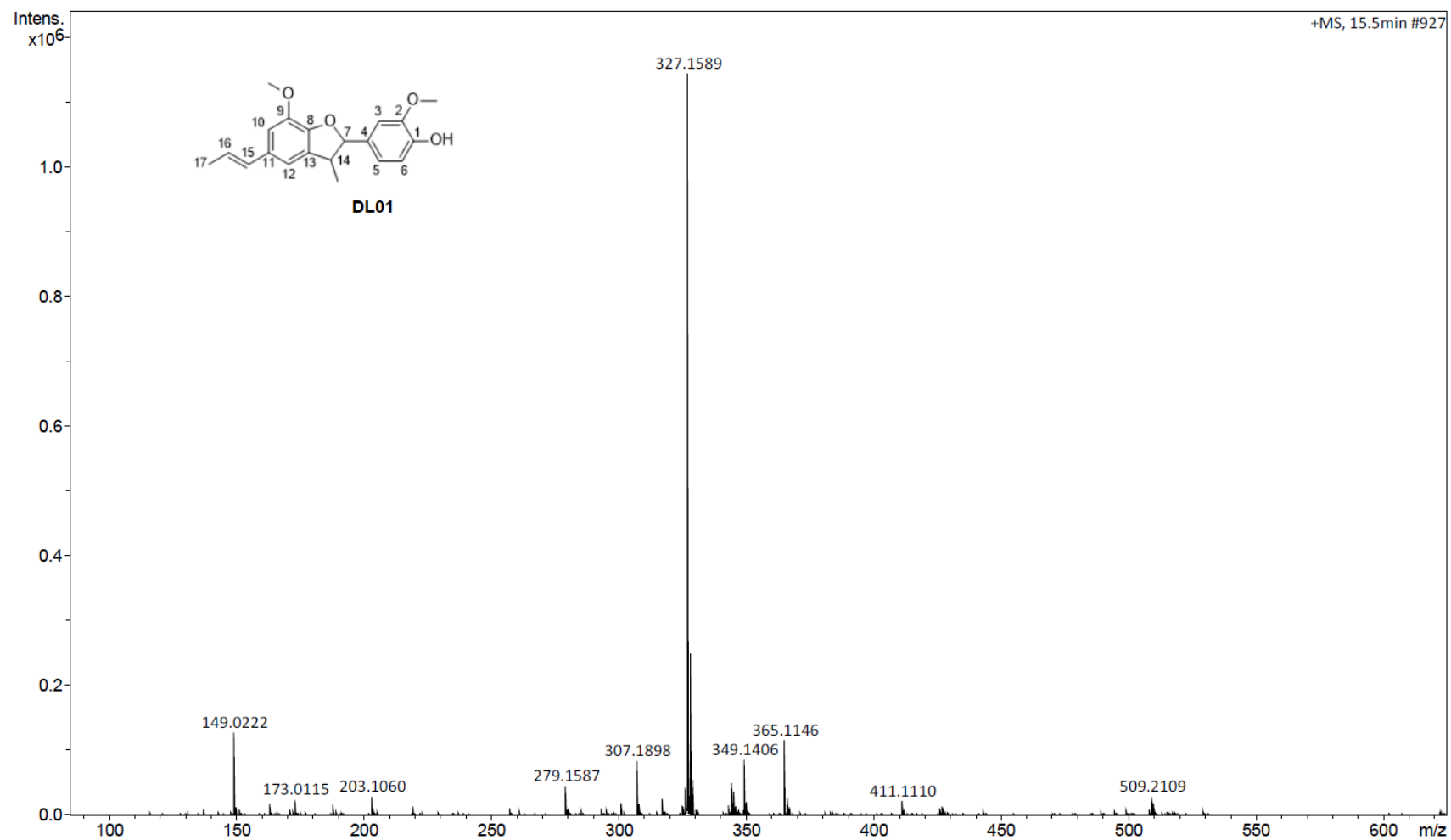
Figura 59 – Espectro de RMN de ^{13}C do derivado DL01 (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Da autora.

Figura 60 – Subespectro DEPT-135 do derivado DL01 (CDCl₃, 75 MHz).

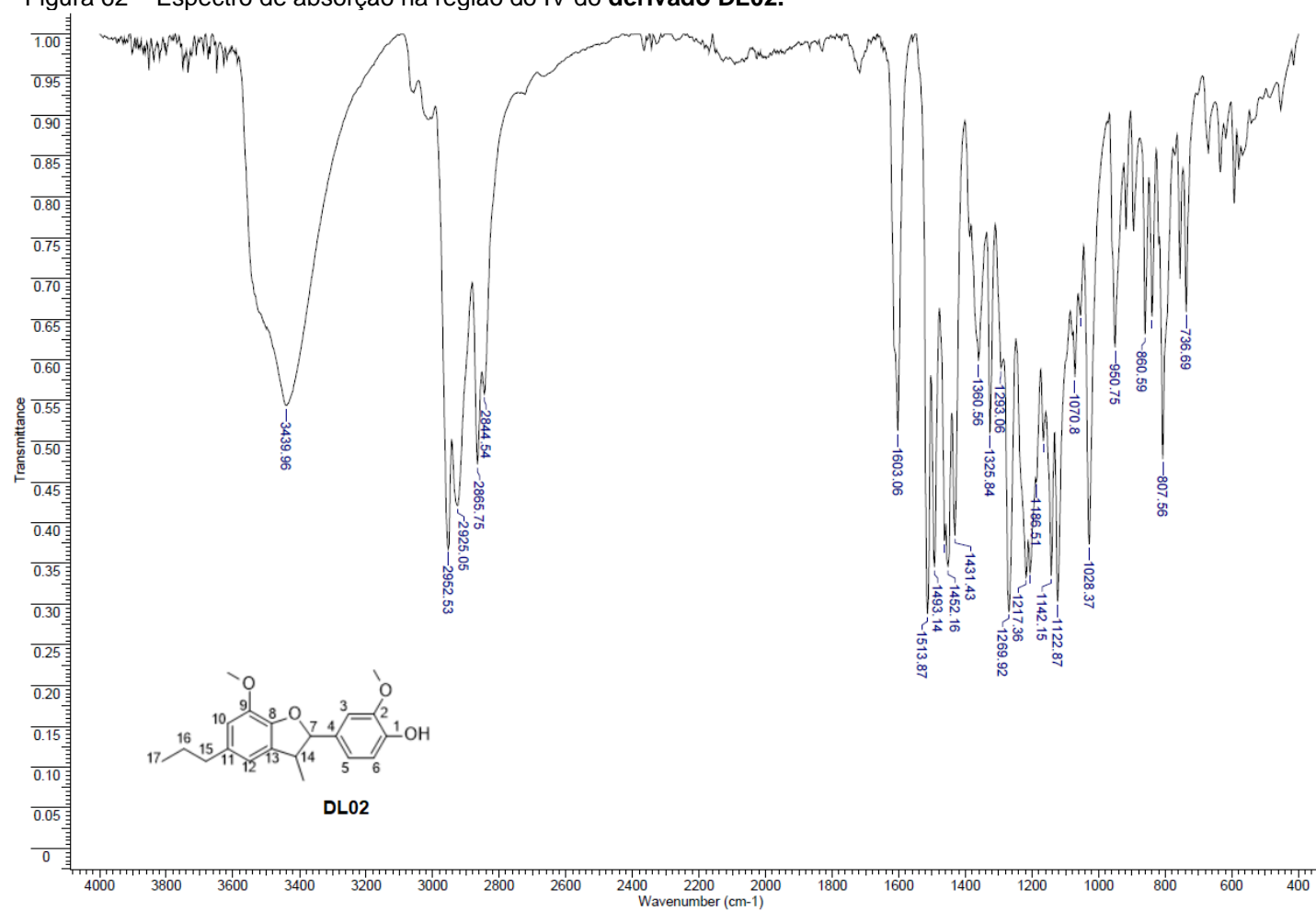
Fonte: Da autora.

Figura 61 – Espectro de massas do derivado DL01.



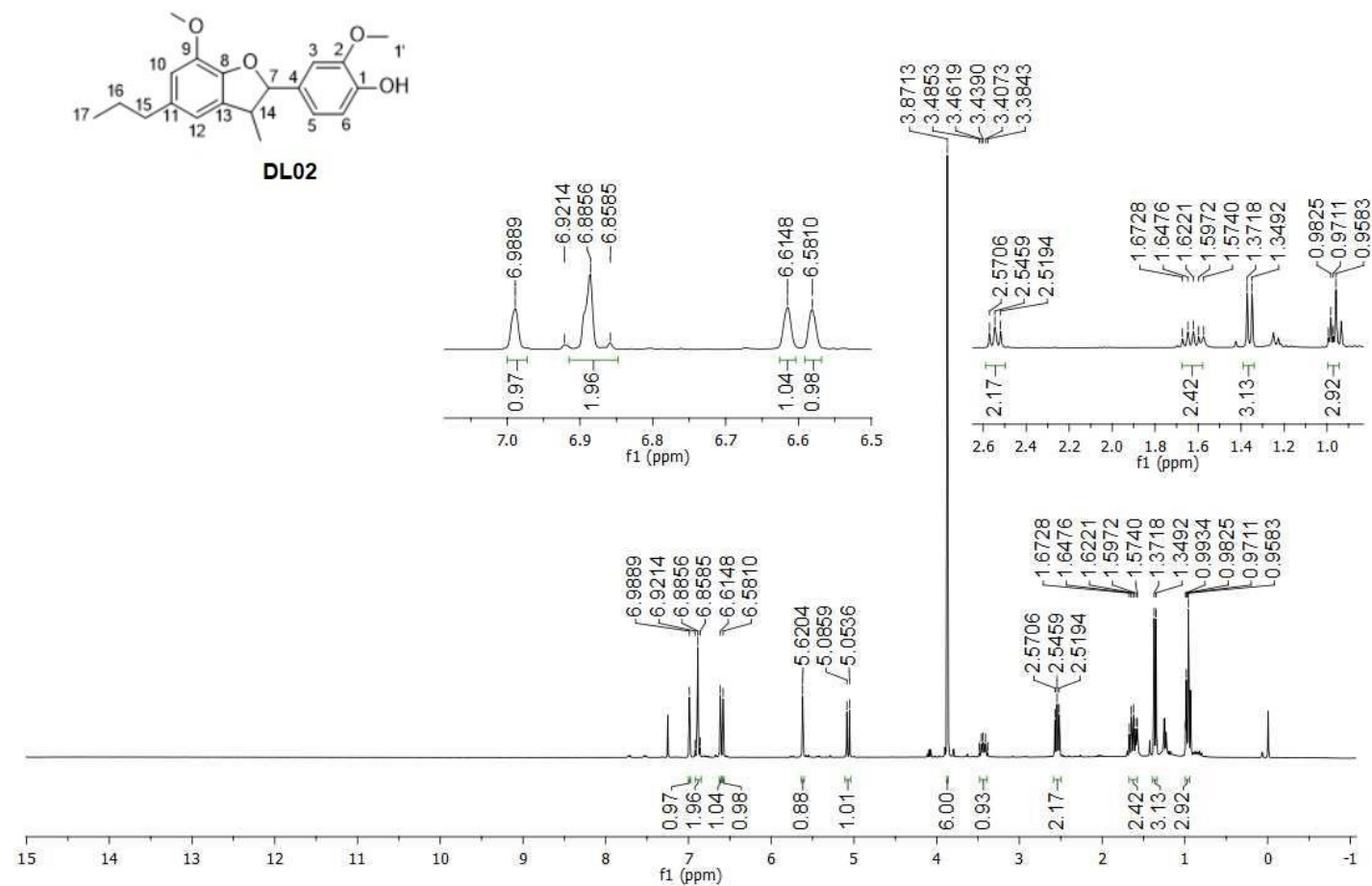
Fonte: Da autora.

Figura 62 – Espectro de absorção na região do IV do derivado DL02.

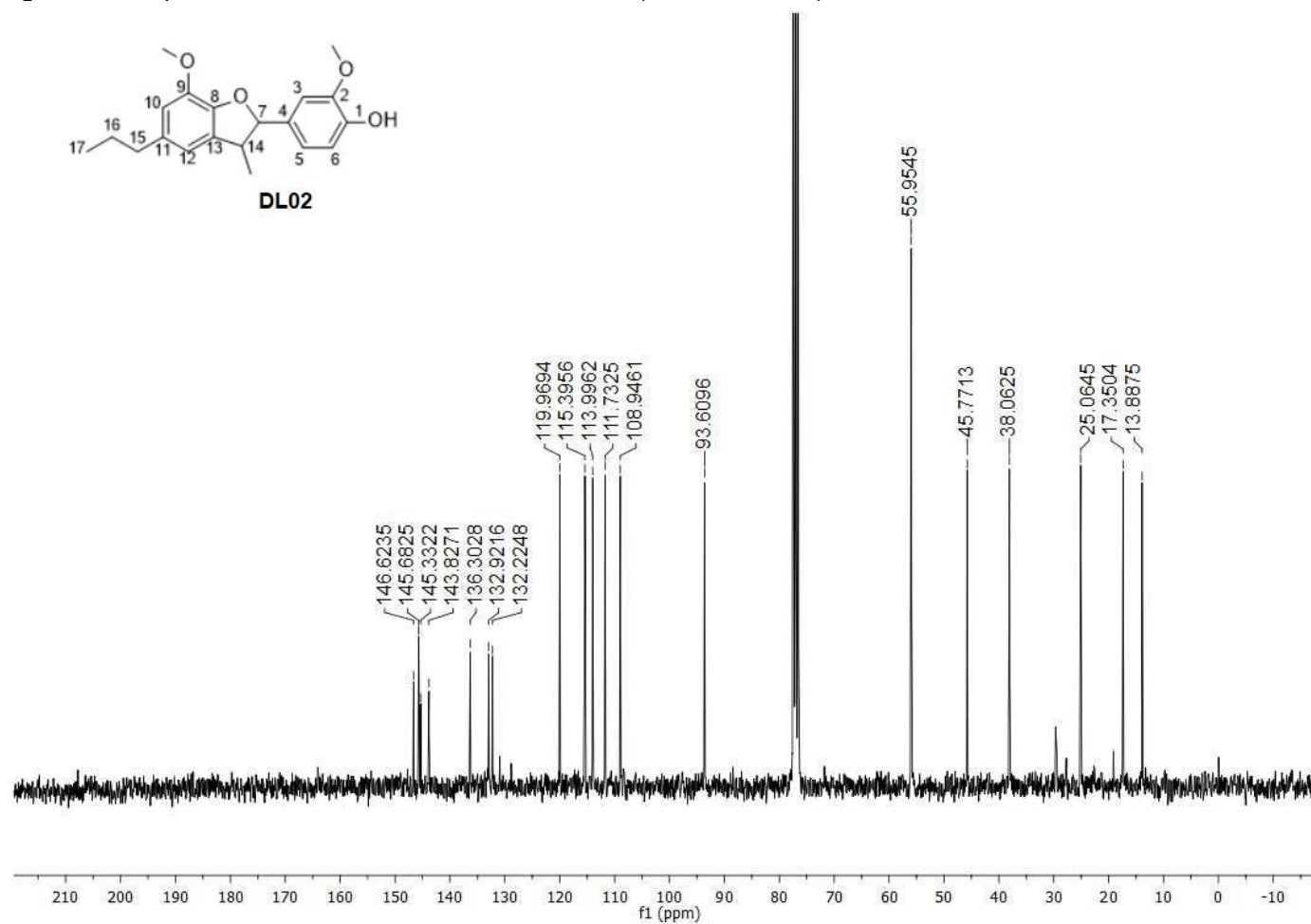


Fonte: Da autora.

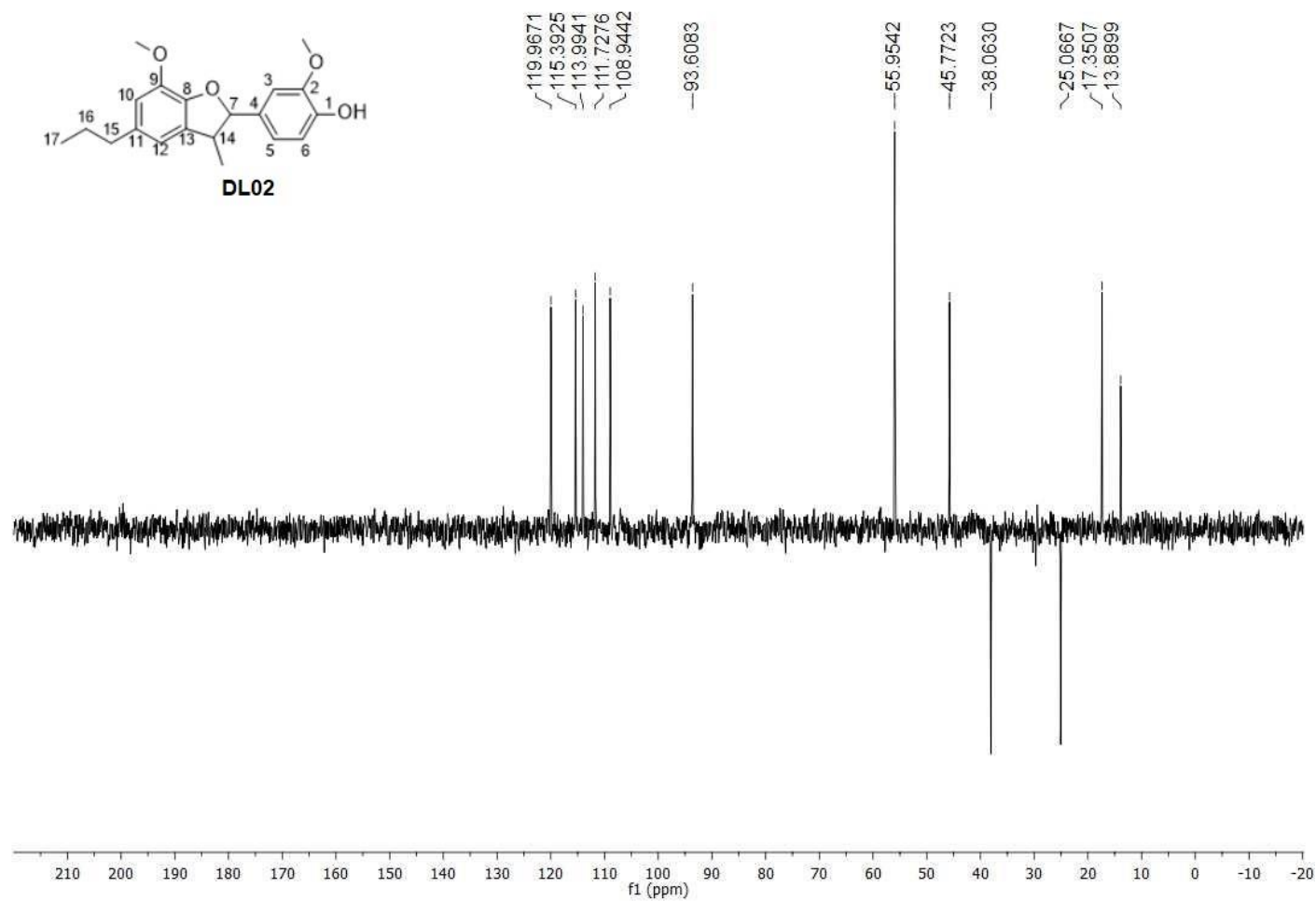
Figura 63 – Espectro de RMN de ^1H do derivado **DL02** (CDCl_3 , 300 MHz).



Fonte: Da autora.

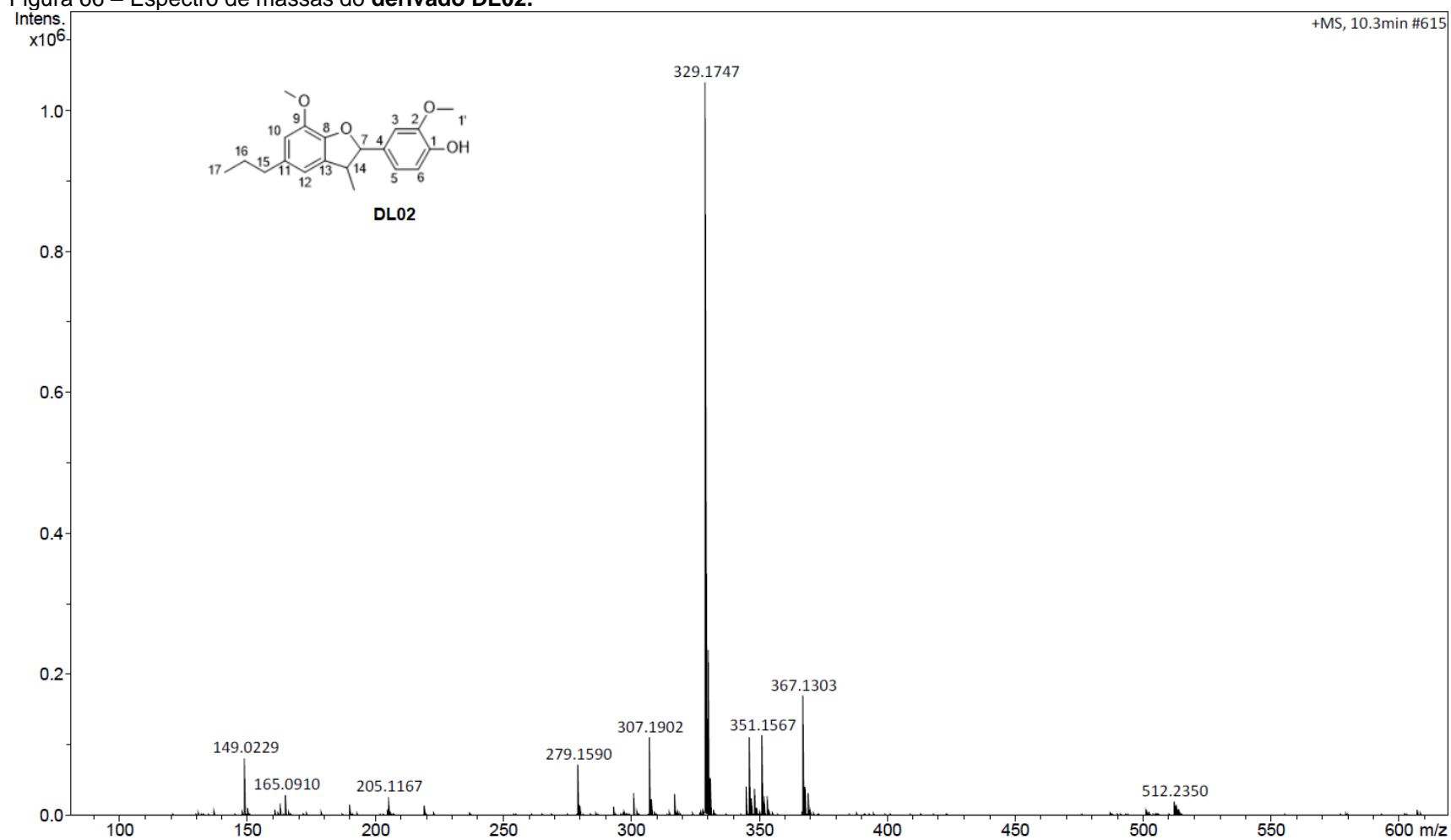
Figura 64 – Espectro de RMN de ^{13}C do derivado DL02 (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Da autora.

Figura 65 – Subespectro DEPT-135 do derivado **DL02** (CDCl₃, 75 MHz).

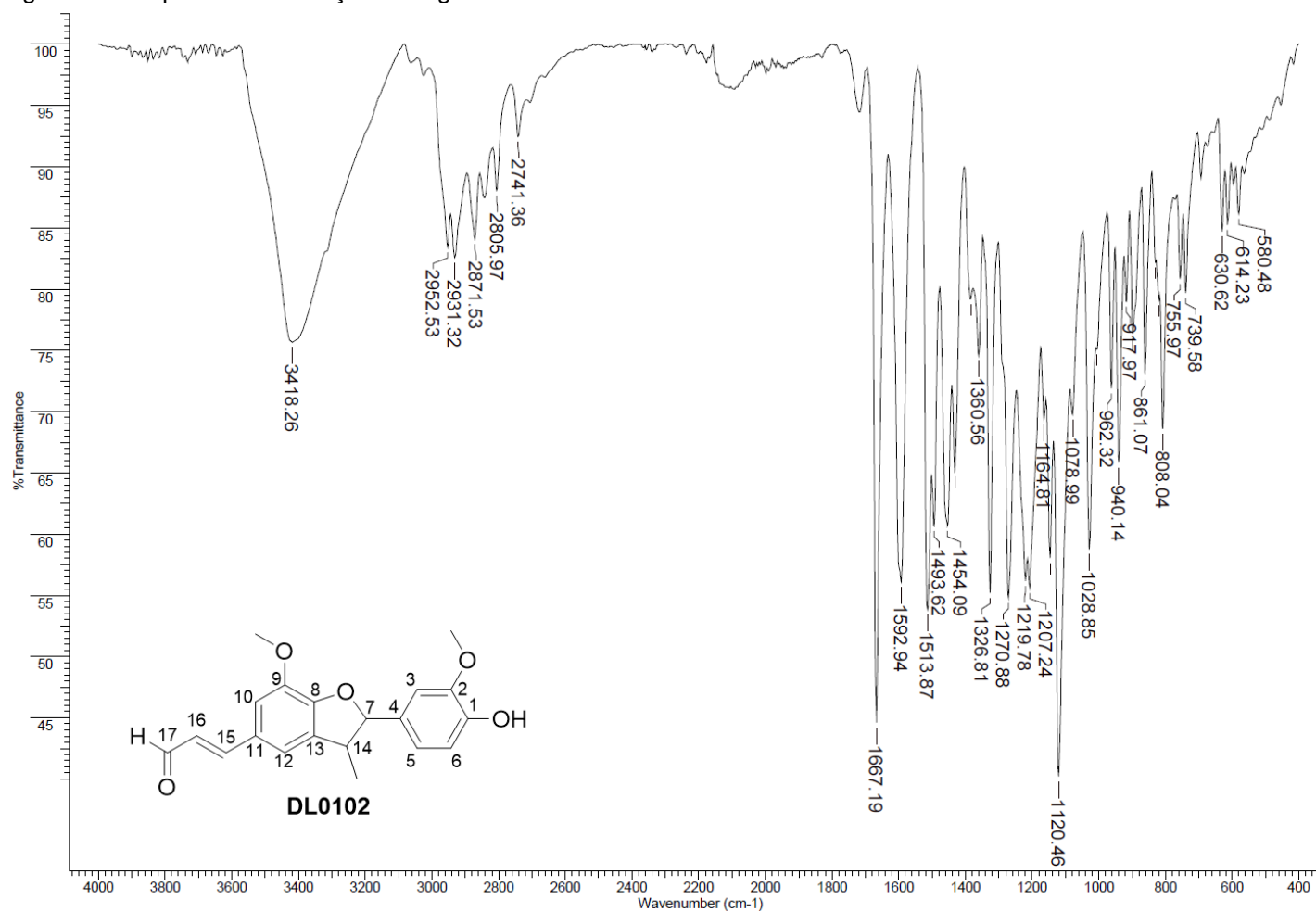
Fonte: Da autora.

Figura 66 – Espectro de massas do derivado DL02.



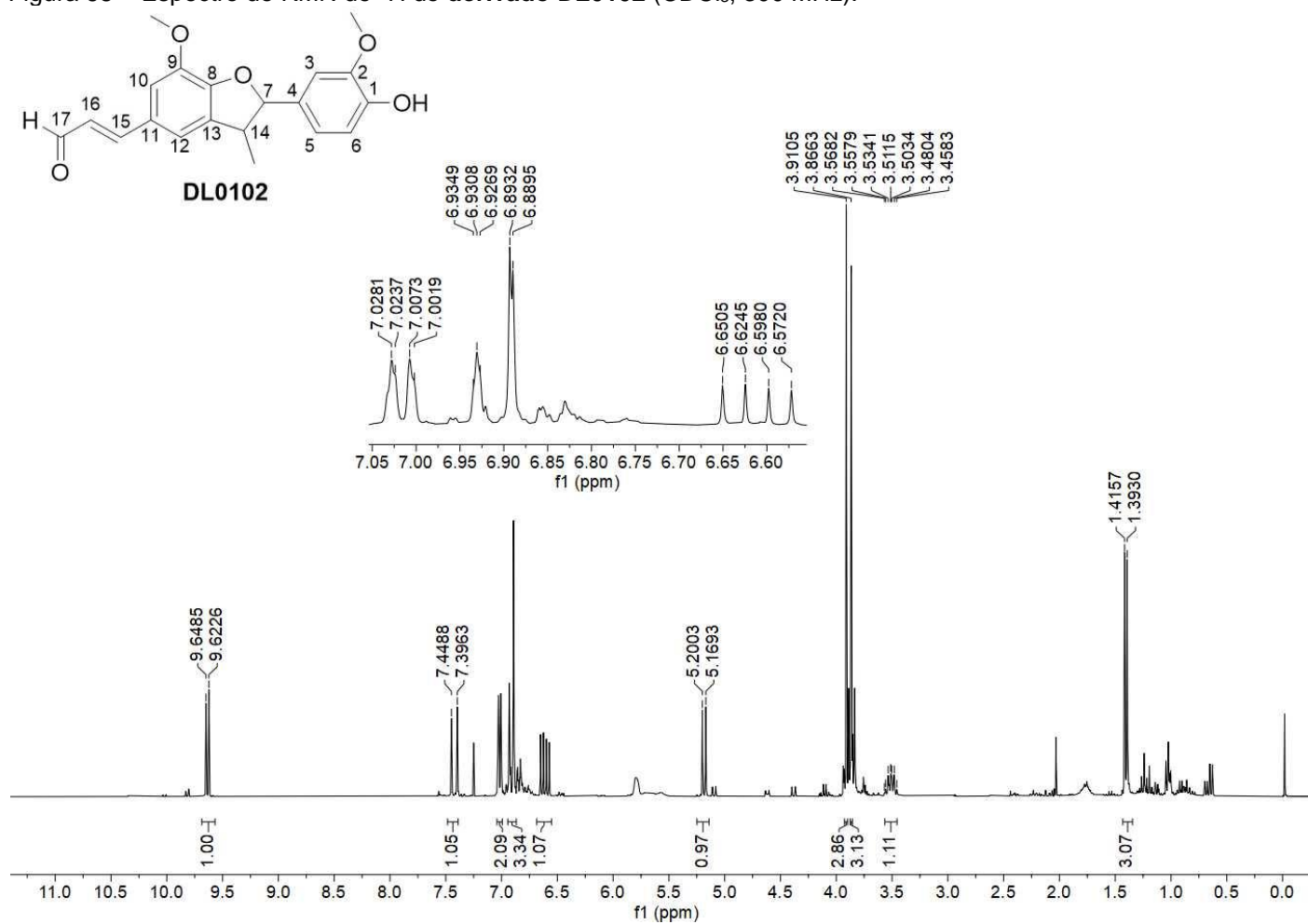
Fonte: Da autora.

Figura 67 – Espectro de absorção na região do IV do derivado DL0102.

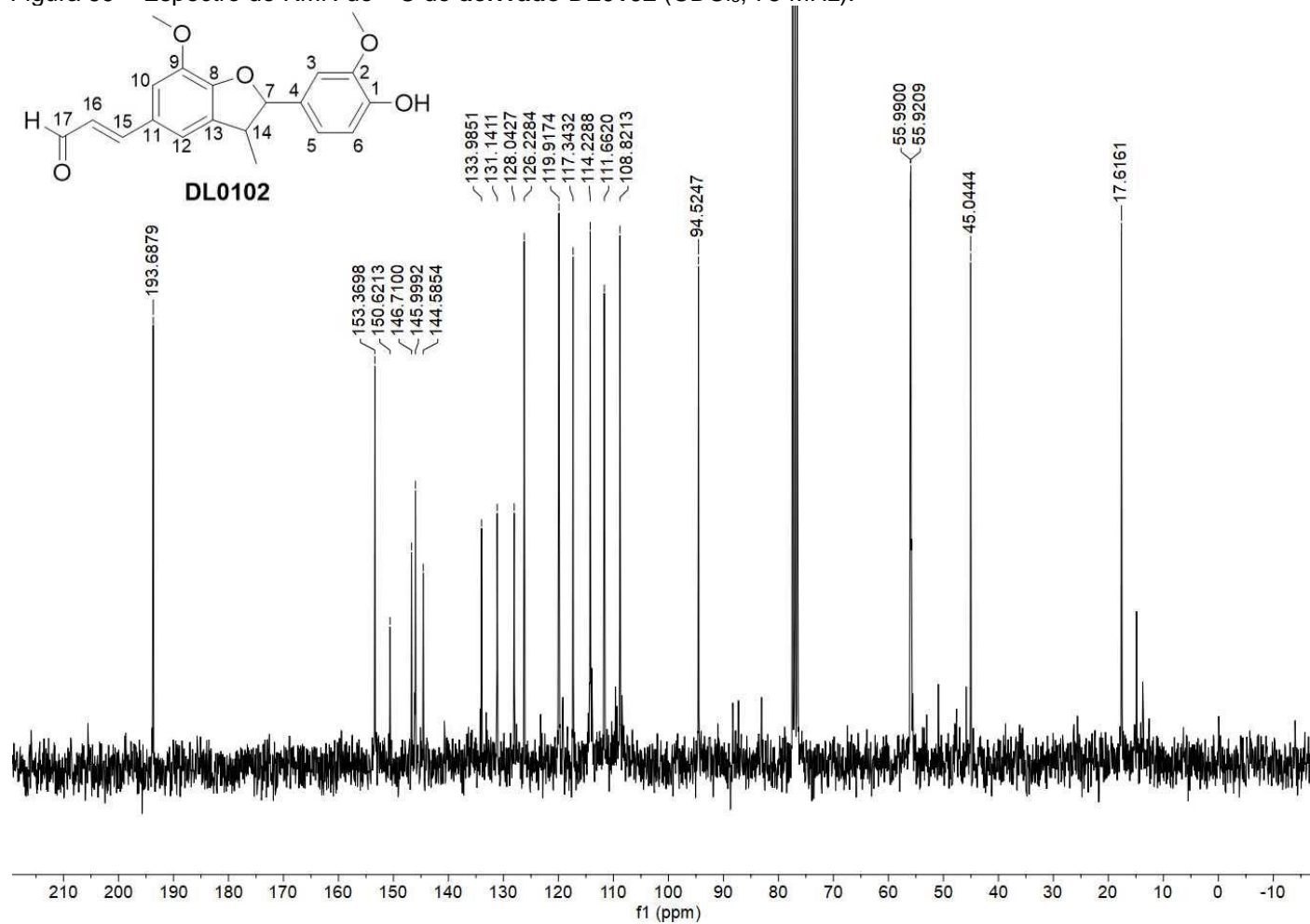


Fonte: Da autora.

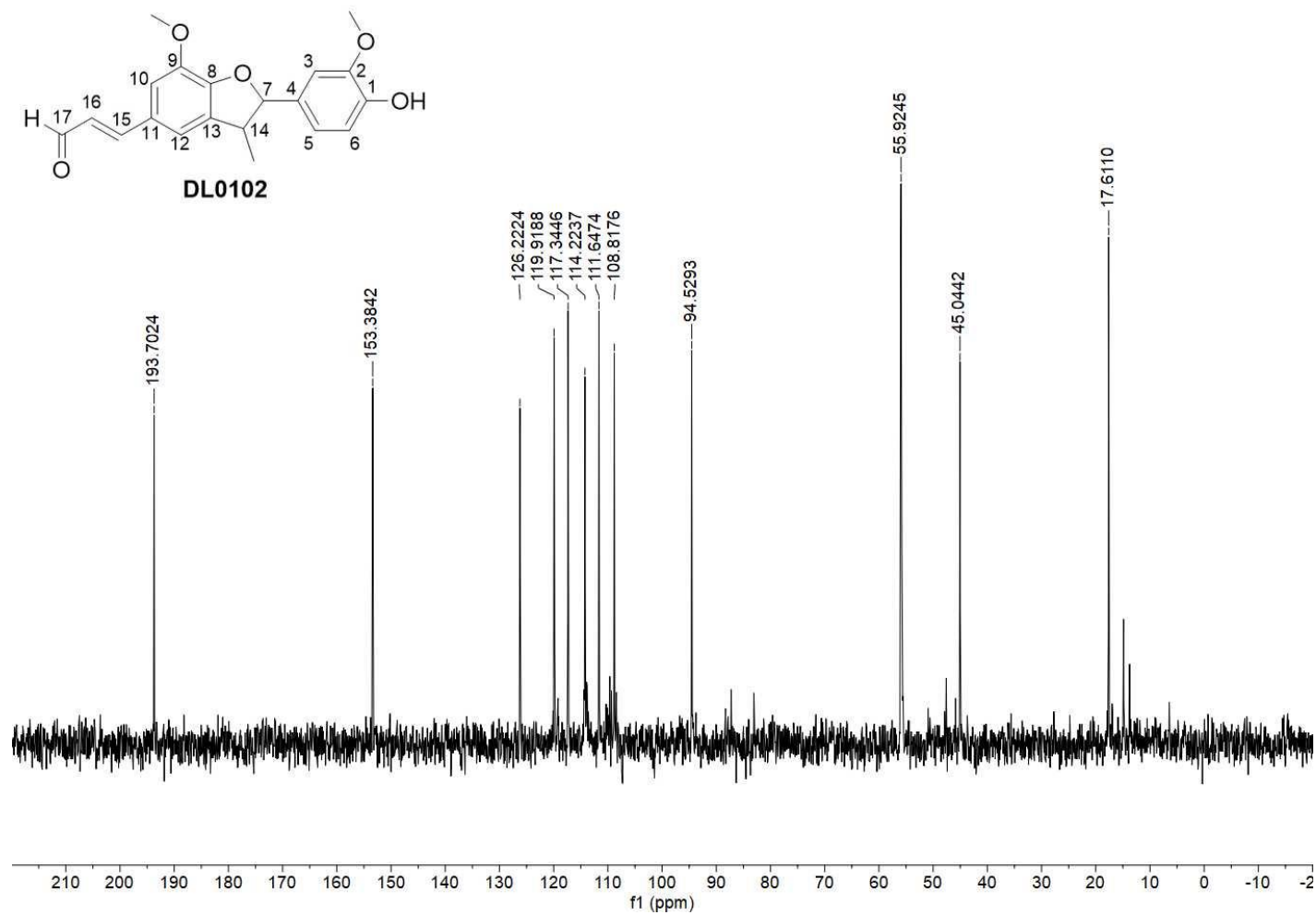
Figura 68 – Espectro de RMN de ^1H do derivado **DL0102** (CDCl_3 , 300 MHz).



Fonte: Da autora.

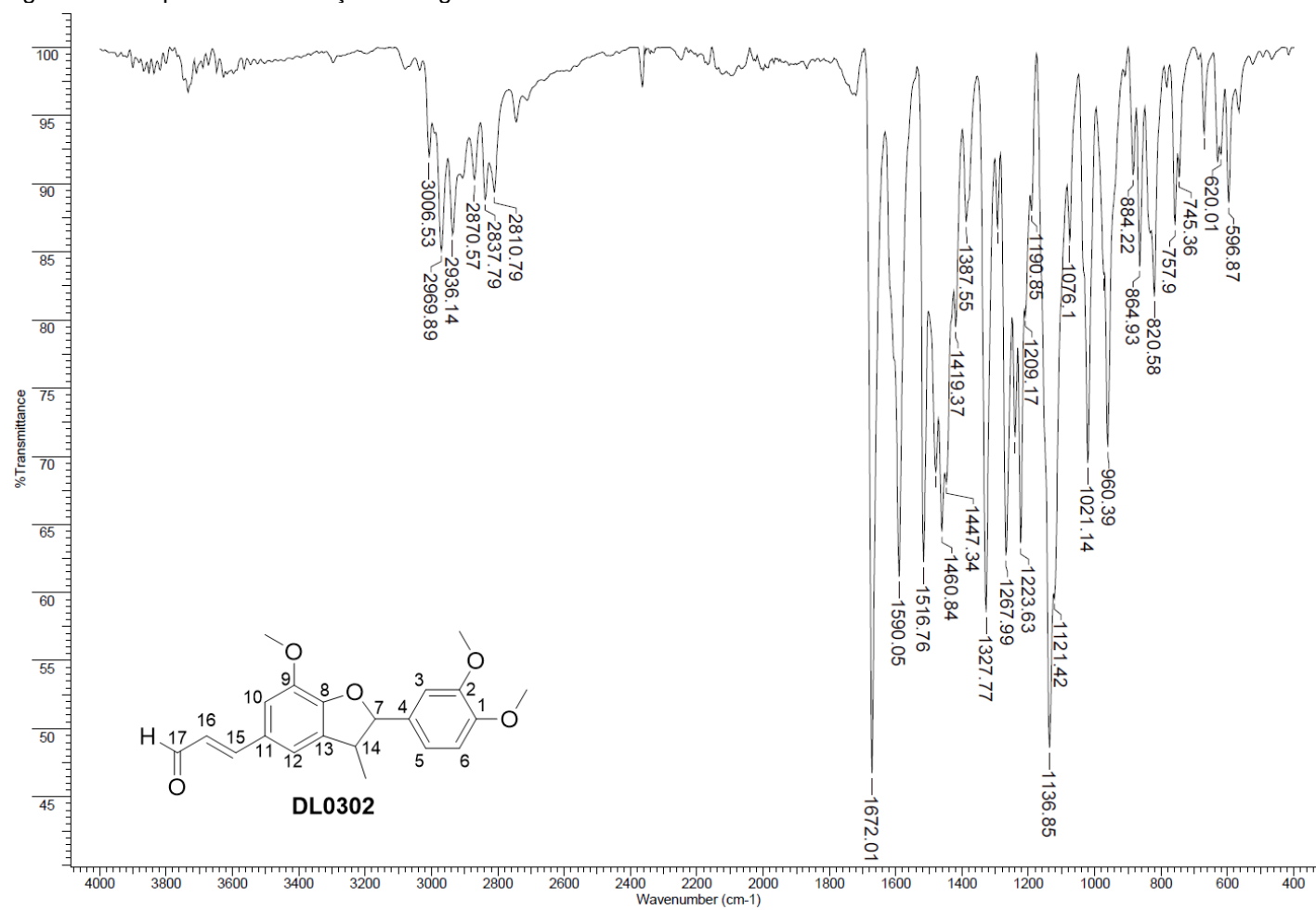
Figura 69 – Espectro de RMN de ^{13}C do derivado DL0102 (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Da autora.

Figura 70 – Subespectro DEPT-135 do derivado **DL0102** (CDCl₃, 75 MHz).

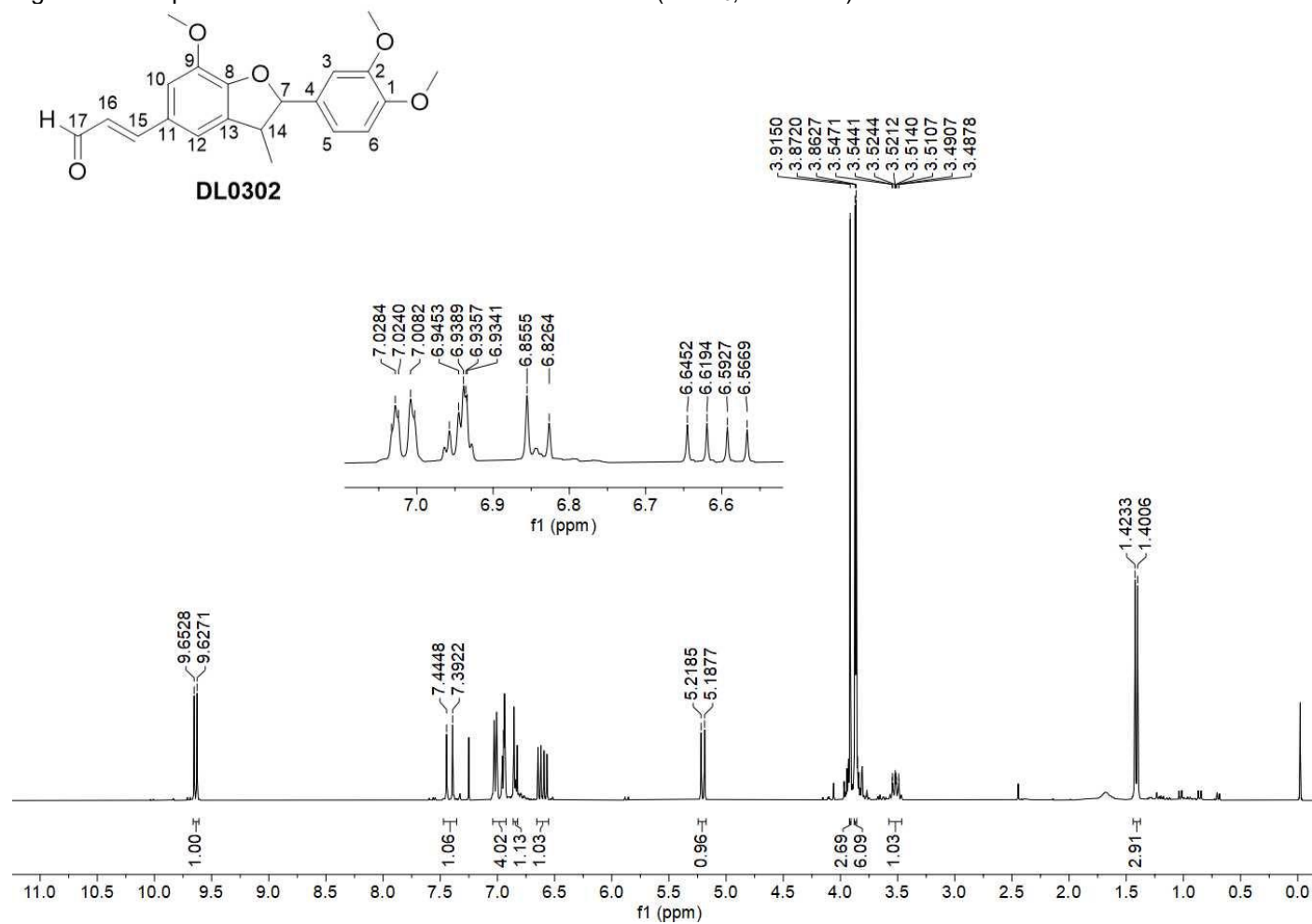
Fonte: Da autora.

Figura 71 – Espectro de absorção na região do IV do derivado DL0302.

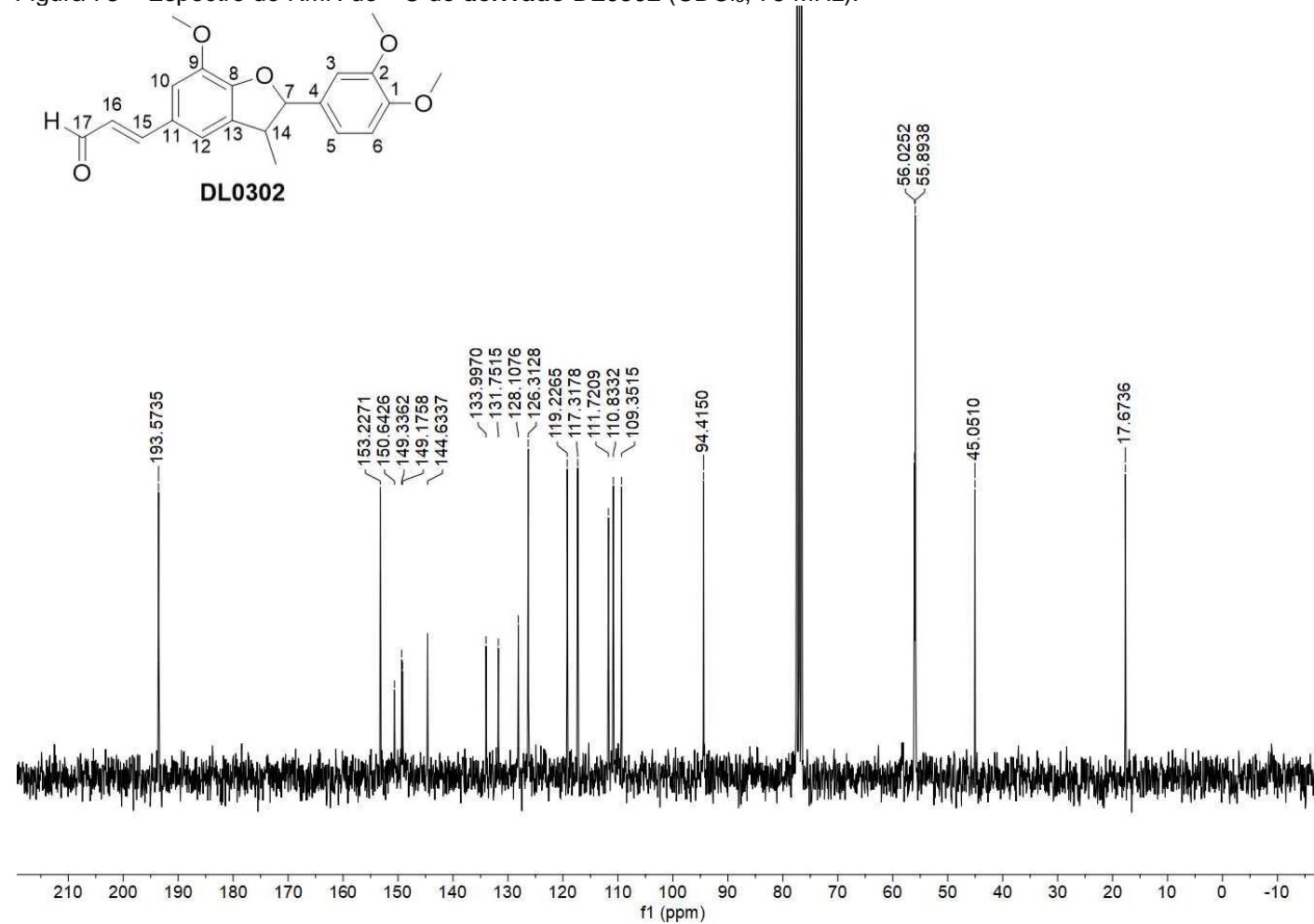


Fonte: Da autora.

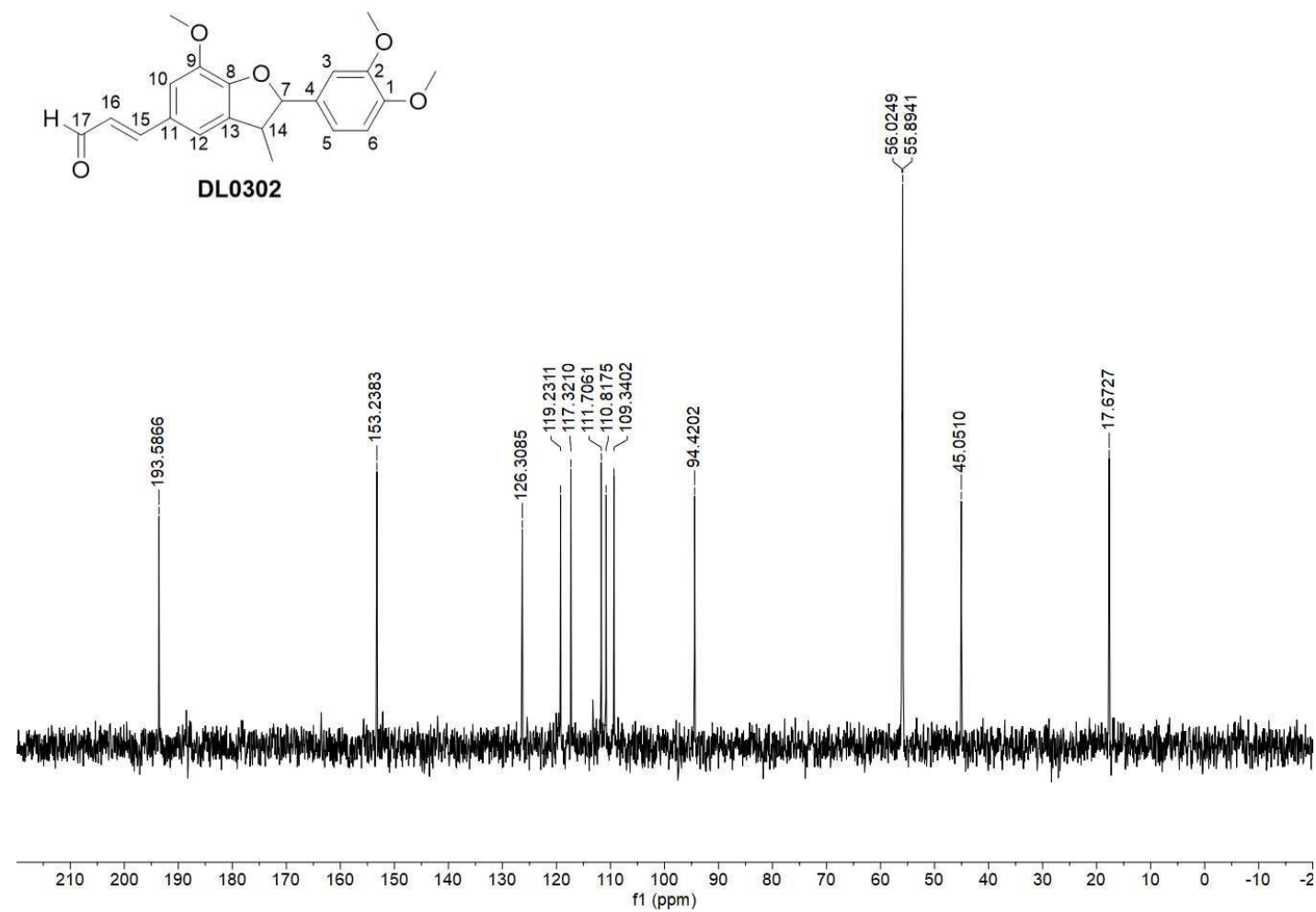
Figura 72 – Espectro de RMN de ^1H do derivado **DL0302** (CDCl_3 , 300 MHz).



Fonte: Da autora.

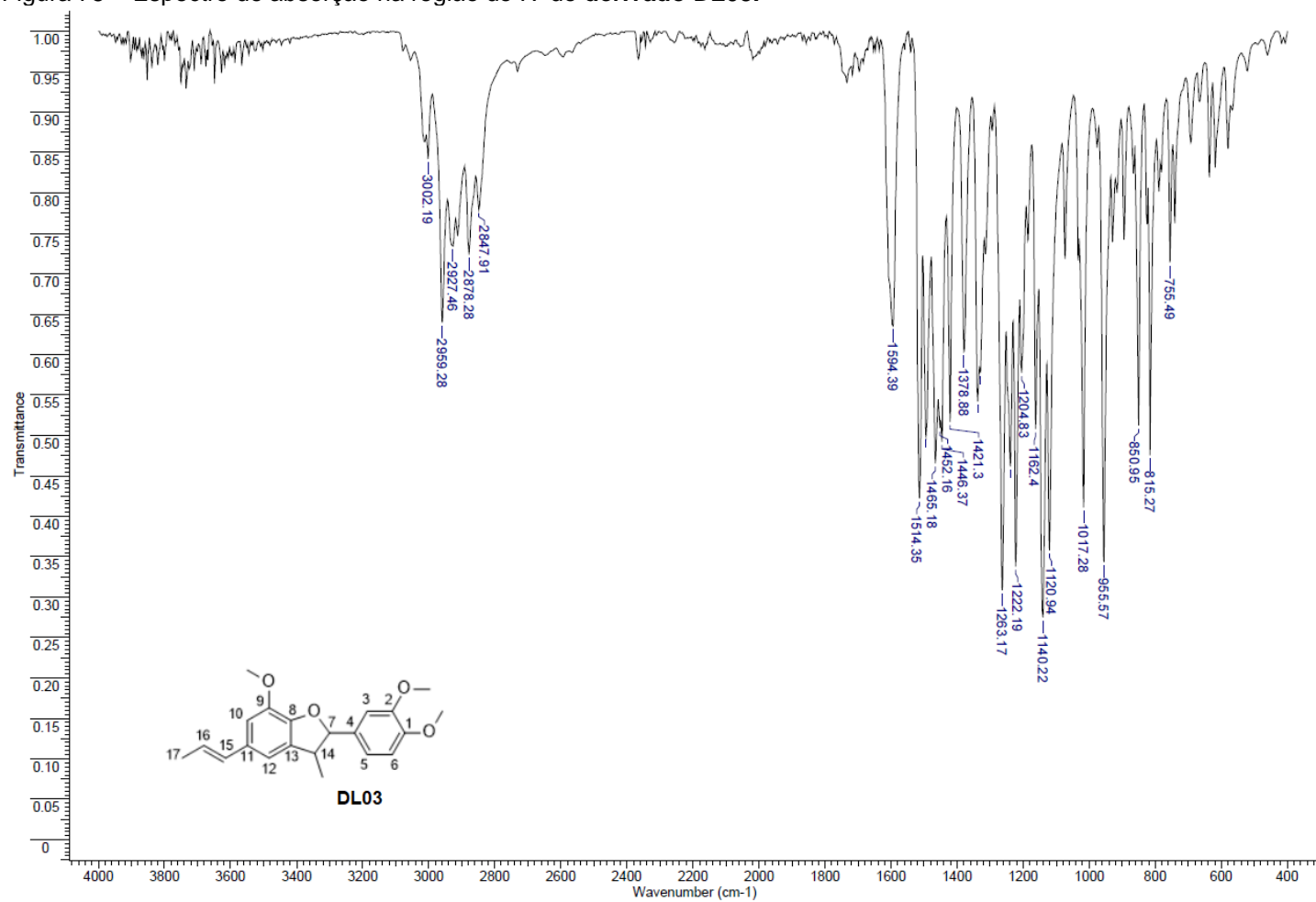
Figura 73 – Espectro de RMN de ^{13}C do derivado DL0302 (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Da autora.

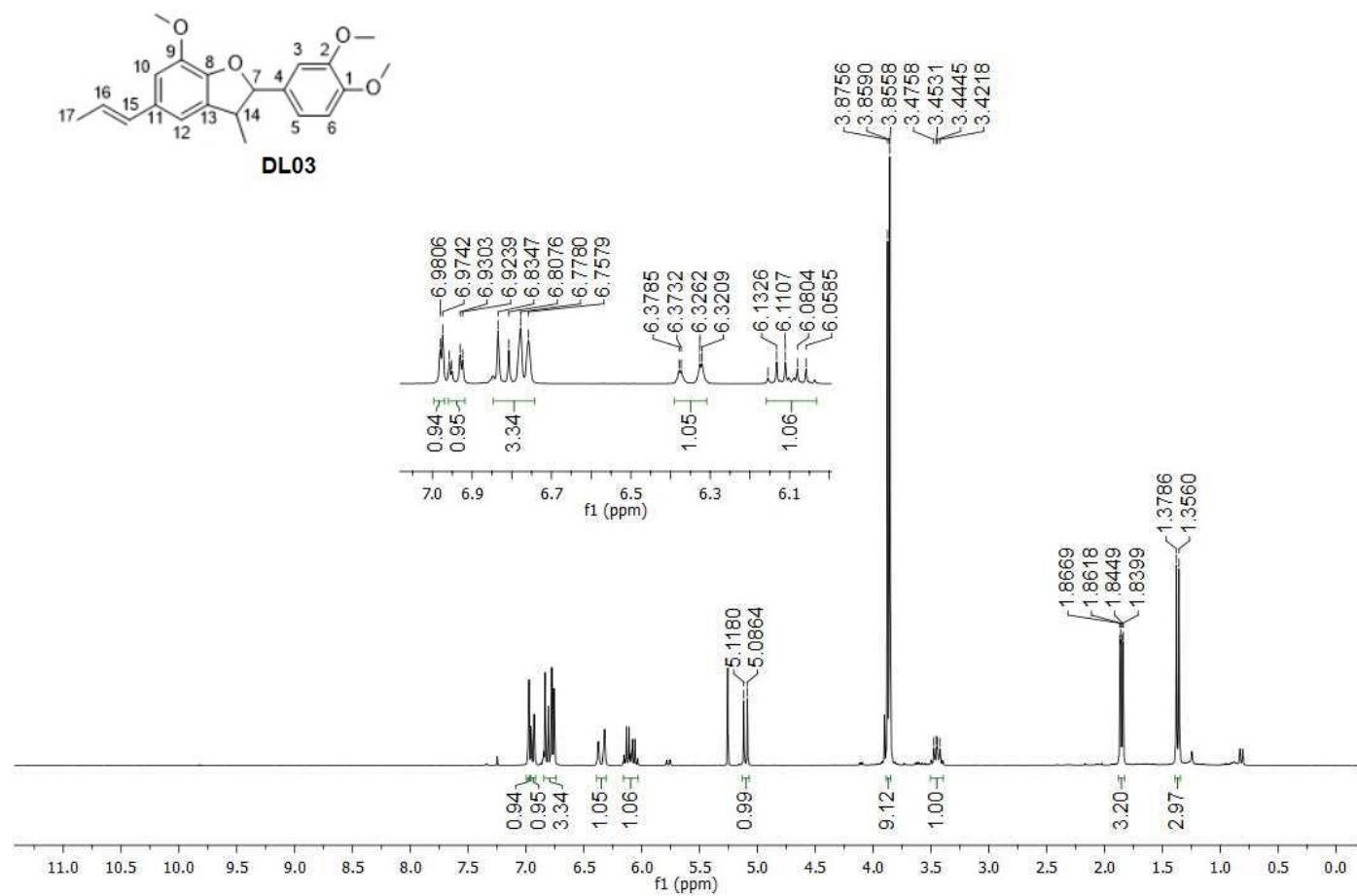
Figura 74 – Subespectro DEPT-135 do derivado **DL0302** (CDCl₃, 75 MHz).

Fonte: Da autora.

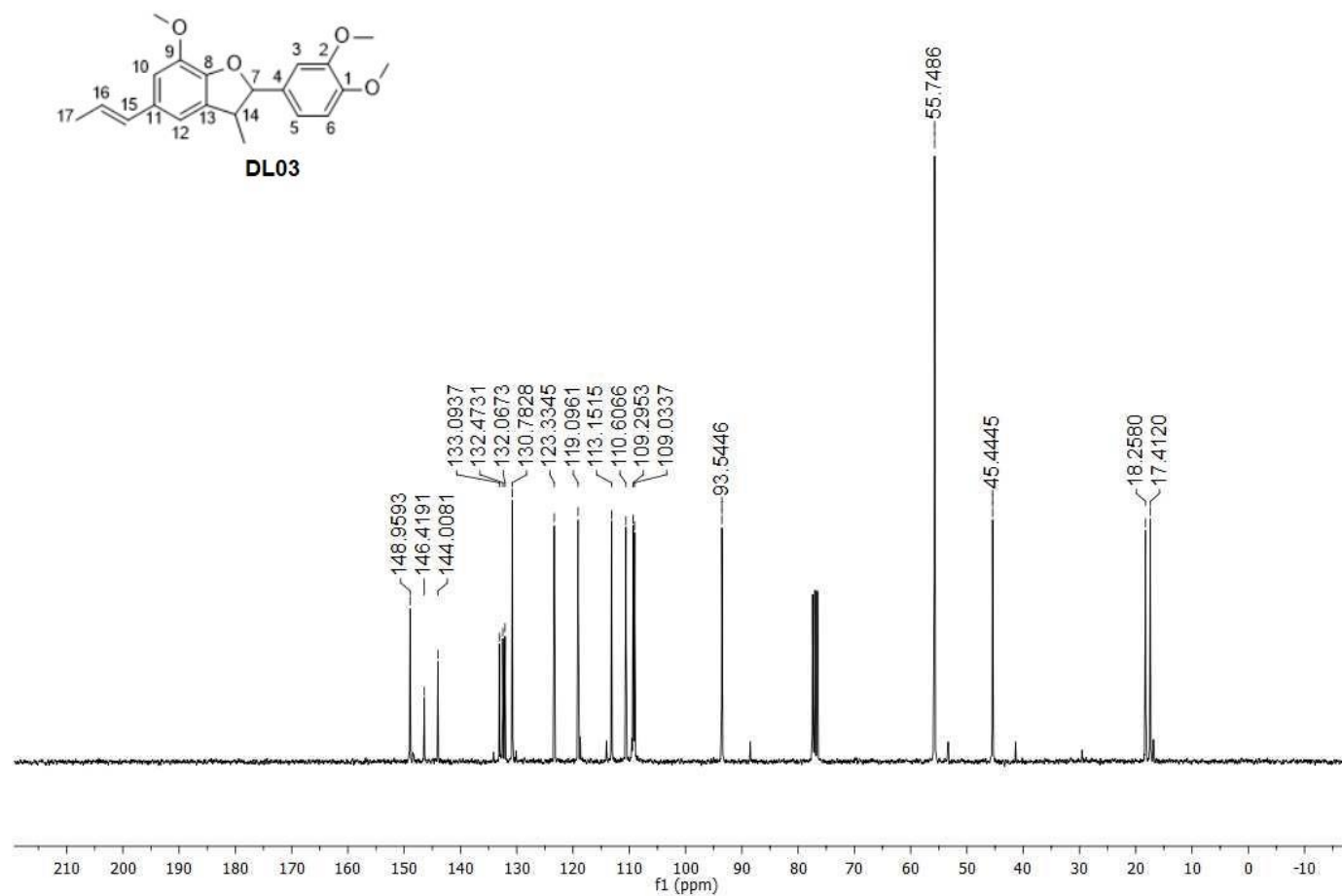
Figura 75 – Espectro de absorção na região do IV do derivado DL03.



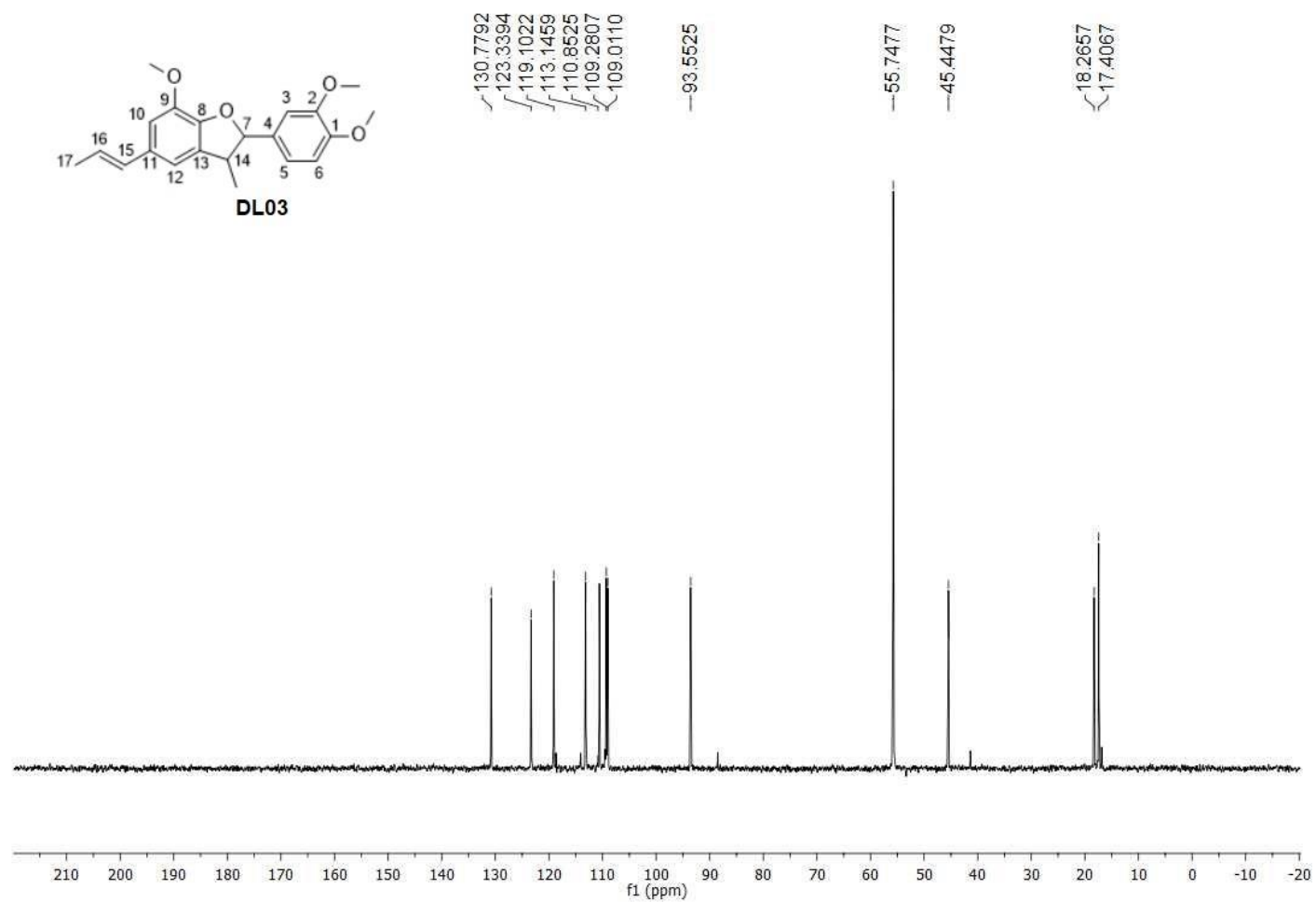
Fonte: Da autora.

Figura 76 – Espectro de RMN de ^1H do derivado DL03 (CDCl_3 , 300 MHz).

Fonte: Da autora.

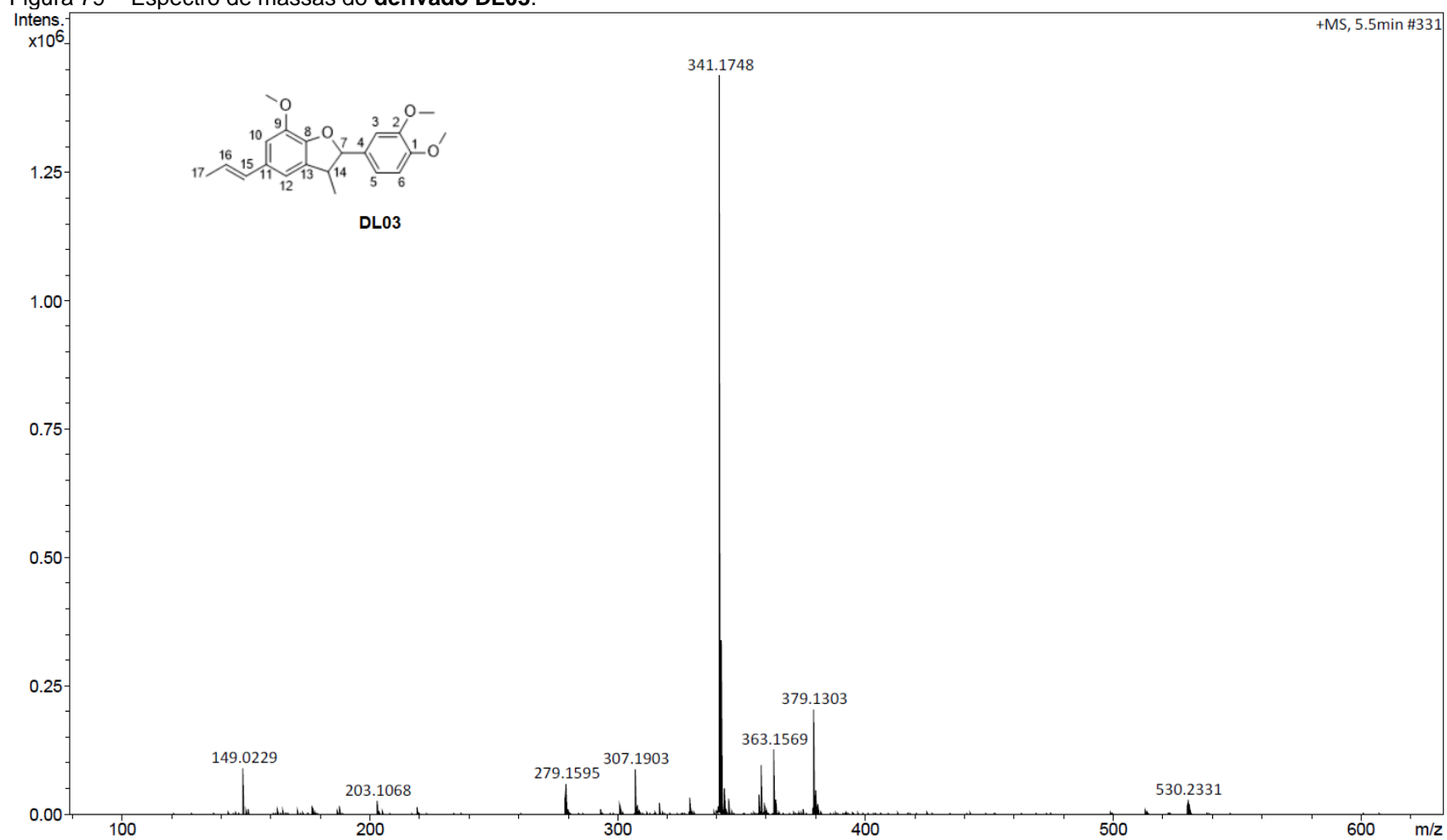
Figura 77 – Espectro de RMN de ^{13}C do derivado DL03 (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Da autora.

Figura 78 – Subespectro DEPT-135 do derivado **DL03** (CDCl₃, 75 MHz).

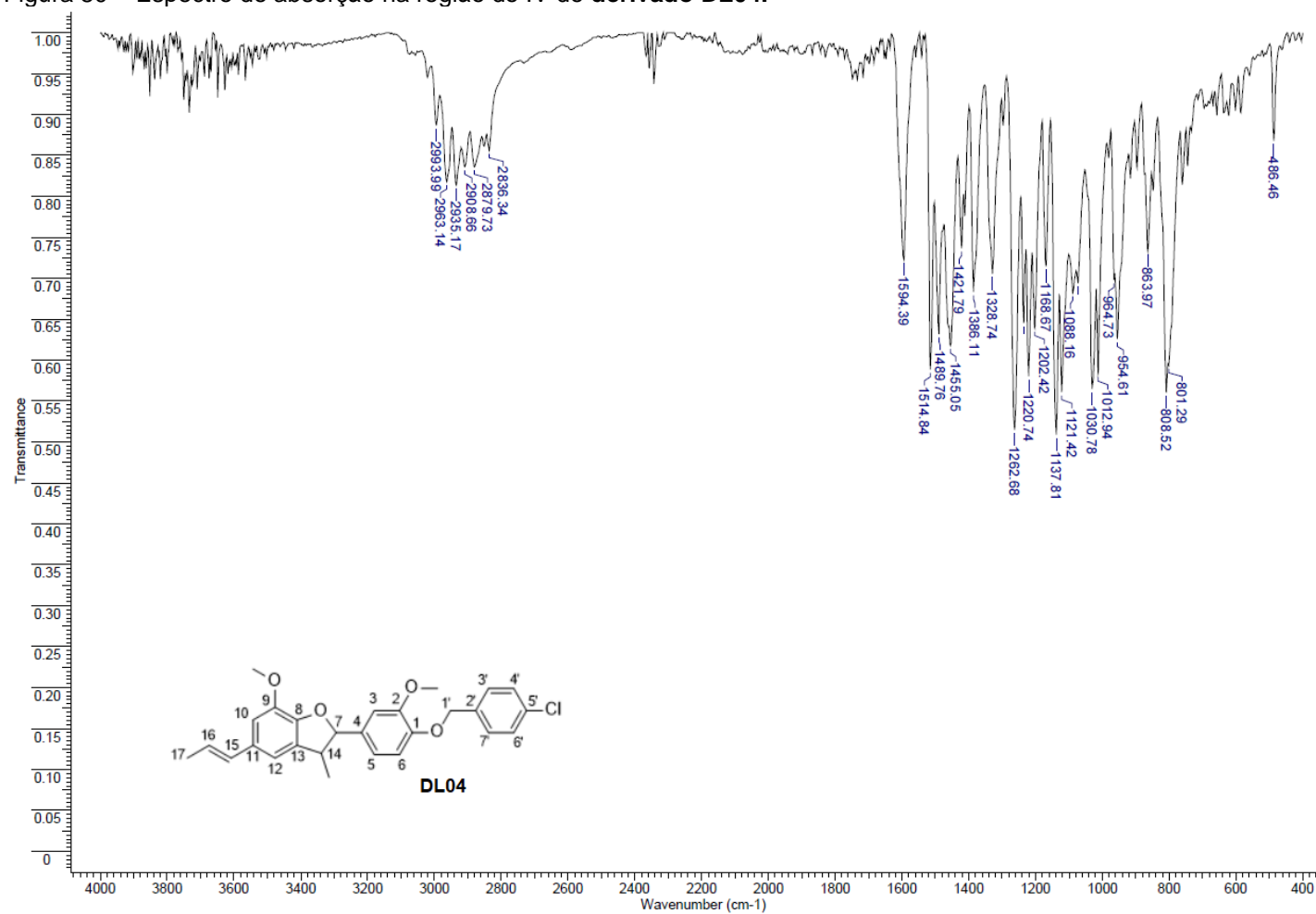
Fonte: Da autora.

Figura 79 – Espectro de massas do derivado DL03.



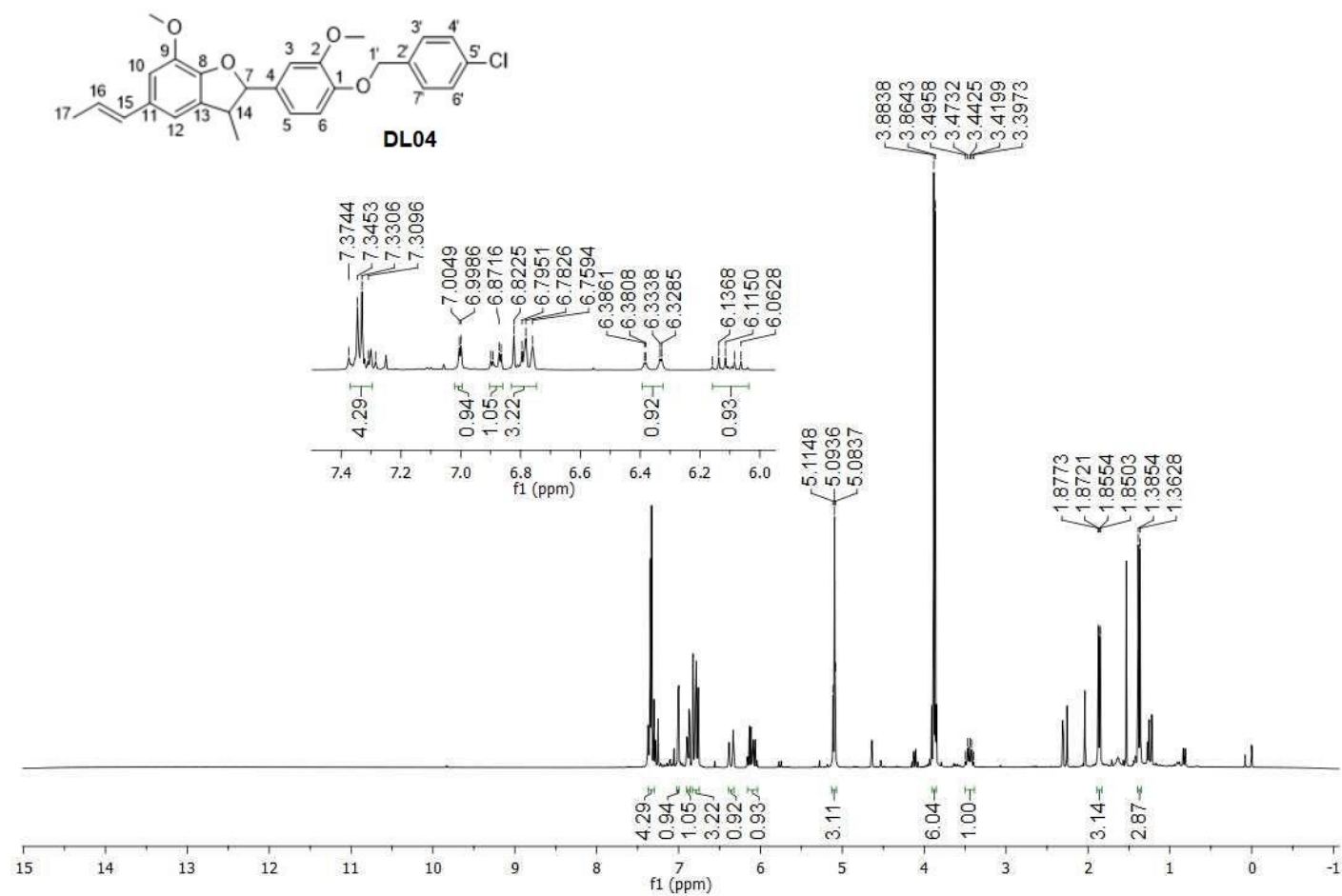
Fonte: Da autora.

Figura 80 – Espectro de absorção na região do IV do derivado DL04.

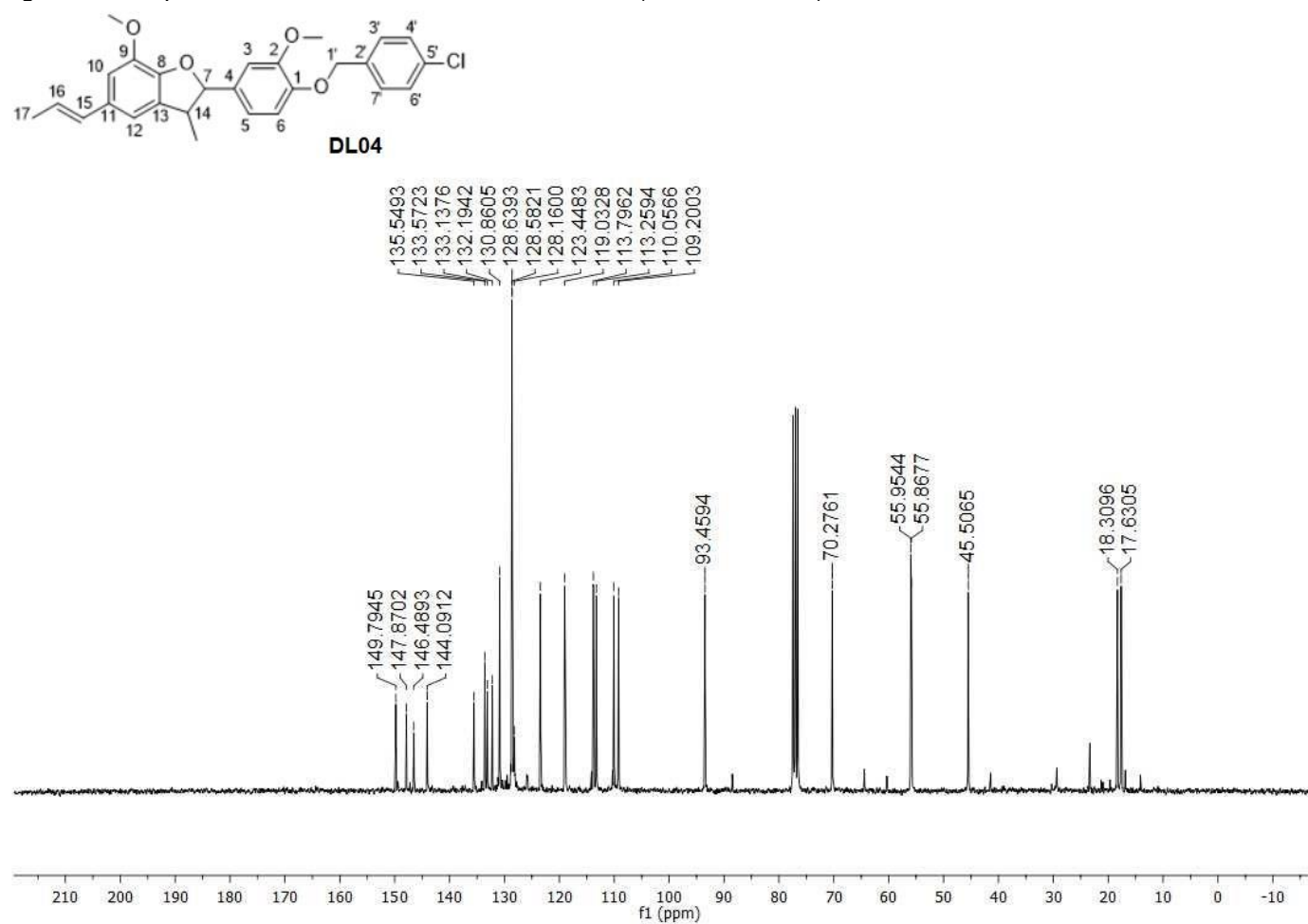


Fonte: Da autora.

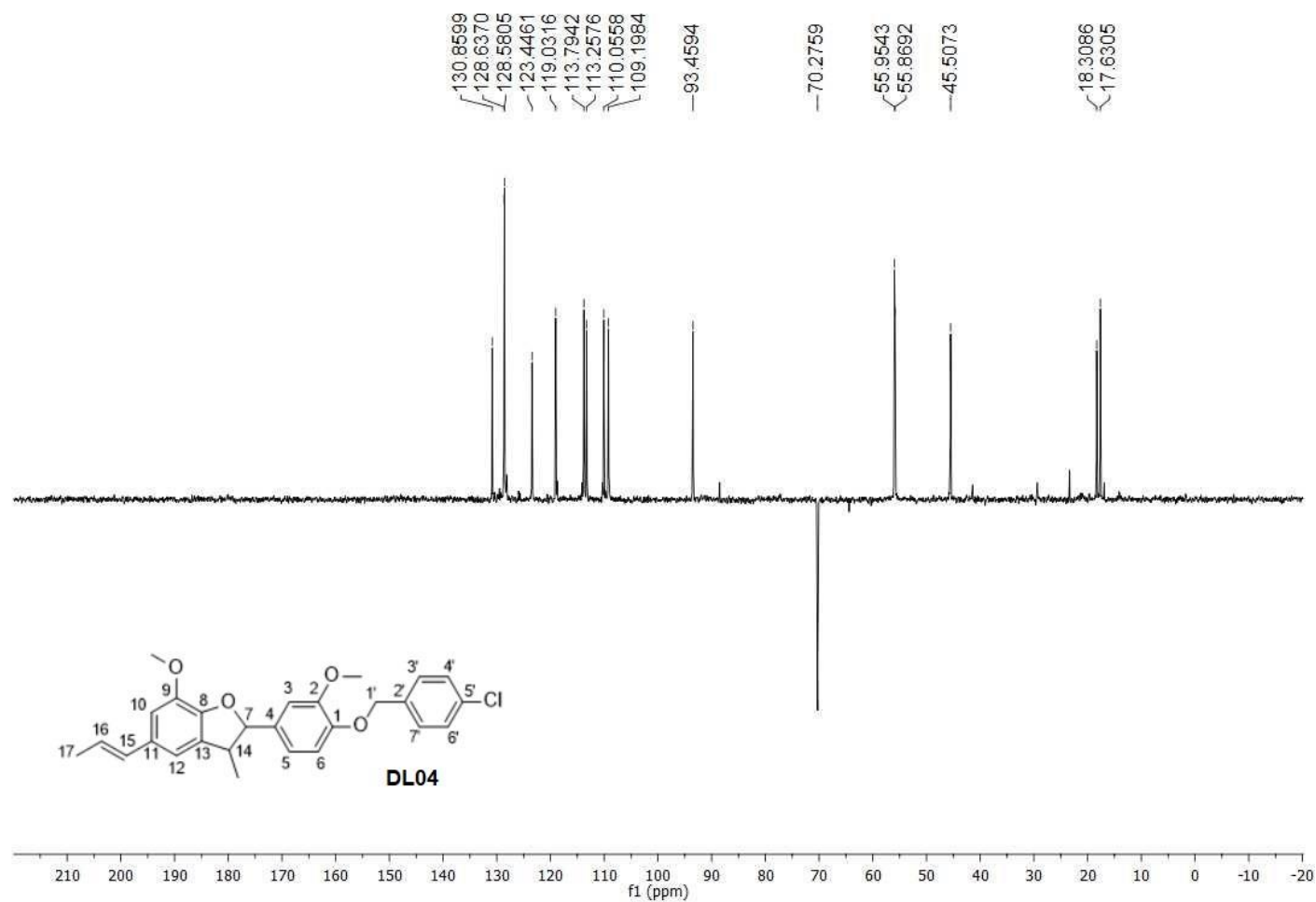
Figura 81 – Espectro de RMN de ^1H do derivado DL04 (CDCl_3 , 300 MHz).



Fonte: Da autora.

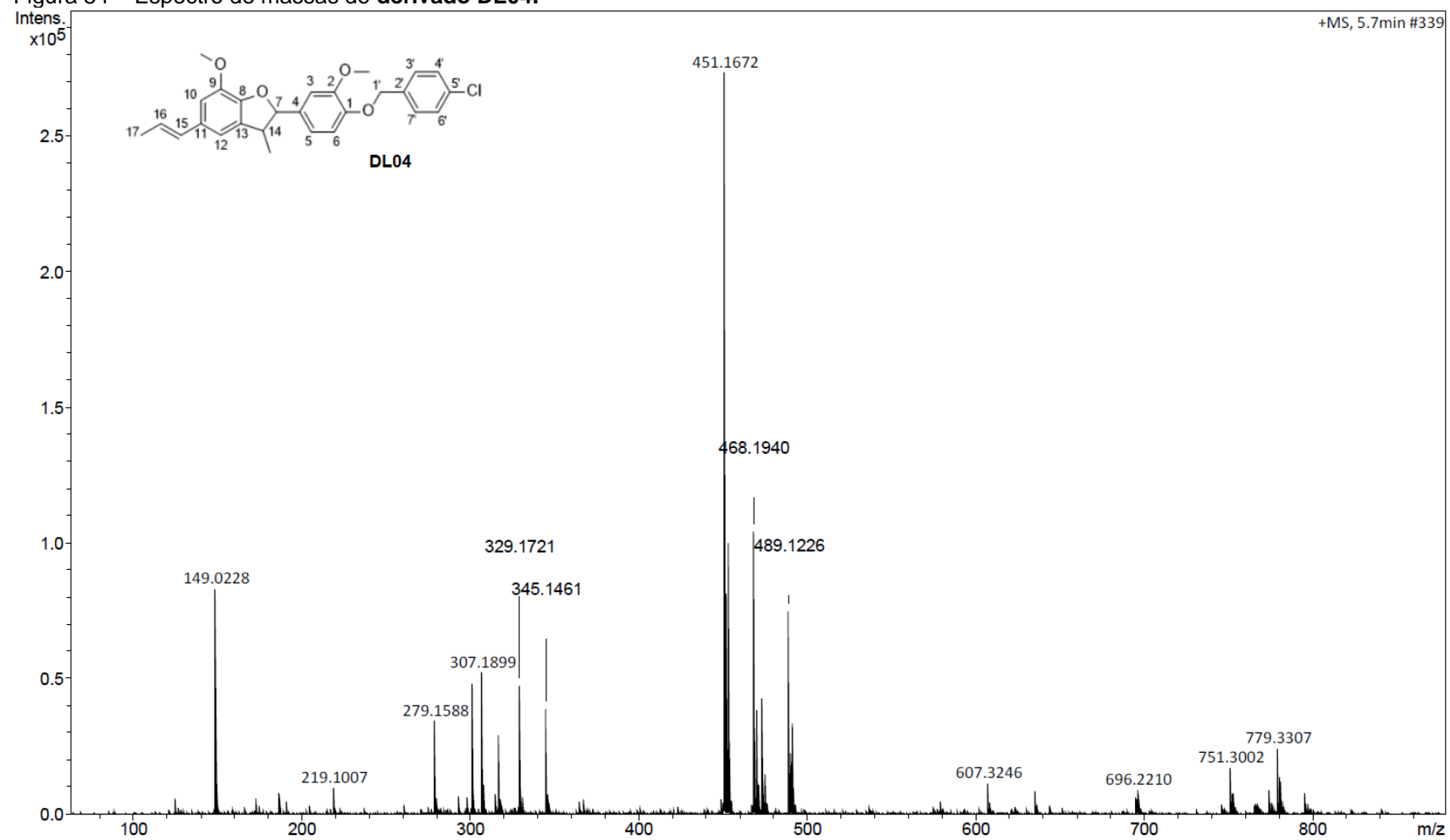
Figura 82 – Espectro de RMN de ^{13}C do derivado DL04 (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Da autora.

Figura 83 – Subespectro DEPT-135 do derivado DL04 (CDCl₃, 75 MHz).

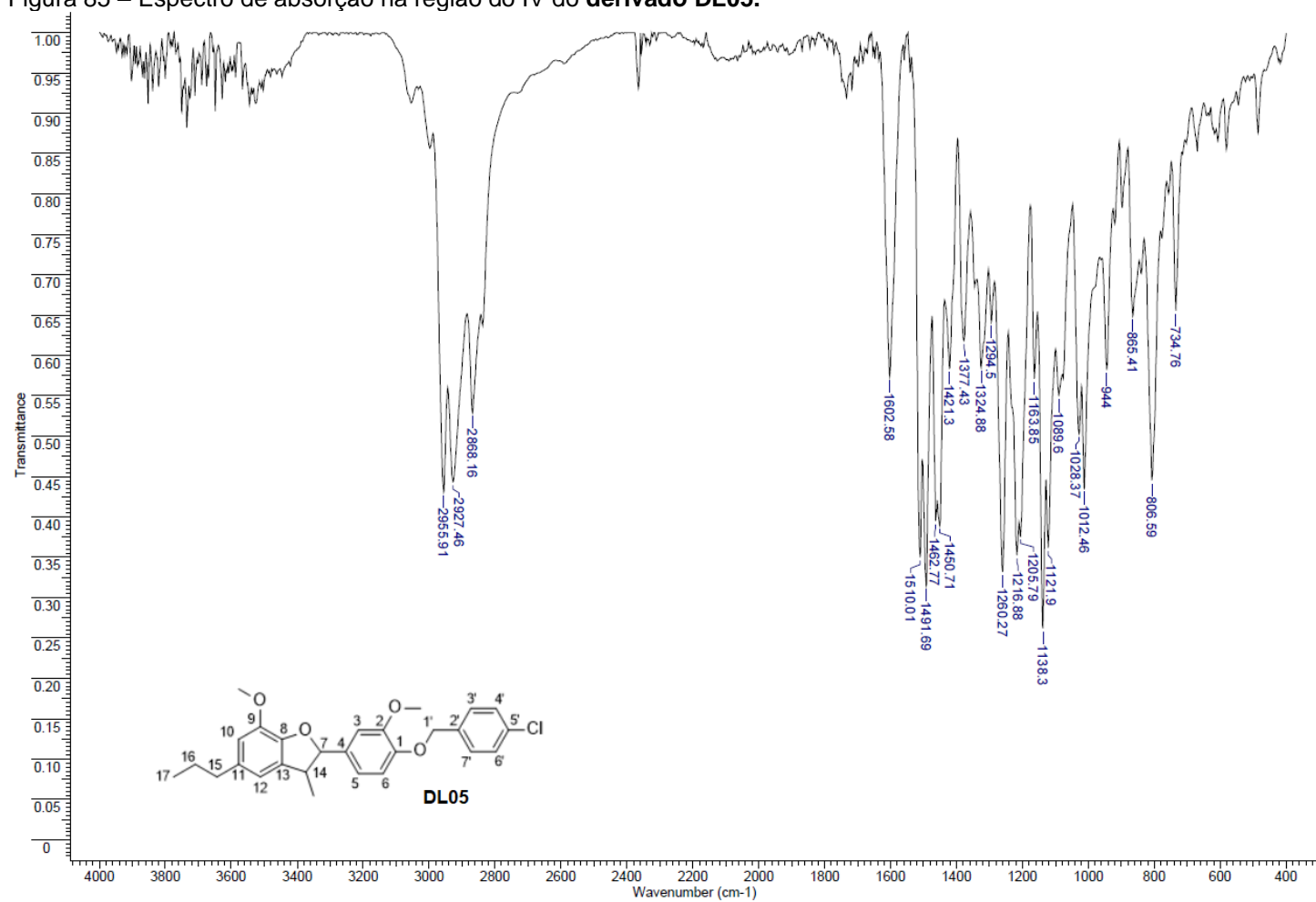
Fonte: Da autora.

Figura 84 – Espectro de massas do derivado DL04.



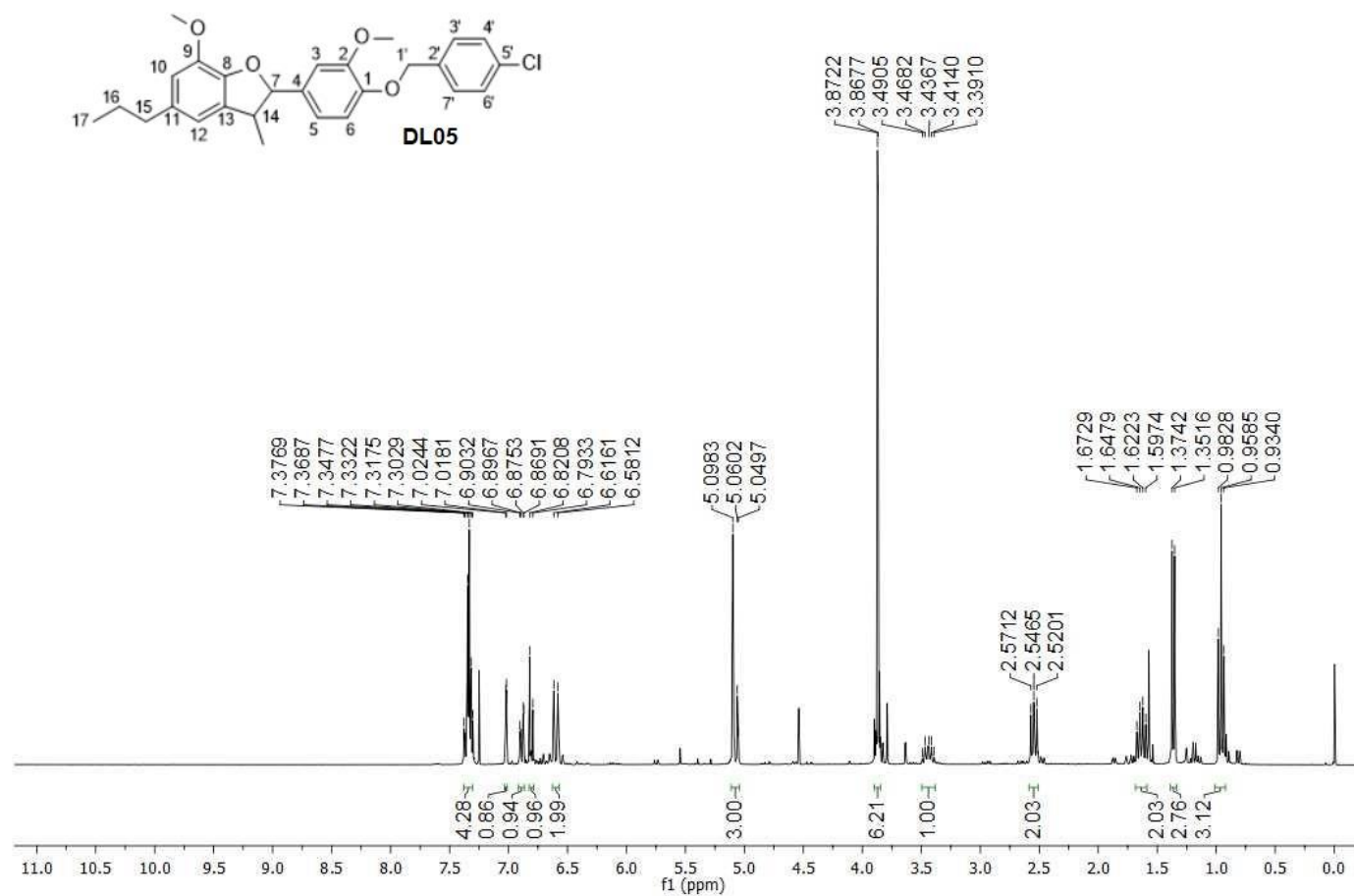
Fonte: Da autora.

Figura 85 – Espectro de absorção na região do IV do derivado DL05.

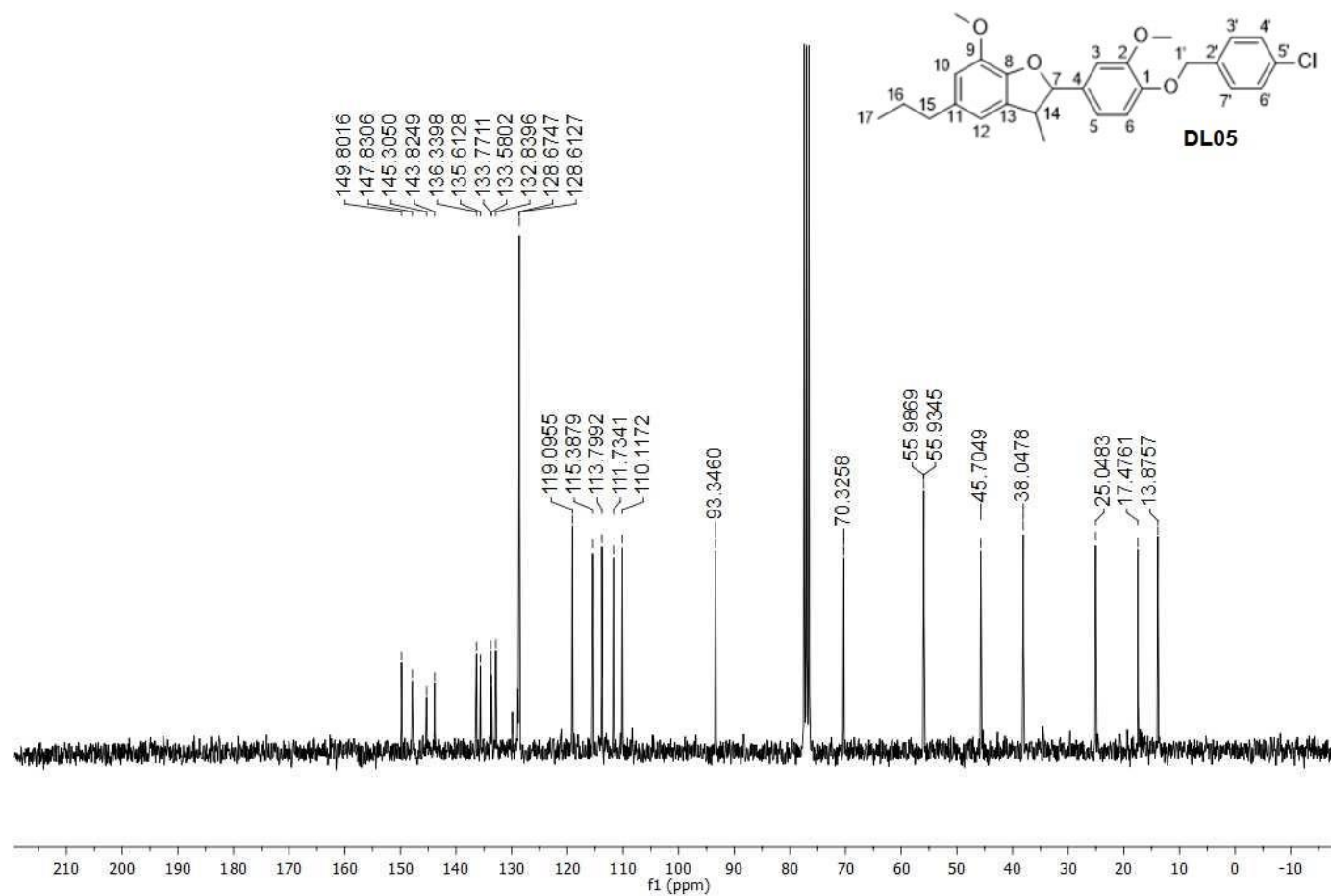


Fonte: Da autora.

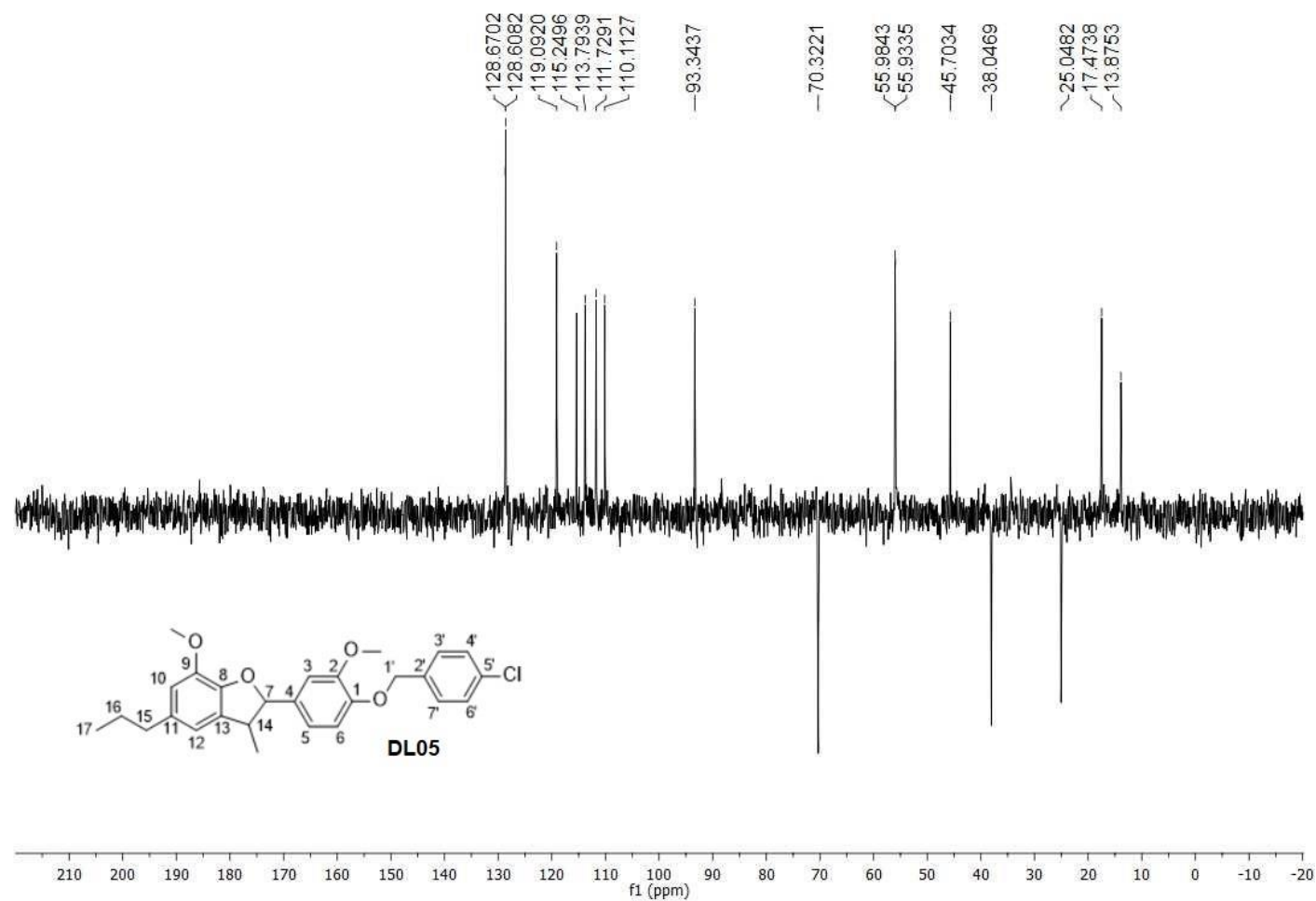
Figura 86 – Espectro de RMN de ^1H do derivado DL05 (CDCl_3 , 300 MHz).



Fonte: Da autora.

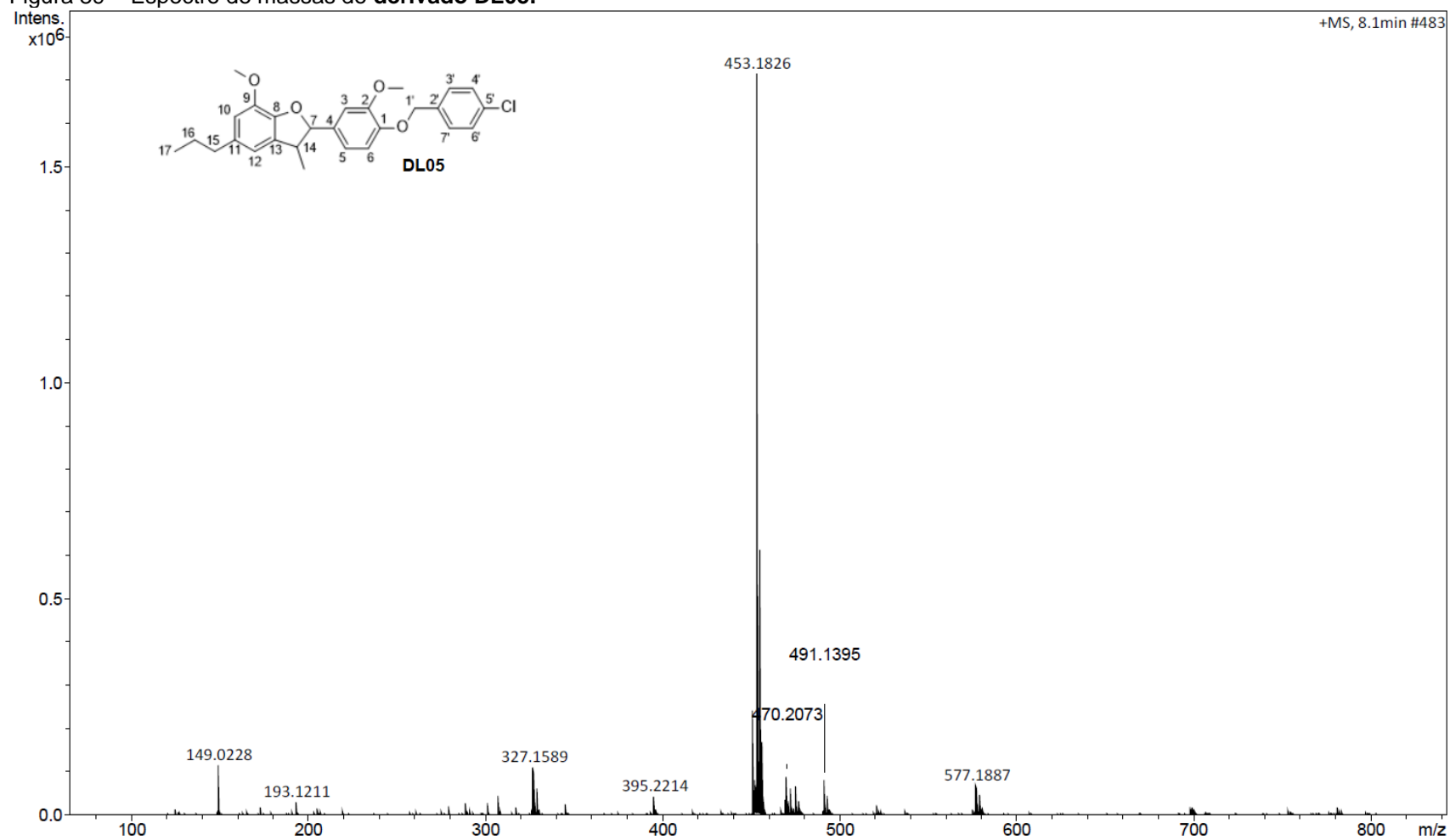
Figura 87 – Espectro de RMN de ^{13}C do derivado **DL05** (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Da autora.

Figura 88 – Subespectro DEPT-135 do derivado DL05 (CDCl₃, 75 MHz).

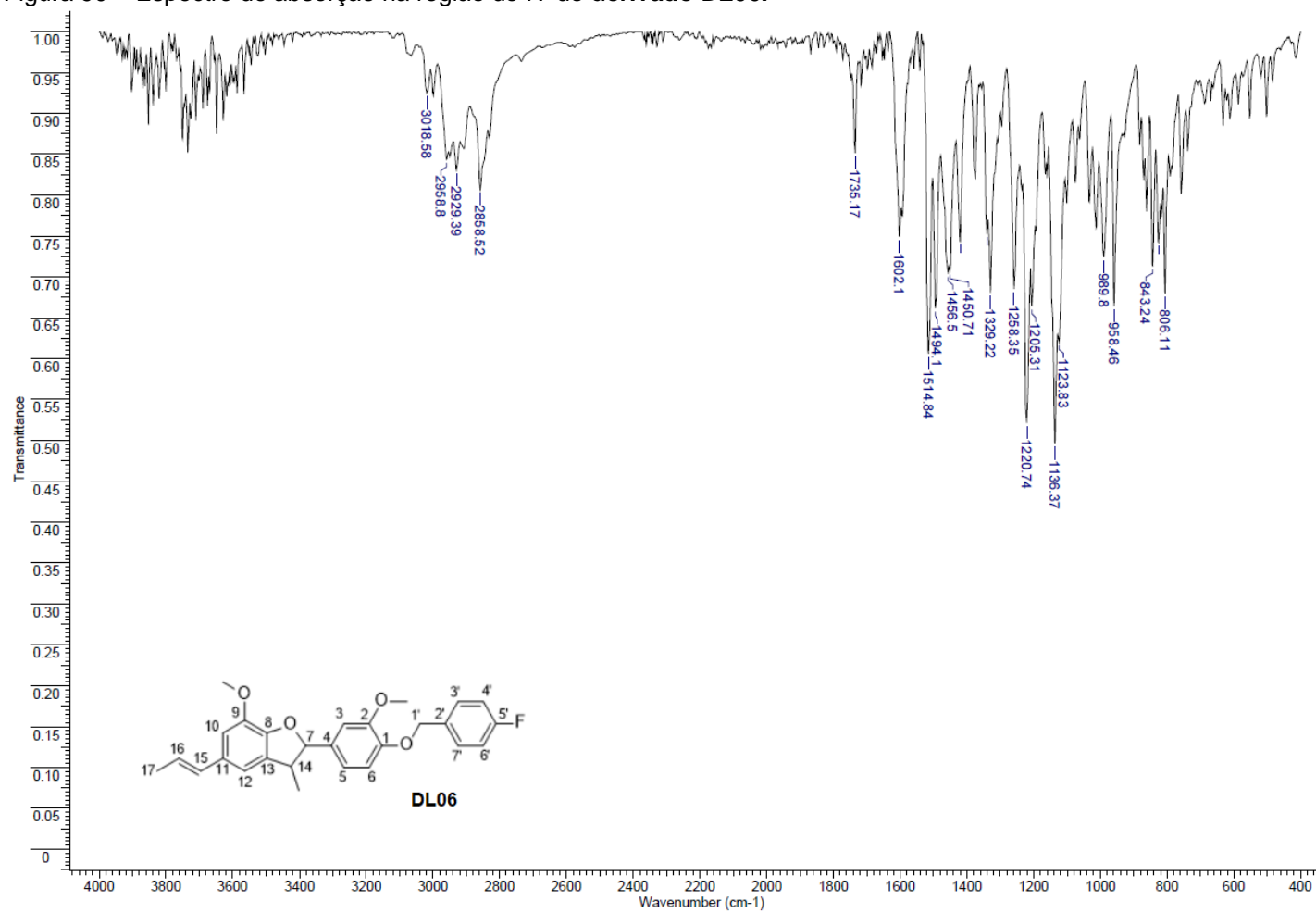
Fonte: Da autora.

Figura 89 – Espectro de massas do derivado DL05.

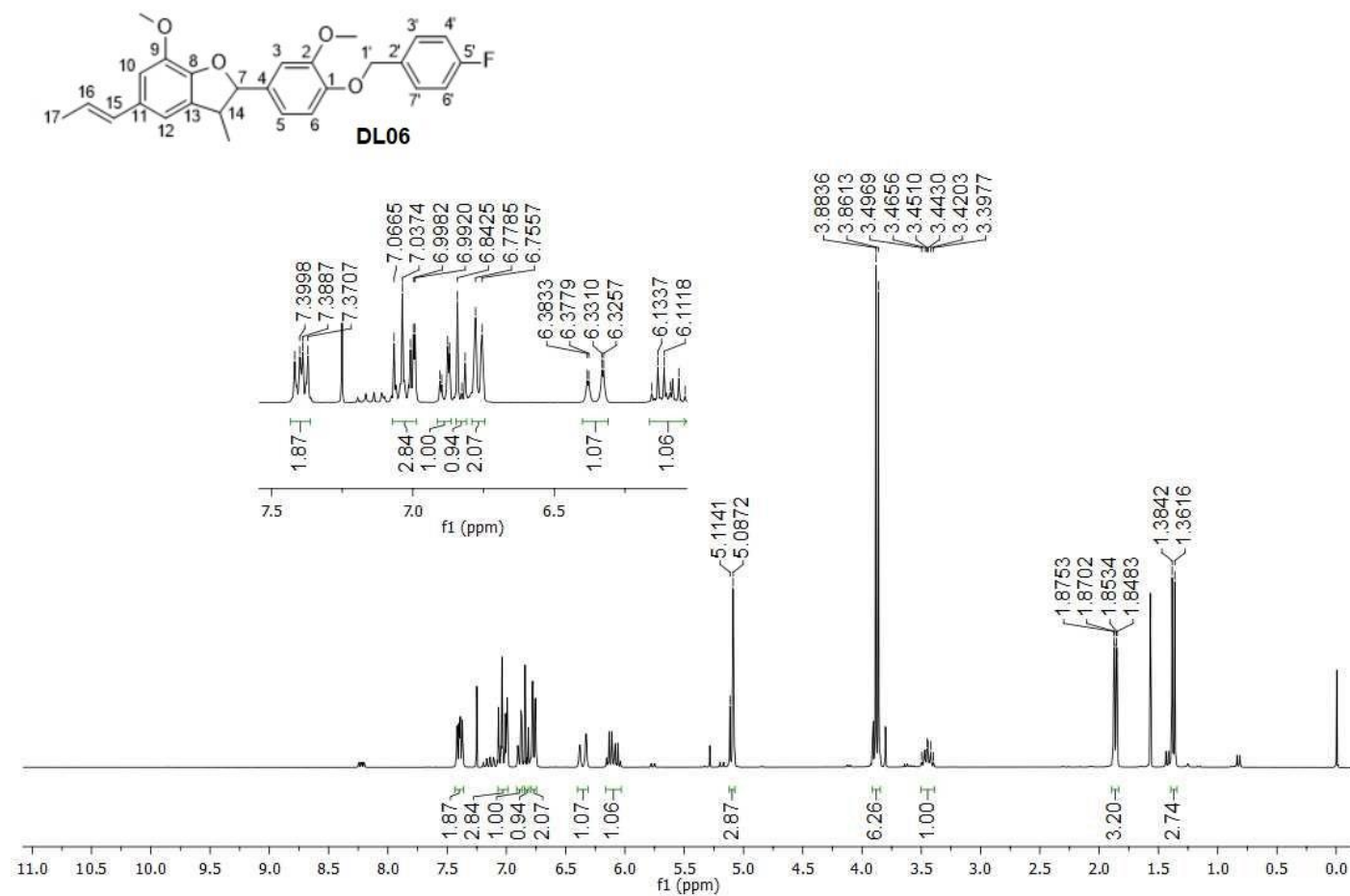


Fonte: Da autora.

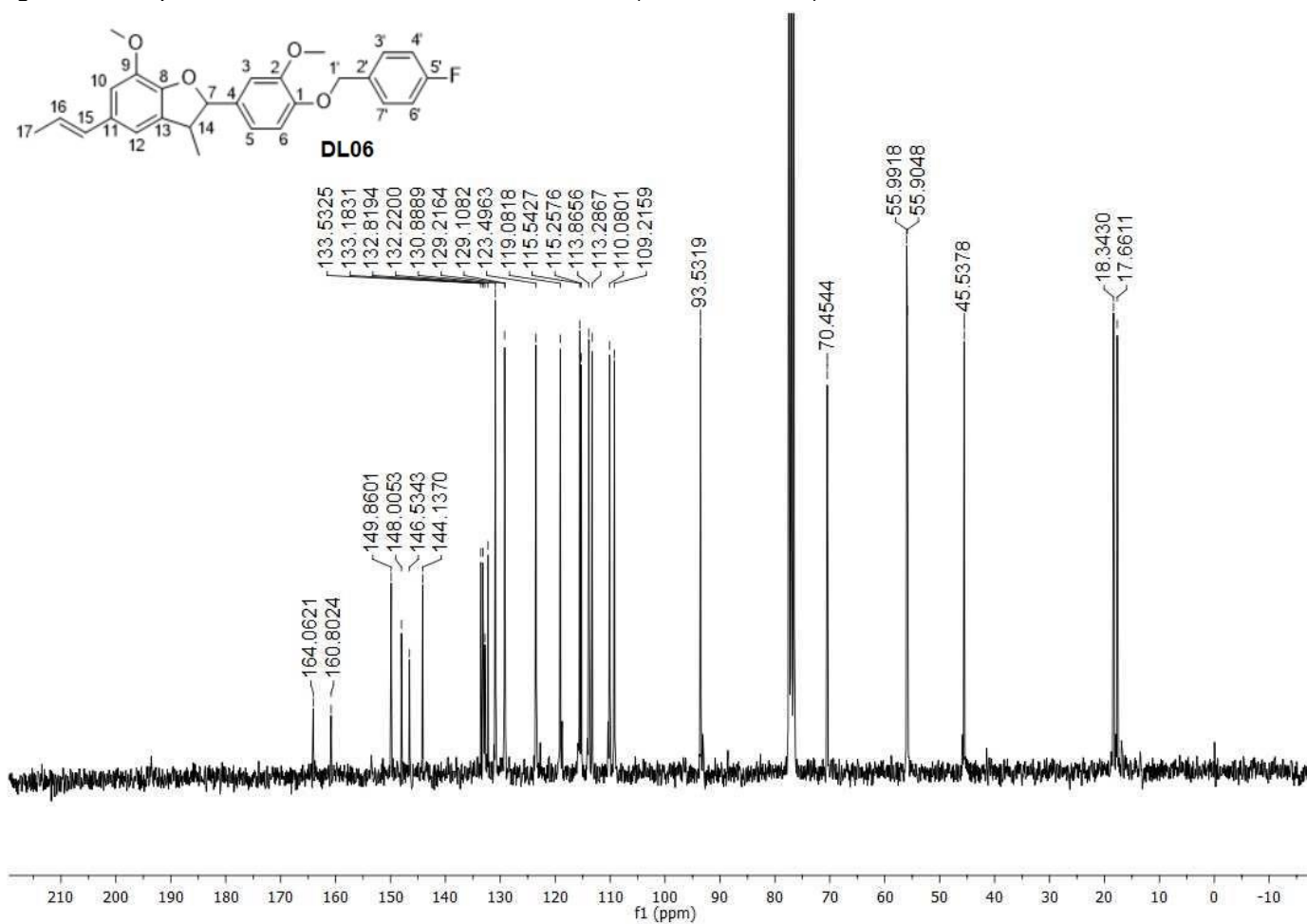
Figura 90 – Espectro de absorção na região do IV do derivado DL06.



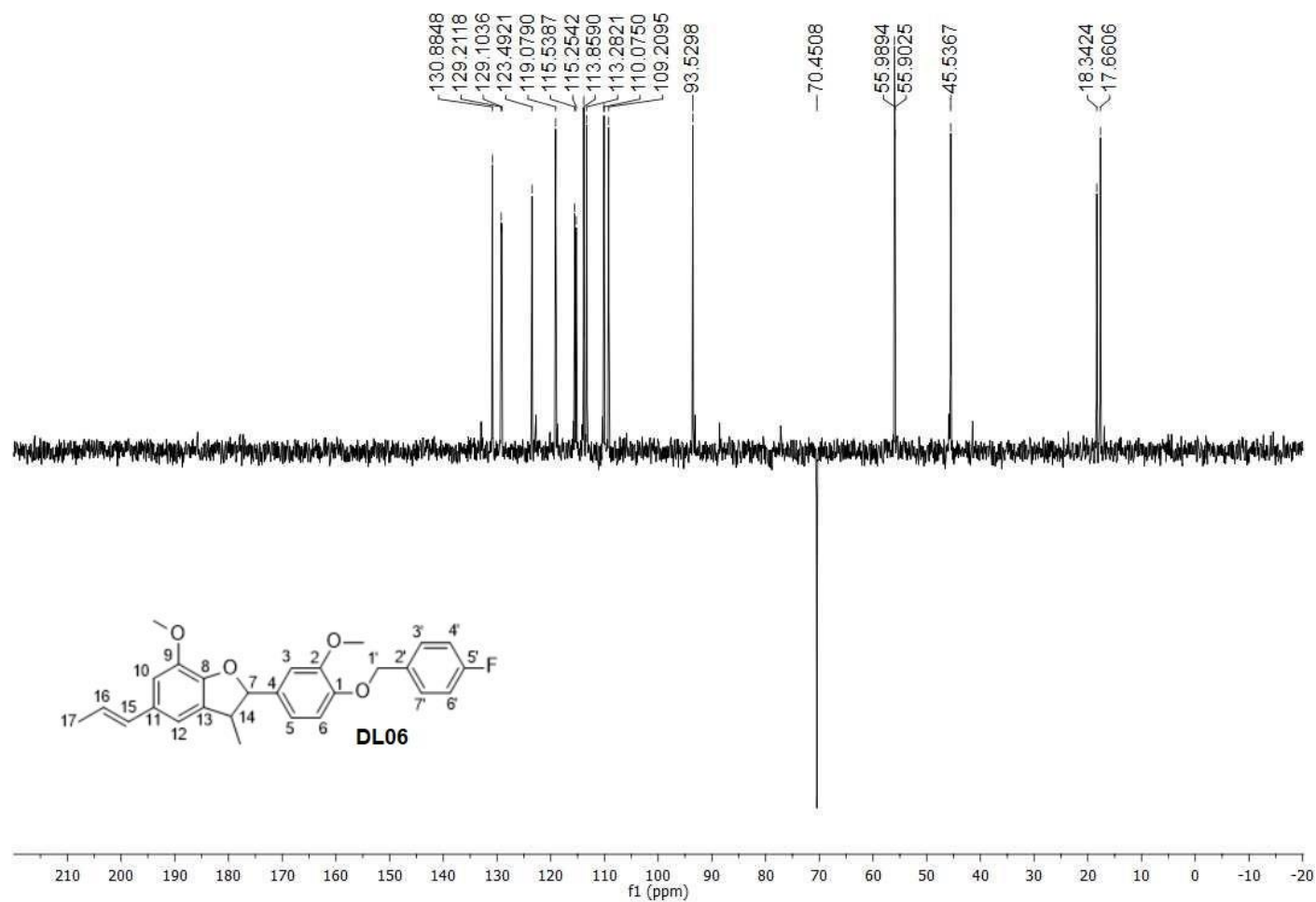
Fonte: Da autora.

Figura 91 – Espectro de RMN de ^1H do derivado DL06 (CDCl_3 , 300 MHz).

Fonte: Da autora.

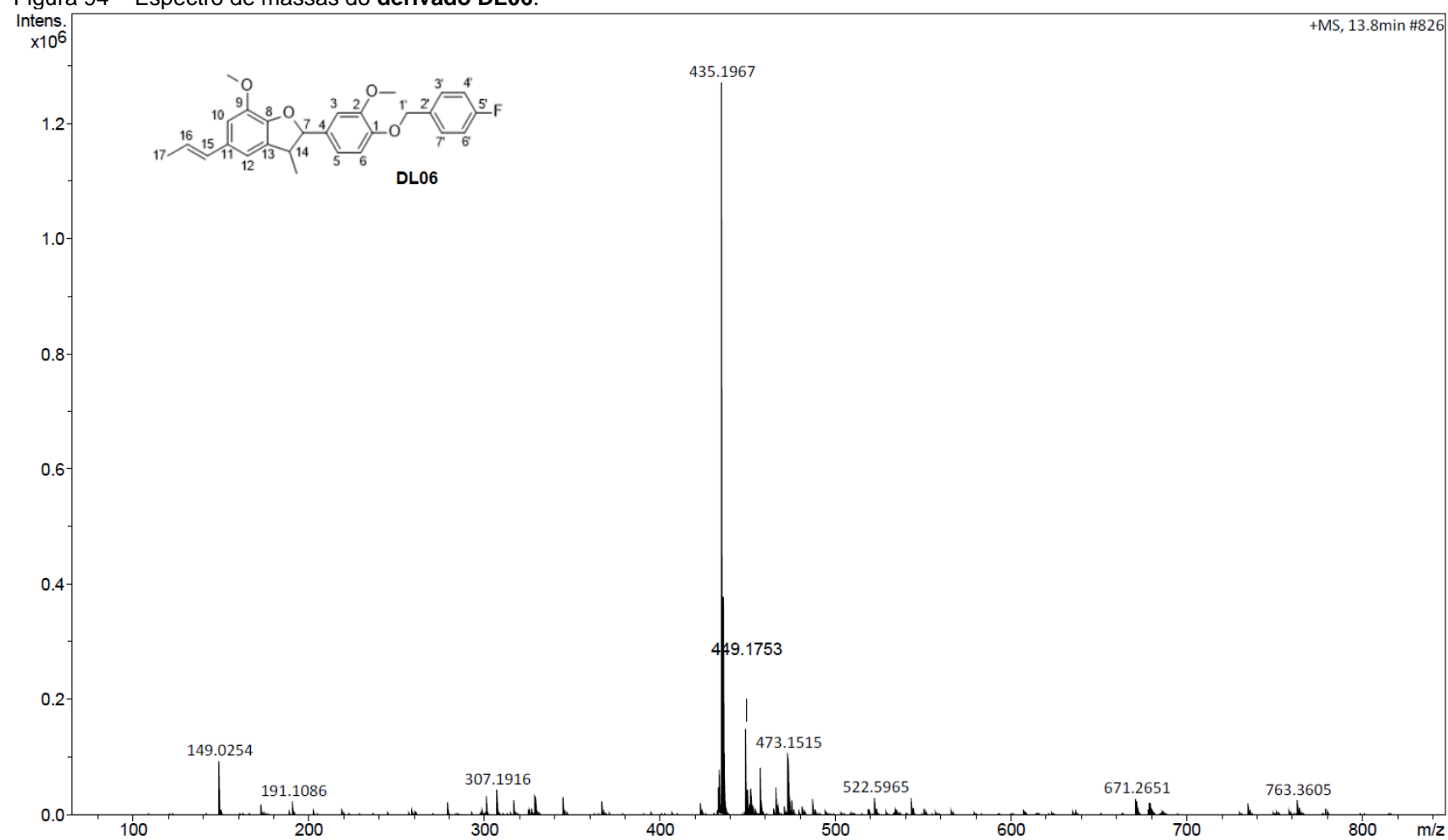
Figura 92 – Espectro de RMN de ^{13}C do derivado DL06 (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Da autora.

Figura 93 – Subespectro DEPT-135 do derivado DL06 (CDCl₃, 75 MHz).

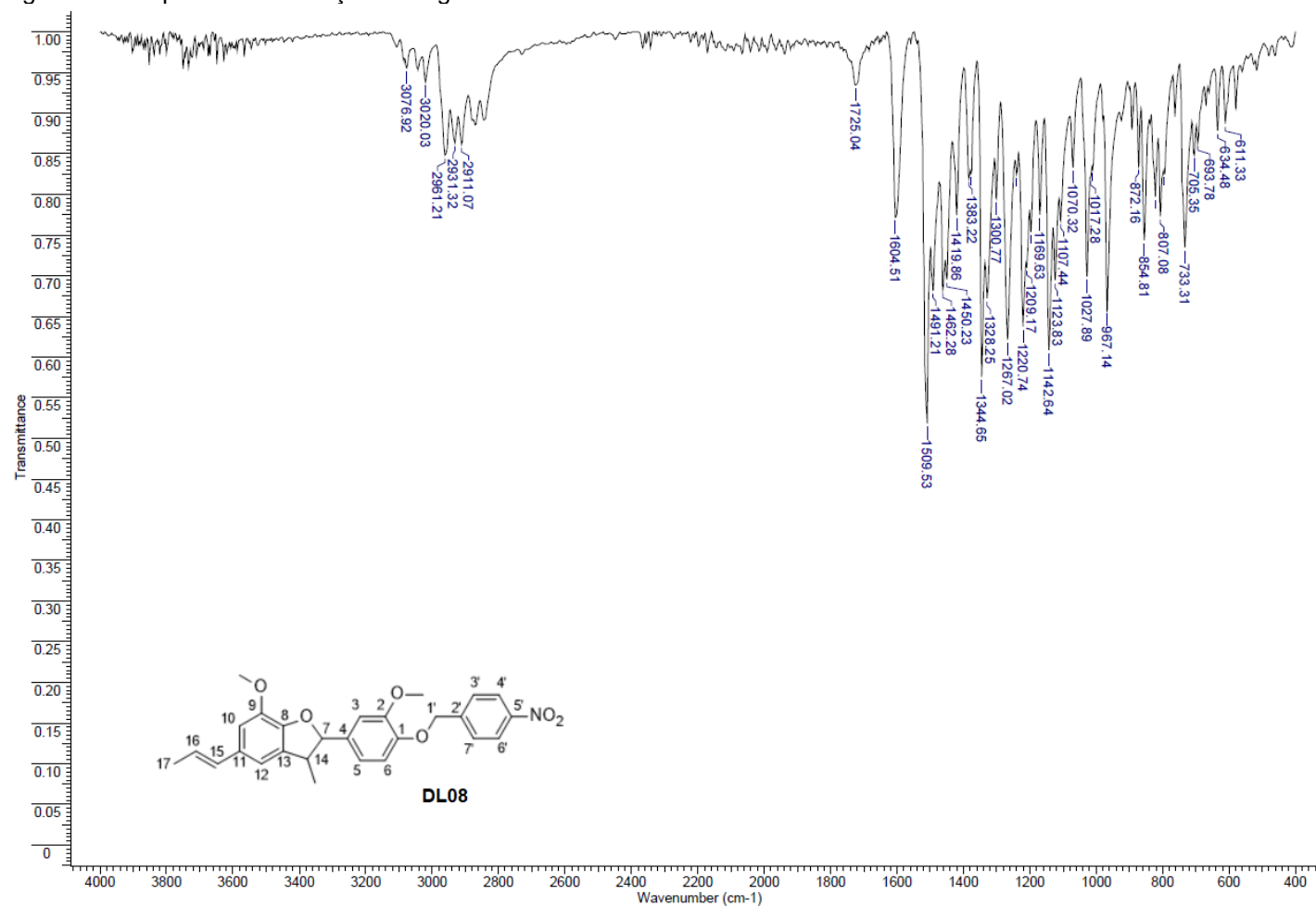
Fonte: Da autora.

Figura 94 – Espectro de massas do derivado DL06.



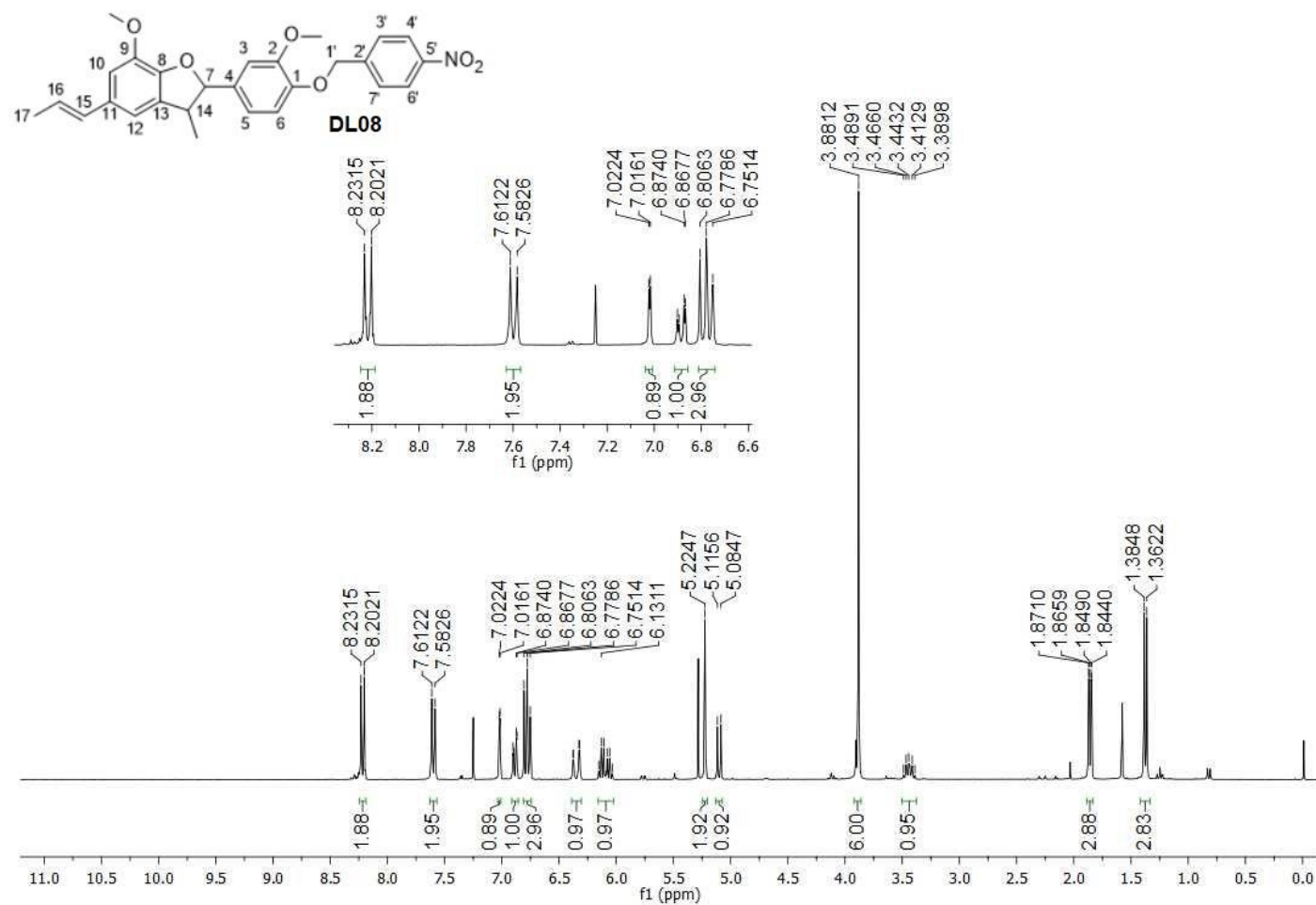
Fonte: Da autora.

Figura 95 – Espectro de absorção na região do IV do derivado DL08.

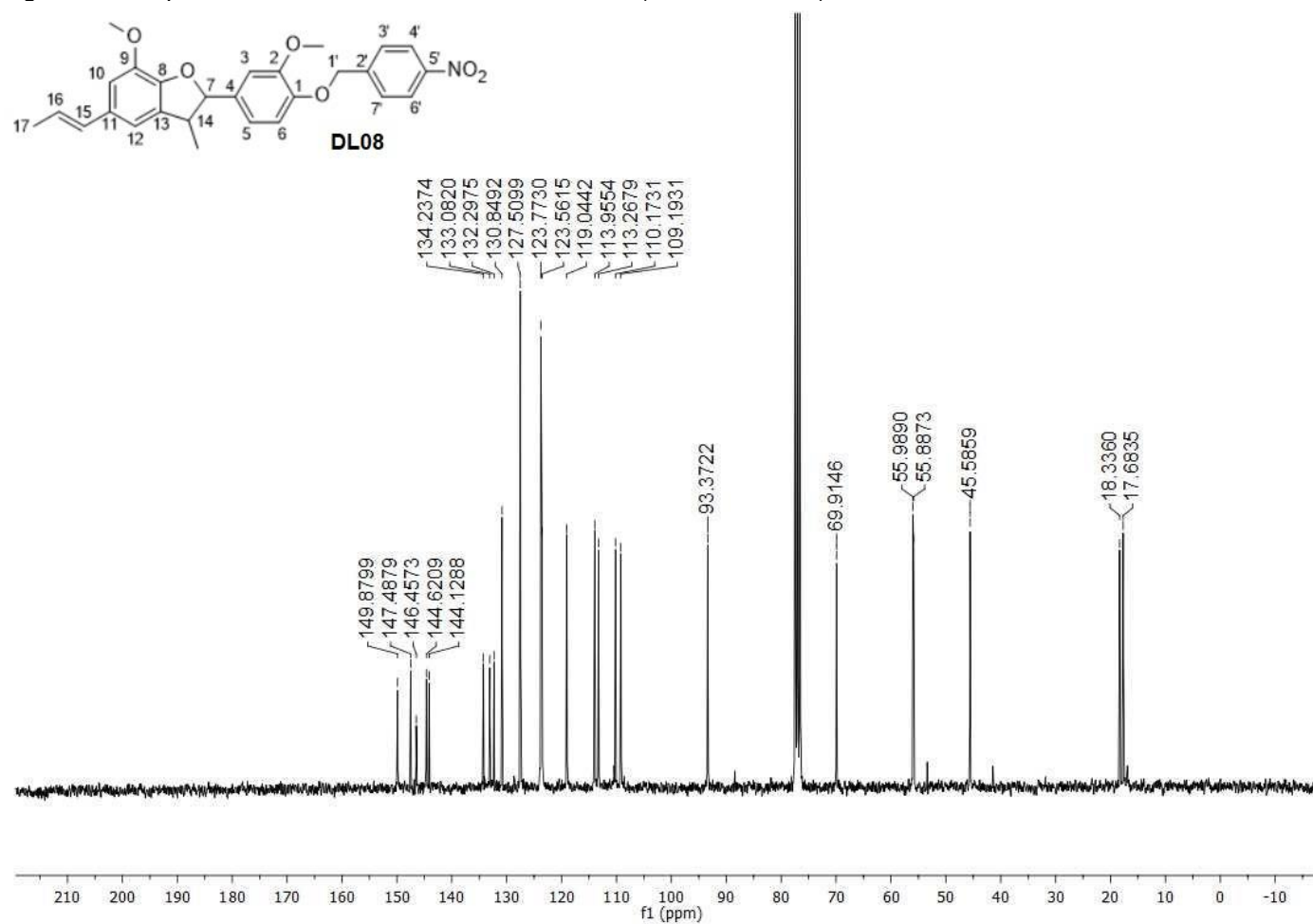


Fonte: Da autora.

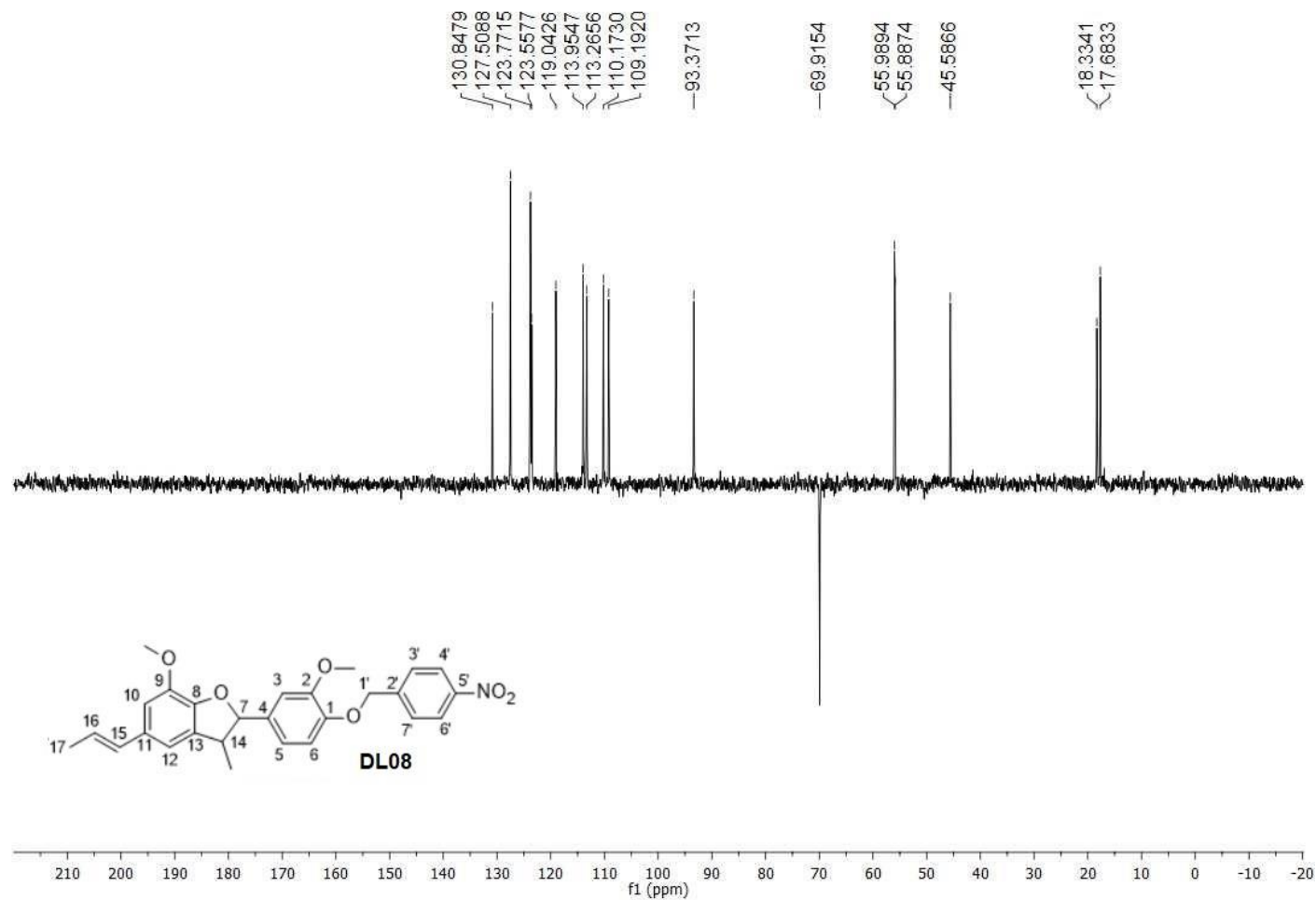
Figura 96 – Espectro de RMN de ^1H do derivado **DL08** (CDCl_3 , 300 MHz).



Fonte: Da autora.

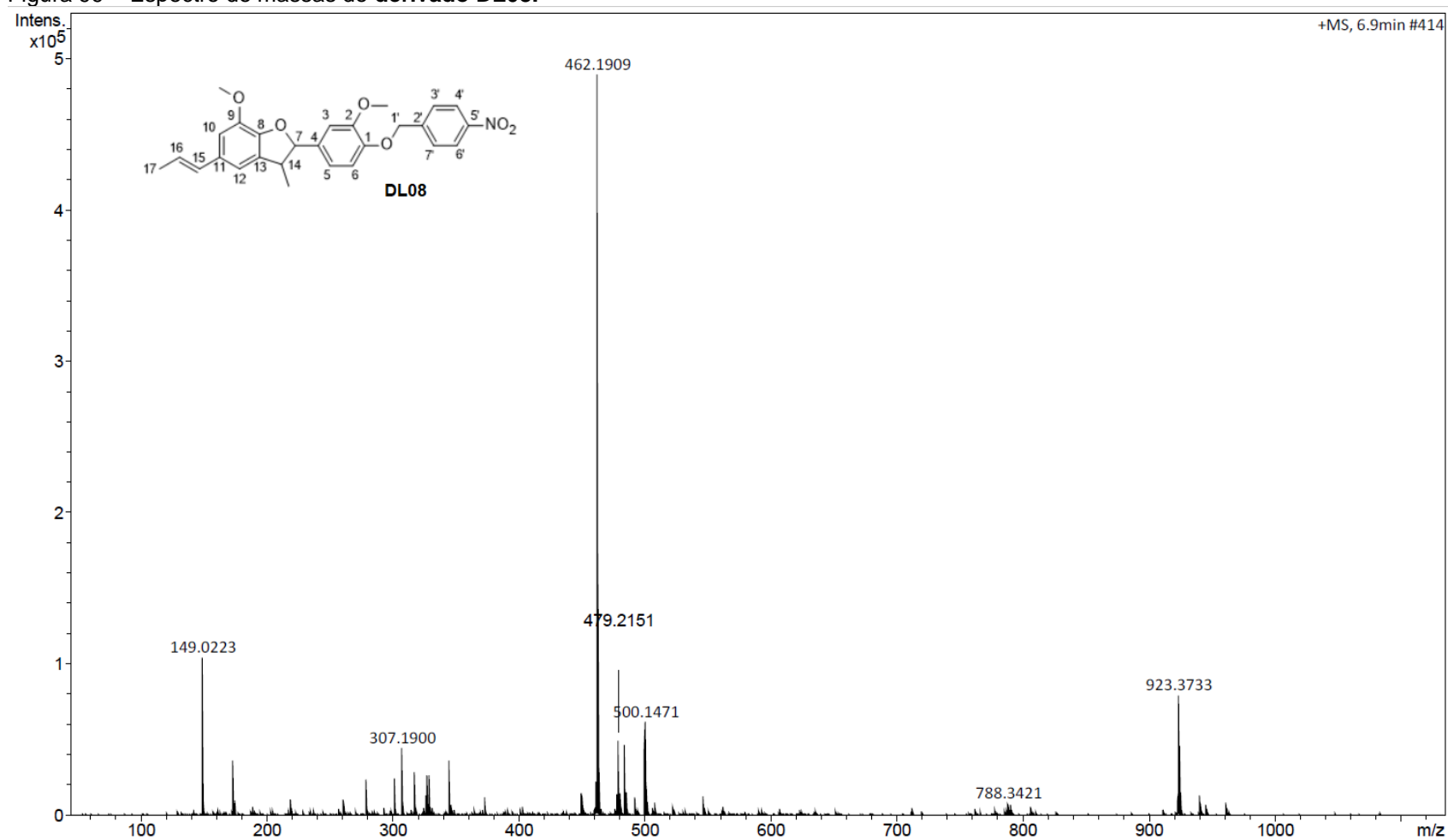
Figura 97 – Espectro de RMN de ^{13}C do derivado DL08 (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Da autora.

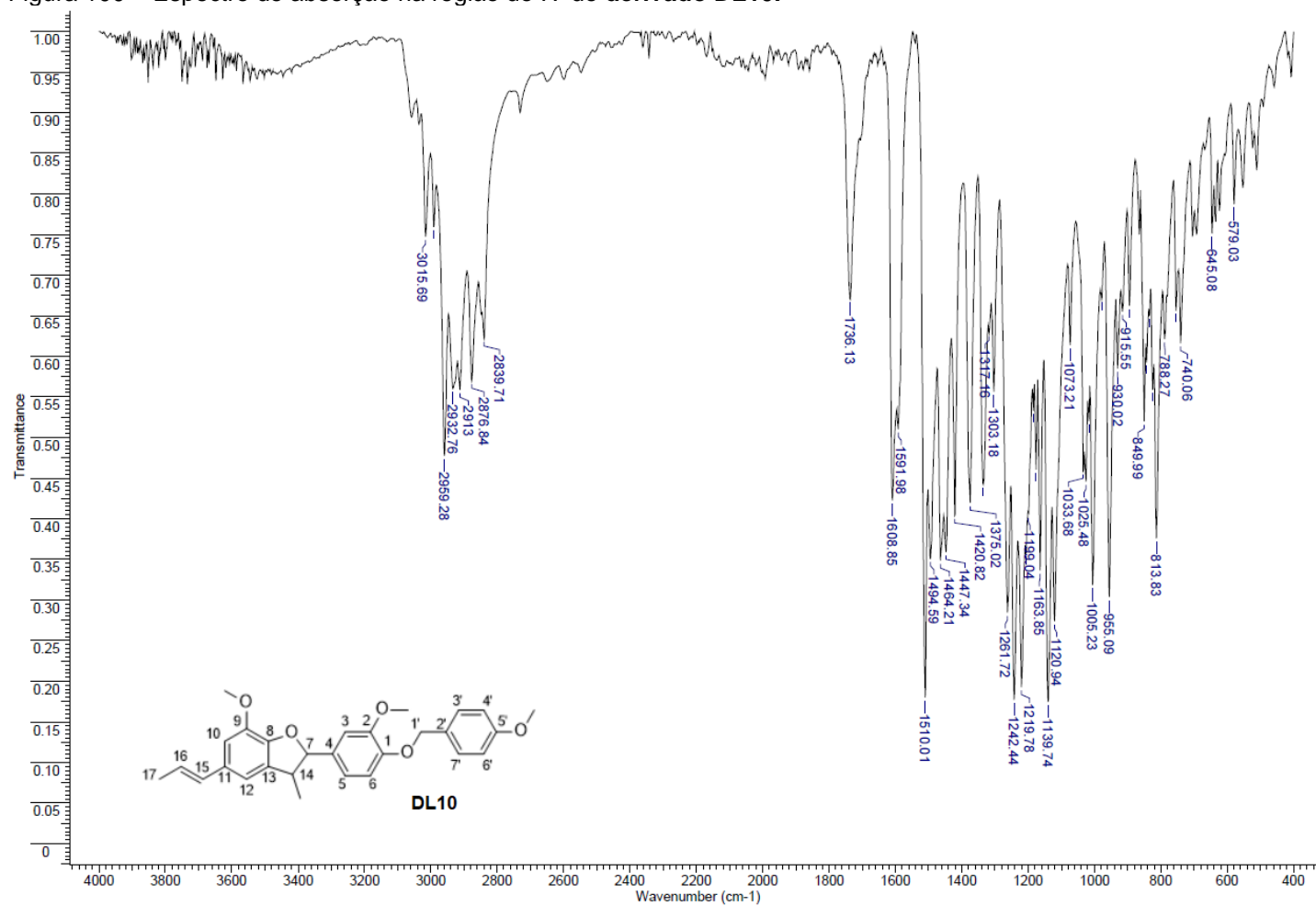
Figura 98 – Subespectro DEPT-135 do derivado DL08 (CDCl₃, 75 MHz).

Fonte: Da autora.

Figura 99 – Espectro de massas do derivado DL08.

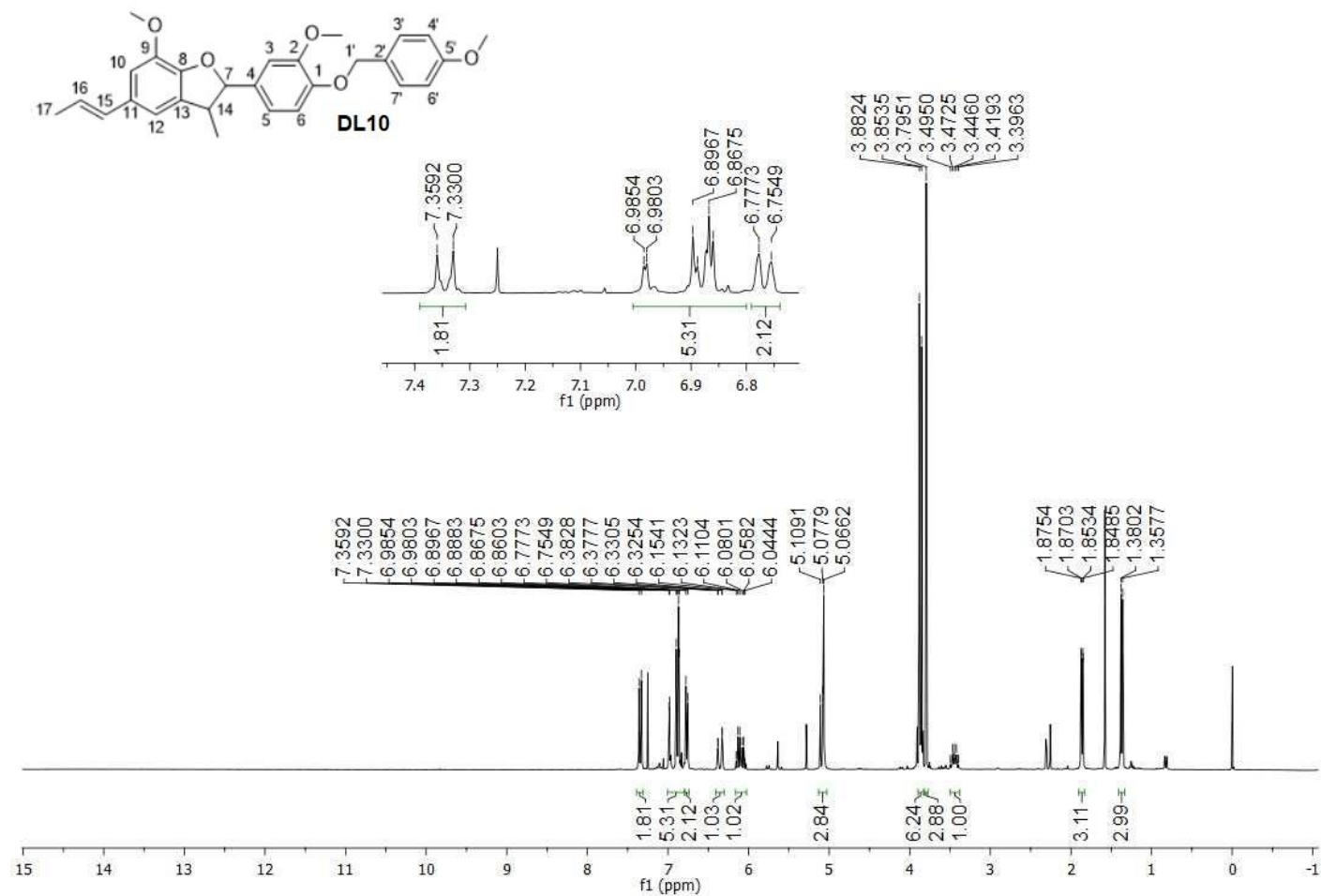


Fonte: Da autora.

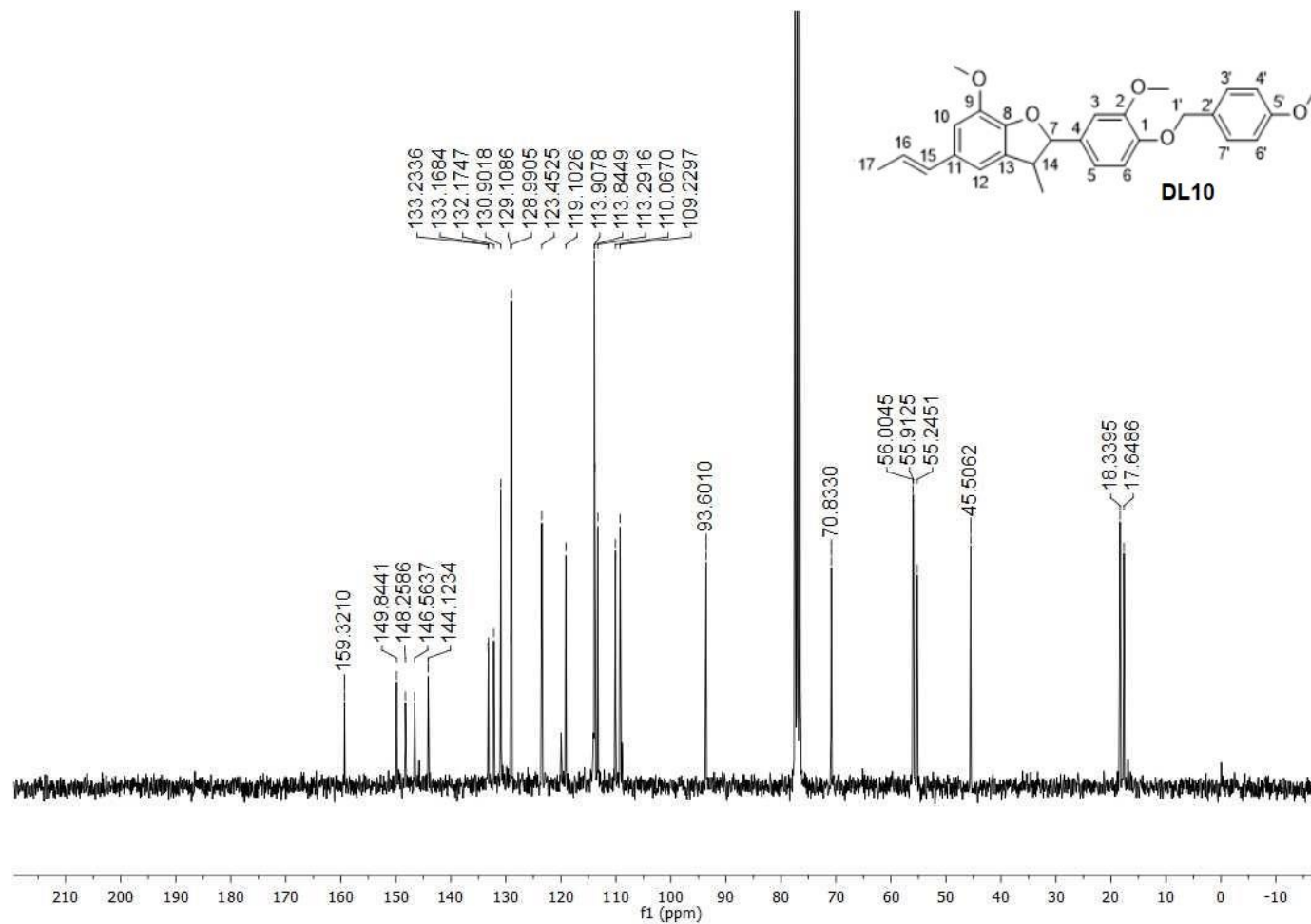
Figura 100 – Espectro de absorção na região do IV do **derivado DL10**.

Fonte: Da autora.

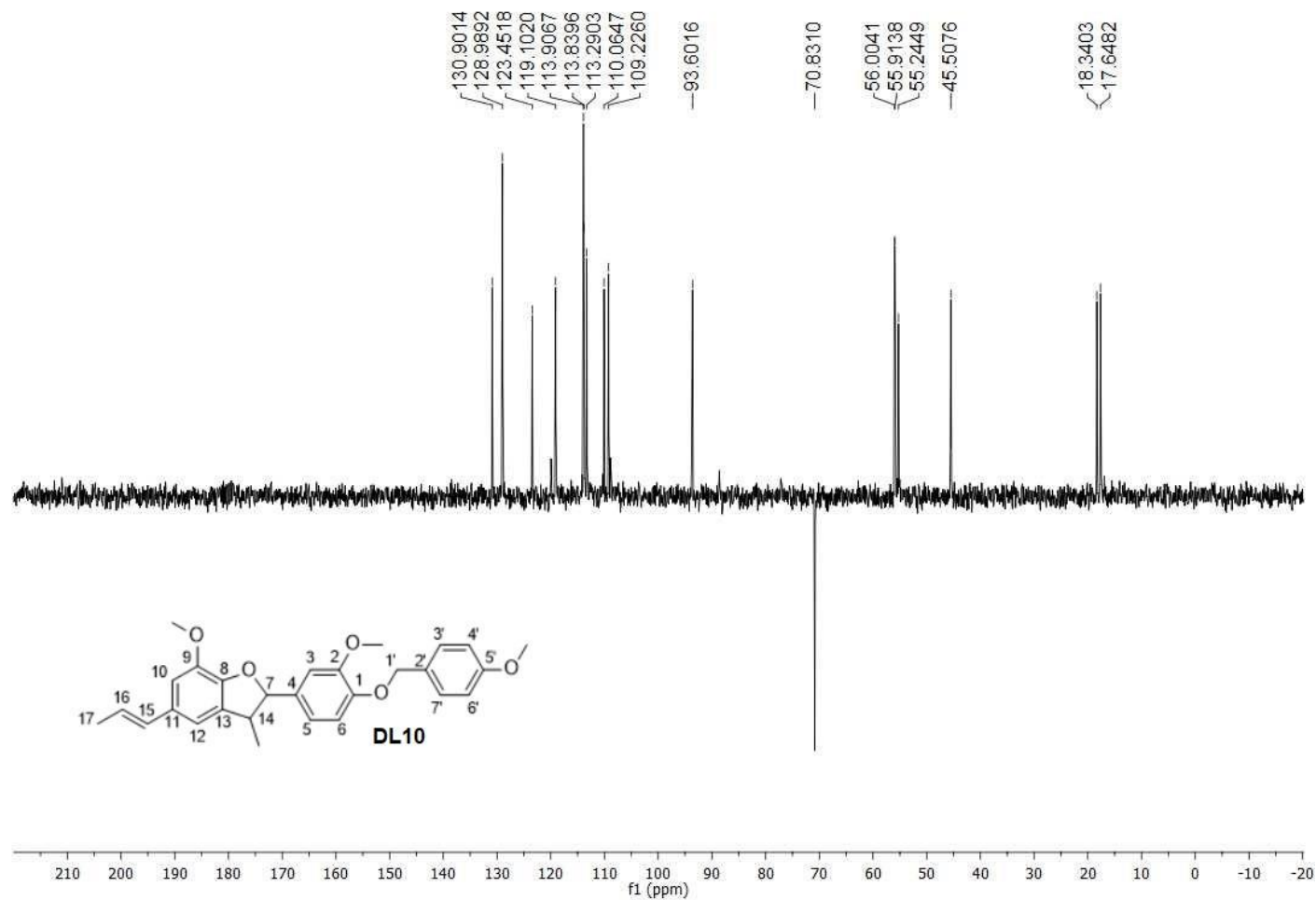
Figura 101 – Espectro de RMN de ^1H do derivado DL10 (CDCl_3 , 300 MHz).



Fonte: Da autora.

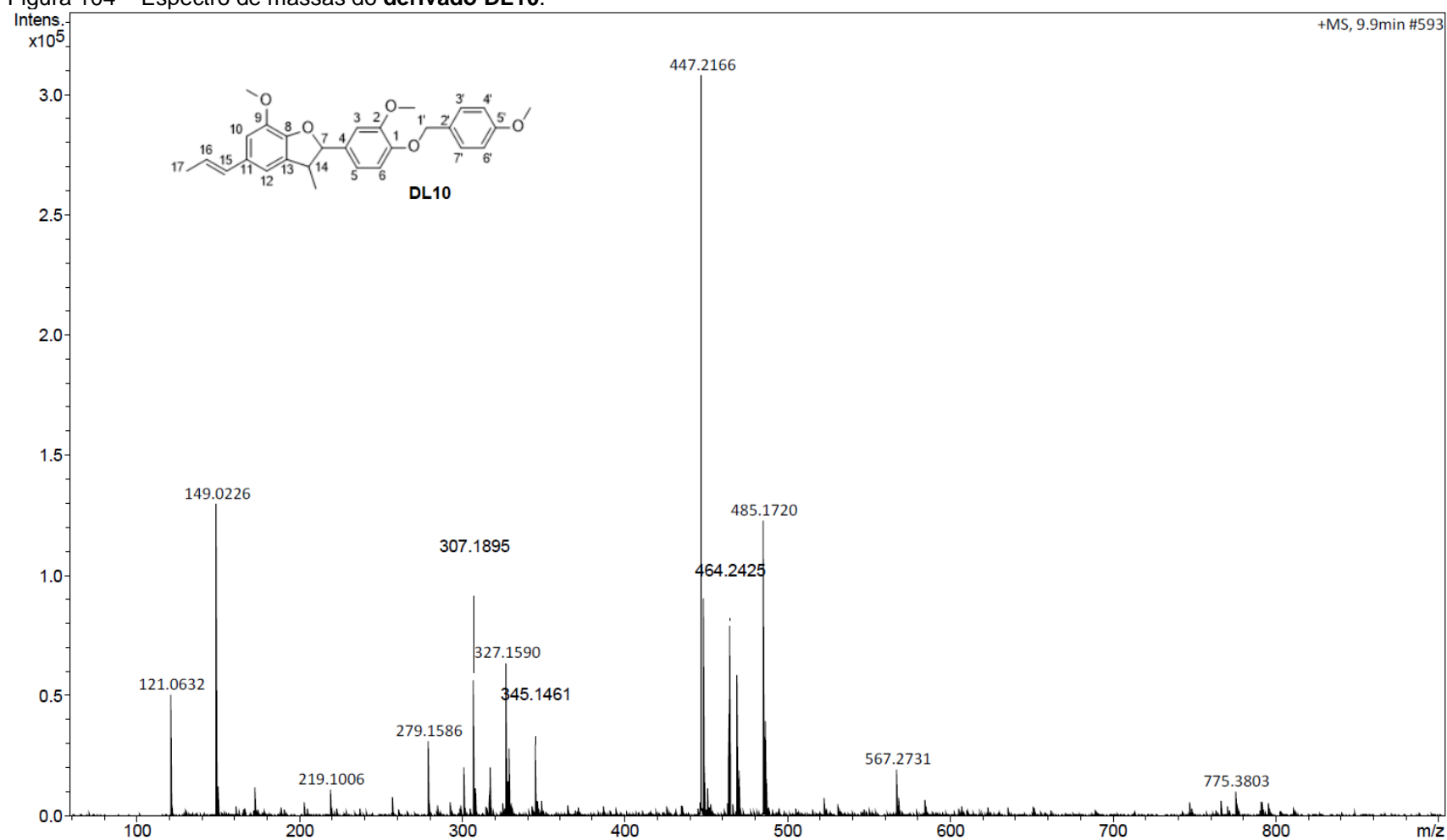
Figura 102 – Espectro de RMN de ^{13}C do derivado DL10 (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Da autora.

Figura 103 – Subespectro DEPT-135 do **derivado DL10** (CDCl₃, 75 MHz).

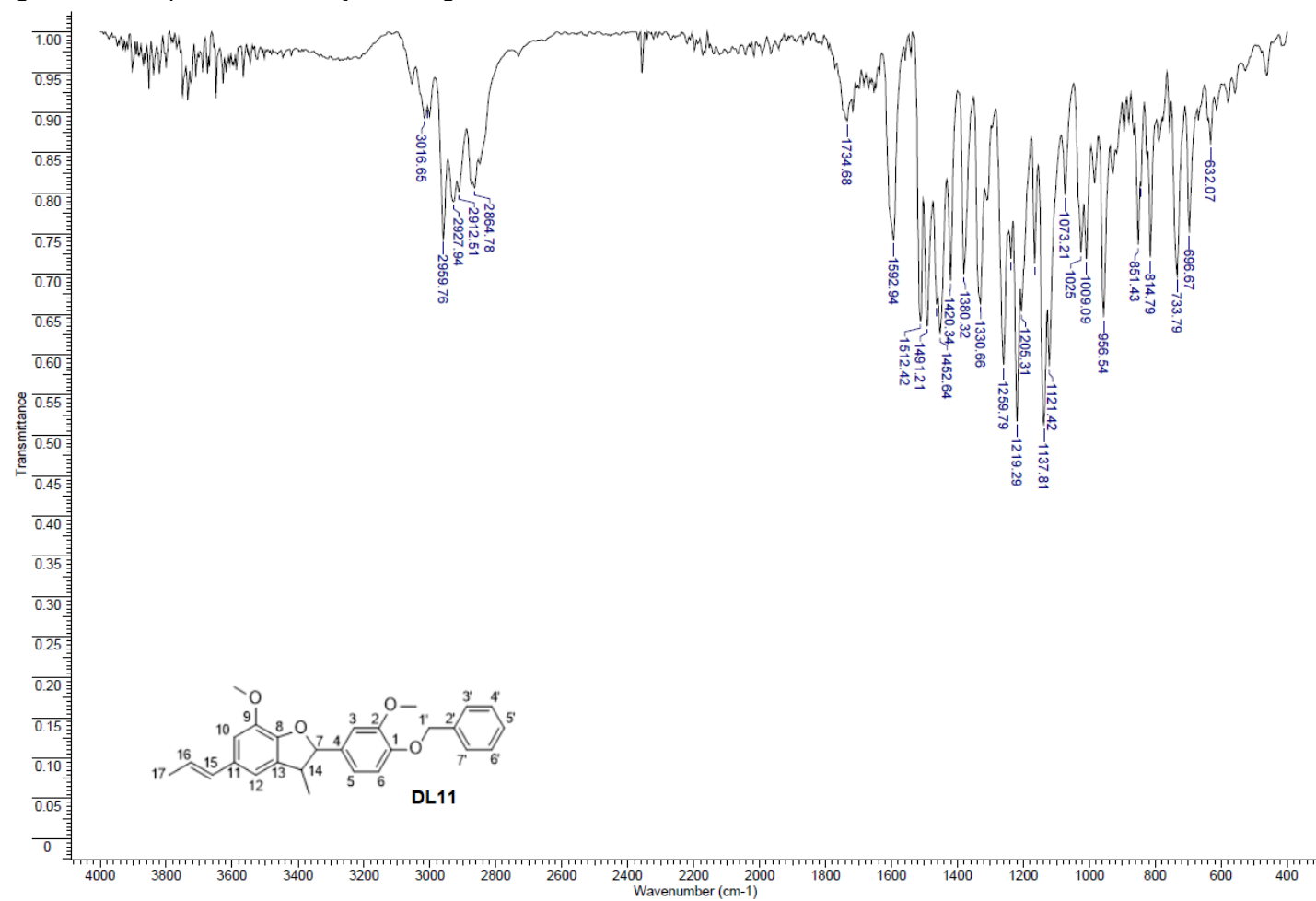
Fonte: Da autora.

Figura 104 – Espectro de massas do derivado DL10.

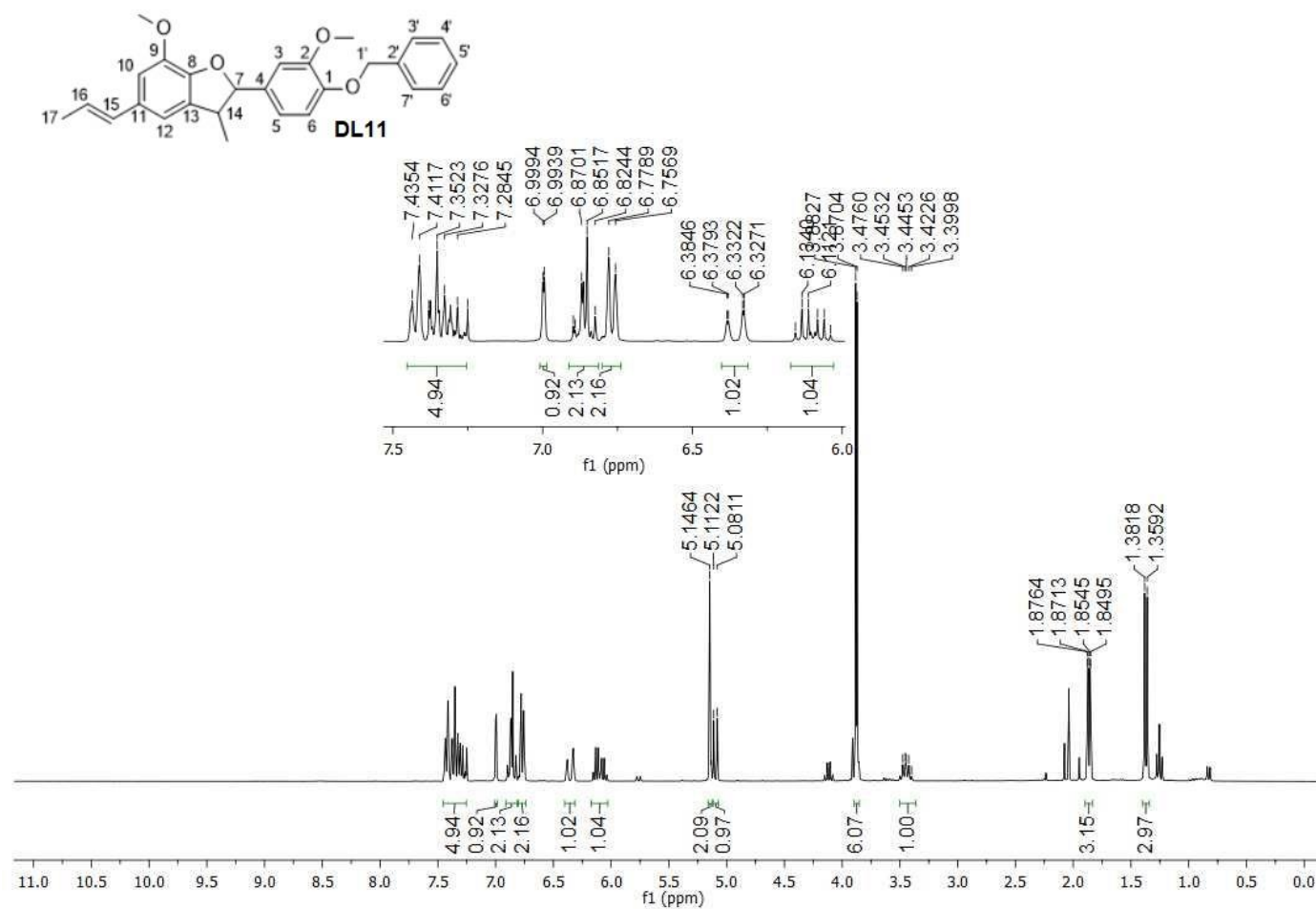


Fonte: Da autora.

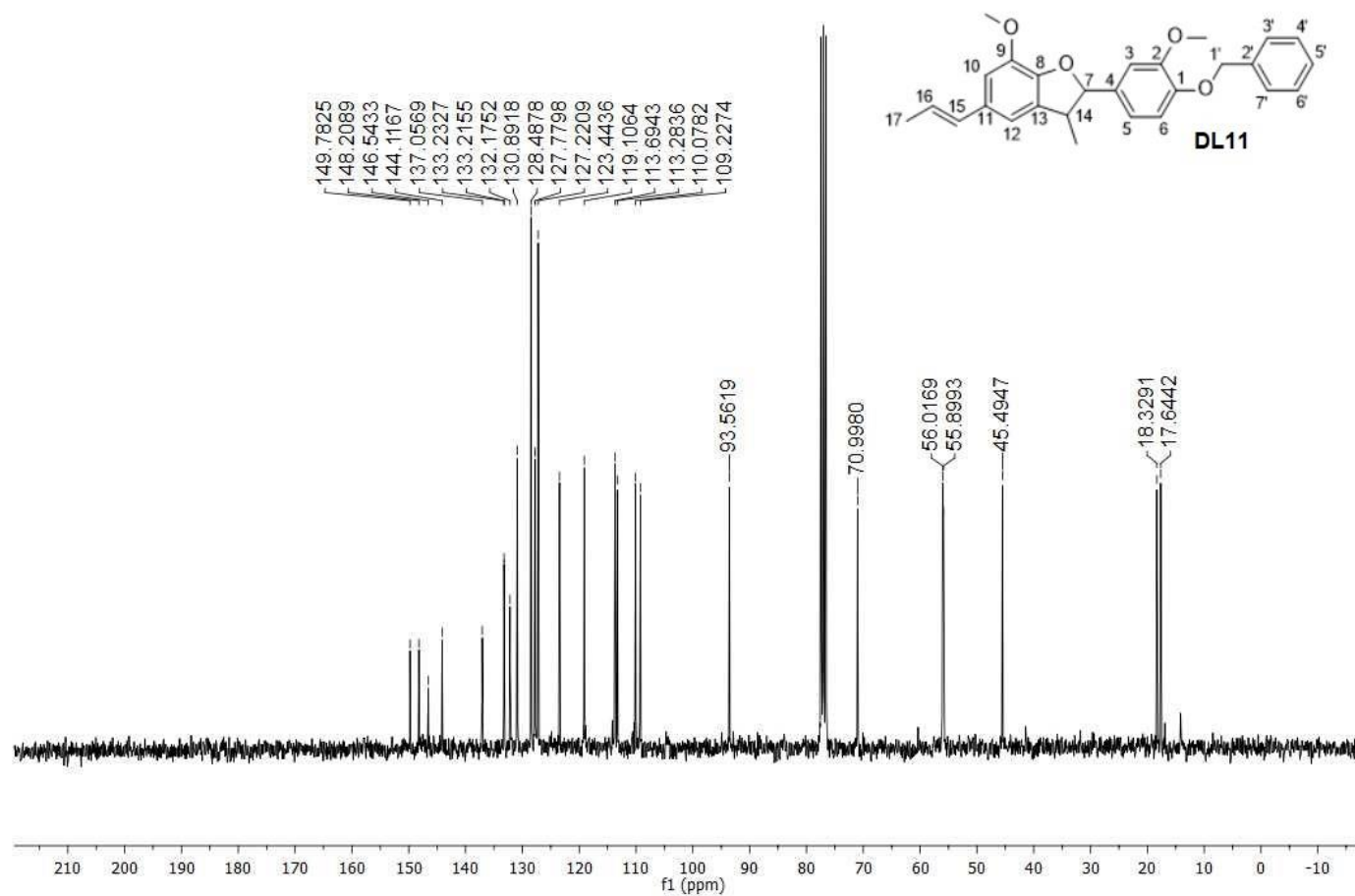
Figura 105 – Espectro de absorção na região do IV do **derivado DL11**.



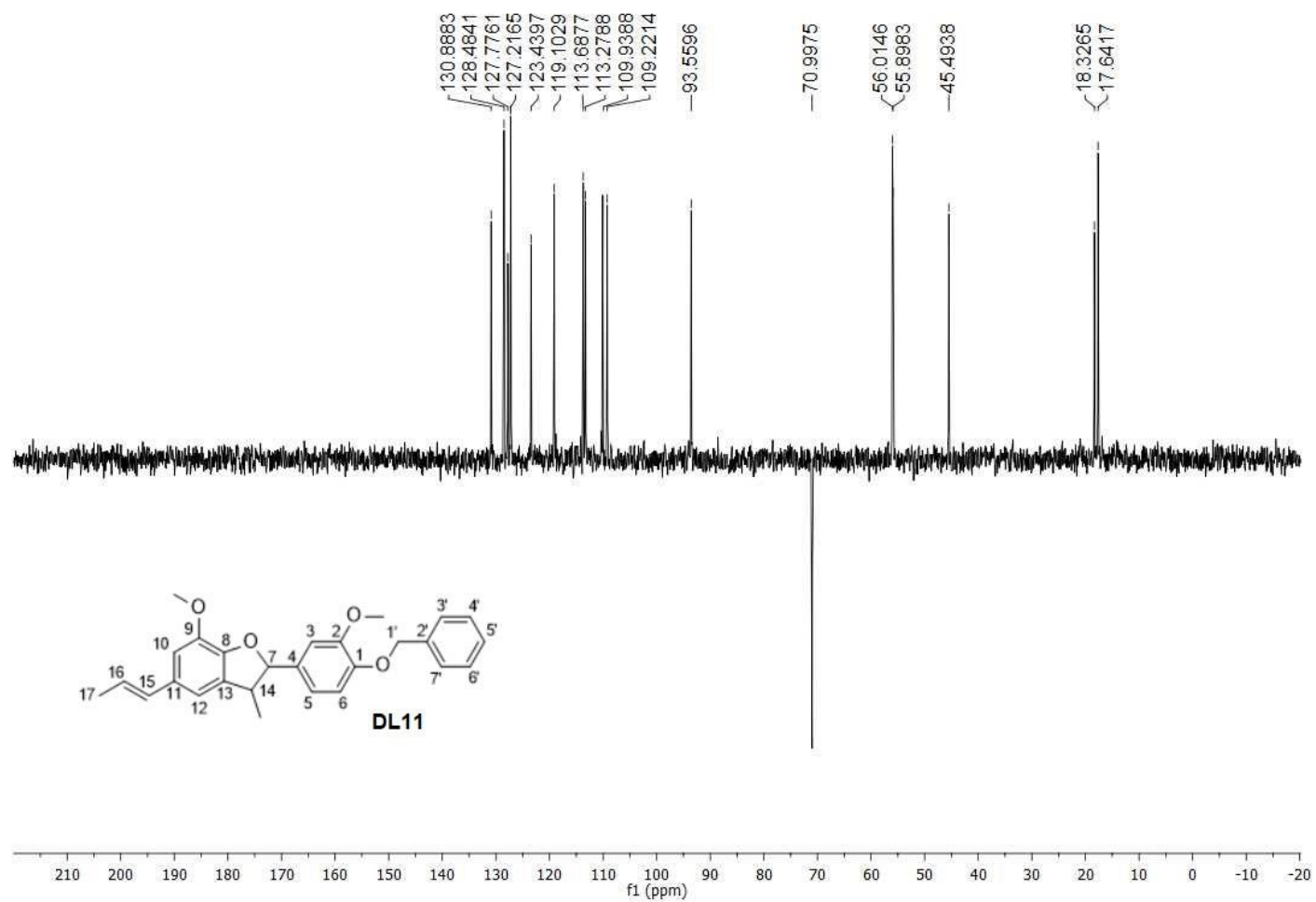
Fonte: Da autora.

Figura 106 – Espectro de RMN de ^1H do derivado DL11 (CDCl_3 , 300 MHz).

Fonte: Da autora.

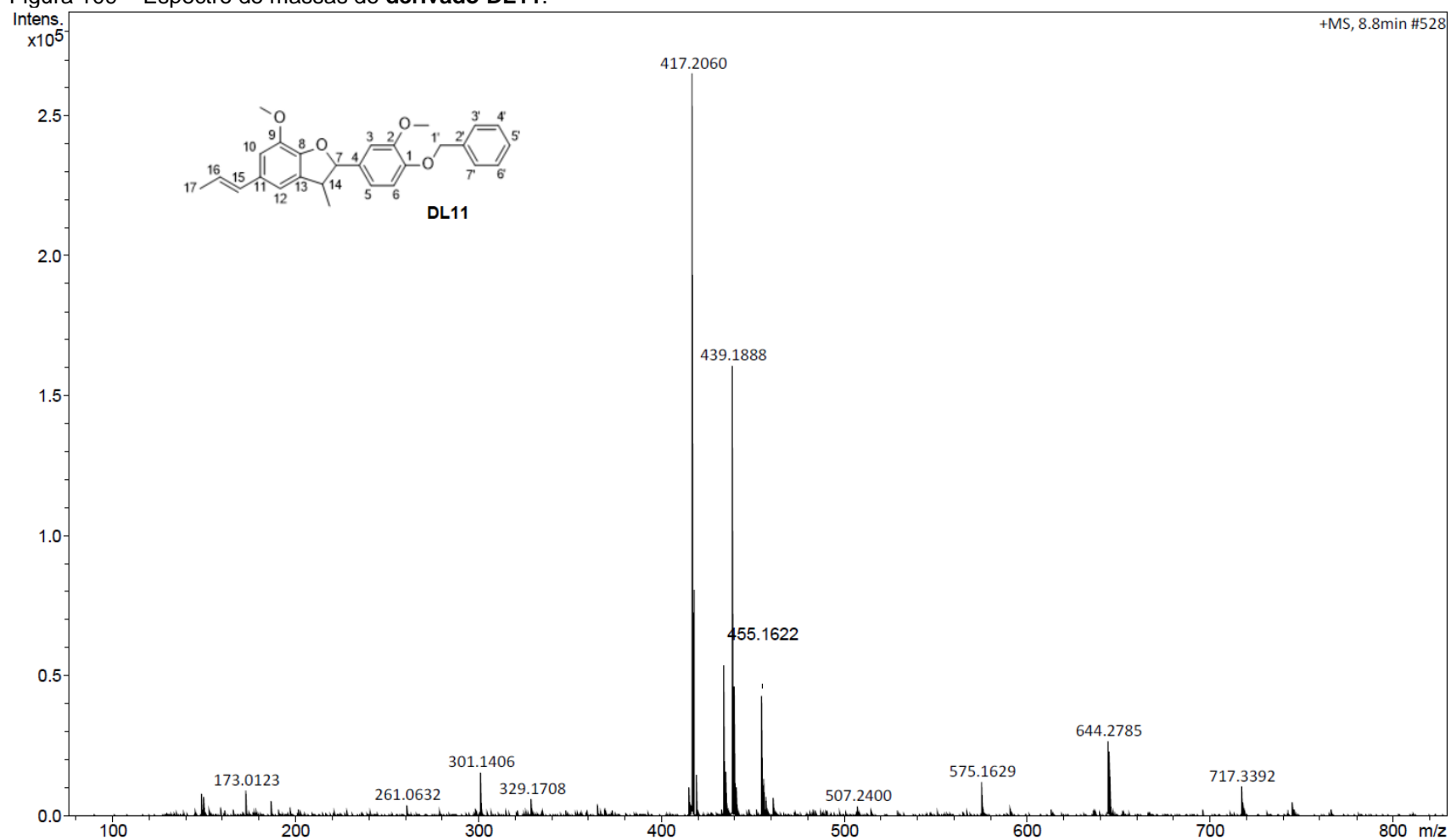
Figura 107 – Espectro de RMN de ^{13}C do derivado DL11 (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Da autora.

Figura 108 – Subespectro DEPT-135 do **derivado DL11** (CDCl₃, 75 MHz).

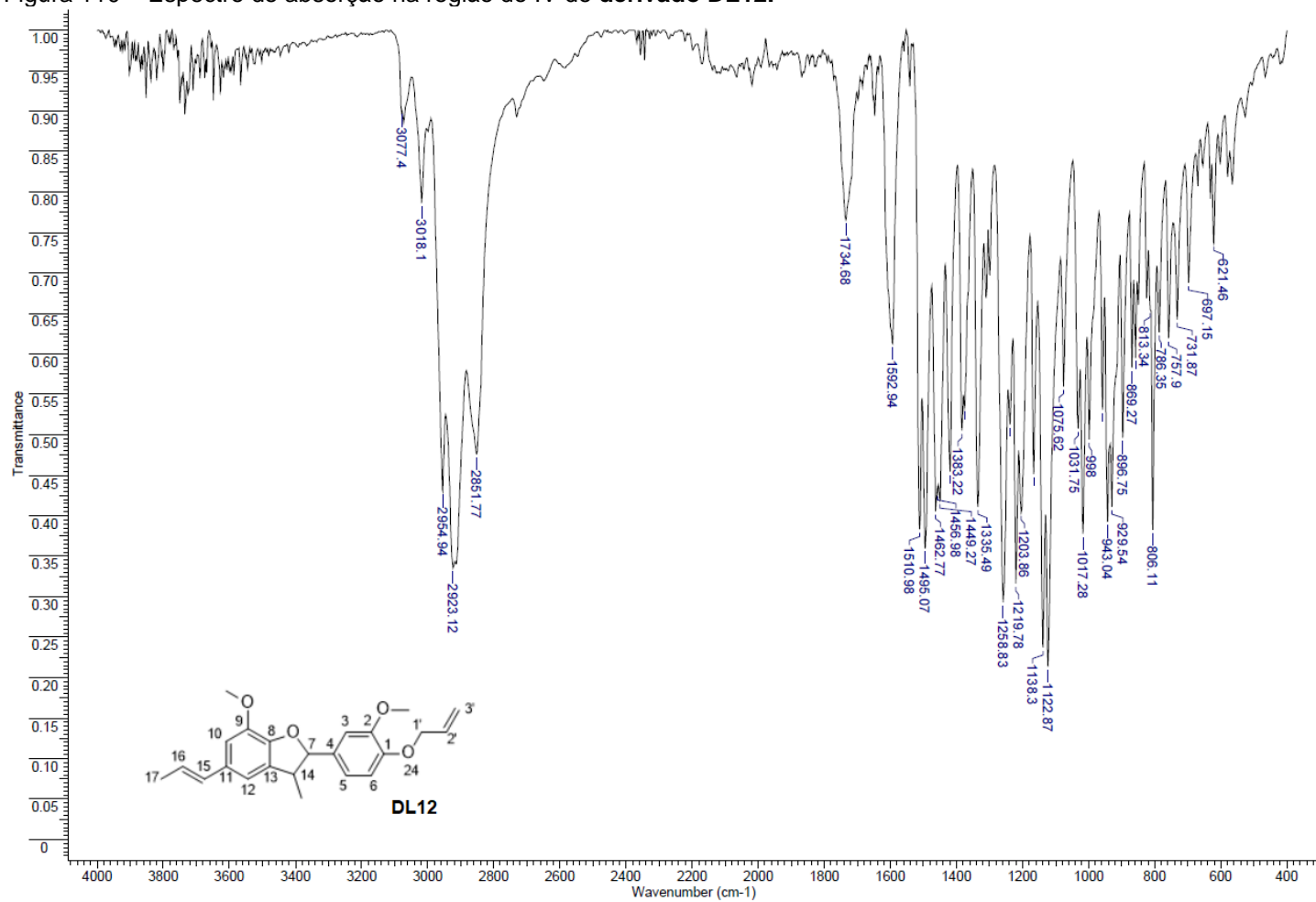
Fonte: Da autora.

Figura 109 – Espectro de massas do derivado DL11.



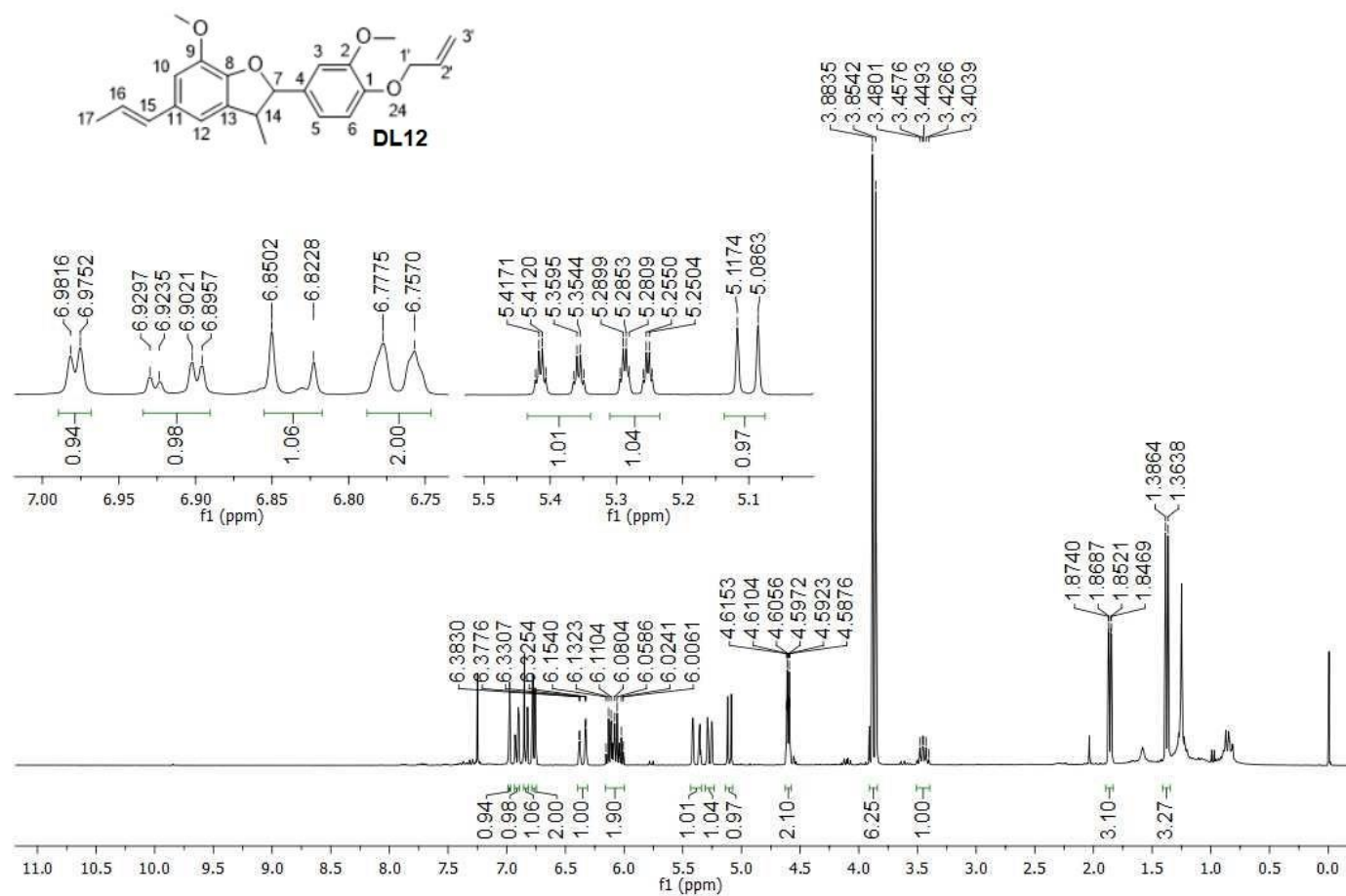
Fonte: Da autora.

Figura 110 – Espectro de absorção na região do IV do derivado DL12.

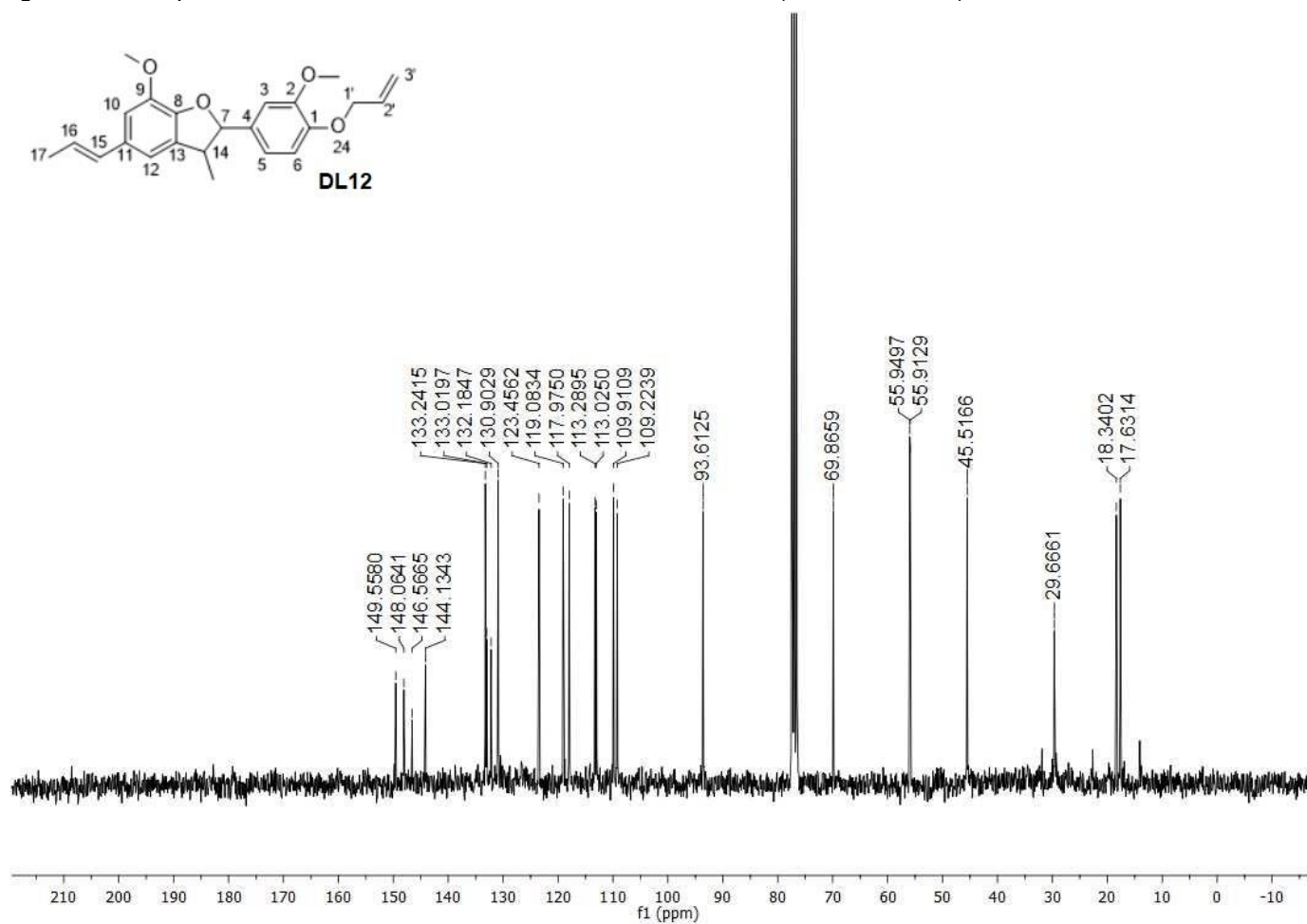


Fonte: Da autora.

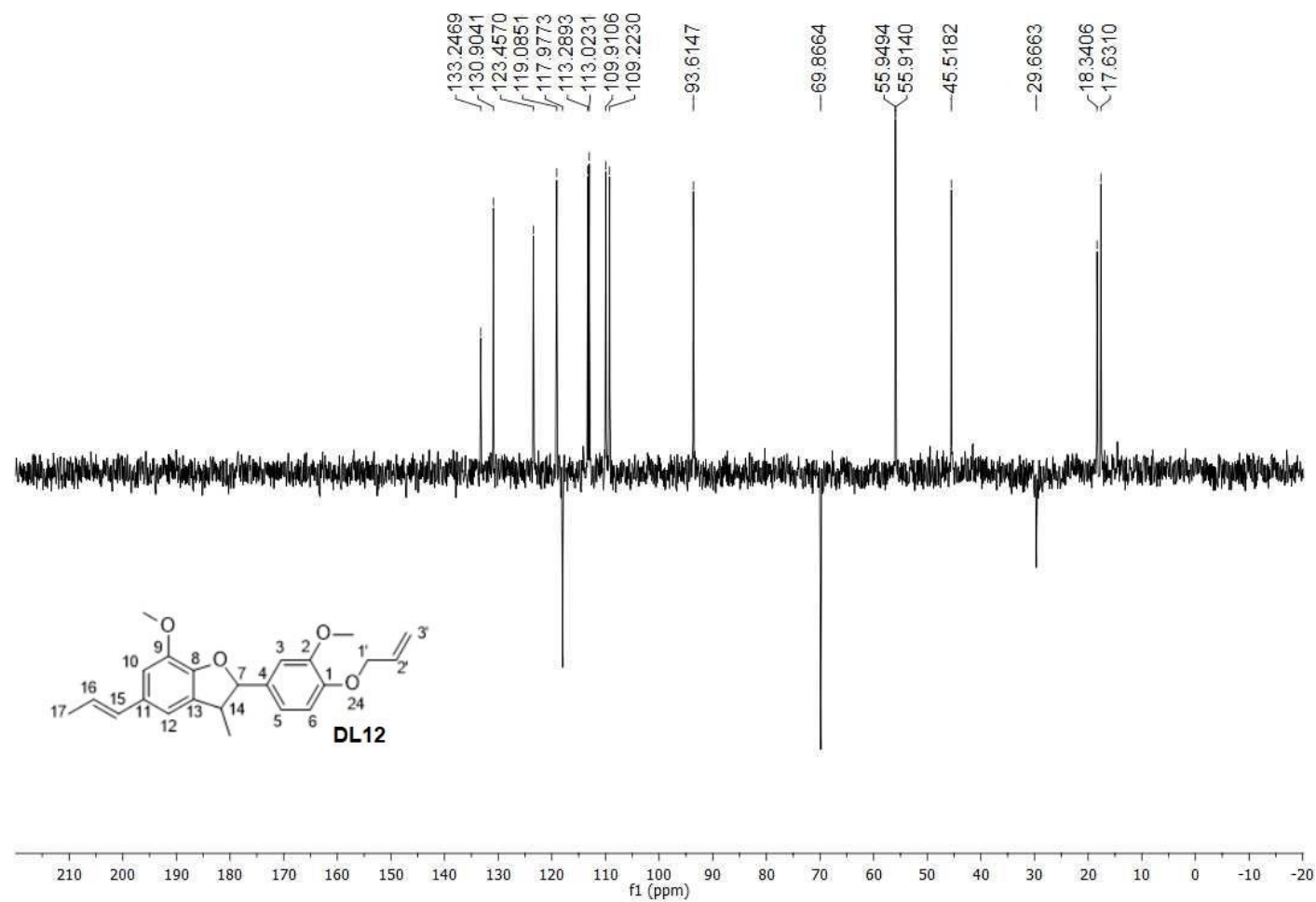
Figura 111 – Espectro de RMN de ^1H da substância derivado DL12 (CDCl_3 , 300 MHz).



Fonte: Da autora.

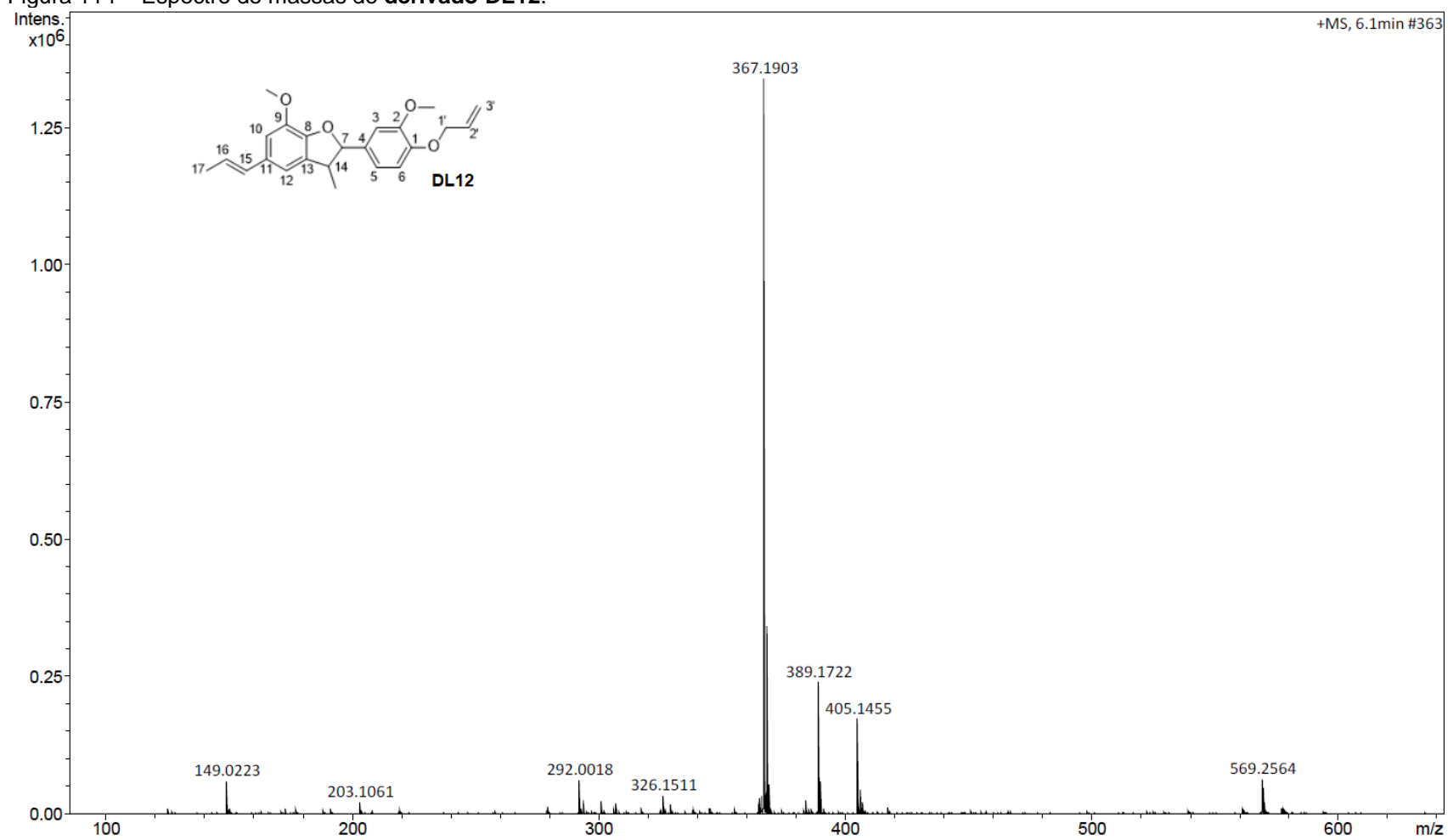
Figura 112 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância derivado **DL12** (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Da autora.

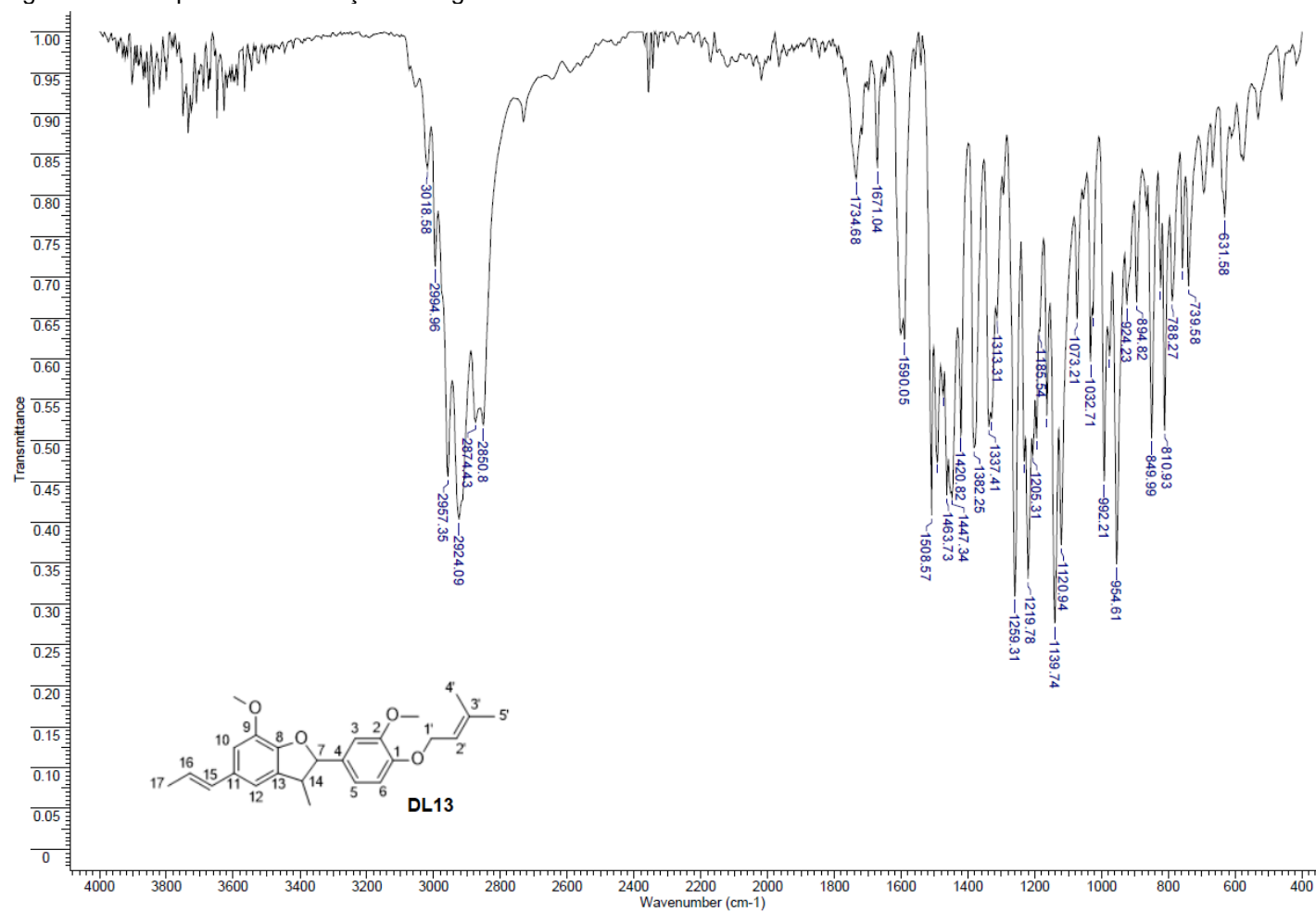
Figura 113 – Subespectro DEPT-135 da substância **derivado DL12** (CDCl₃, 75 MHz).

Fonte: Da autora.

Figura 114 – Espectro de massas do derivado DL12.

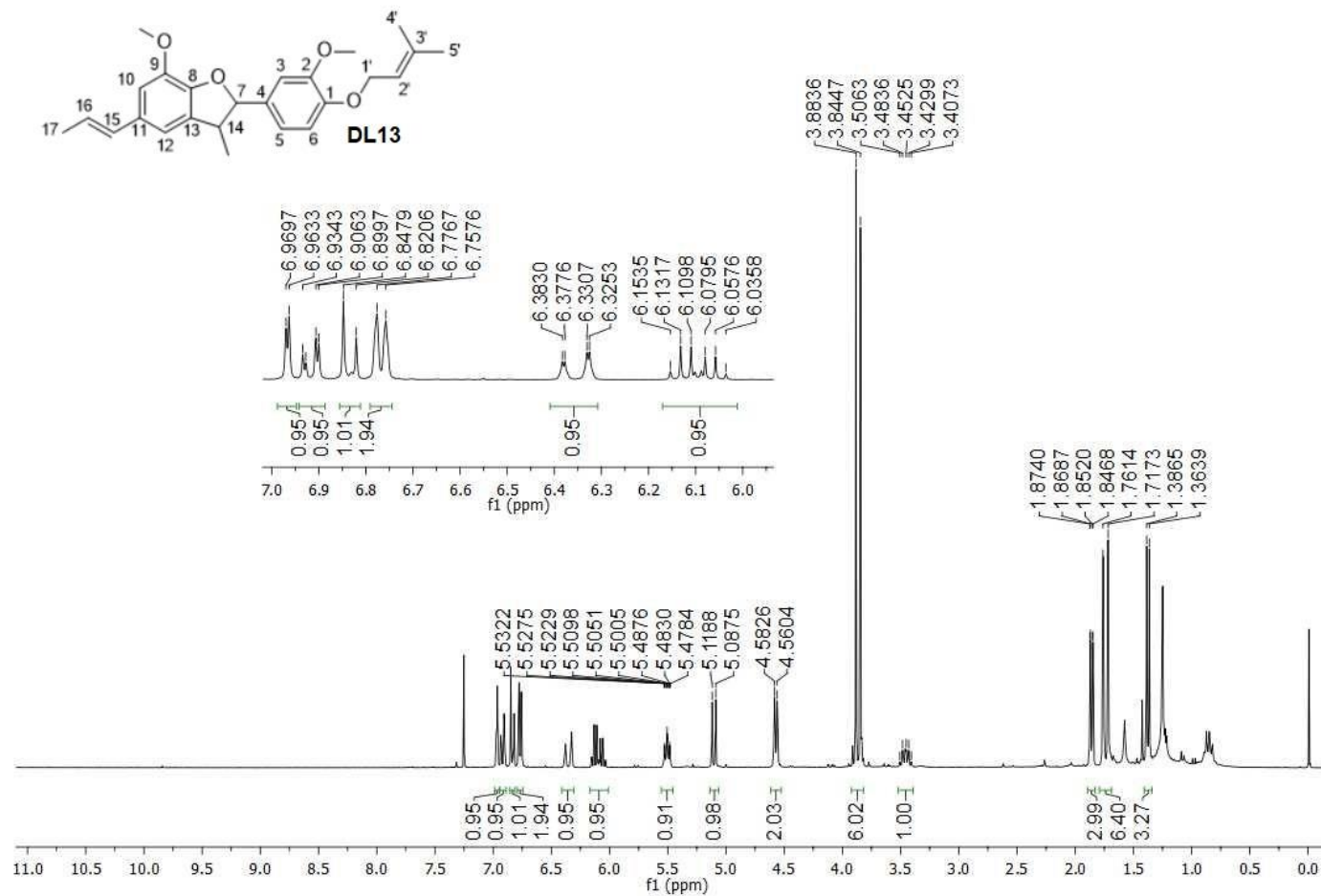


Fonte: Da autora.

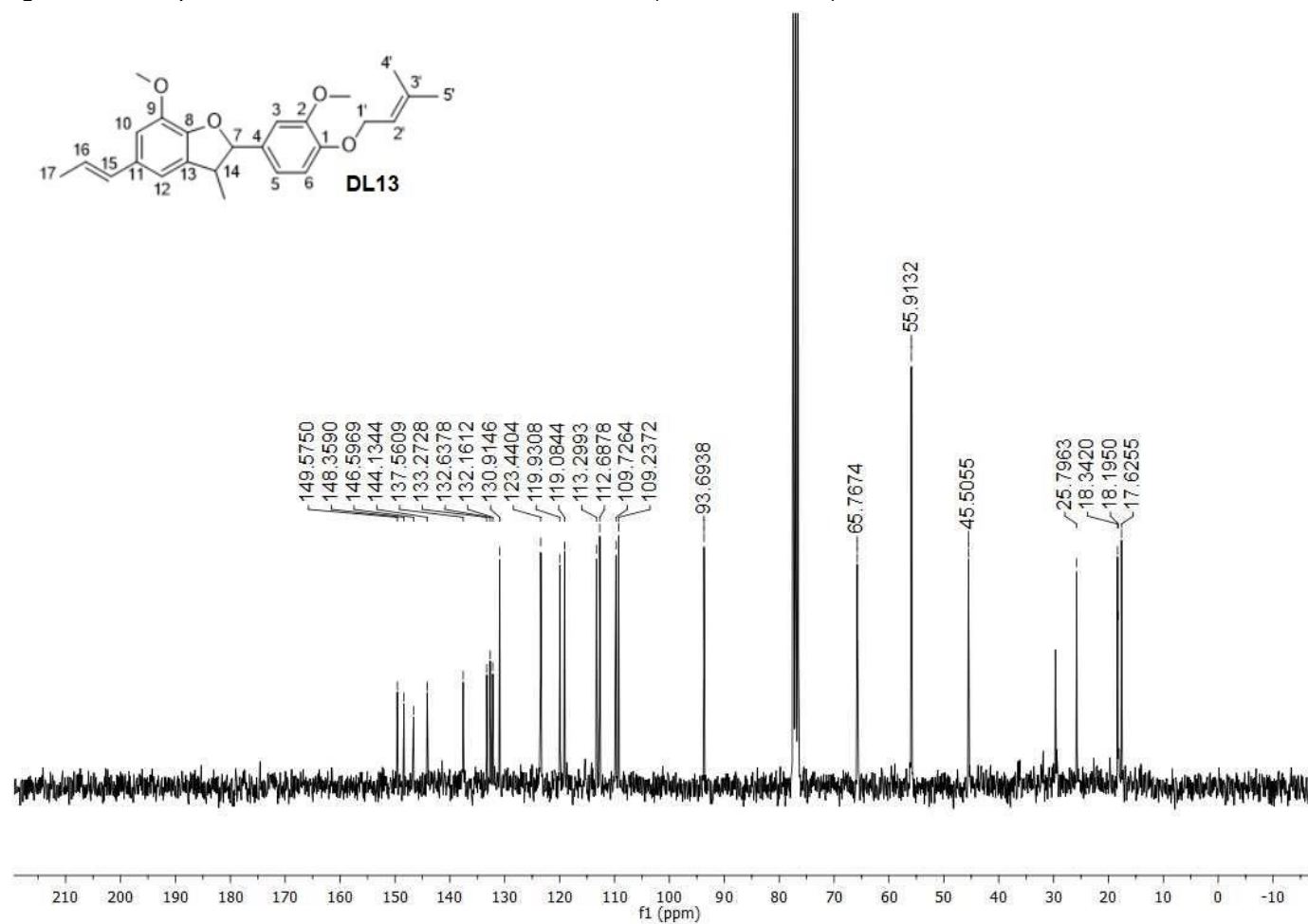
Figura 115 – Espectro de absorção na região do IV do **derivado DL13**.

Fonte: Da autora.

Figura 116 – Espectro de RMN de ^1H do derivado DL13 (CDCl_3 , 300 MHz).

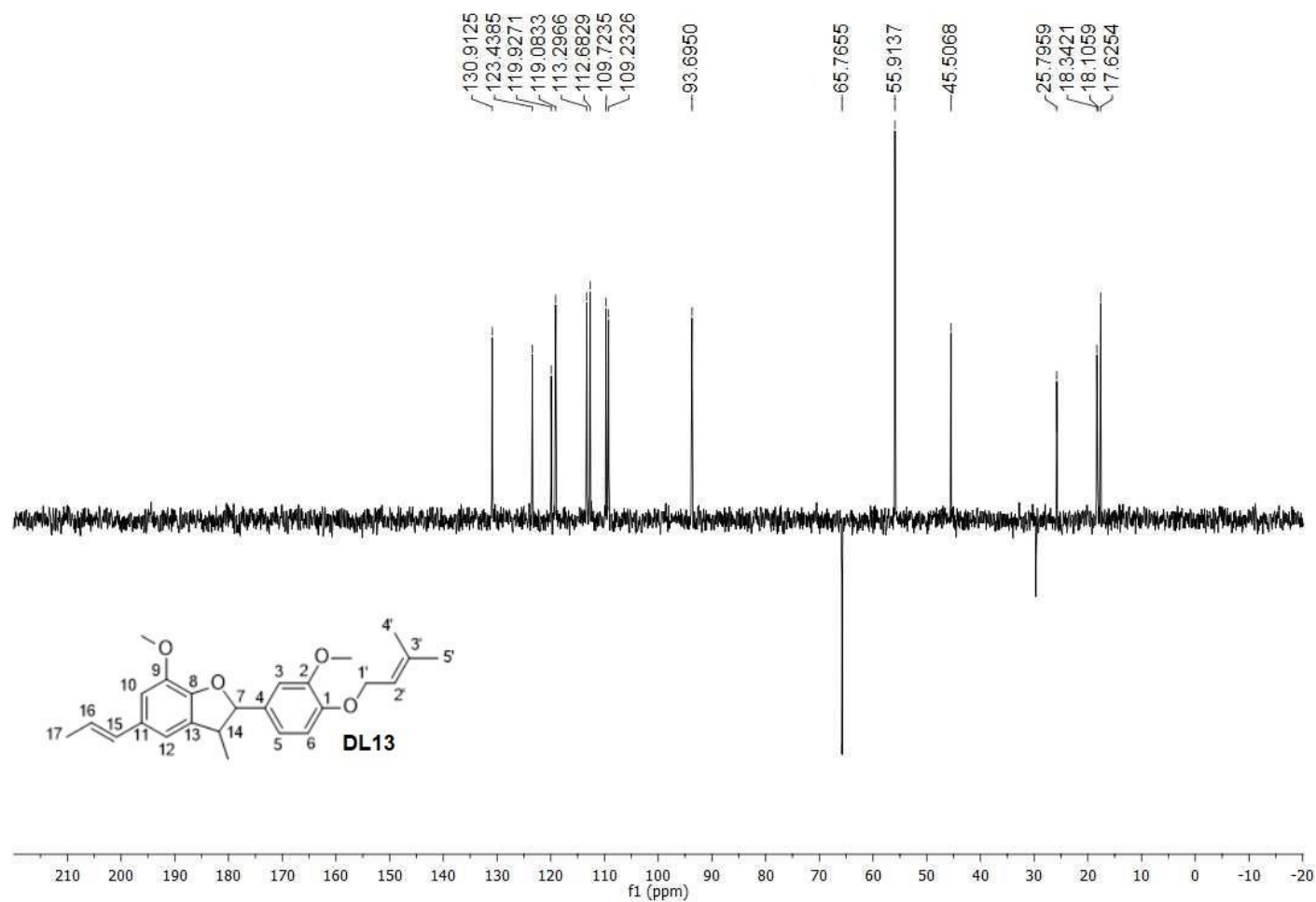


Fonte: Da autora.

Figura 117 – Espectro de RMN de ^{13}C do derivado DL13 (CDCl_3 , 75 MHz).

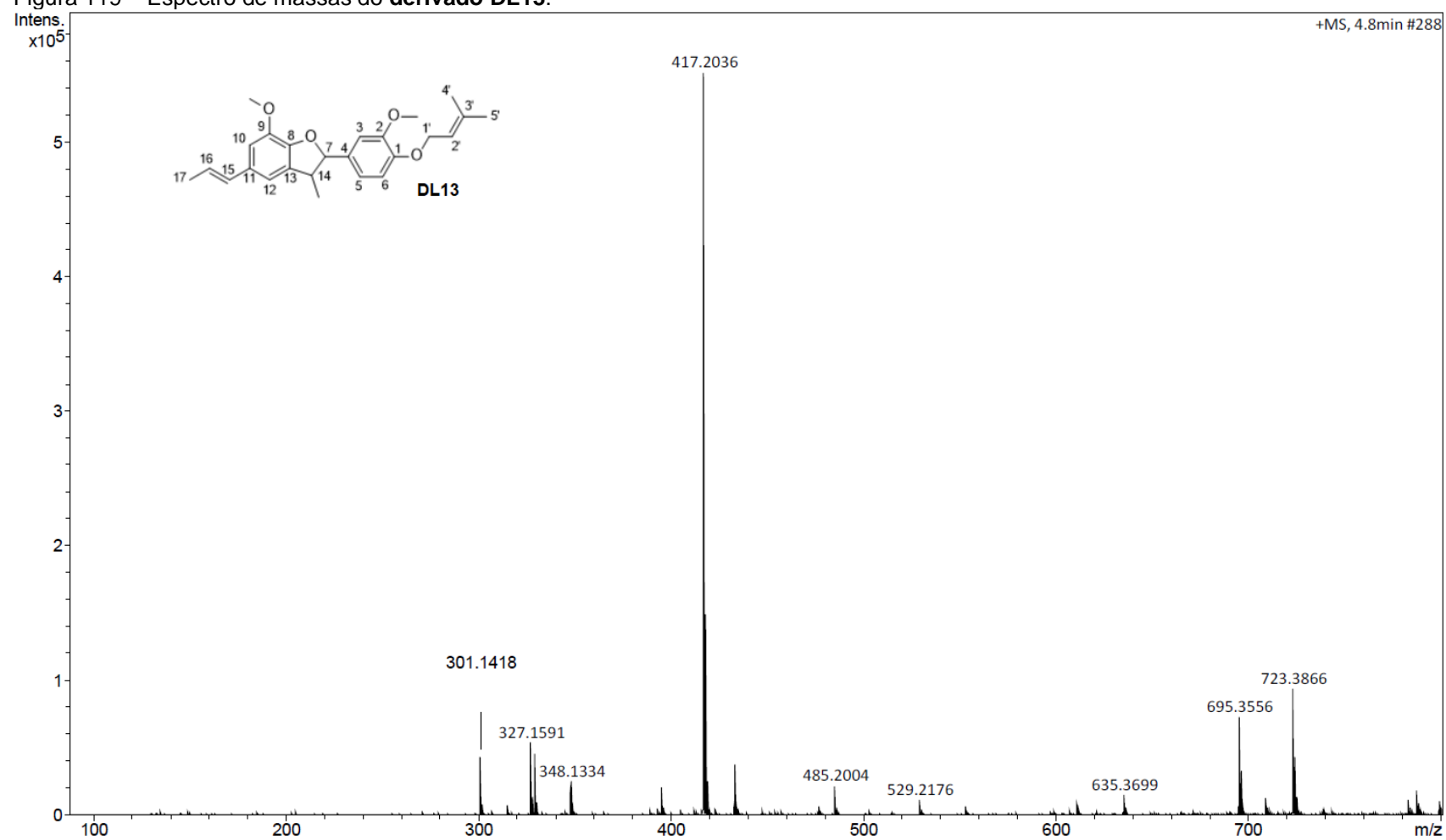
Fonte: Da autora.

Figura 118 – Subespectro DEPT-135 do **derivado DL13** (CDCl₃, 75 MHz).

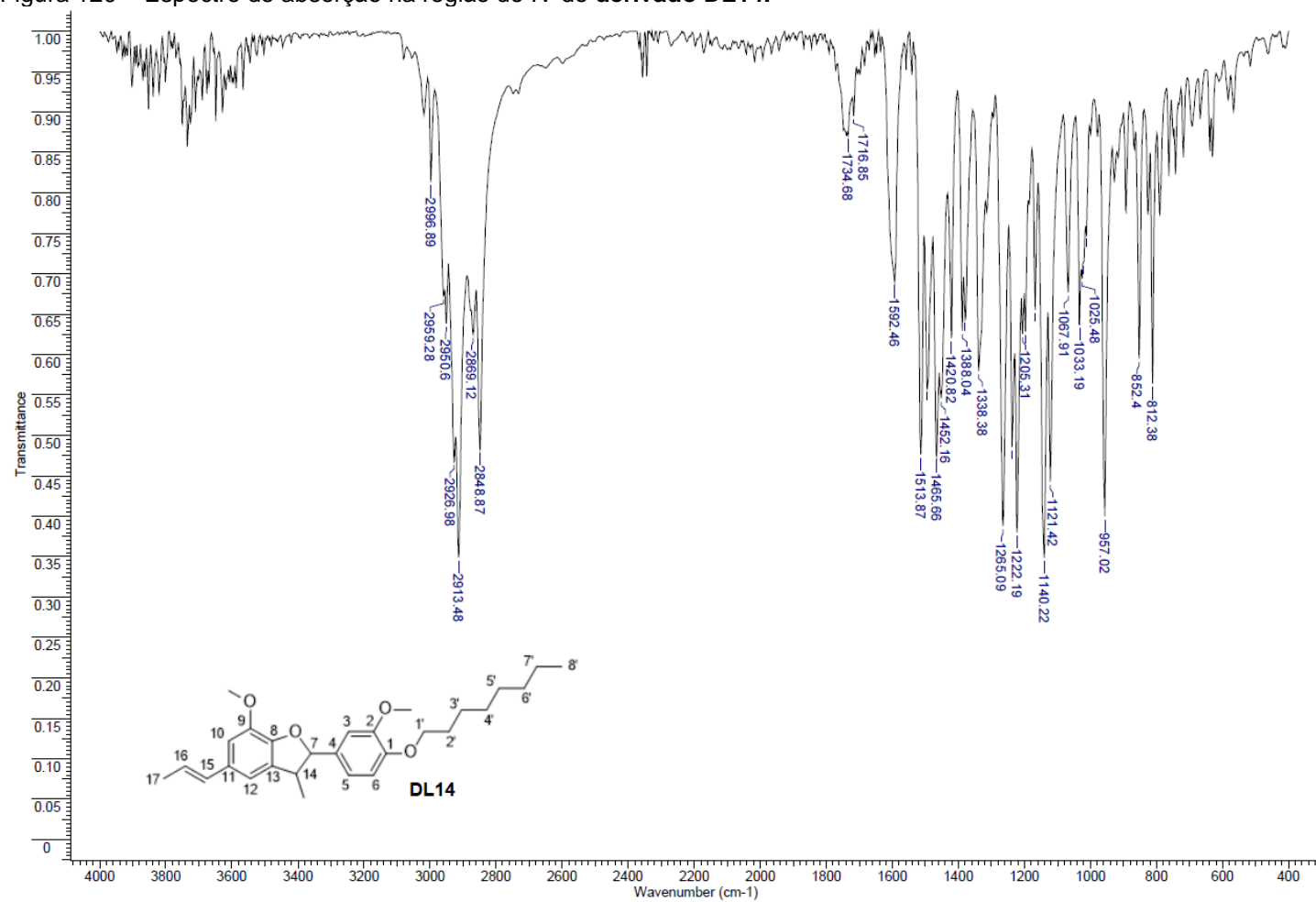


Fonte: Da autora.

Figura 119 – Espectro de massas do derivado DL13.

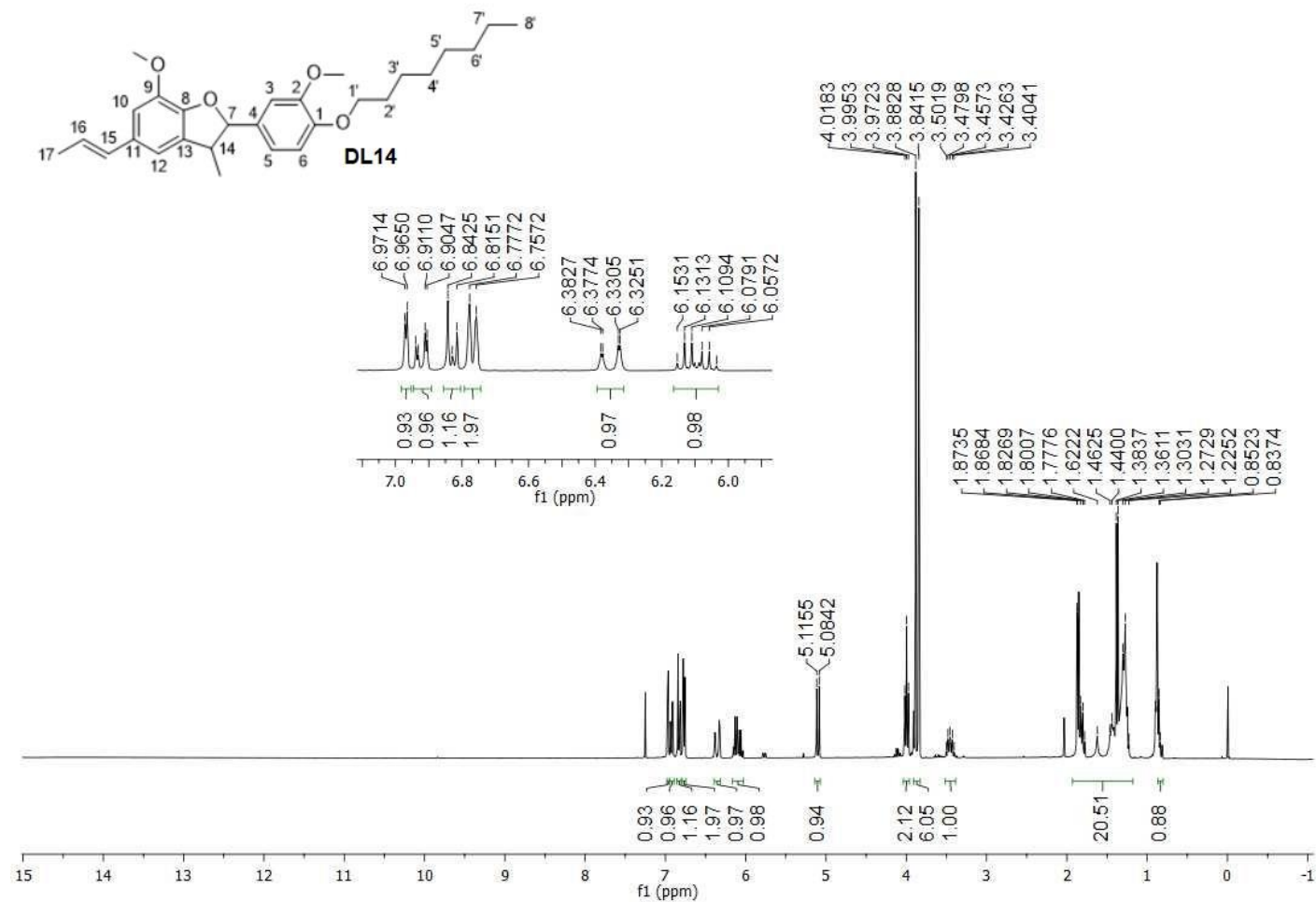


Fonte: Da autora.

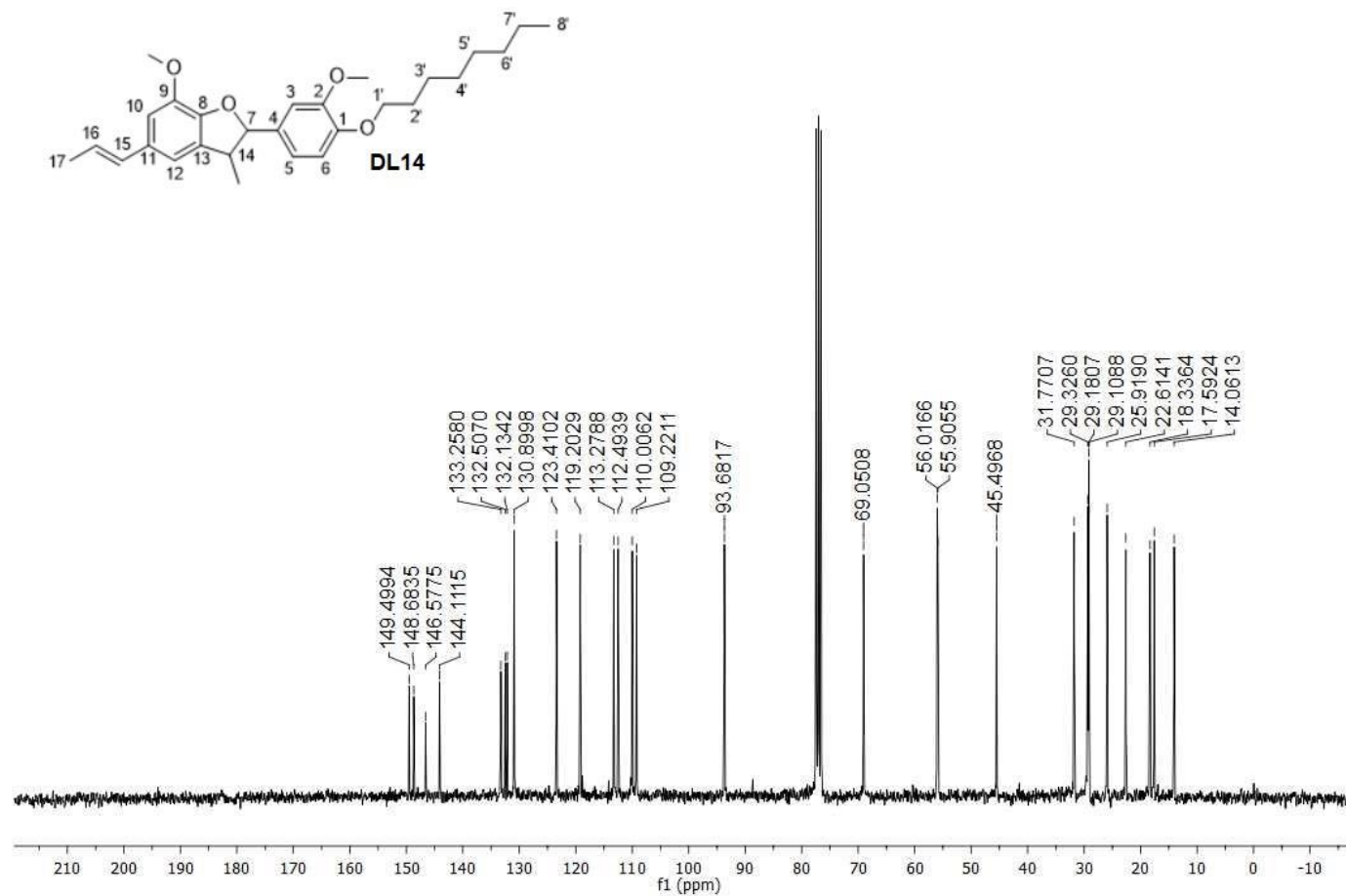
Figura 120 – Espectro de absorção na região do IV do **derivado DL14**.

Fonte: Da autora.

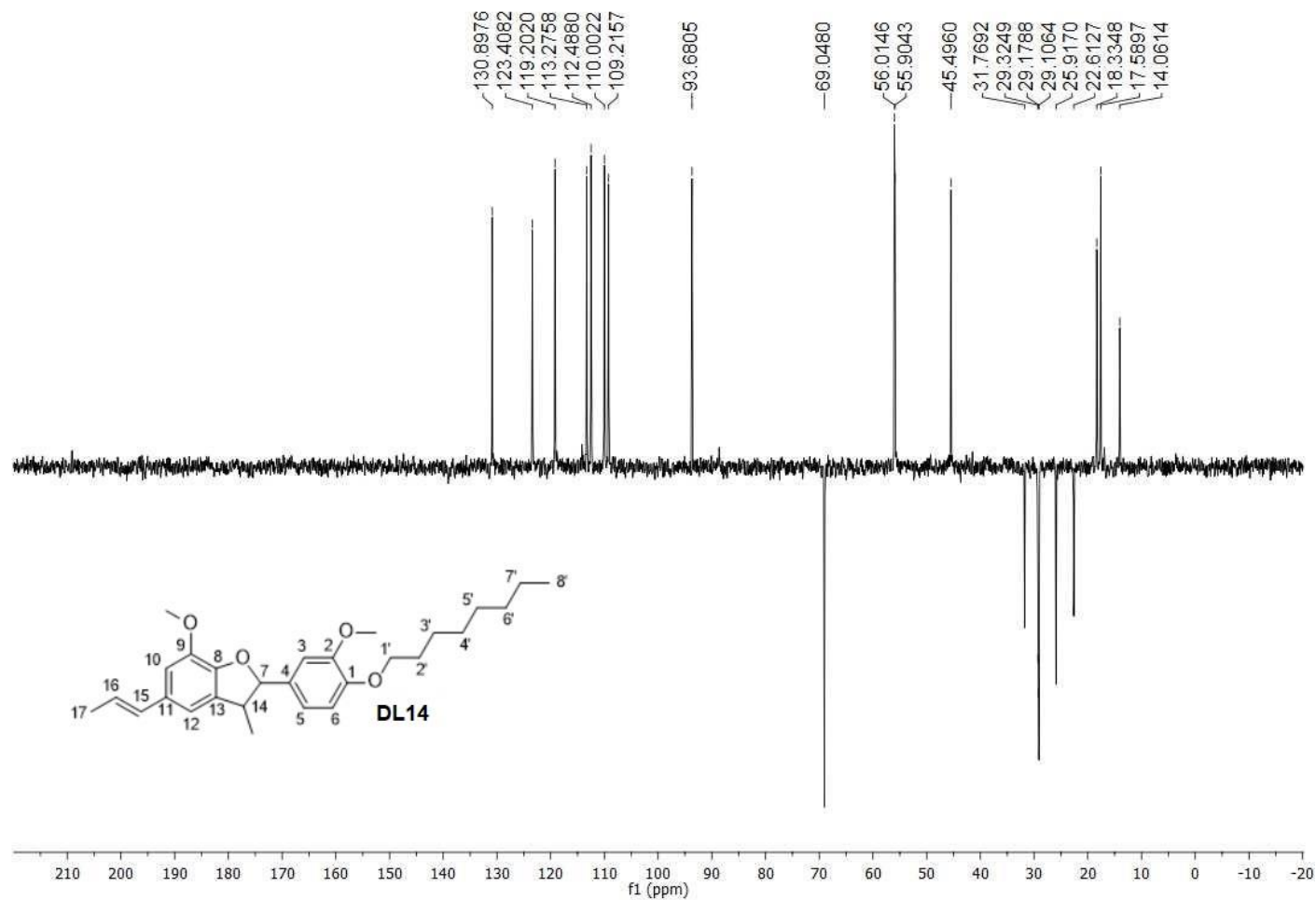
Figura 121 – Espectro de RMN de ^1H da substância derivado DL14 (CDCl_3 , 300 MHz).



Fonte: Da autora.

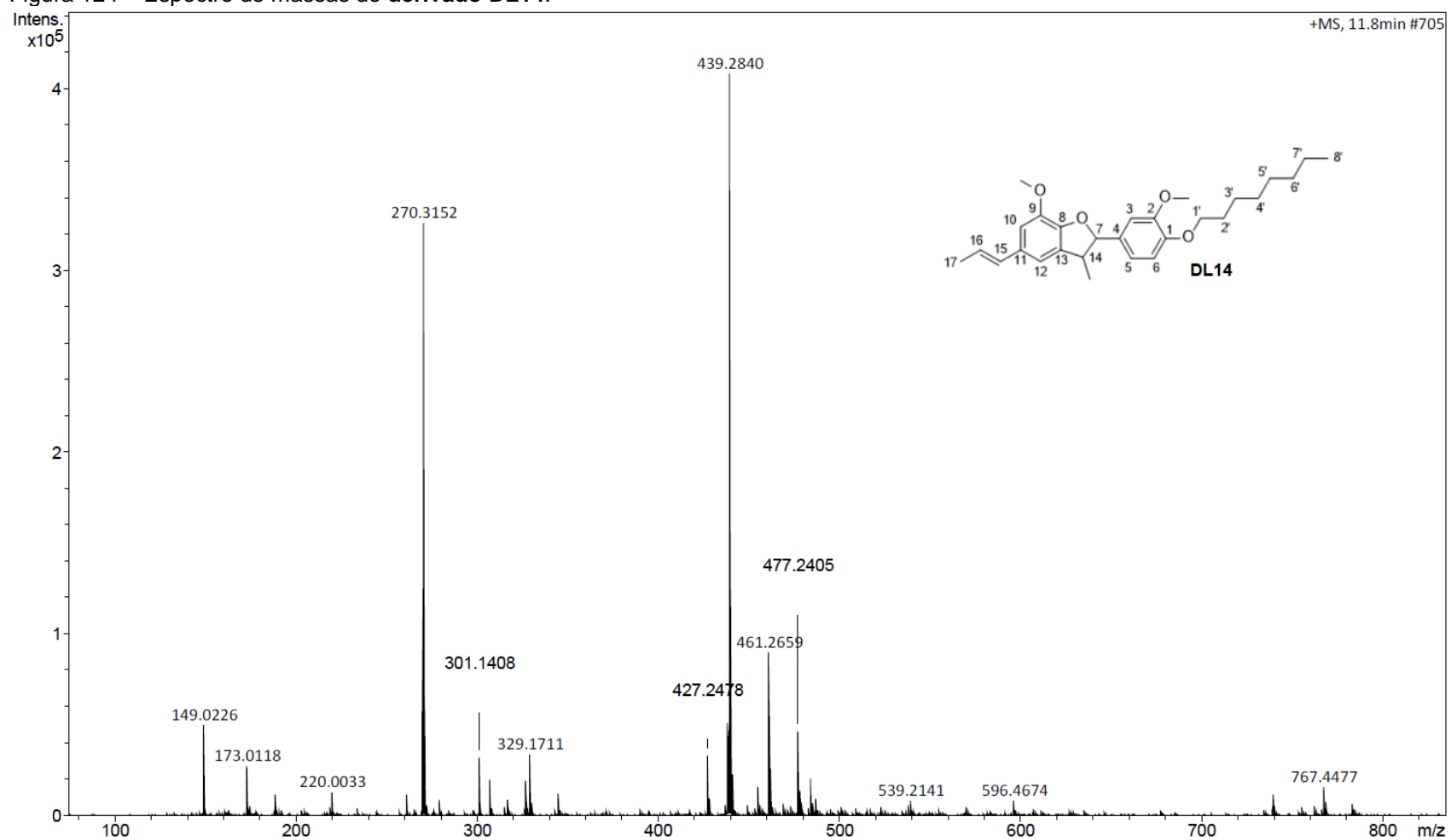
Figura 122 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância derivado DL14 (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Da autora.

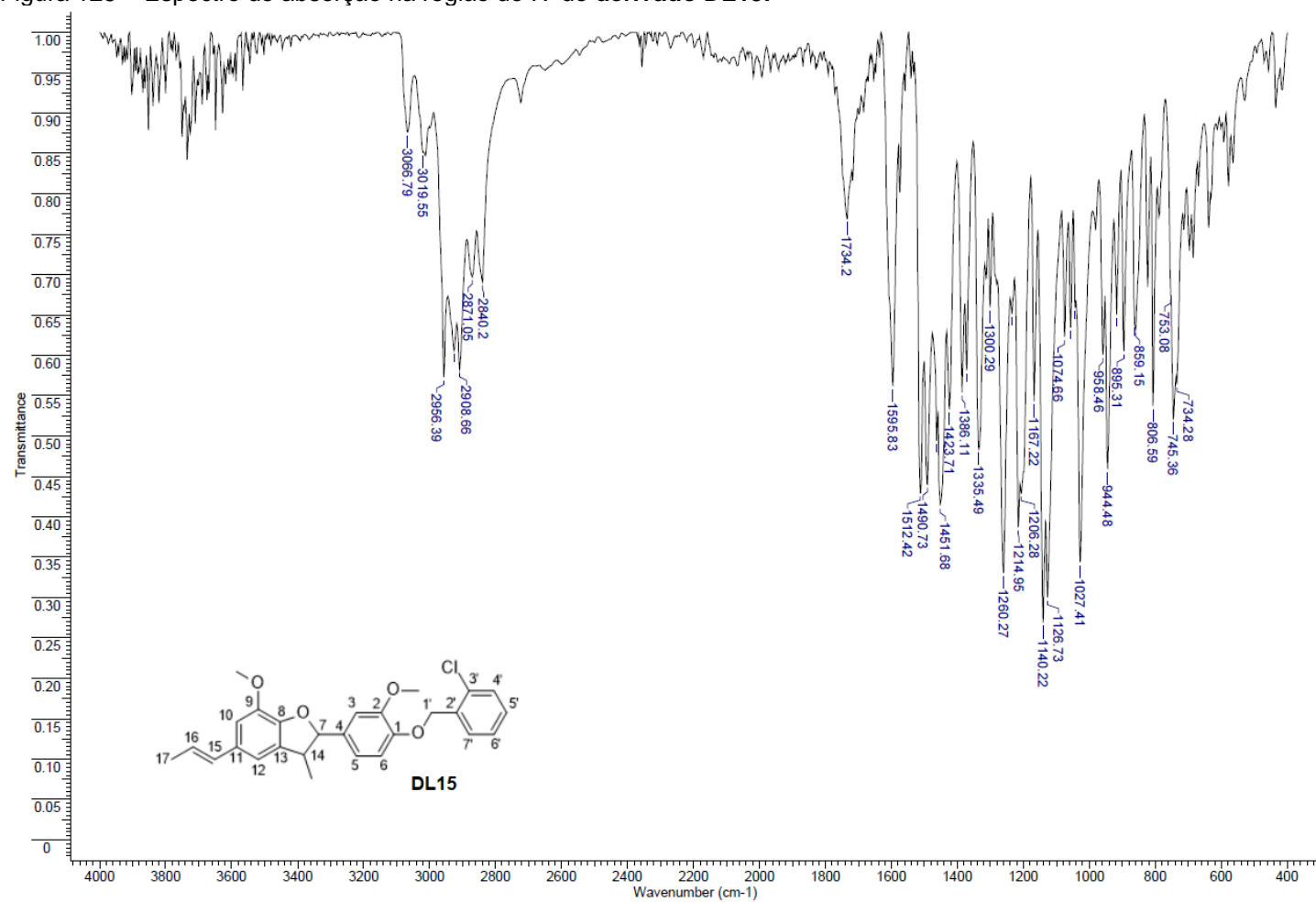
Figura 123 – Subespectro DEPT-135 da substância **derivado DL14** (CDCl₃, 75 MHz).

Fonte: Da autora.

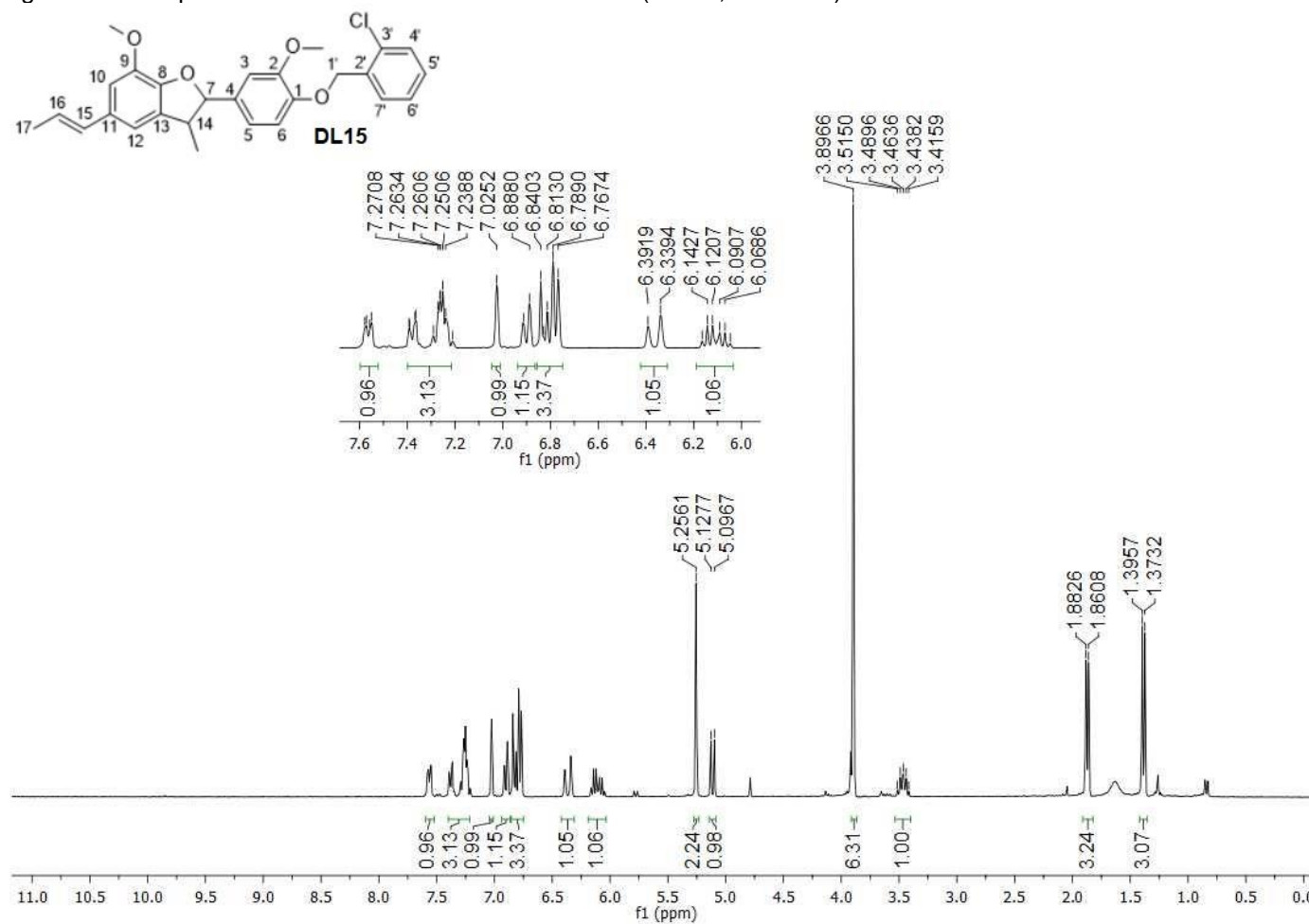
Figura 124 – Espectro de massas do derivado DL14.



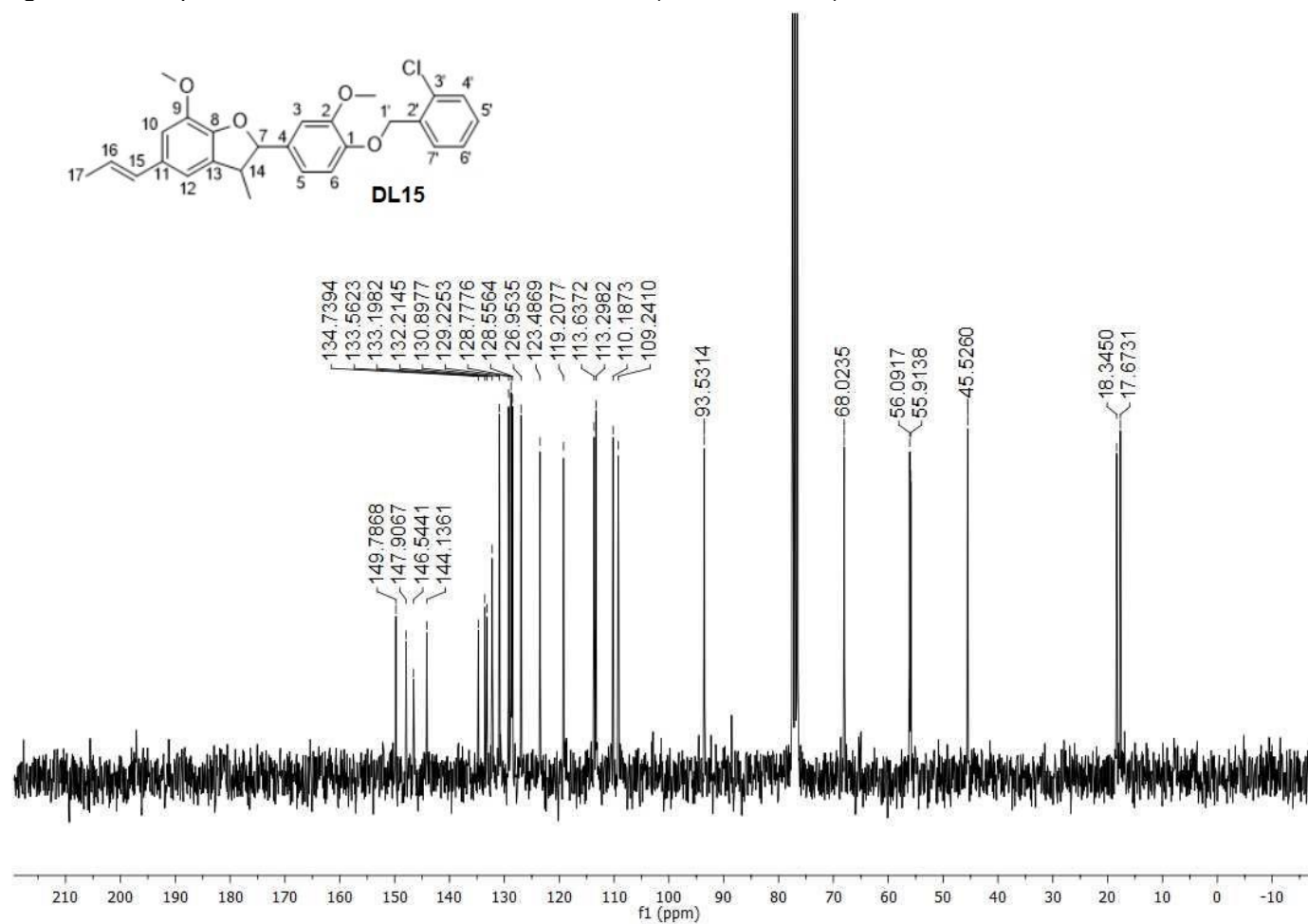
Fonte: Da autora.

Figura 125 – Espectro de absorção na região do IV do **derivado DL15**.

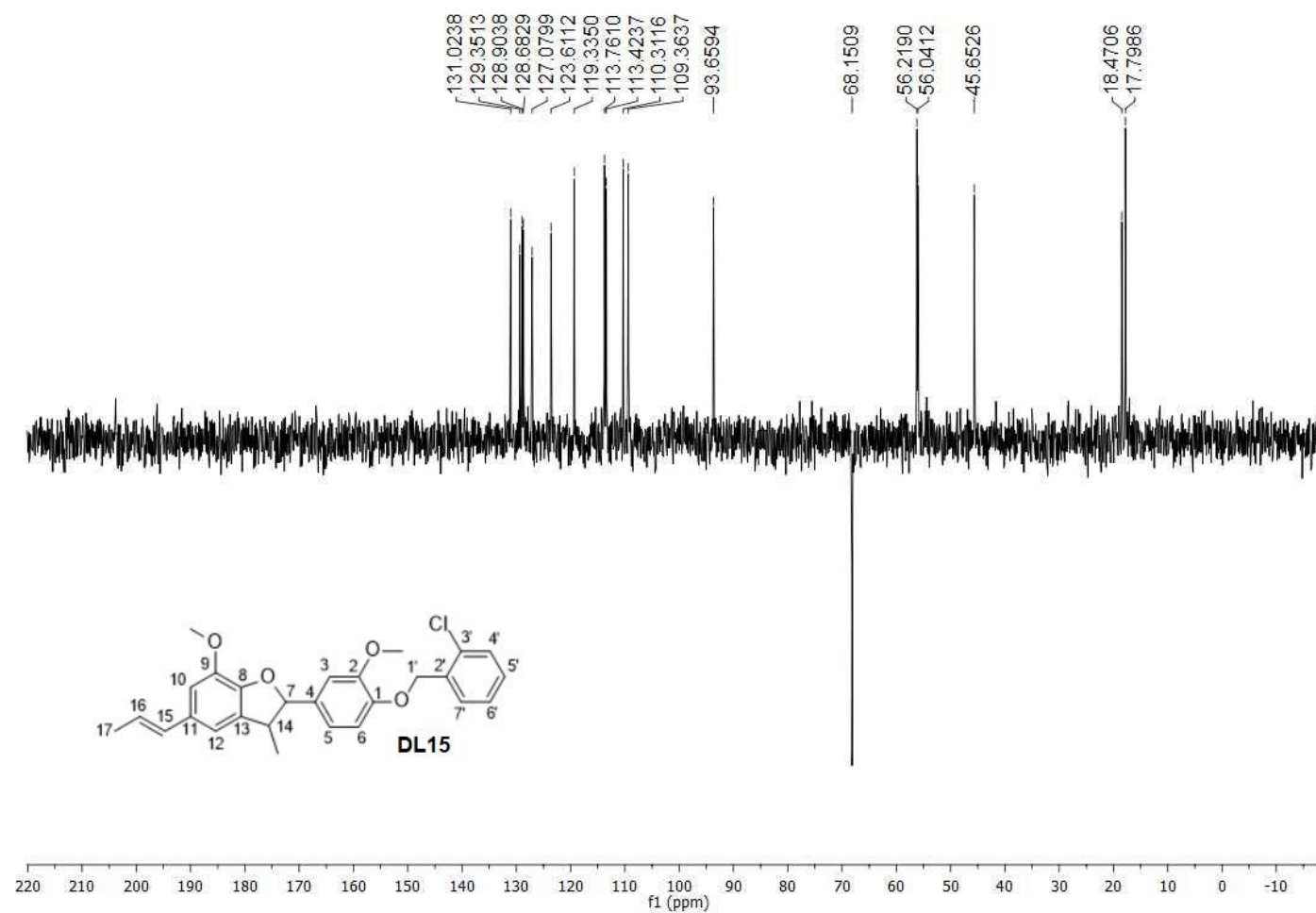
Fonte: Da autora.

Figura 126 – Espectro de RMN de ^1H do derivado DL15 (CDCl_3 , 300 MHz).

Fonte: Da autora.

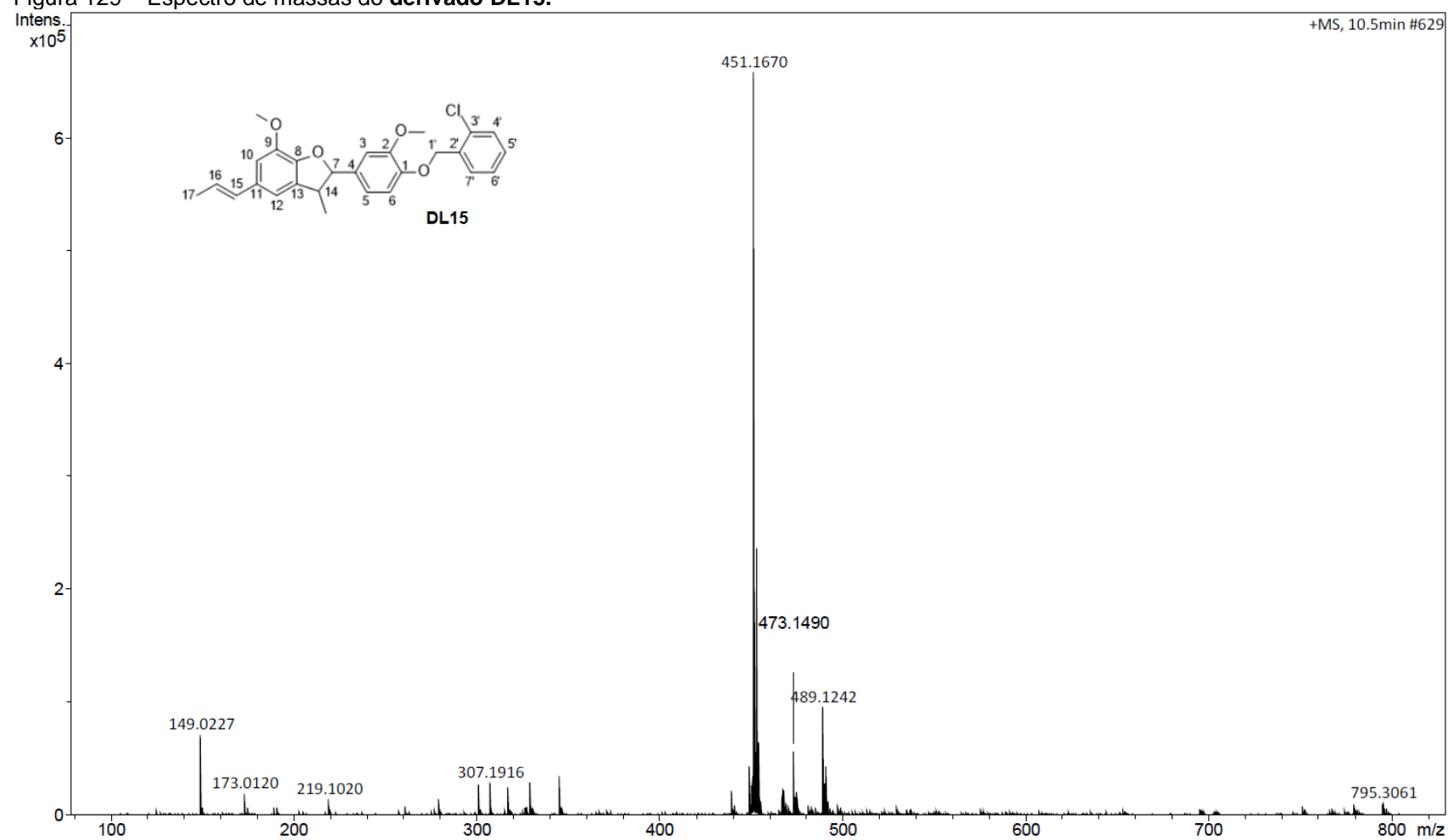
Figura 127 – Espectro de RMN de ^{13}C do derivado DL15 (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Da autora.

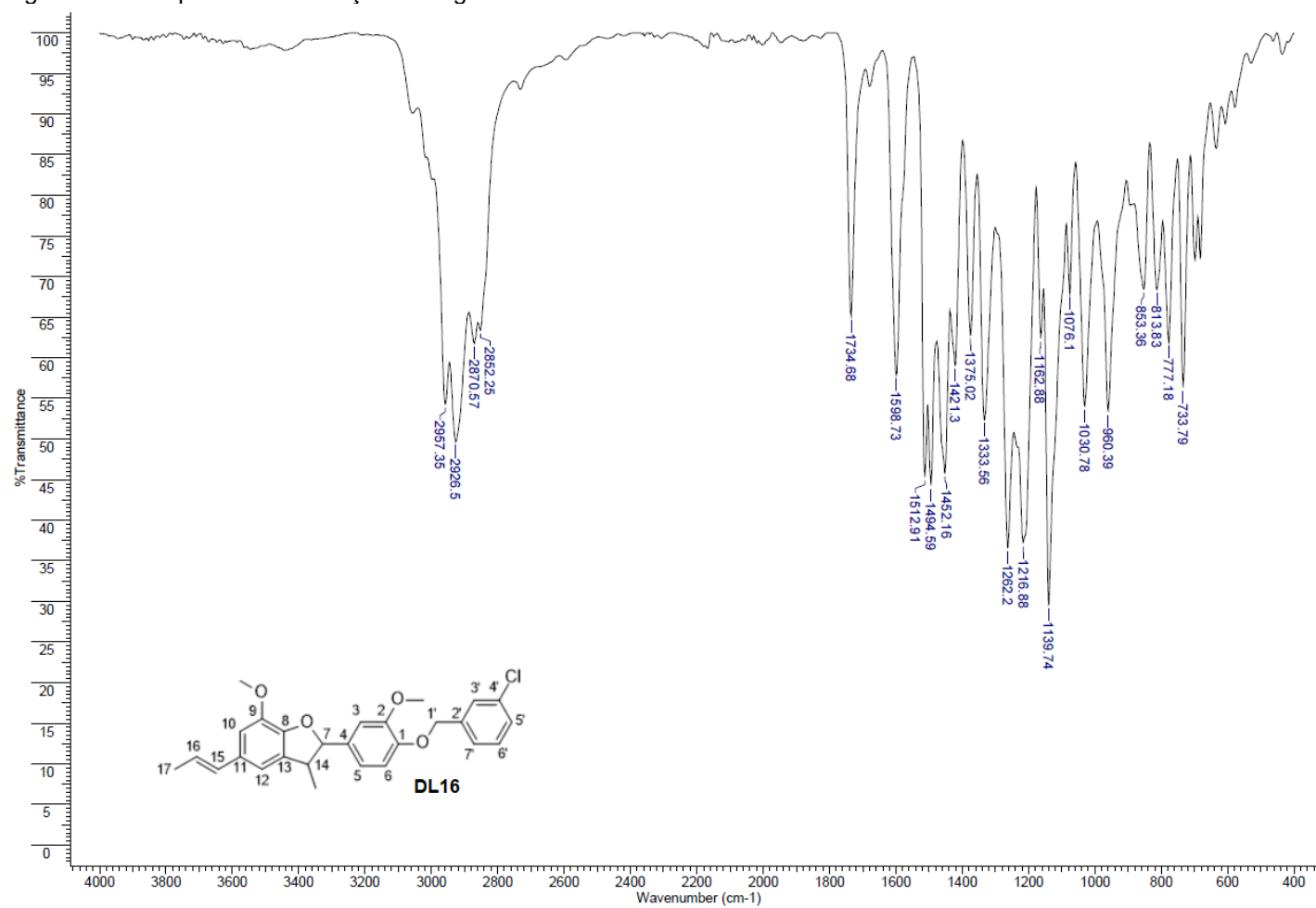
Figura 128 – Subespectro DEPT-135 do **derivado DL15** (CDCl₃, 75 MHz).

Fonte: Da autora.

Figura 129 – Espectro de massas do derivado DL15.

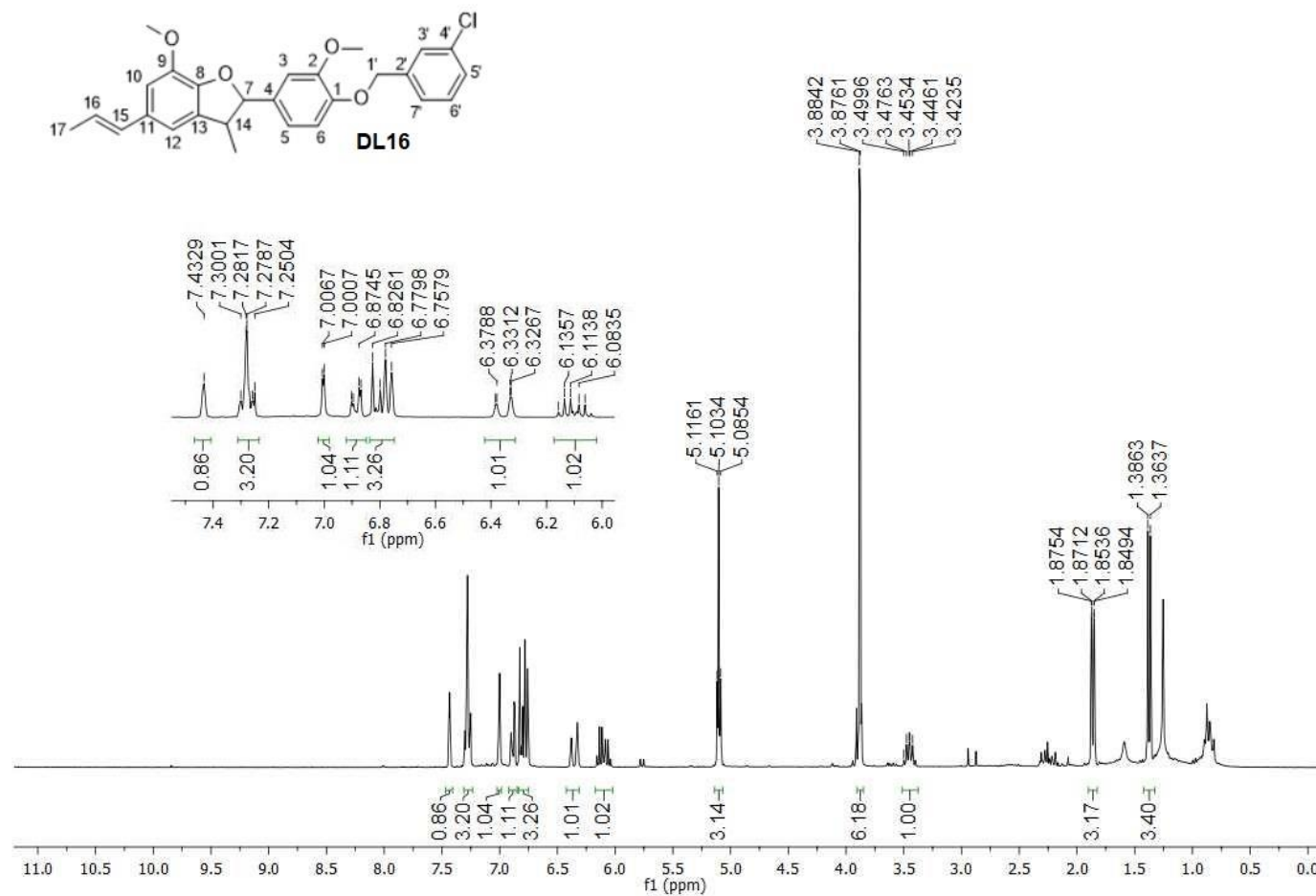


Fonte: Da autora.

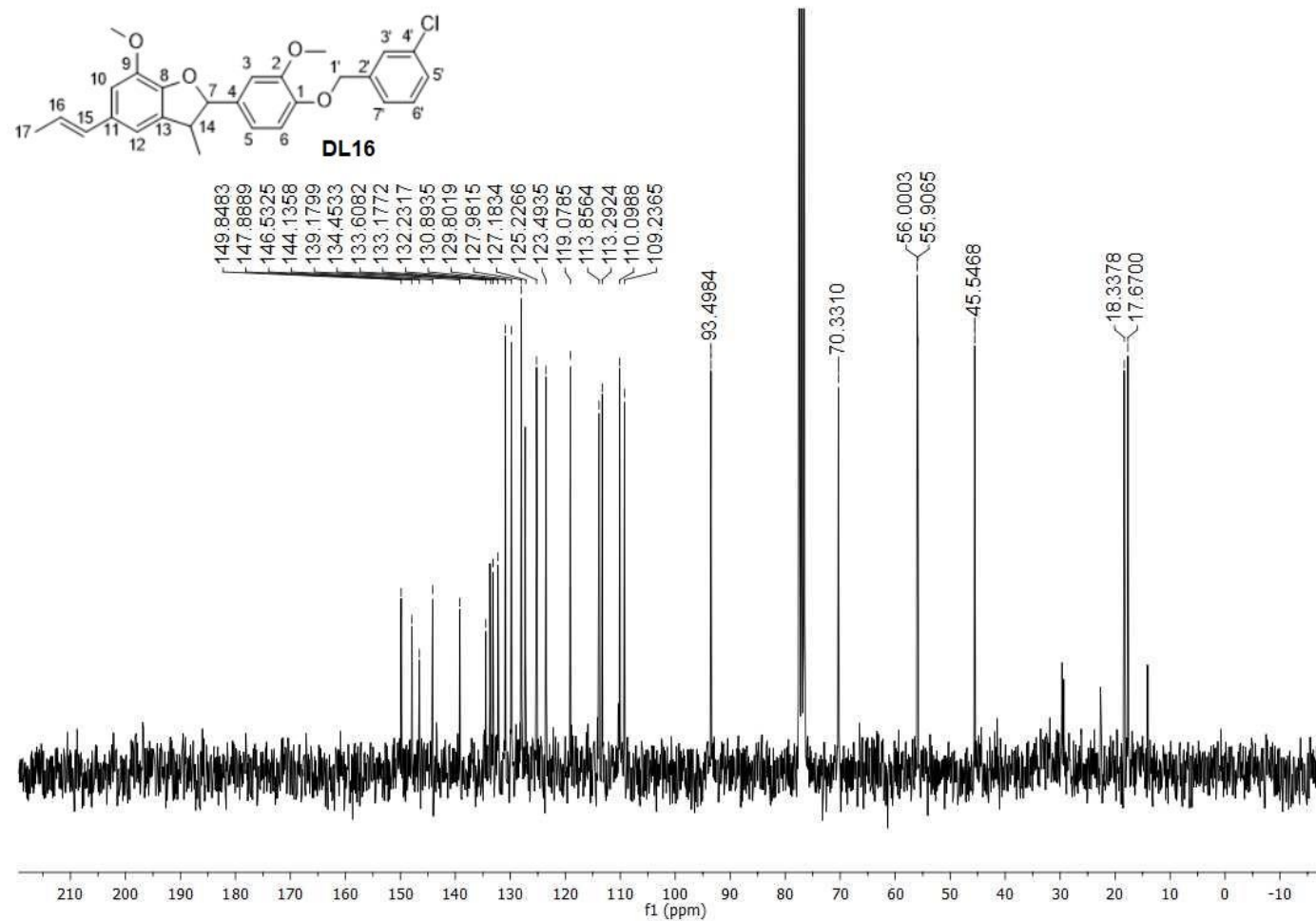
Figura 130 – Espectro de absorção na região do IV do **derivado DL16**.

Fonte: Da autora.

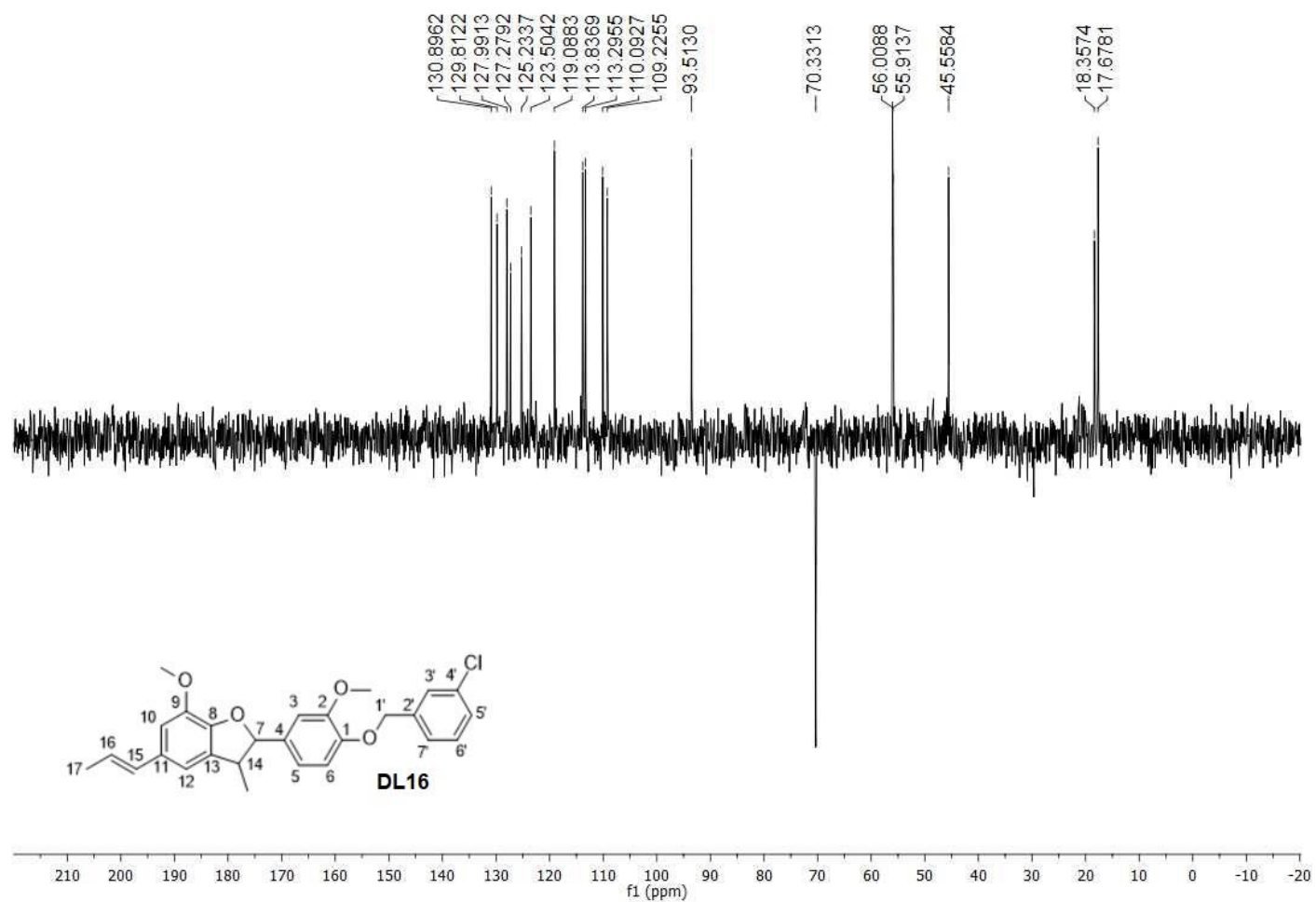
Figura 131 – Espectro de RMN de ^1H do derivado DL16 (CDCl_3 , 300 MHz).



Fonte: Da autora.

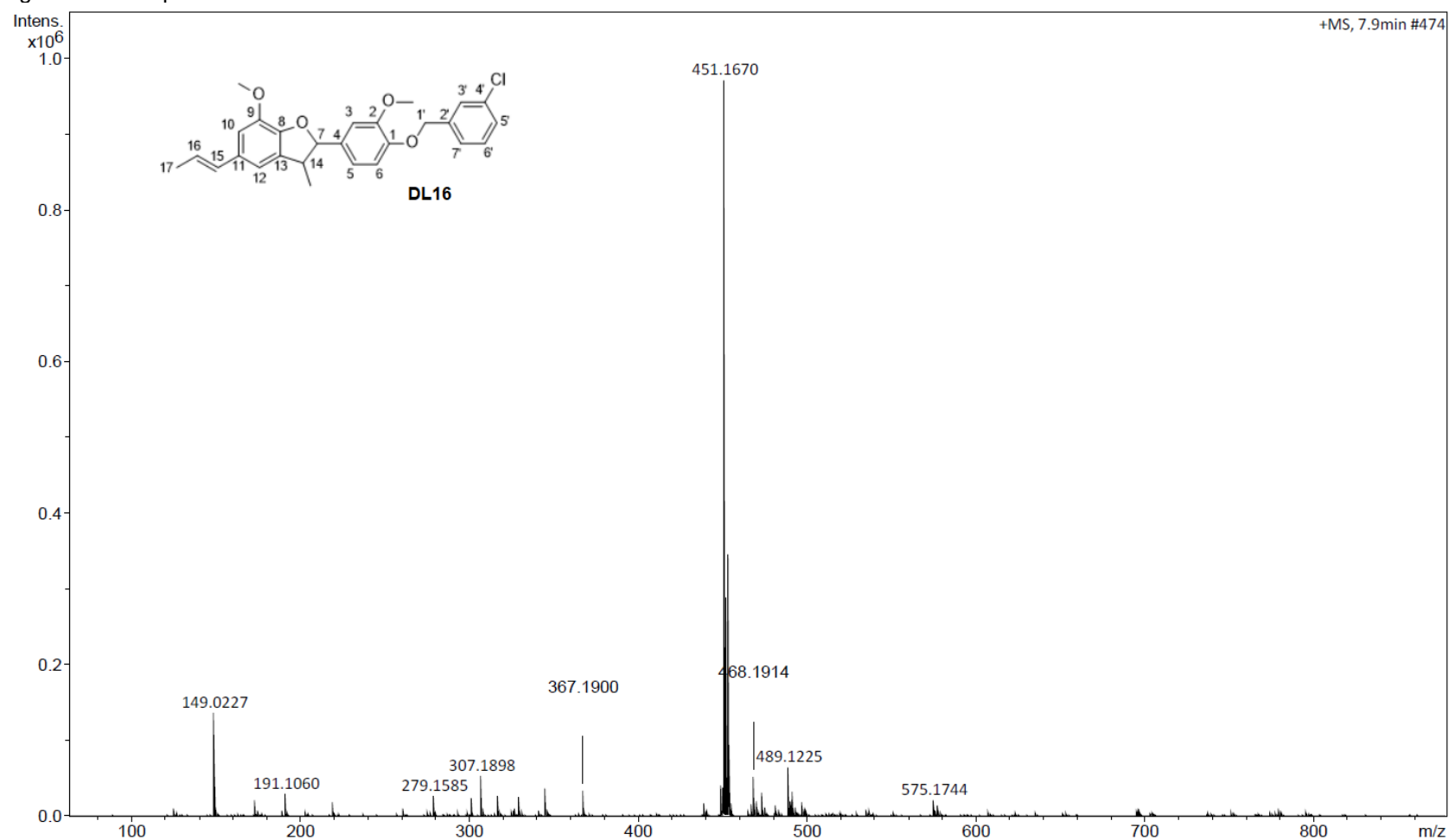
Figura 132 – Espectro de RMN de ^{13}C do derivado DL16 (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Da autora.

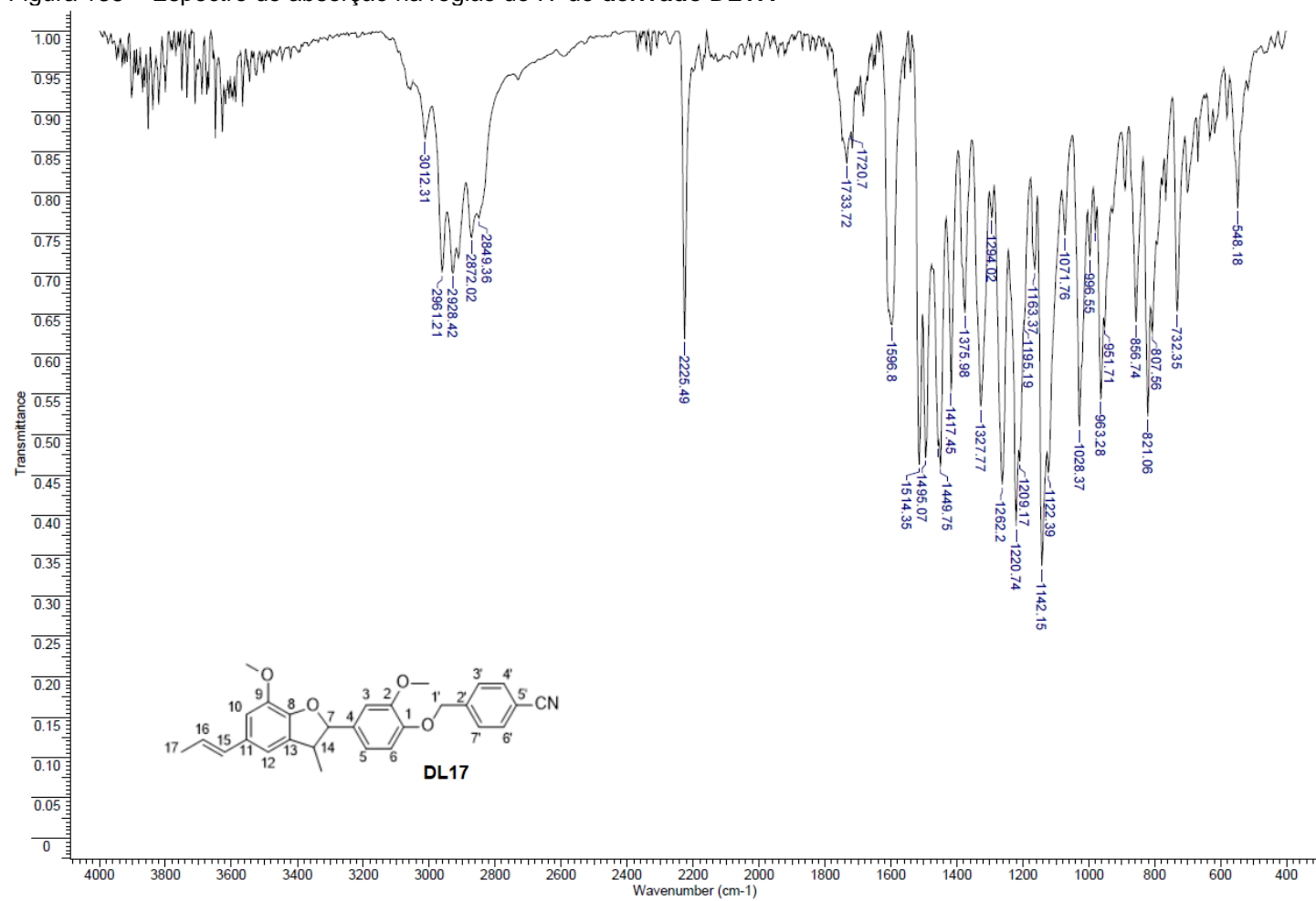
Figura 133 – Subespectro DEPT-135 do **derivado DL16** (CDCl₃, 75 MHz).

Fonte: Da autora.

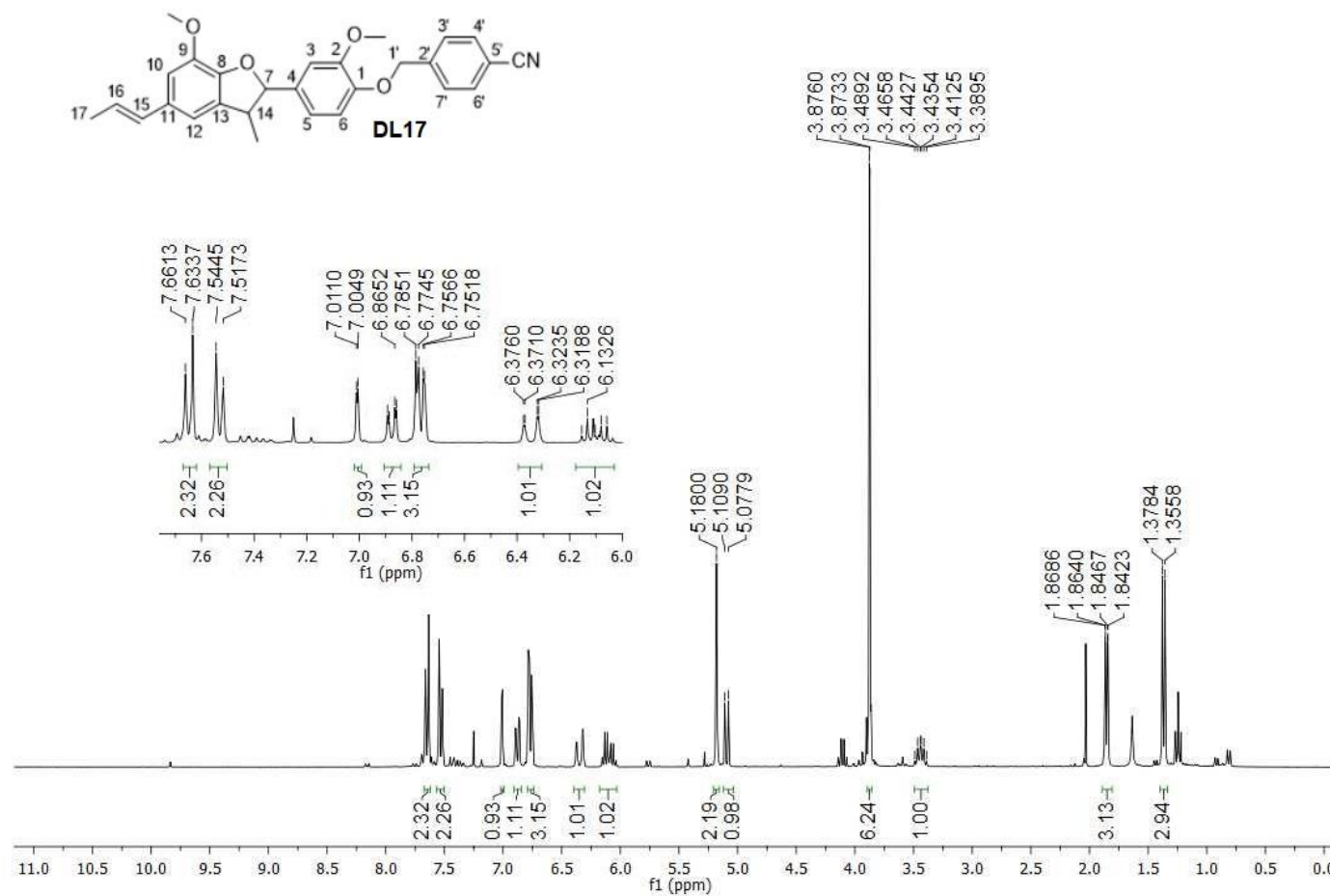
Figura 134 – Espectro de massas do derivado DL16.



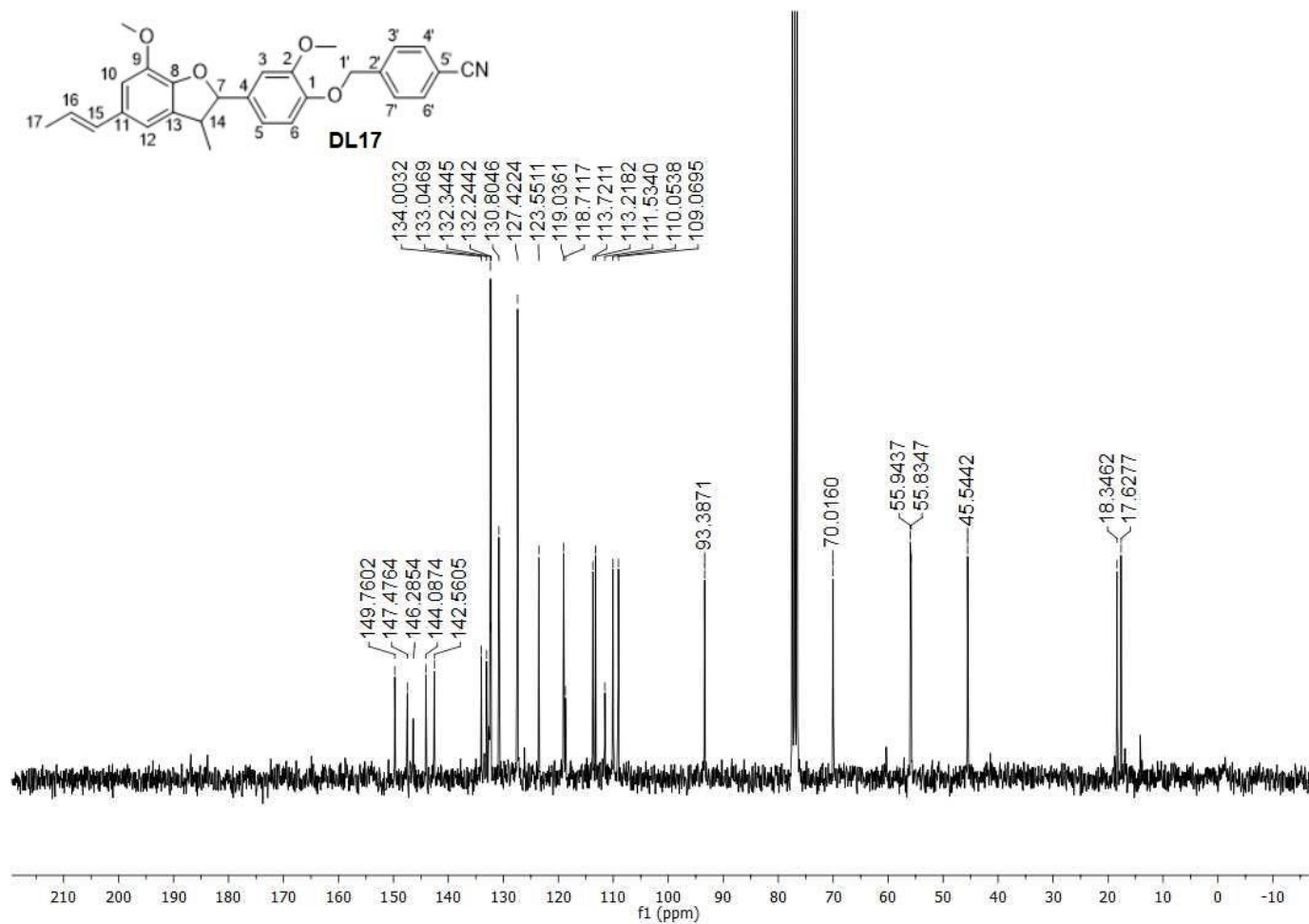
Fonte: Da autora.

Figura 135 – Espectro de absorção na região do IV do **derivado DL17**.

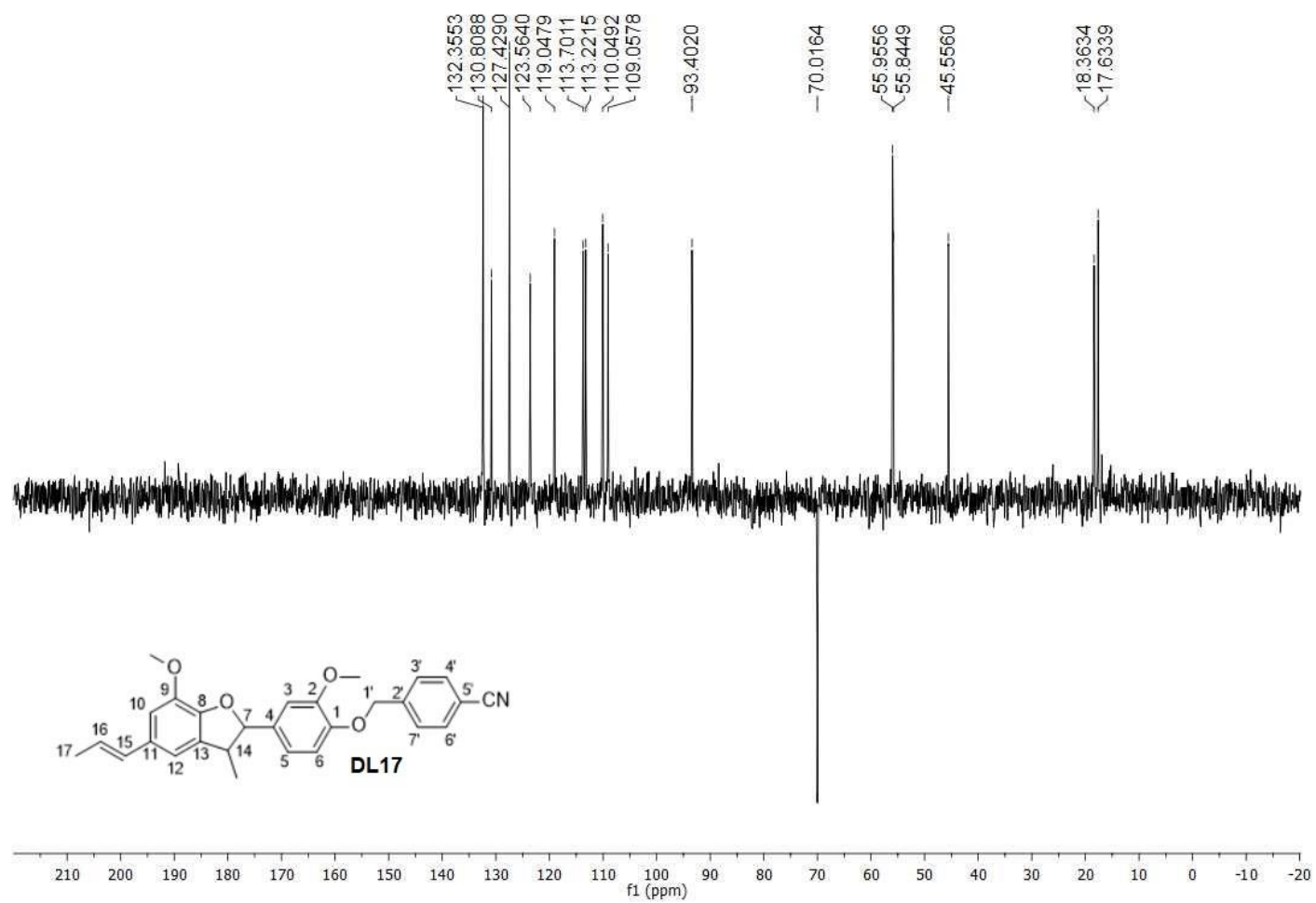
Fonte: Da autora.

Figura 136 – Espectro de RMN de ^1H do derivado DL17 (CDCl_3 , 300 MHz).

Fonte: Da autora.

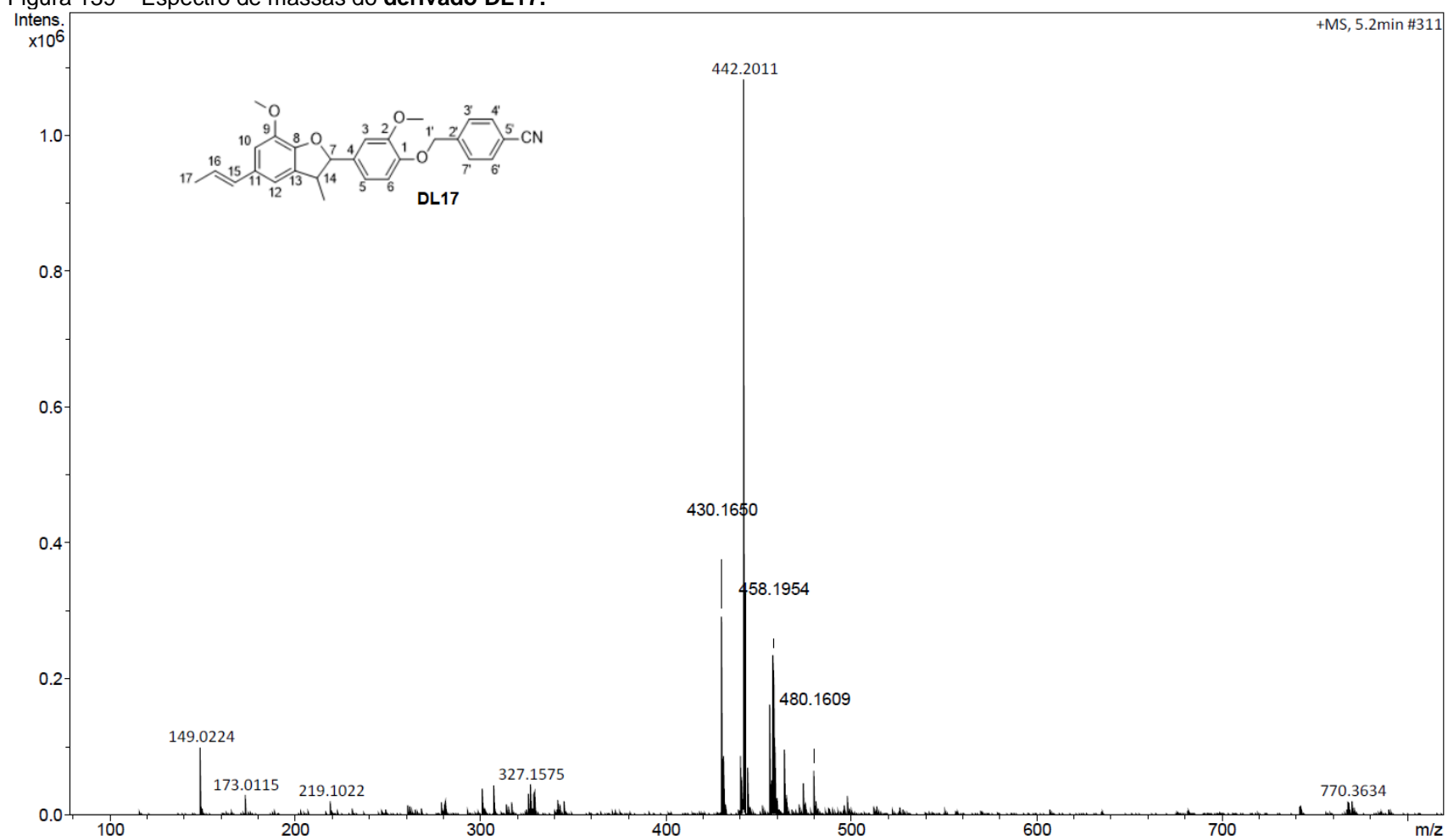
Figura 137 – Espectro de RMN de ^{13}C do derivado DL17 (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Da autora.

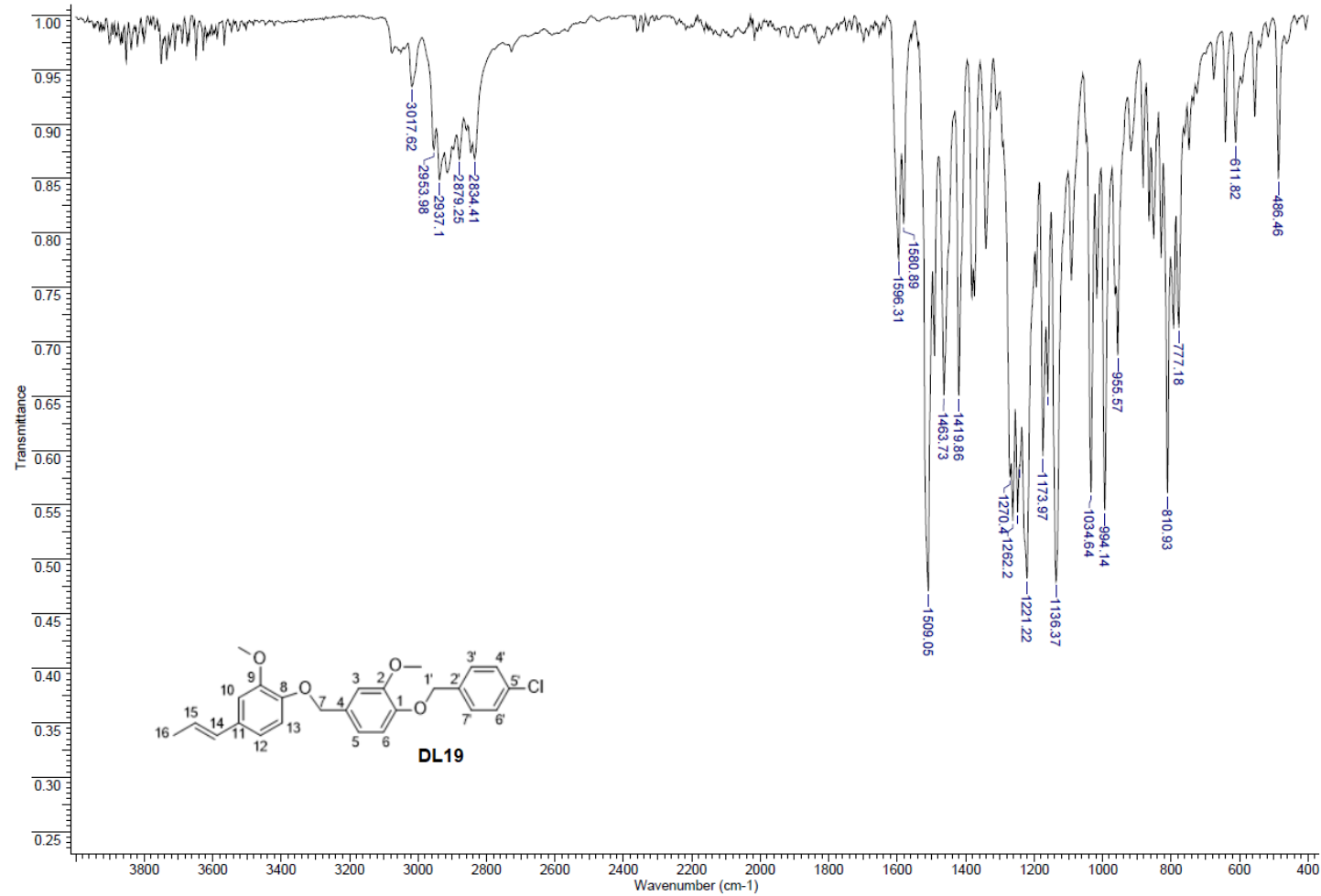
Figura 138 – Subespectro DEPT-135 do **derivado DL17** (CDCl₃, 75 MHz).

Fonte: Da autora.

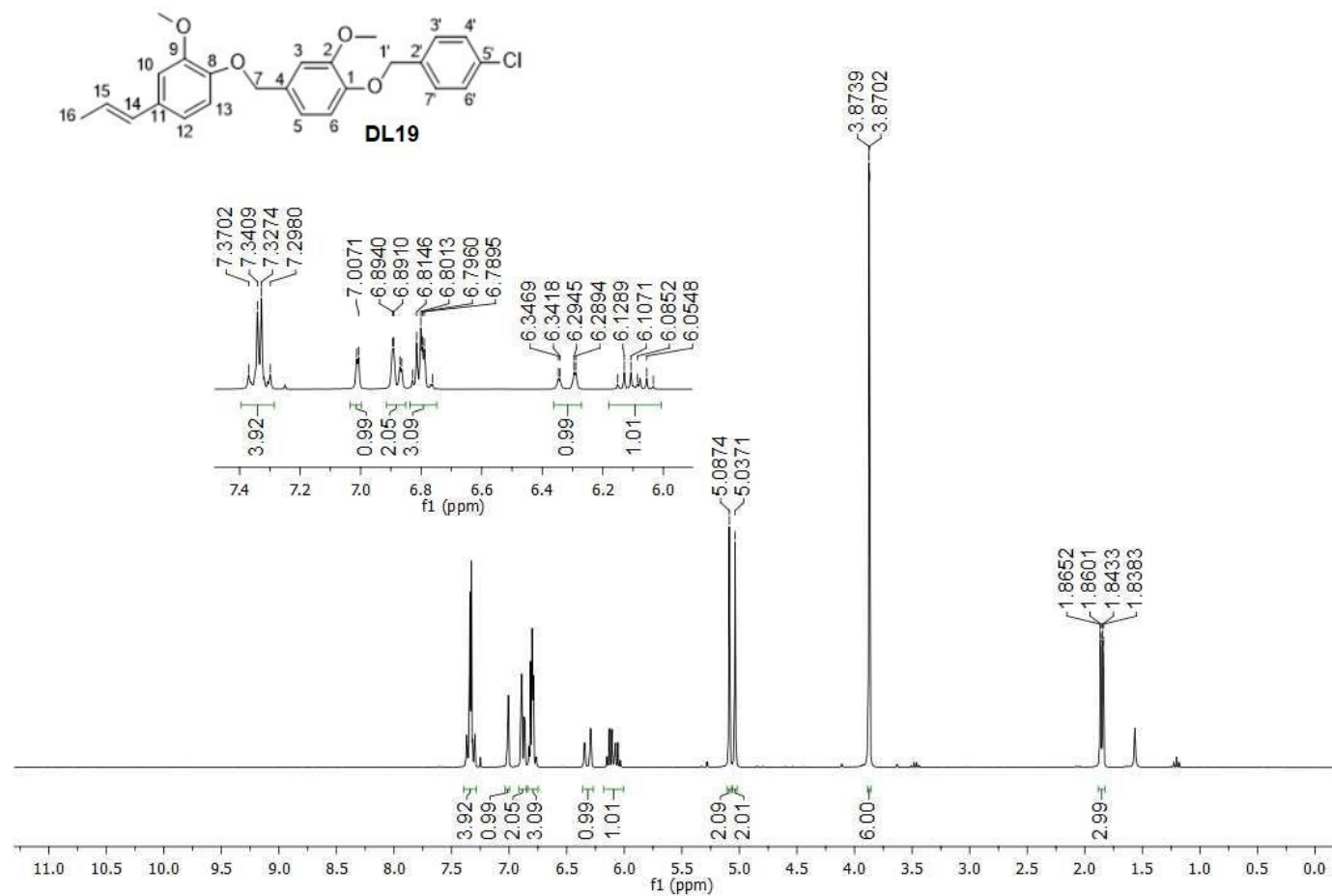
Figura 139 – Espectro de massas do derivado DL17.



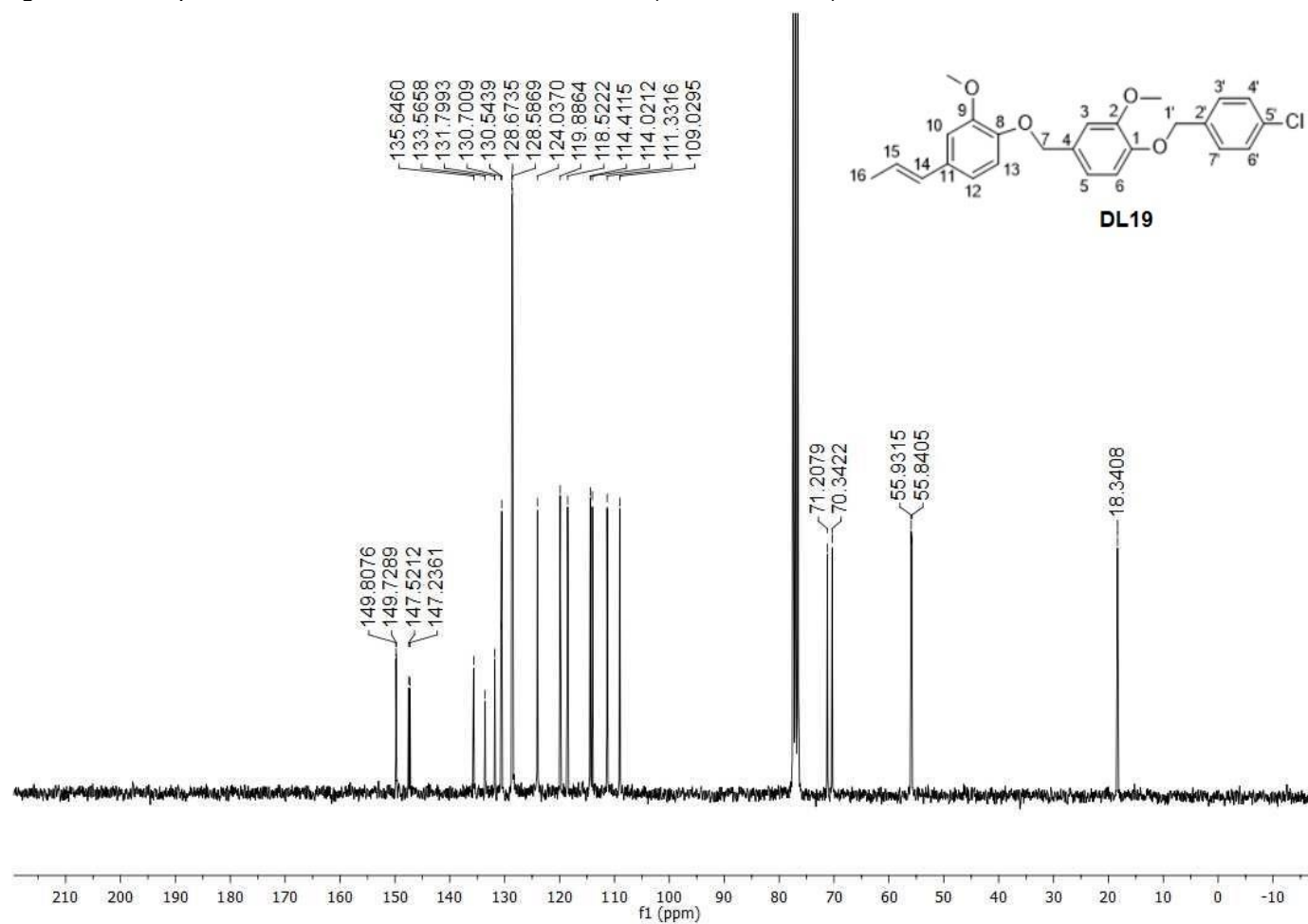
Fonte: Da autora.

Figura 140 – Espectro de absorção na região do IV do **derivado DL19**.

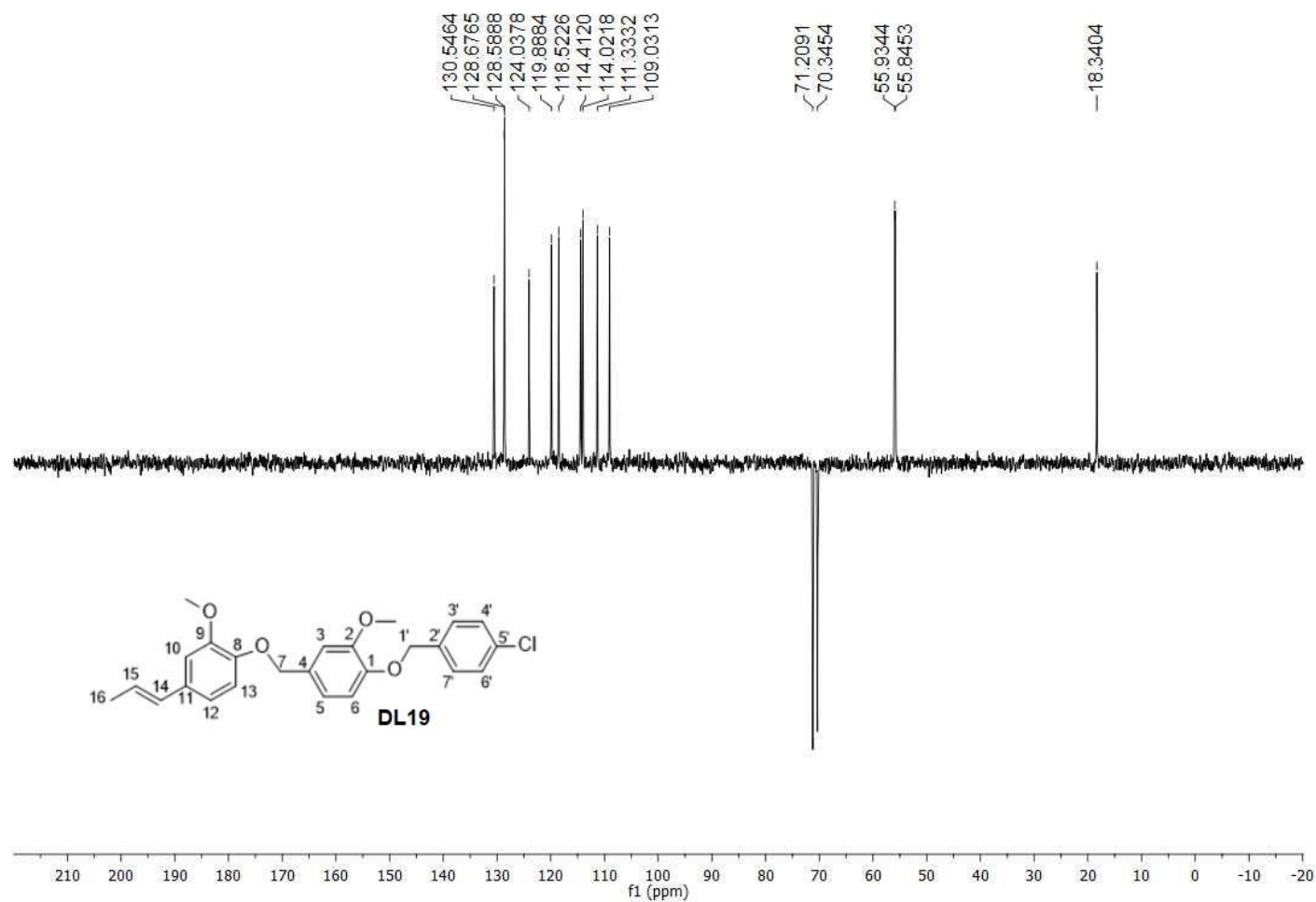
Fonte: Da autora.

Figura 141 – Espectro de RMN de ^1H do derivado DL19 (CDCl_3 , 300 MHz).

Fonte: Da autora.

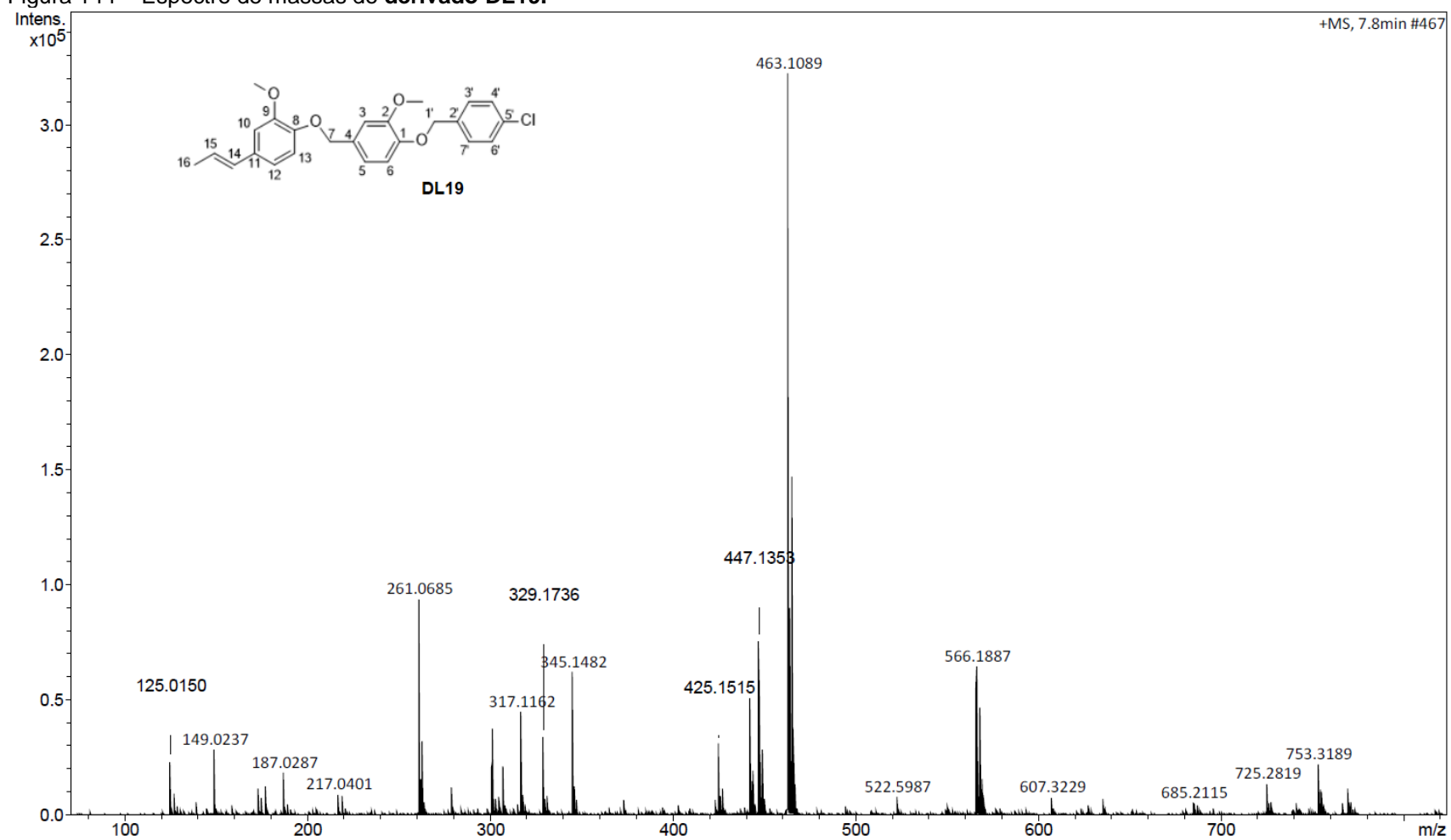
Figura 142 – Espectro de RMN de ^{13}C do derivado DL19 (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Da autora.

Figura 143 – Subespectro DEPT-135 do **derivado DL19** (CDCl₃, 75 MHz).

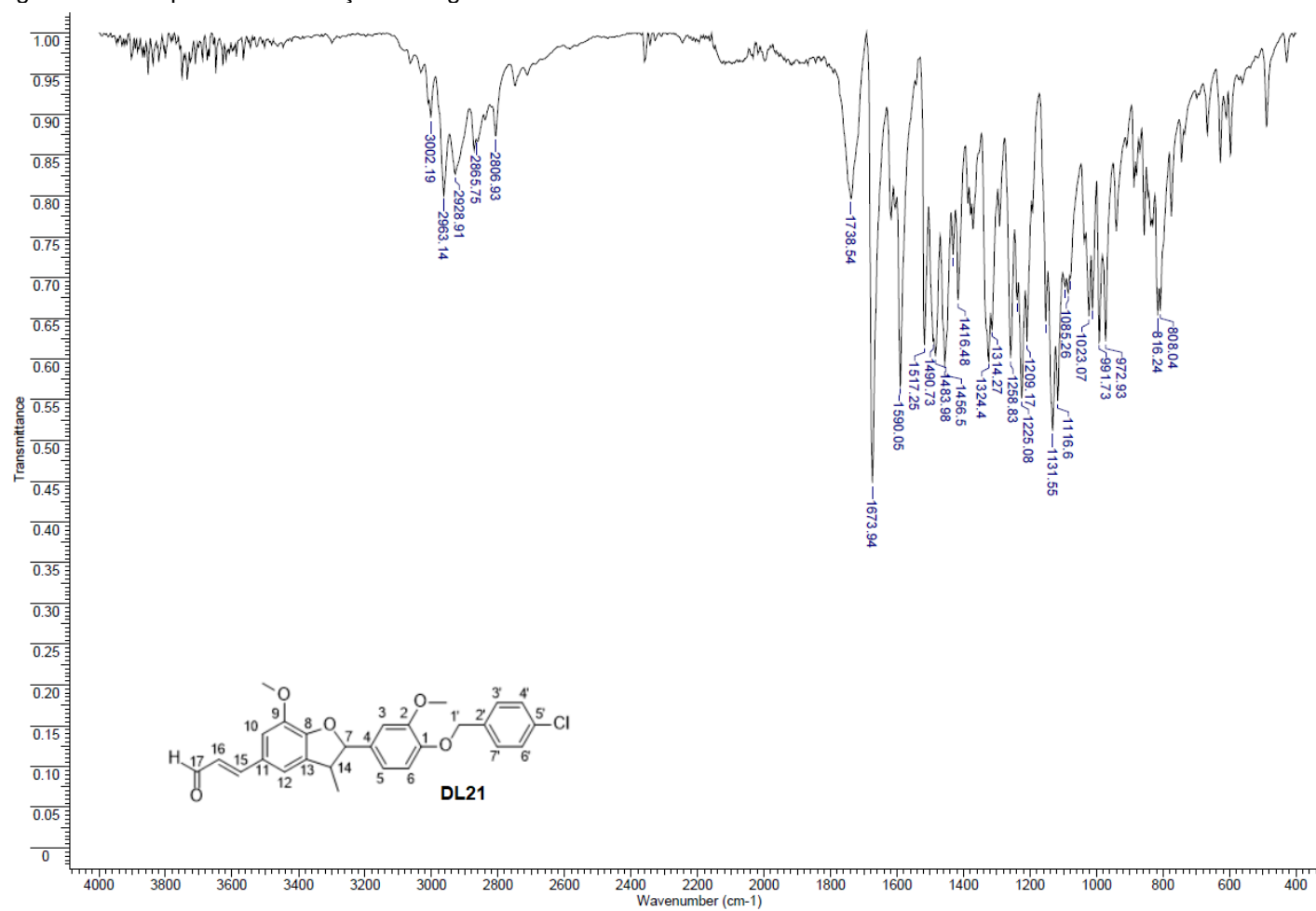
Fonte: Da autora.

Figura 144 – Espectro de massas do derivado DL19.



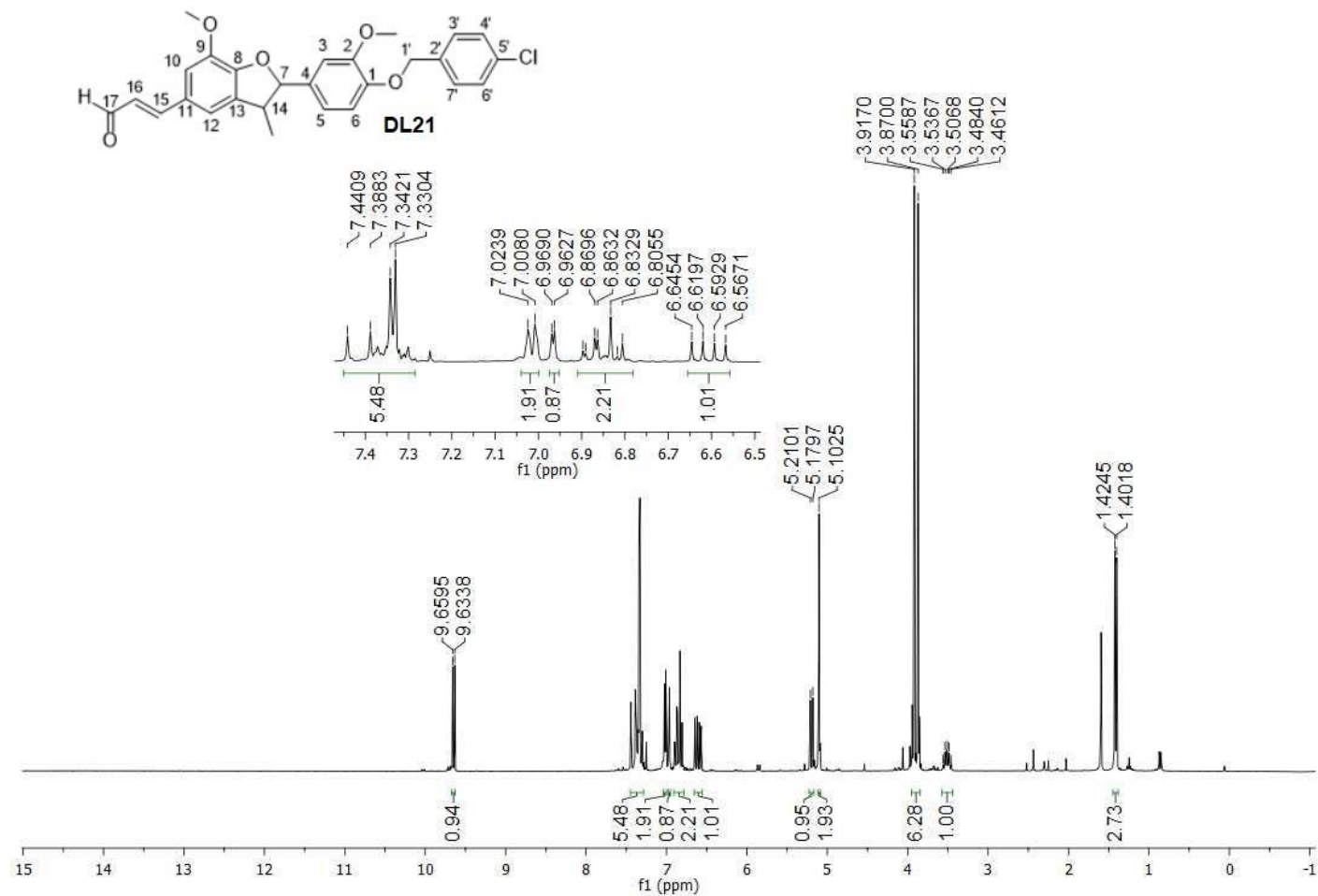
Fonte: Da autora.

Figura 145 – Espectro de absorção na região do IV do derivado DL21.

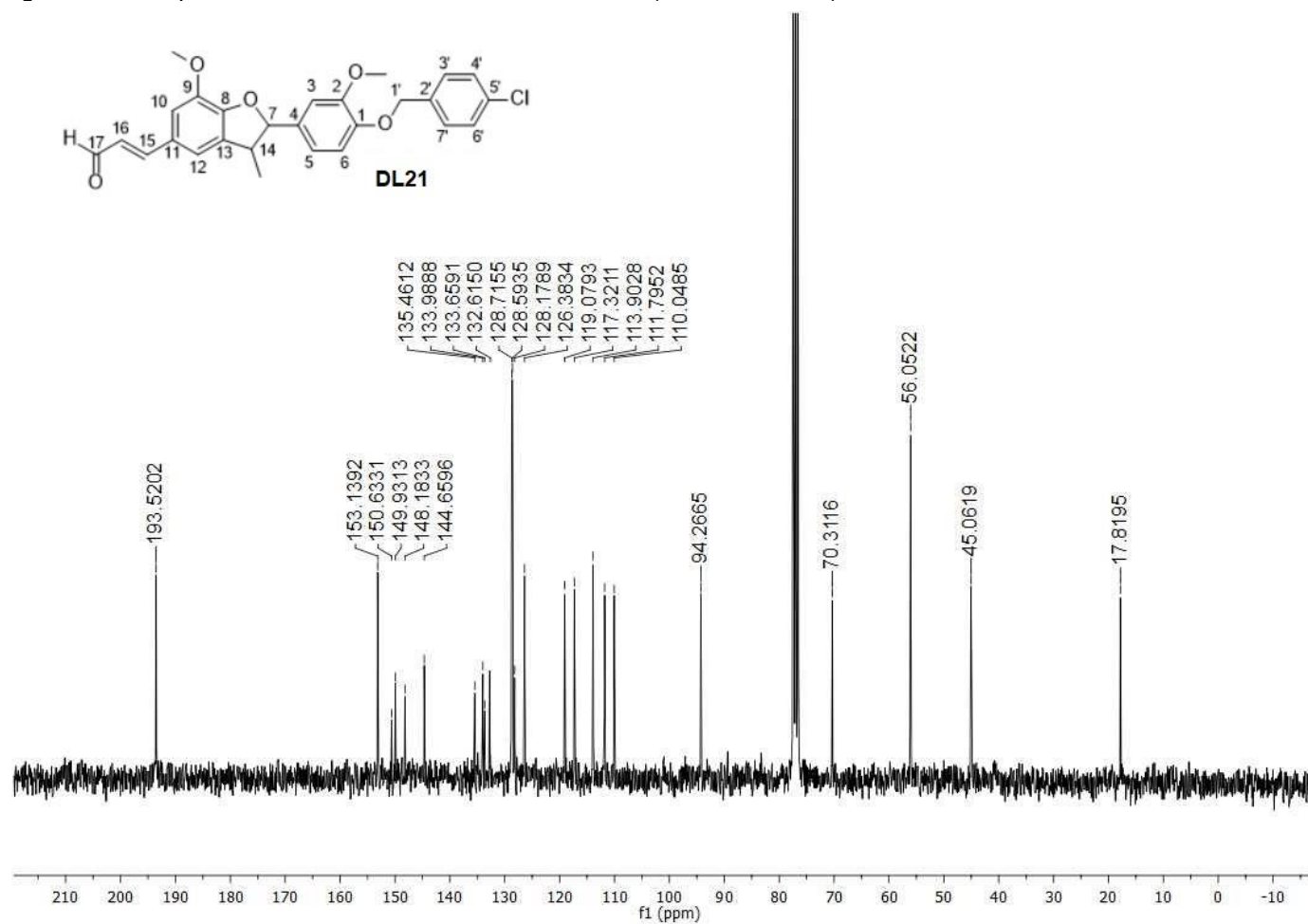


Fonte: Da autora.

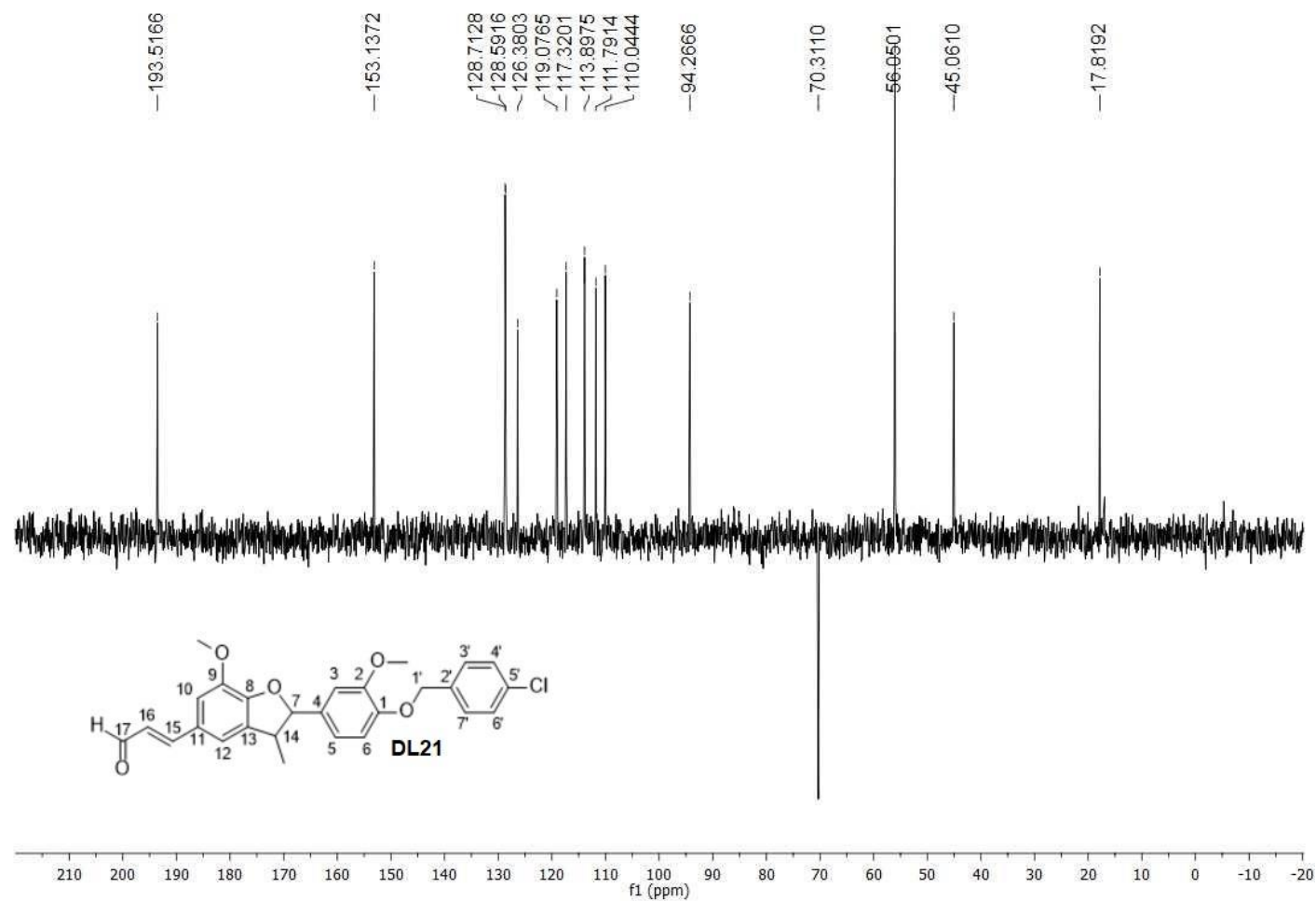
Figura 146 – Espectro de RMN de ^1H do derivado DL21 (CDCl_3 , 300 MHz).



Fonte: Da autora.

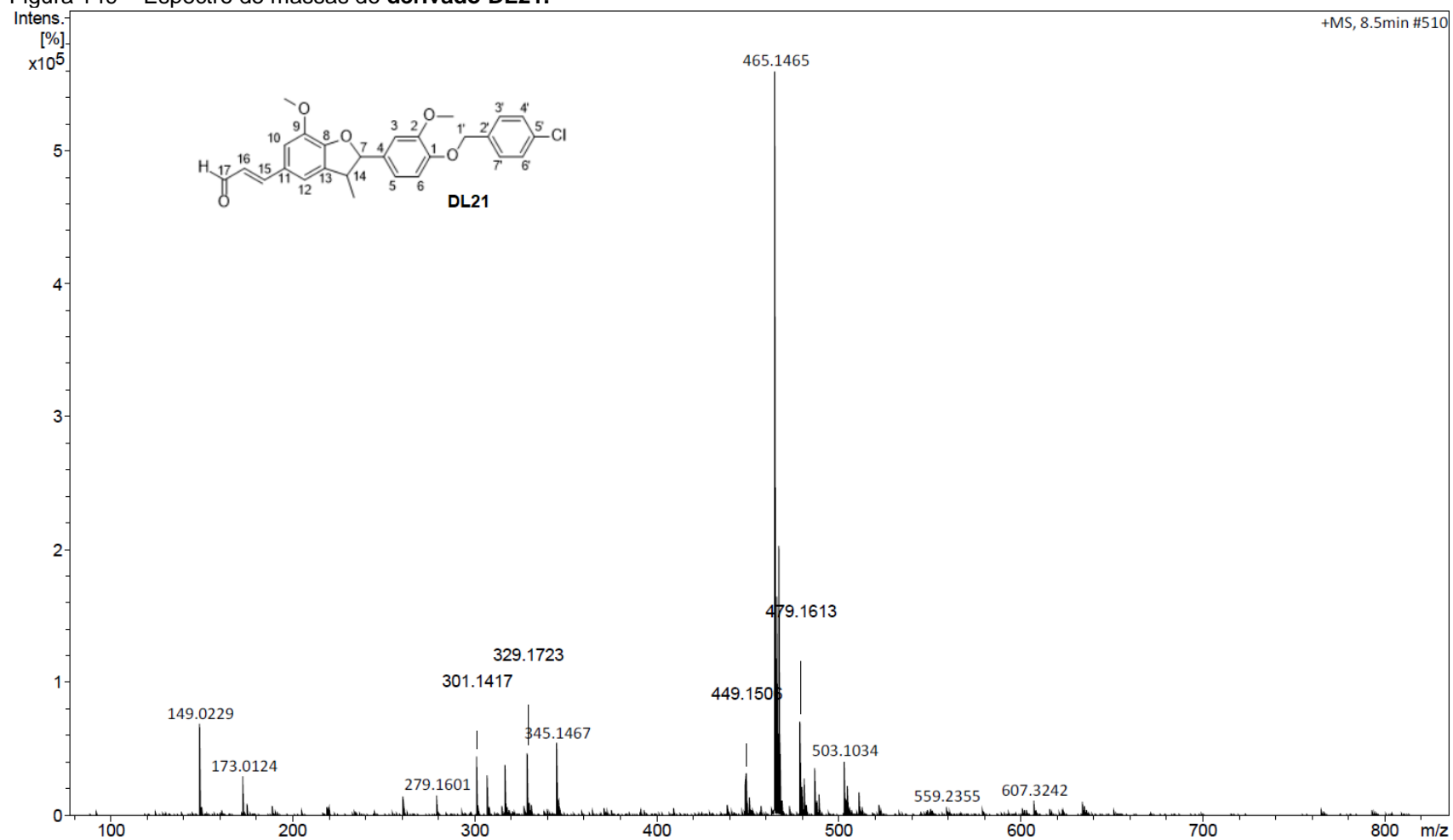
Figura 147 – Espectro de RMN de ^{13}C do derivado DL21 (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Da autora.

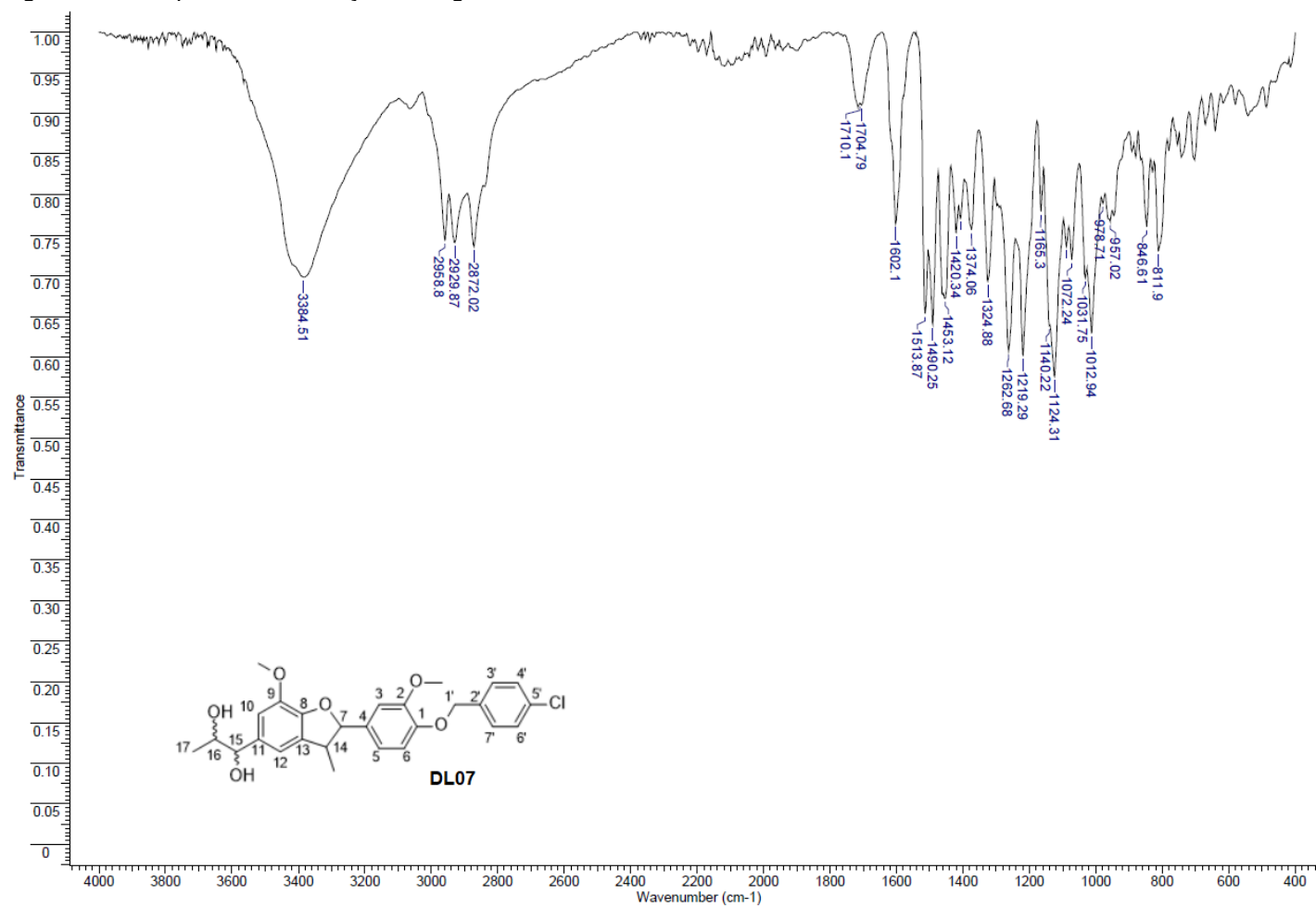
Figura 148 – Subespectro DEPT-135 do **derivado DL21** (CDCl₃, 75 MHz).

Fonte: Da autora.

Figura 149 – Espectro de massas do derivado DL21.

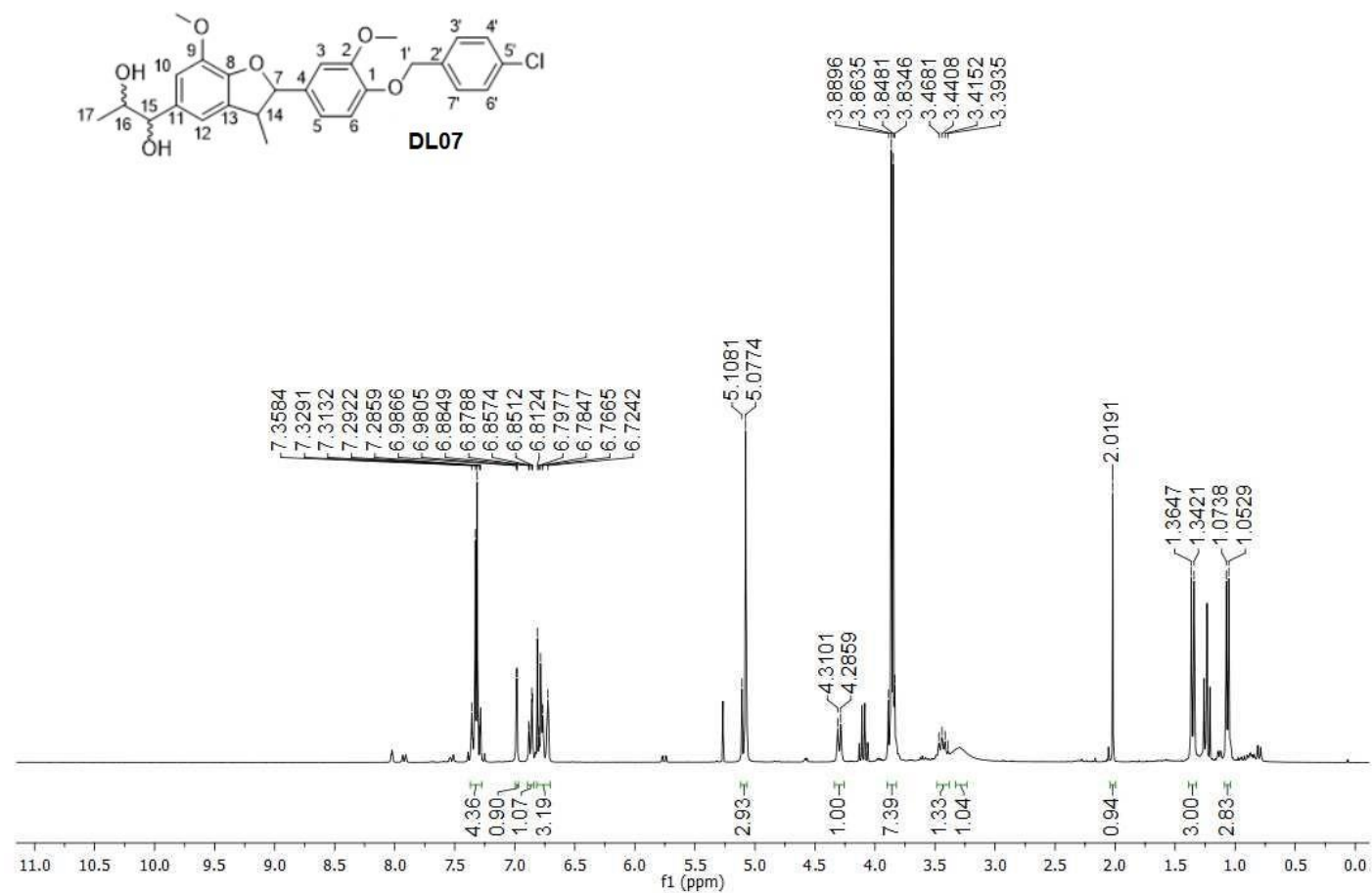


Fonte: Da autora.

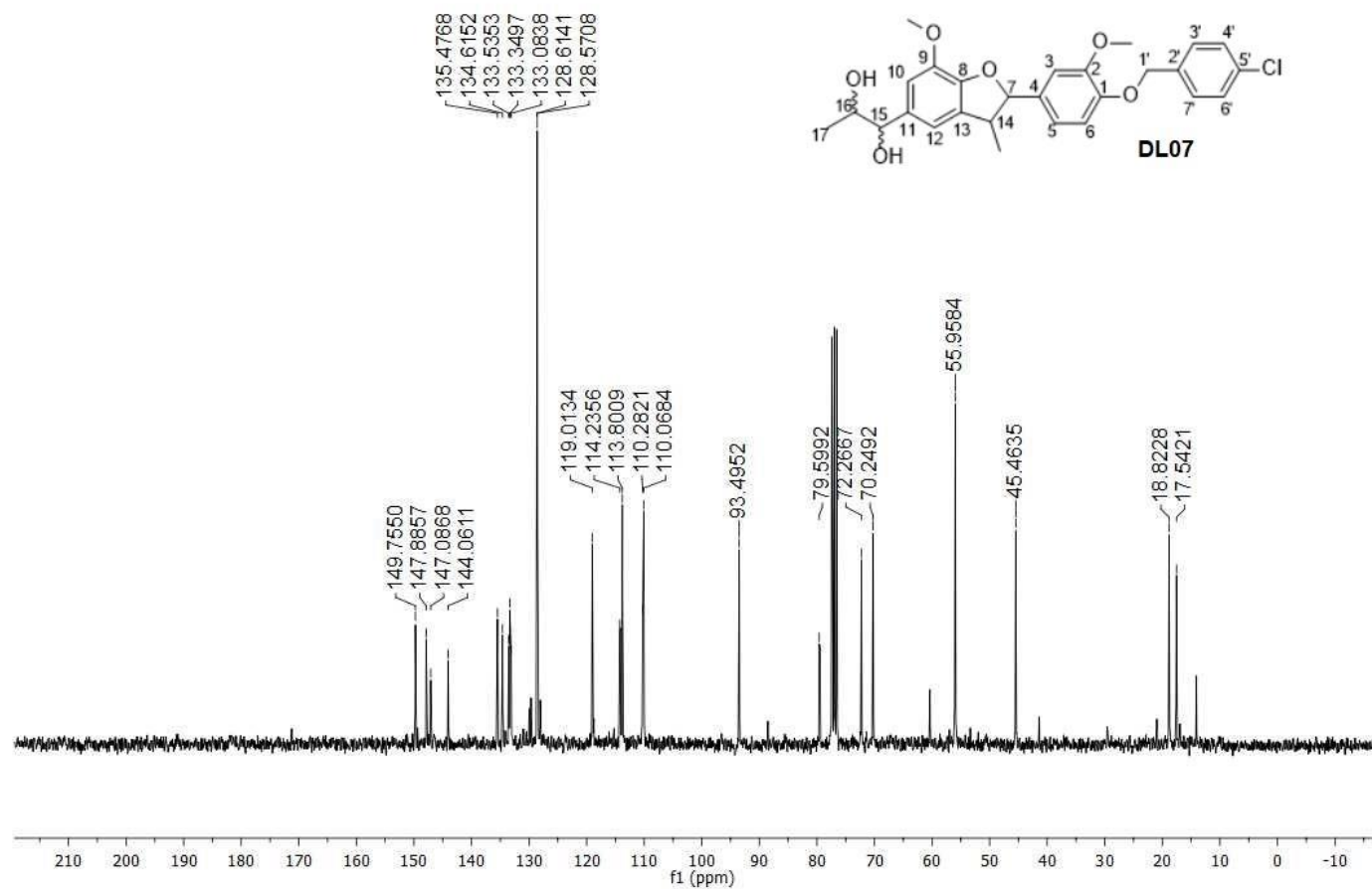
Figura 150 – Espectro de absorção na região do IV do **derivado DL07**.

Fonte: Da autora.

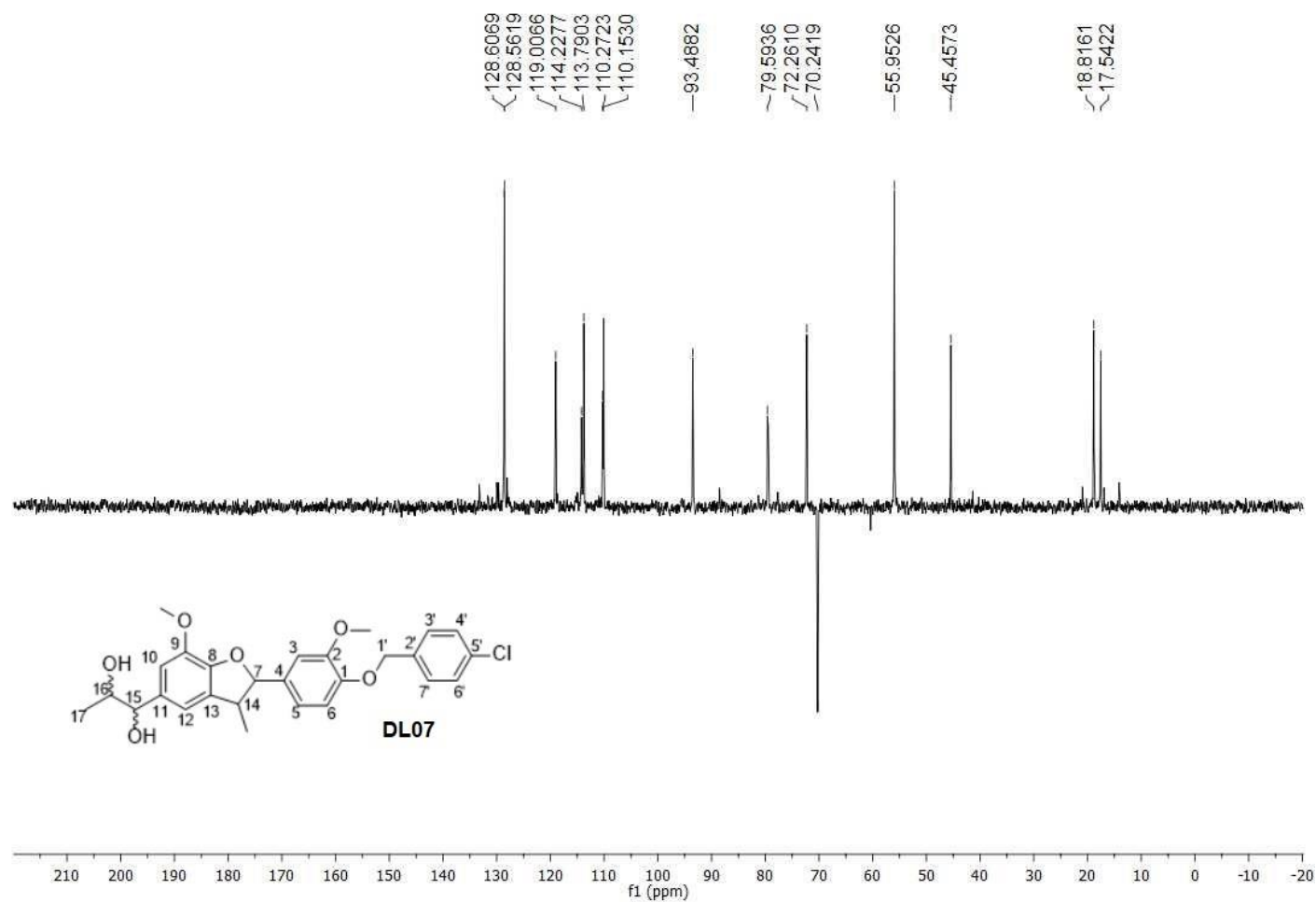
Figura 151 – Espectro de RMN de ^1H do derivado DL07 (CDCl_3 , 300 MHz).



Fonte: Da autora.

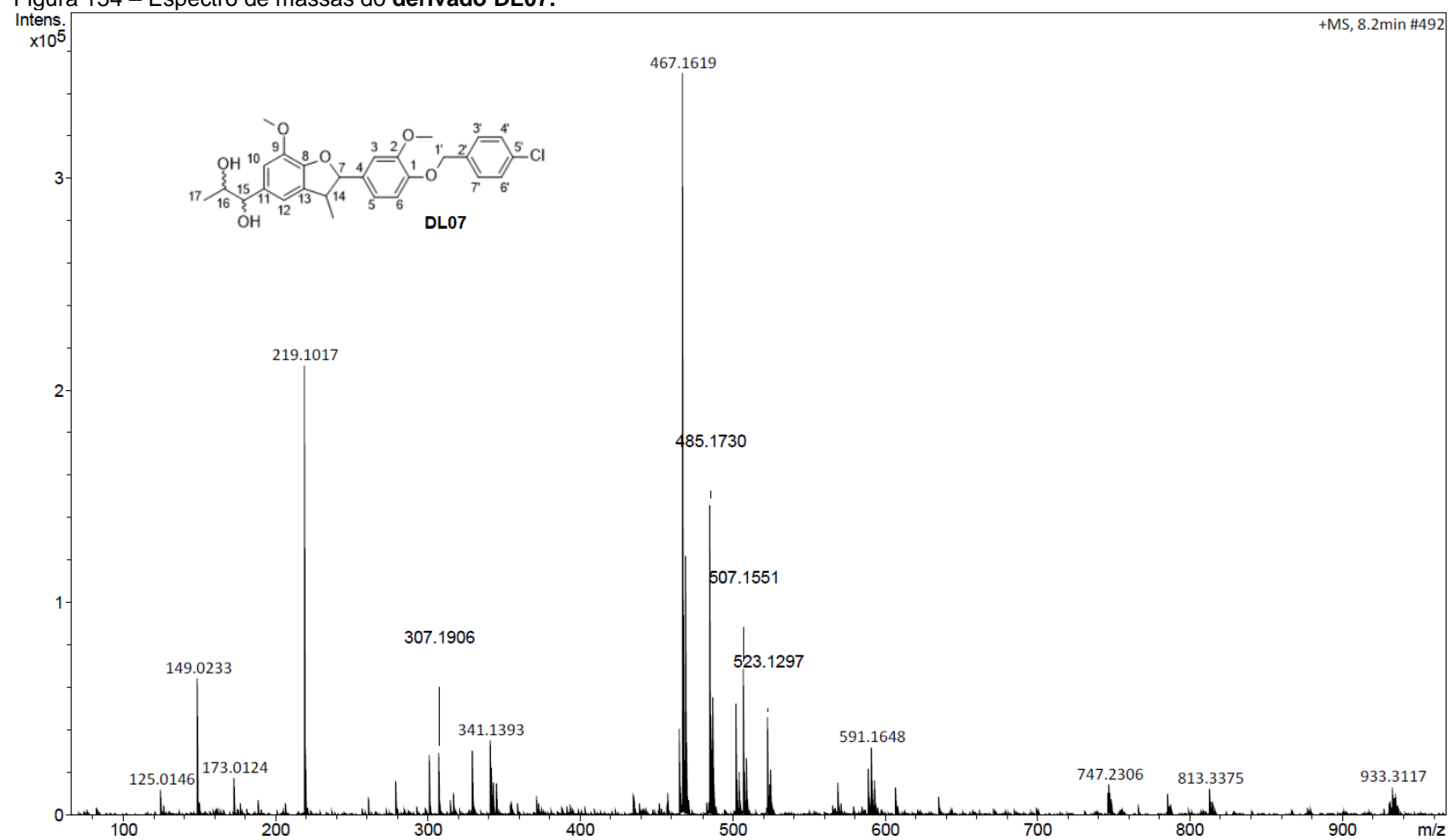
Figura 152 – Espectro de RMN de ^{13}C do derivado **DL07** (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Da autora.

Figura 153 – Subespectro DEPT-135 do **derivado DL07** (CDCl₃, 75 MHz).

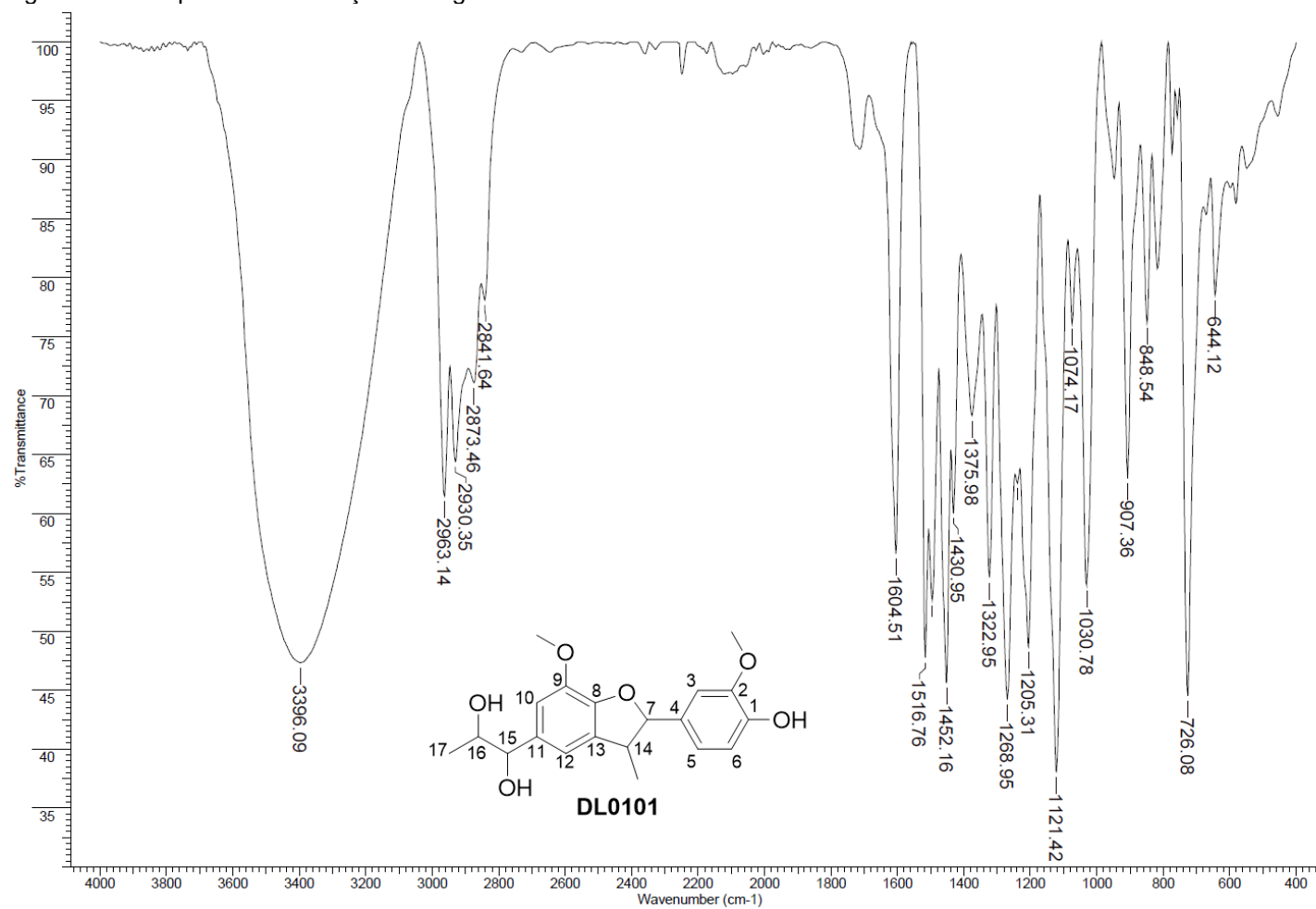
Fonte: Da autora.

Figura 154 – Espectro de massas do derivado DL07.

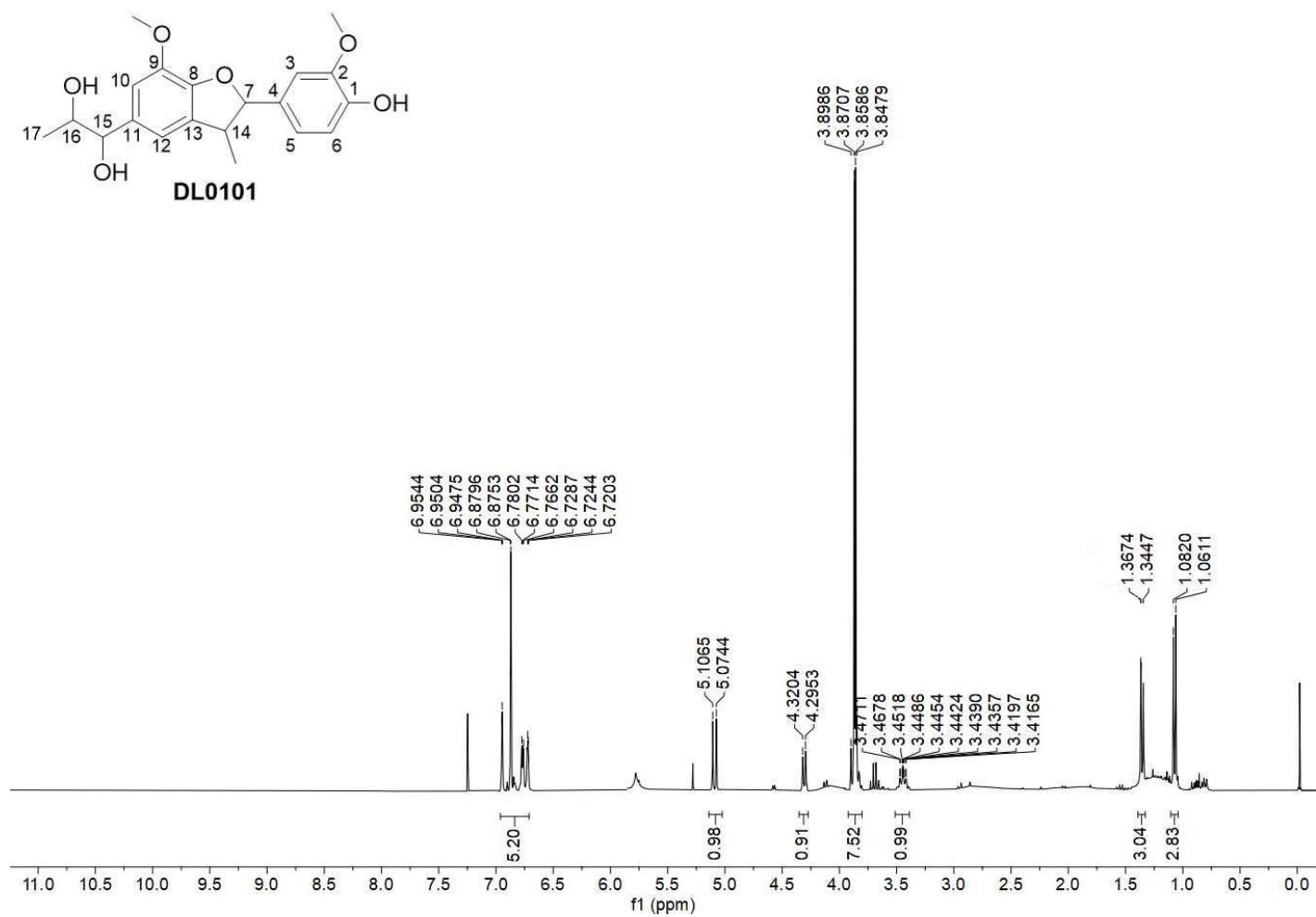


Fonte: Da autora.

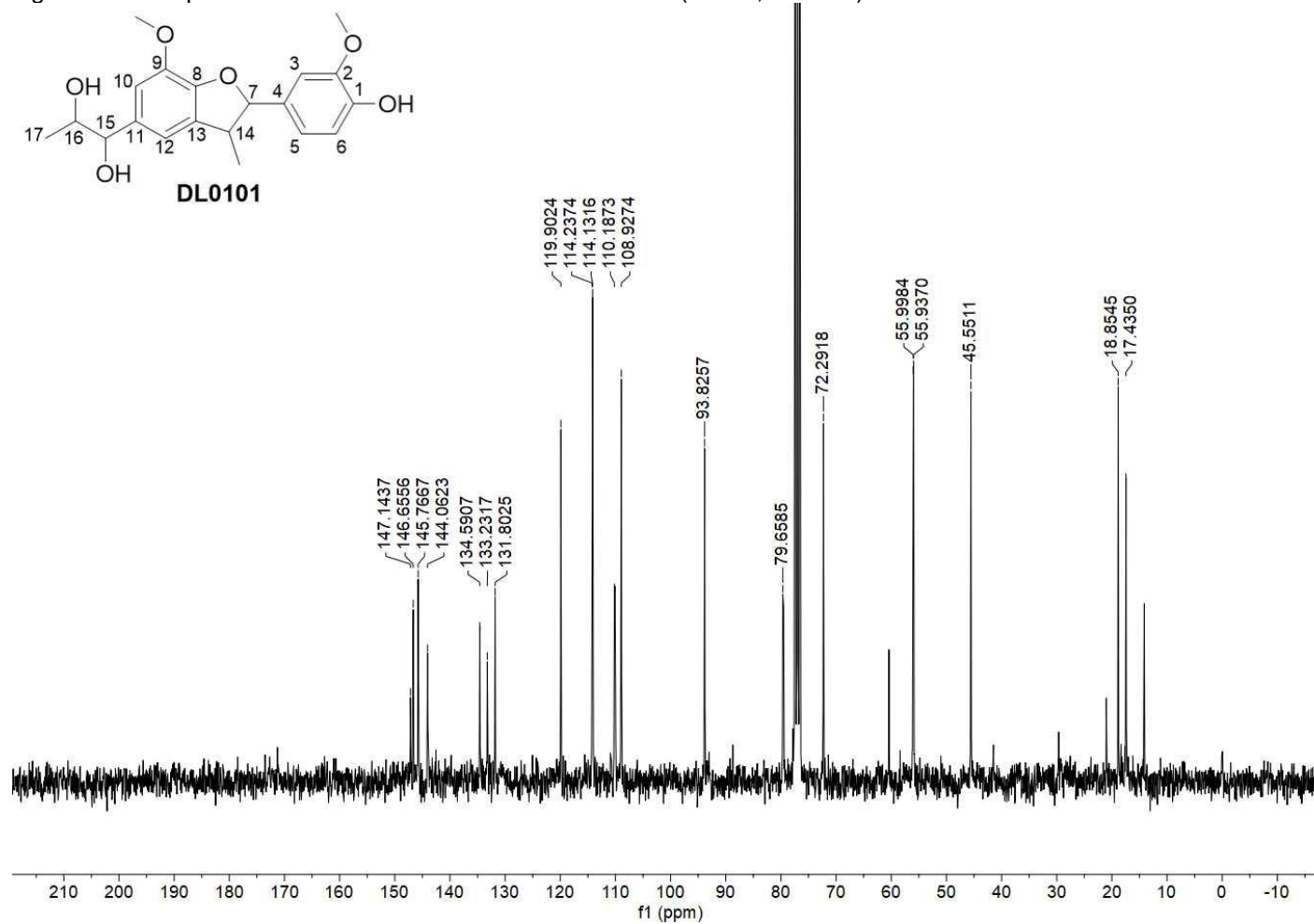
Figura 155 – Espectro de absorção na região do IV do derivado DL0101.



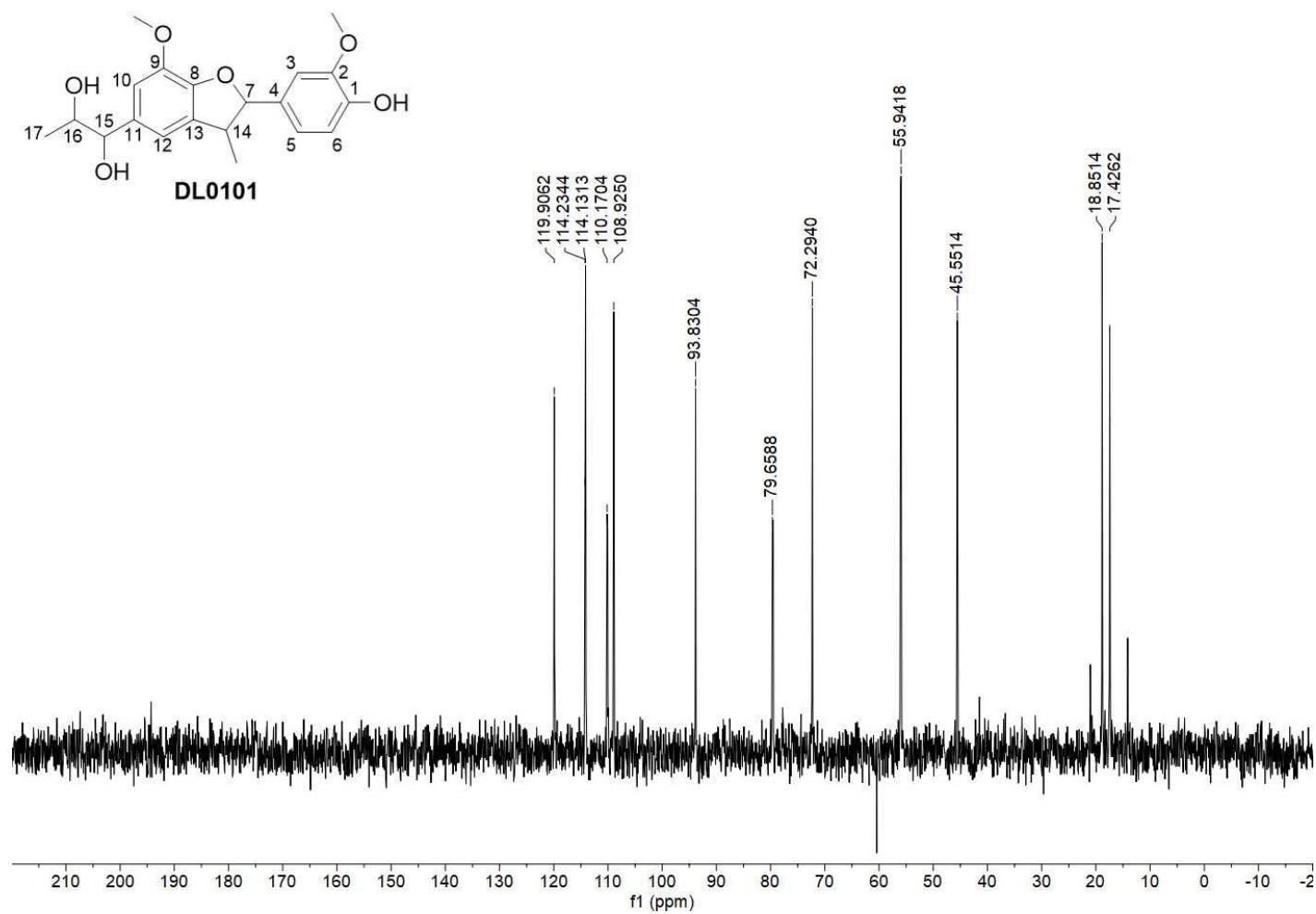
Fonte: Da autora.

Figura 156 – Espectro de RMN de ^1H do derivado DL0101 (CDCl_3 , 300 MHz).

Fonte: Da autora.

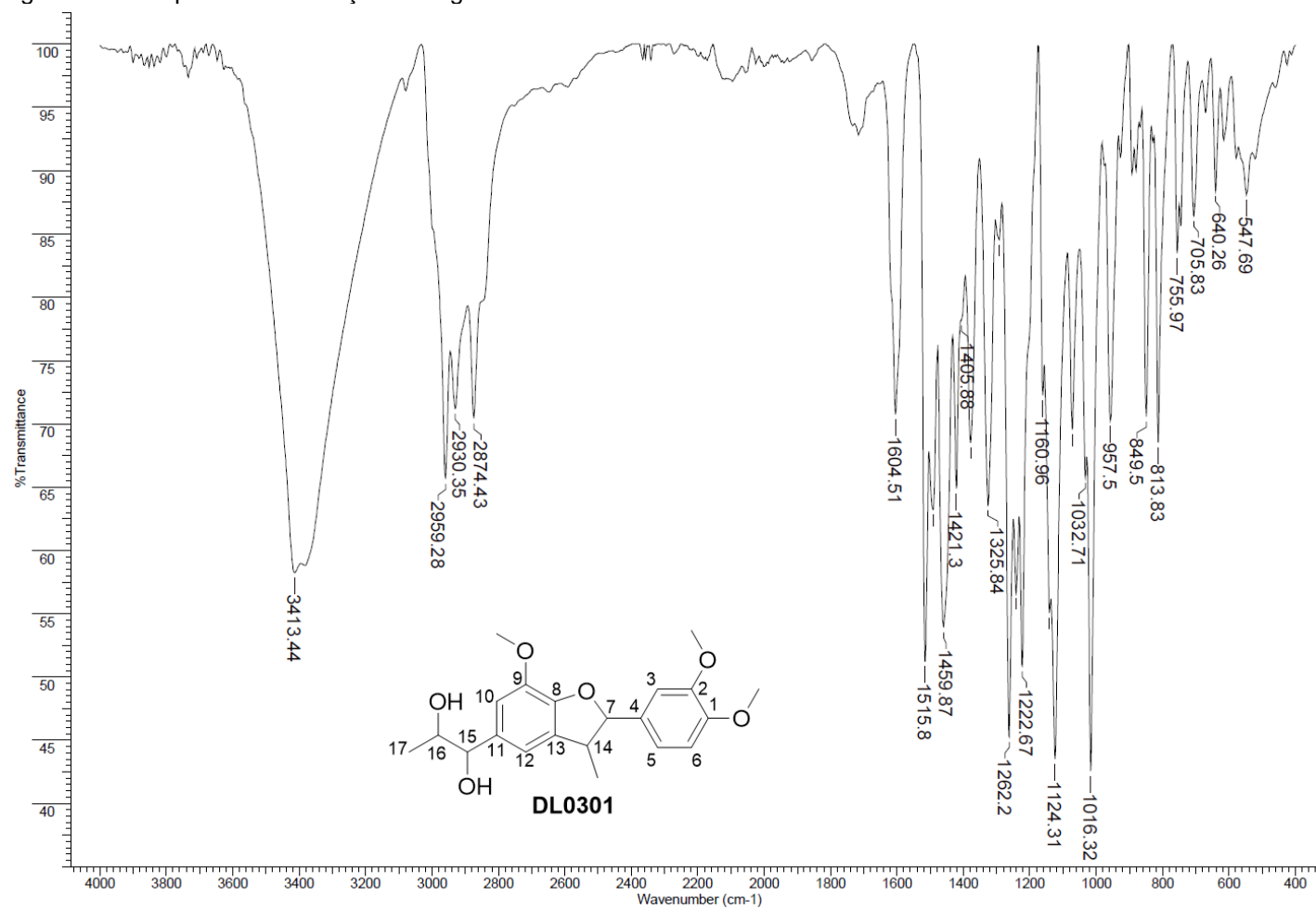
Figura 157 – Espectro de RMN de ^{13}C do derivado DL0101 (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Da autora.

Figura 158 – Subespectro DEPT-135 do derivado DL0101 (CDCl₃, 75 MHz).

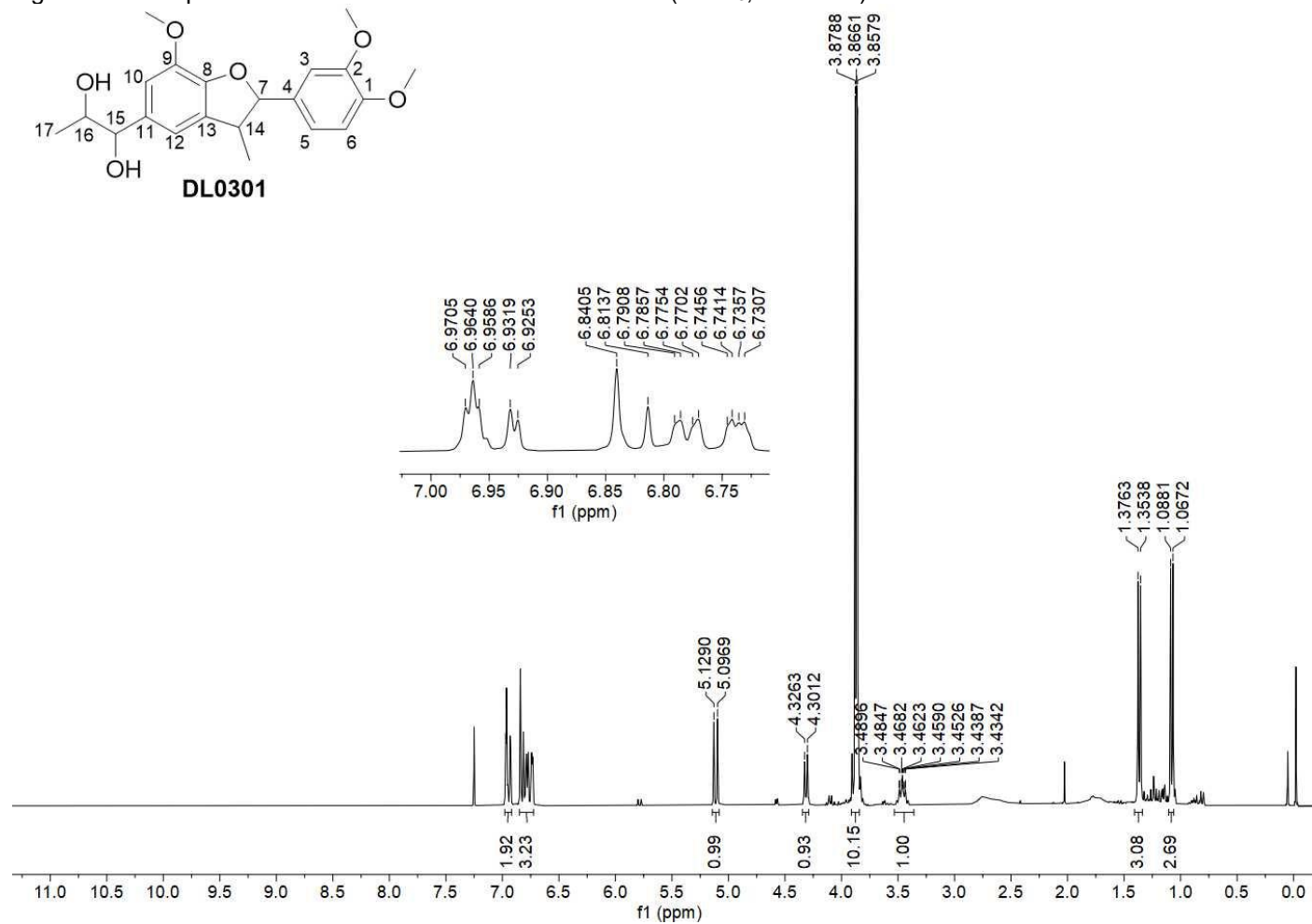
Fonte: Da autora.

Figura 159 – Espectro de absorção na região do IV do derivado DL0301.

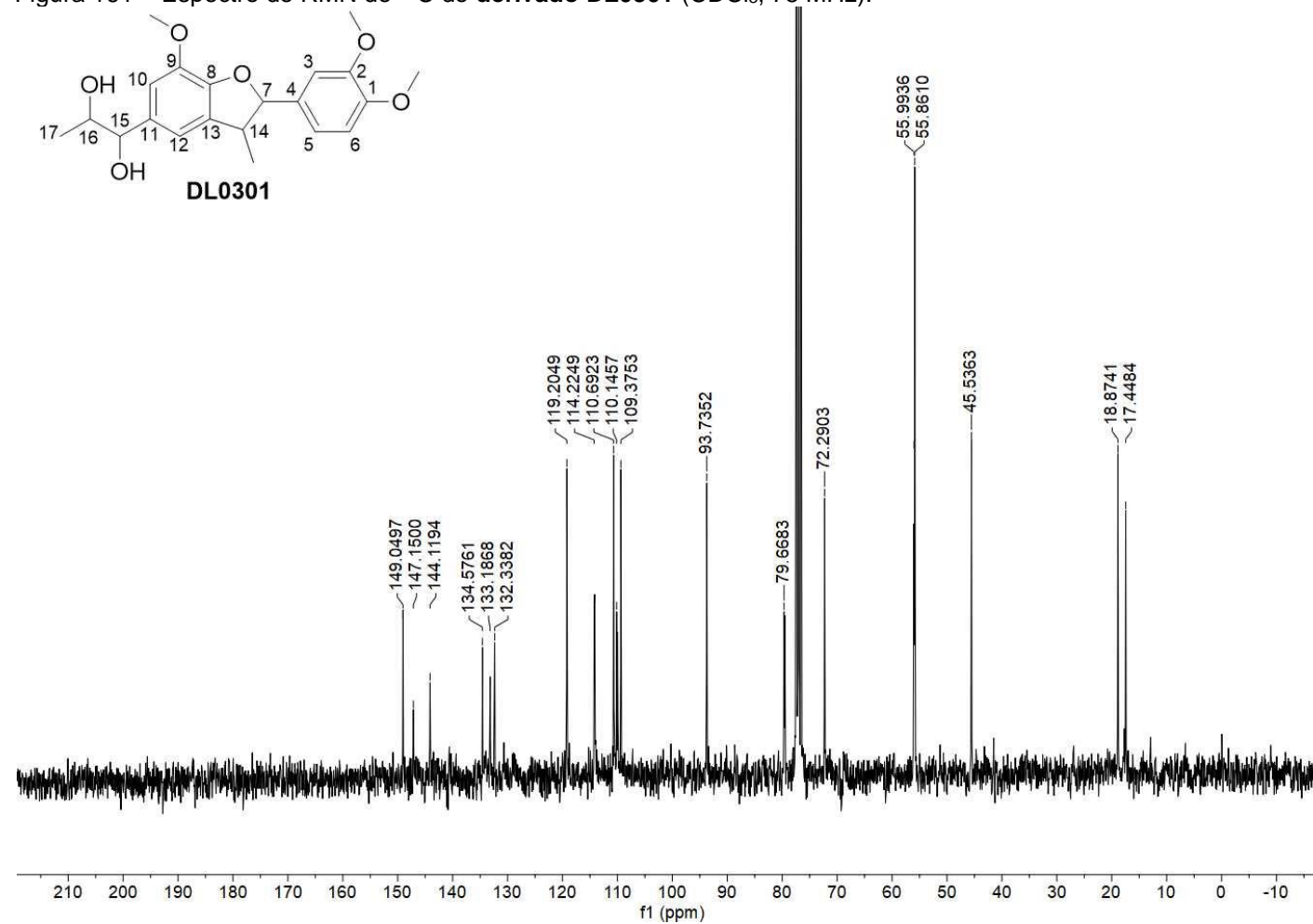


Fonte: Da autora.

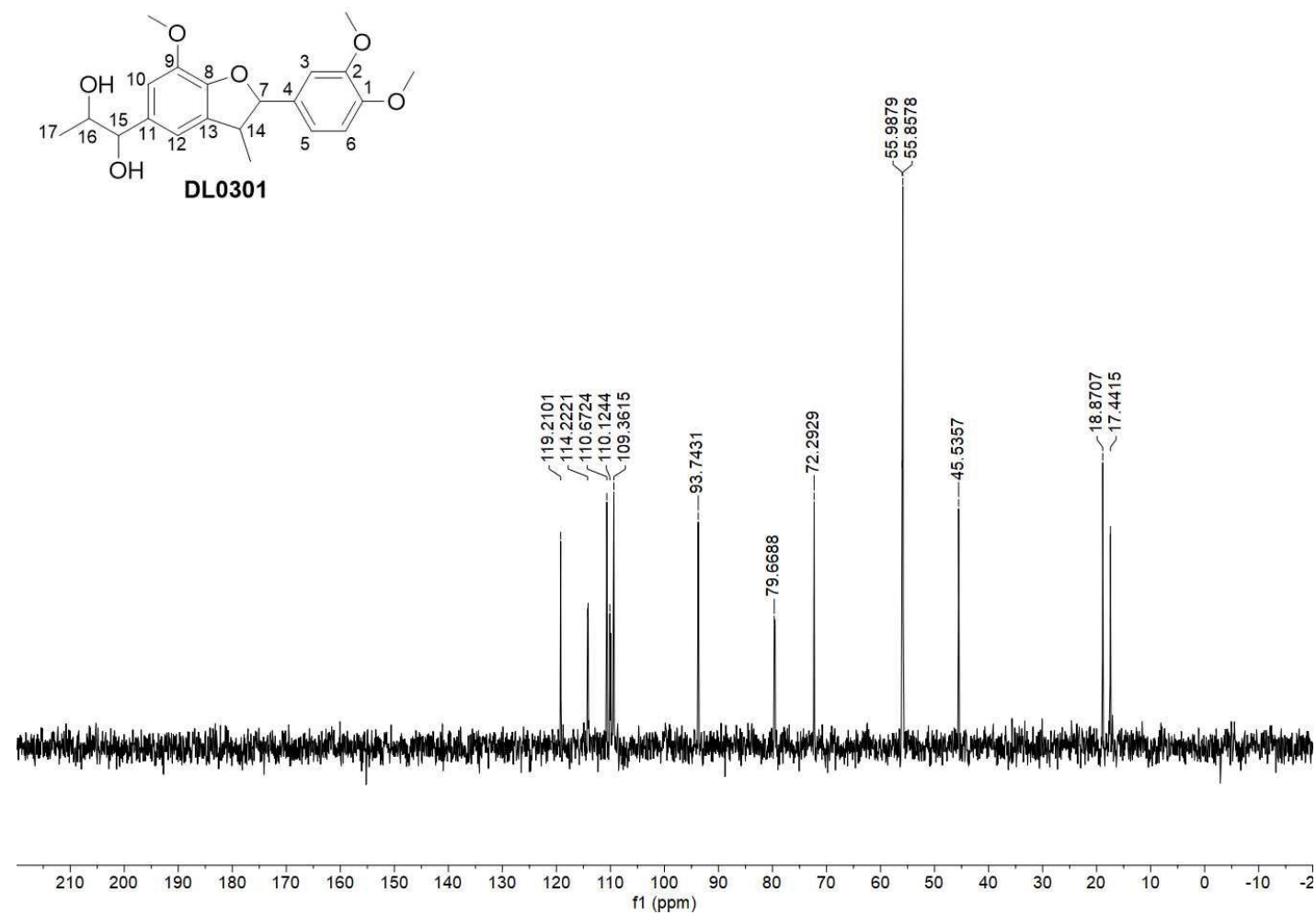
Figura 160 – Espectro de RMN de ^1H do derivado **DL0301** (CDCl_3 , 300 MHz).



Fonte: Da autora.

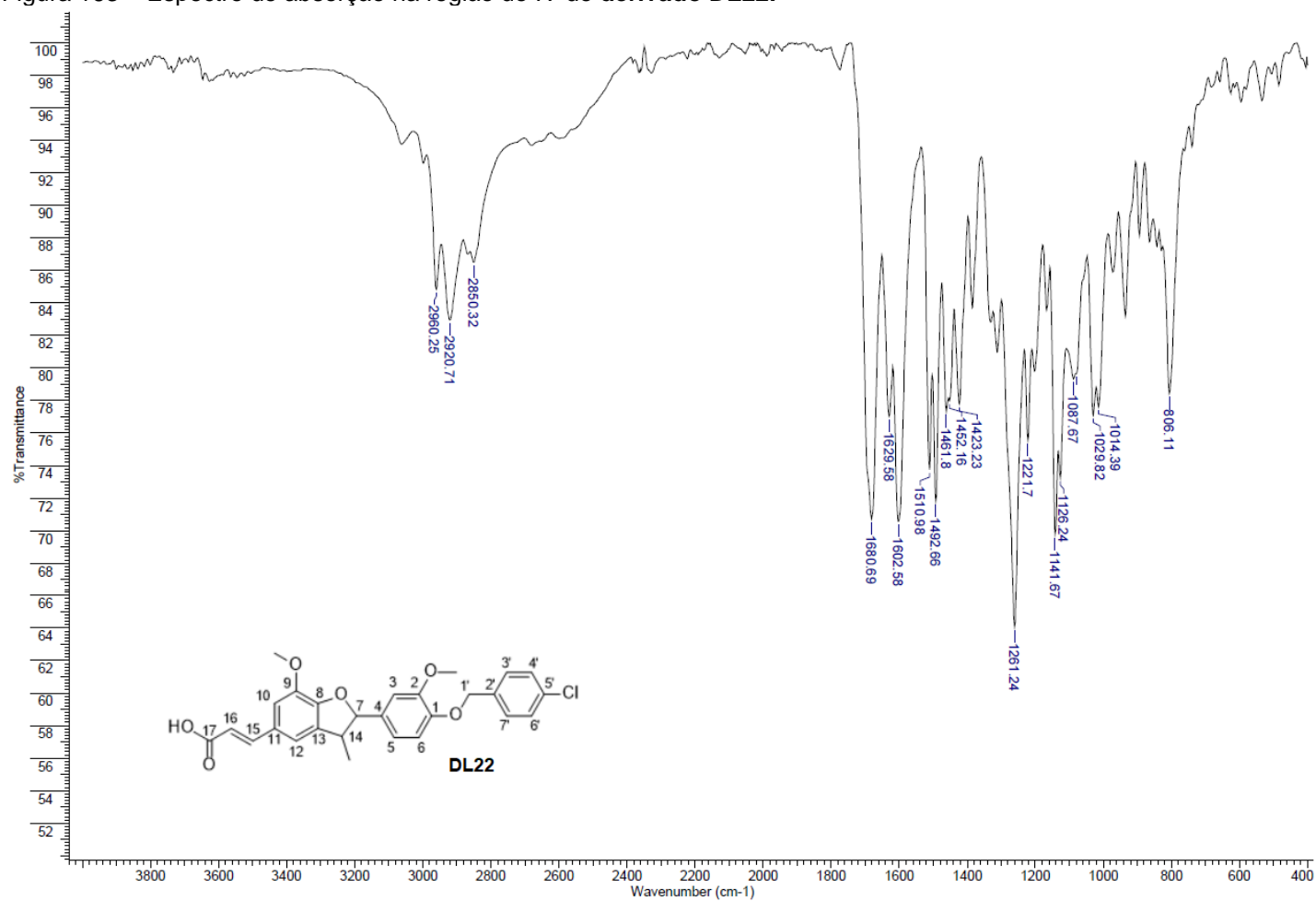
Figura 161 – Espectro de RMN de ^{13}C do derivado DL0301 (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Da autora.

Figura 162 – Subespectro DEPT-135 do derivado DL0301 (CDCl₃, 75 MHz).

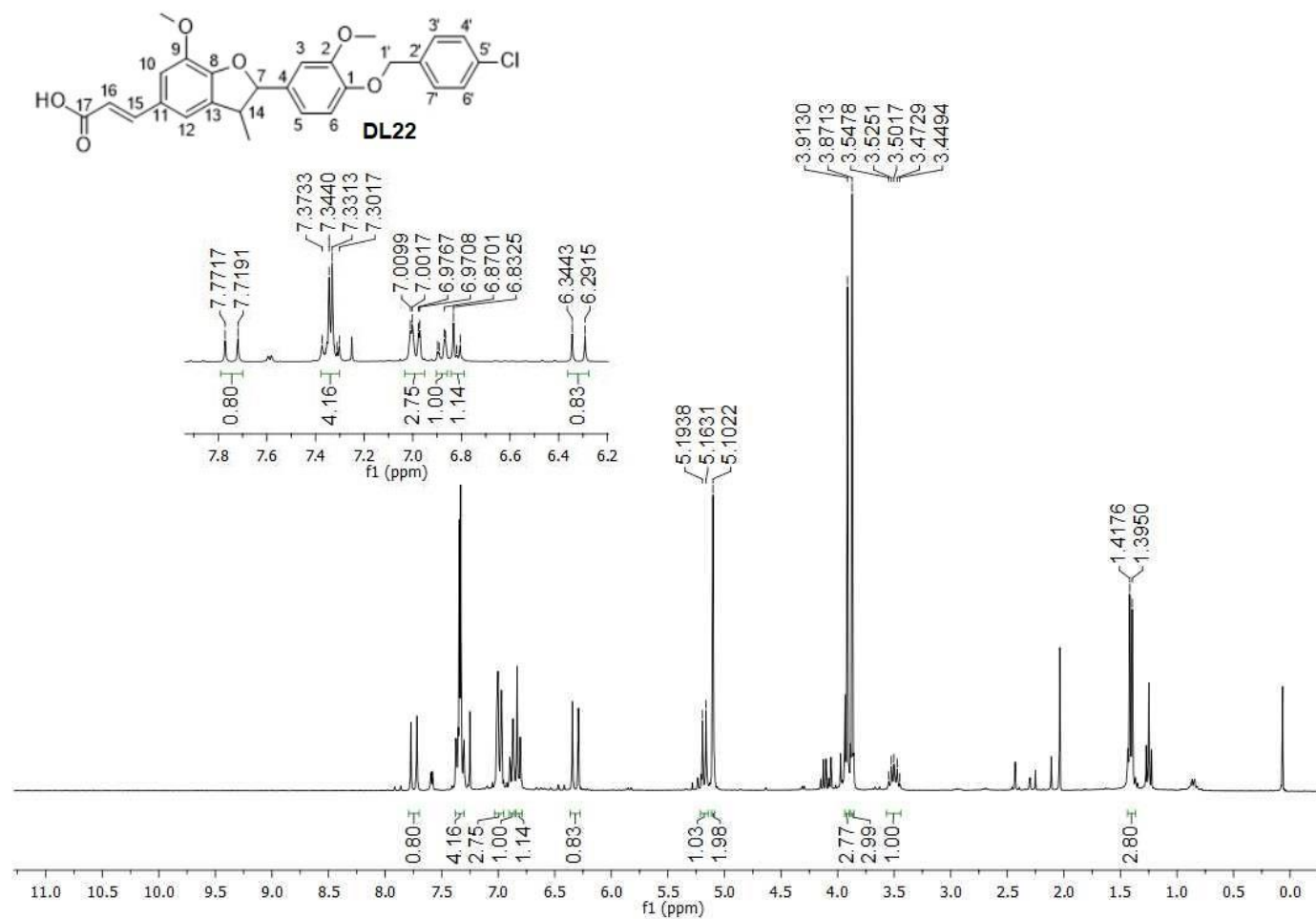
Fonte: Da autora.

Figura 163 – Espectro de absorção na região do IV do derivado DL22.

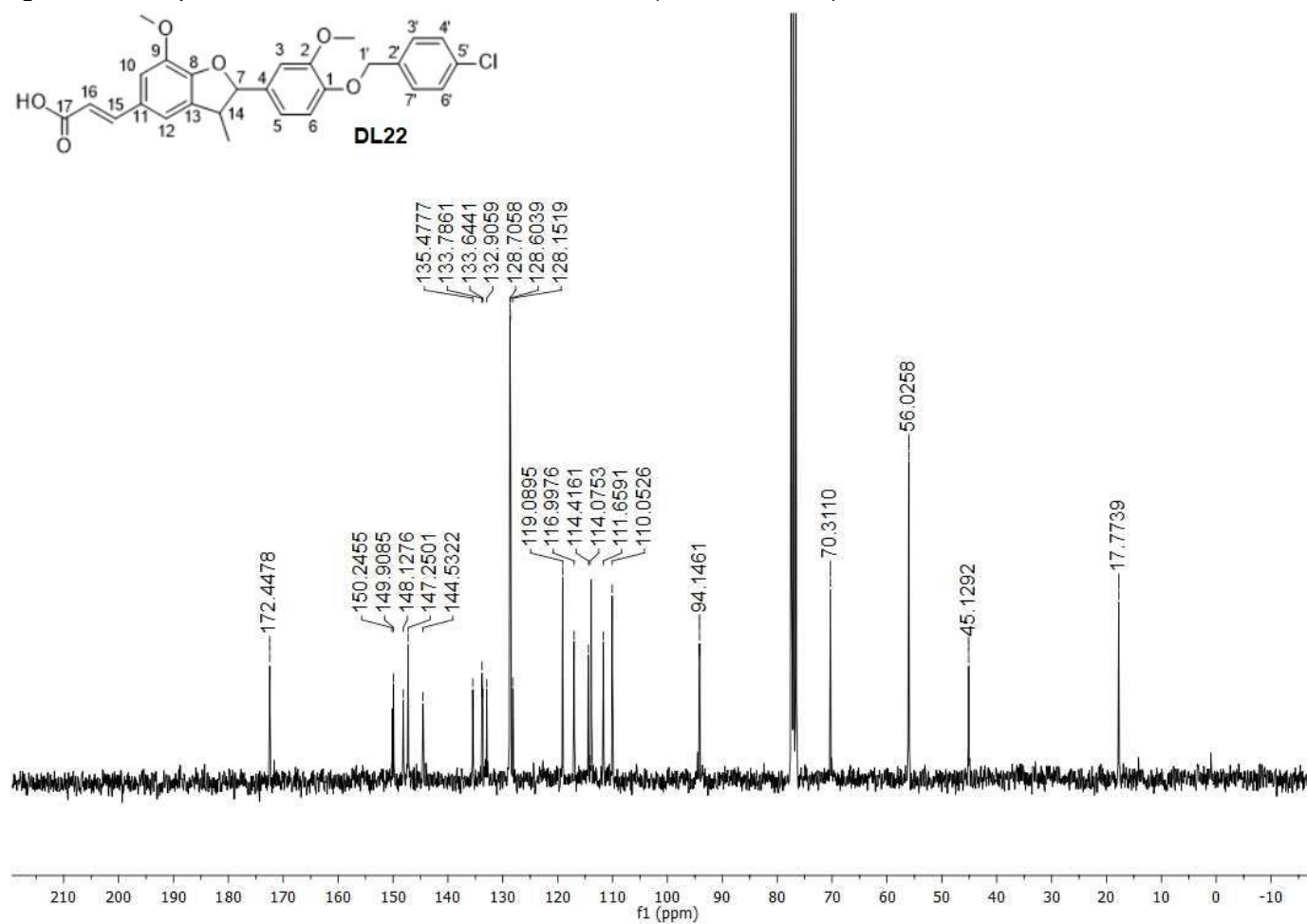


Fonte: Da autora.

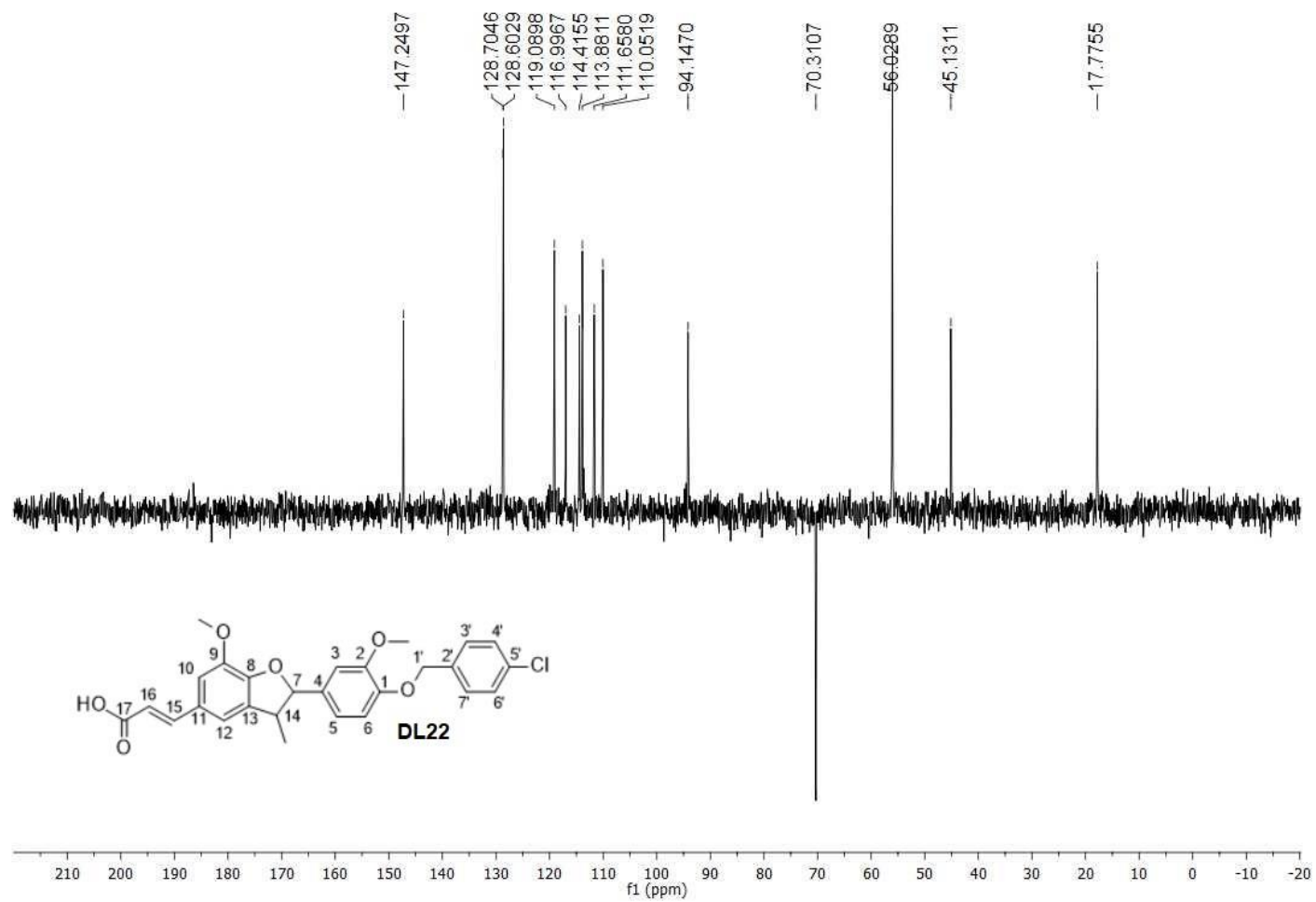
Figura 164 – Espectro de RMN de ^1H do derivado DL22 (CDCl_3 , 300 MHz).



Fonte: Da autora.

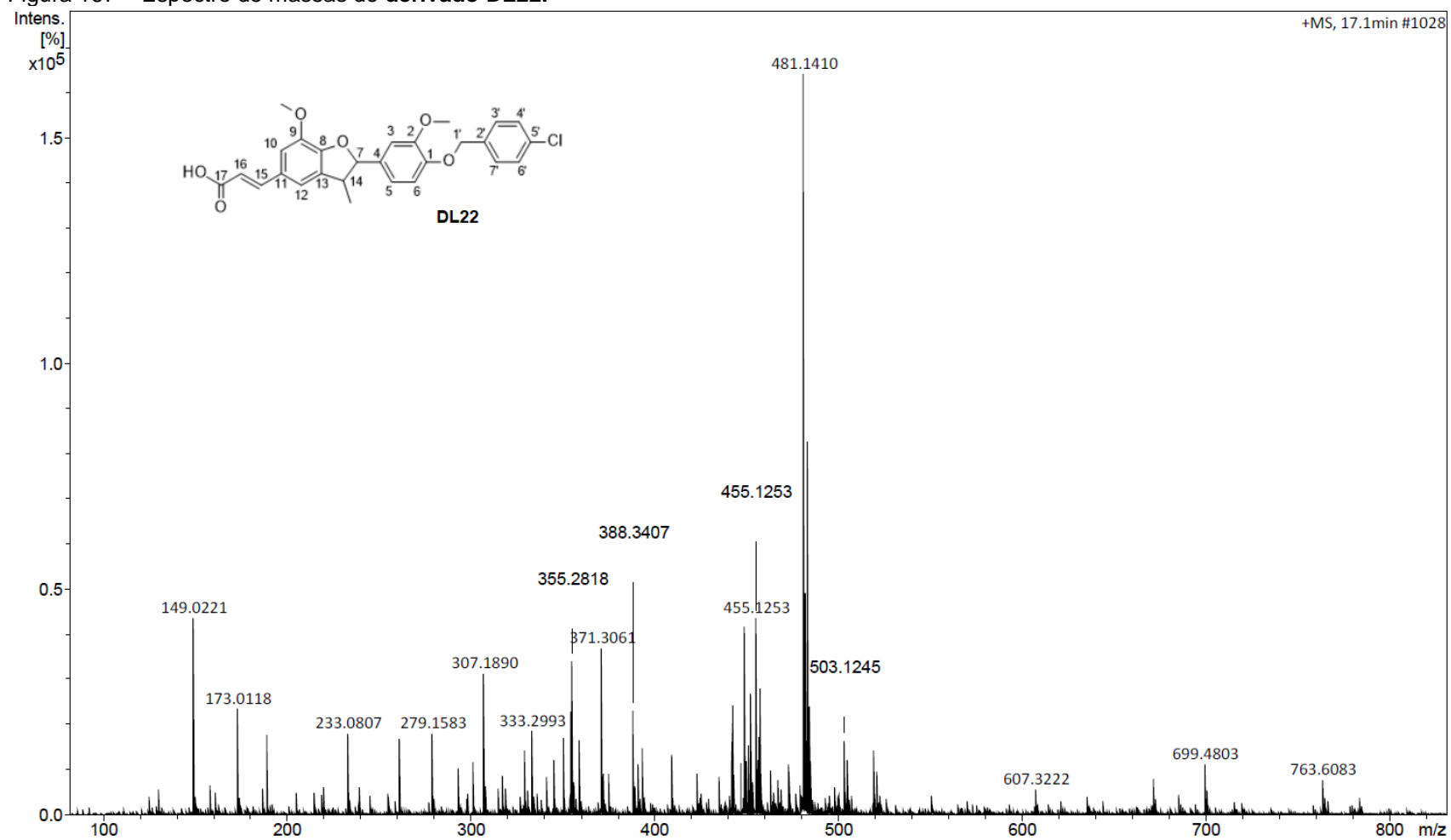
Figura 165 – Espectro de RMN de ^{13}C do derivado DL22 (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Da autora.

Figura 166 – Subespectro DEPT-135 do **derivado DL22** (CDCl₃, 75 MHz).

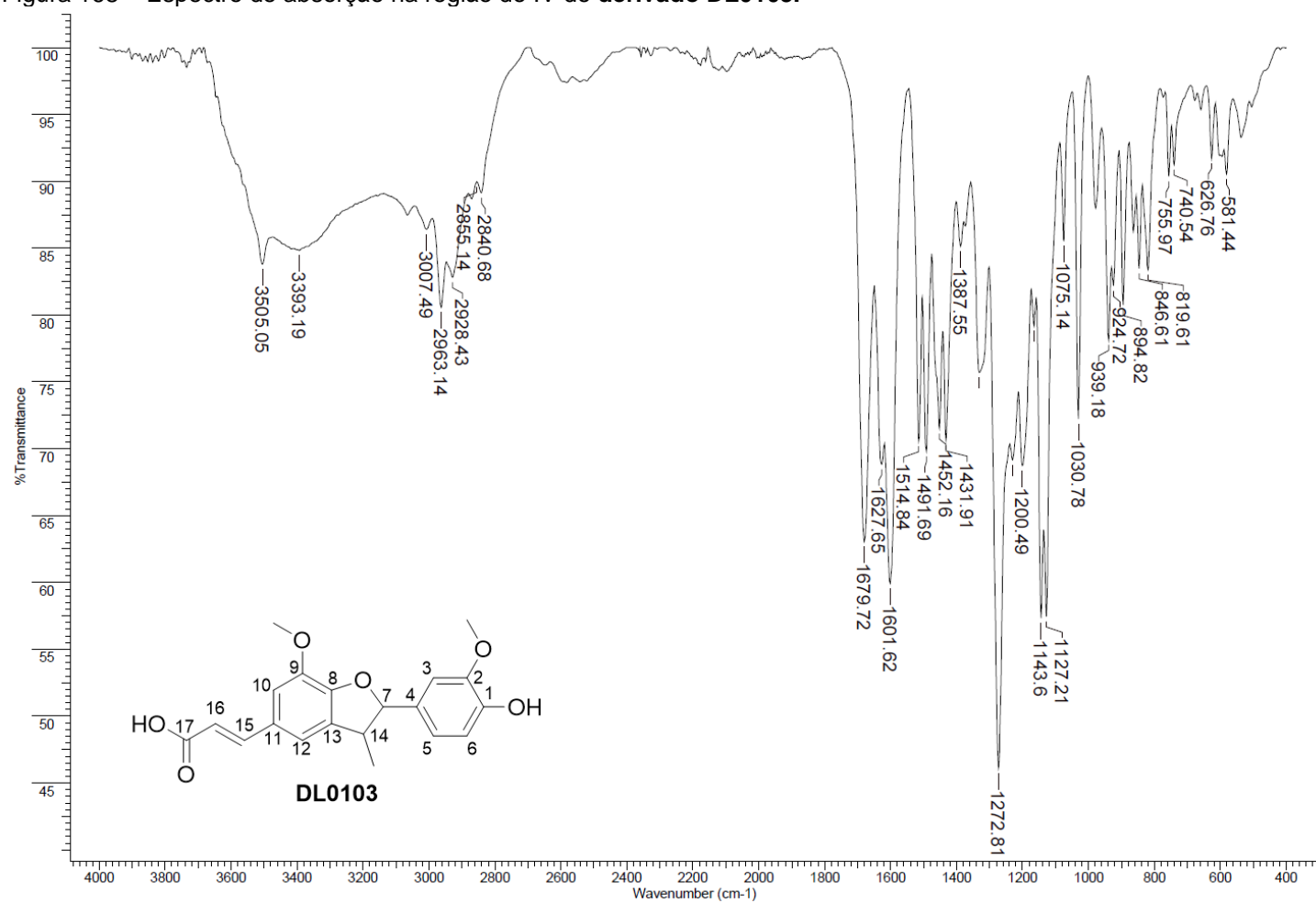
Fonte: Da autora.

Figura 167 – Espectro de massas do derivado DL22.



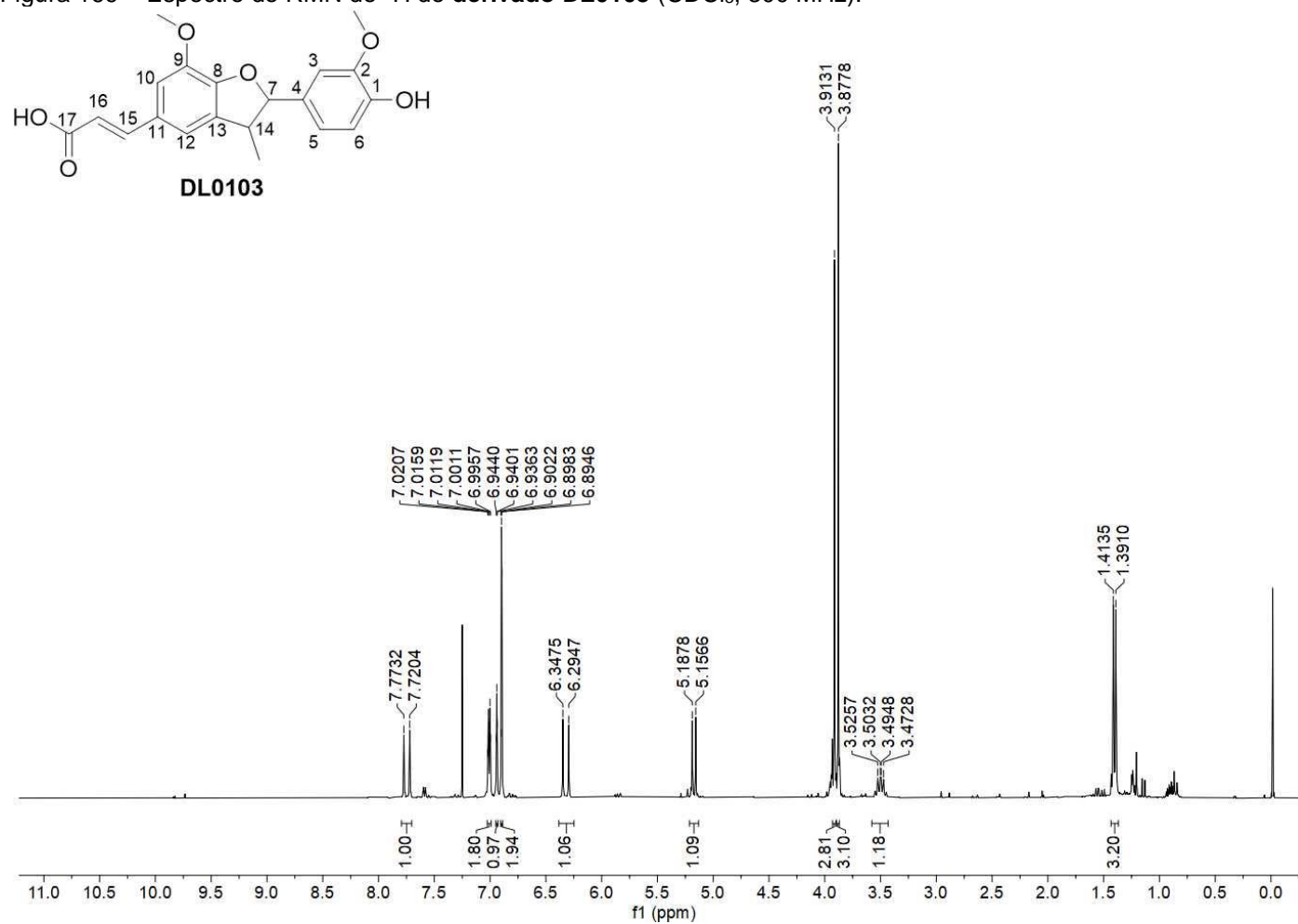
Fonte: Da autora.

Figura 168 – Espectro de absorção na região do IV do derivado DL0103.

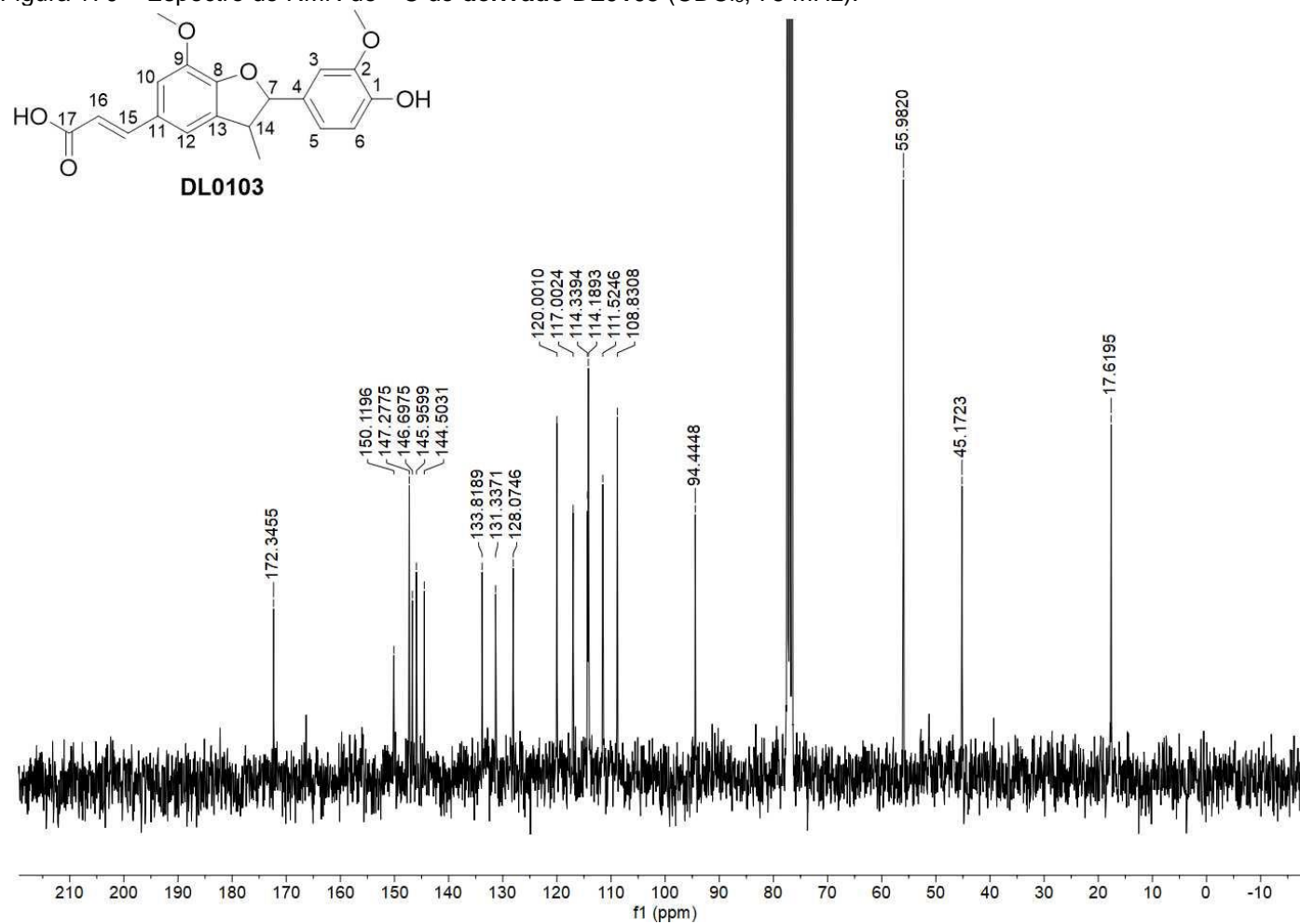


Fonte: Da autora.

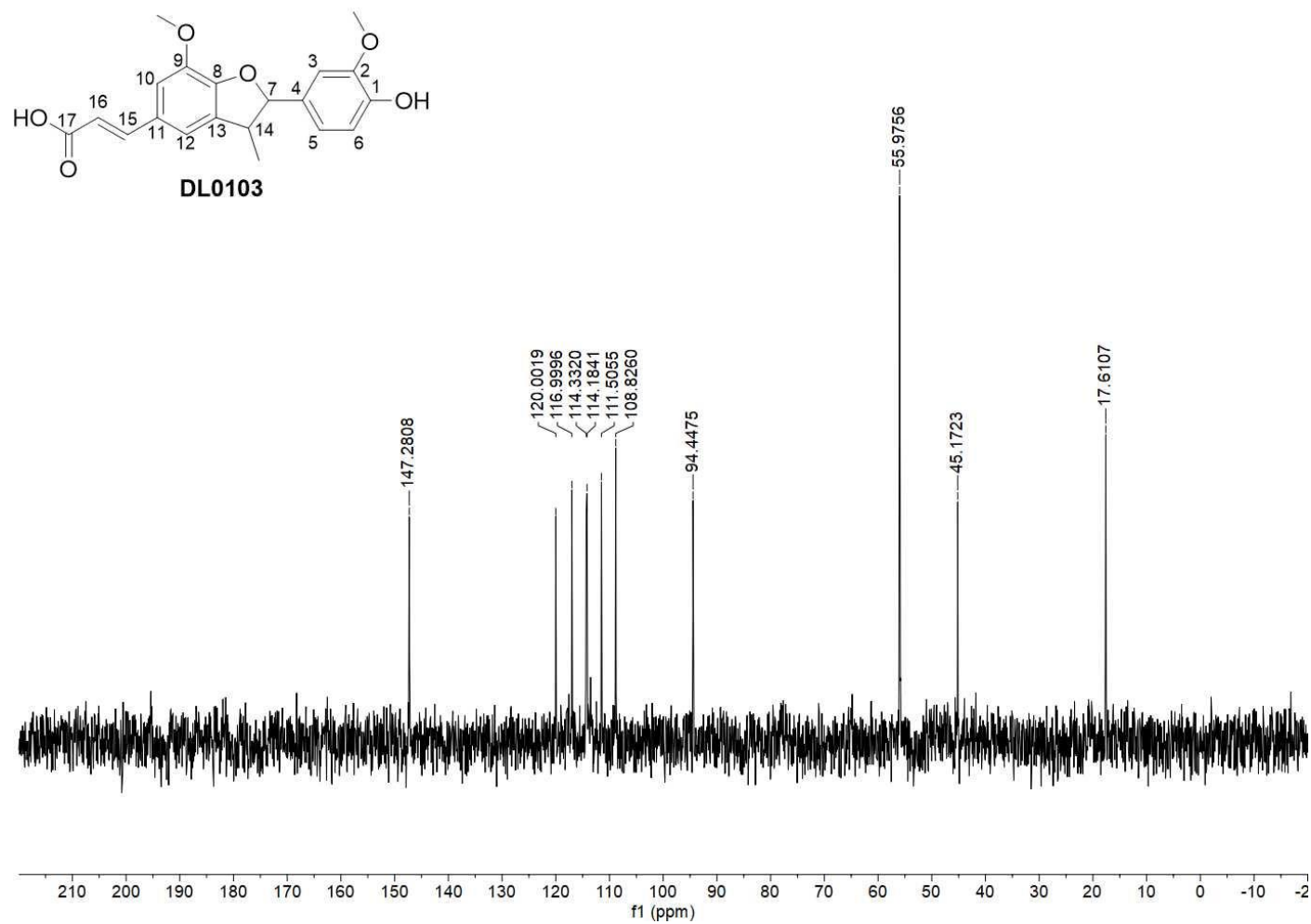
Figura 169 – Espectro de RMN de ^1H do derivado **DL0103** (CDCl_3 , 300 MHz).



Fonte: Da autora.

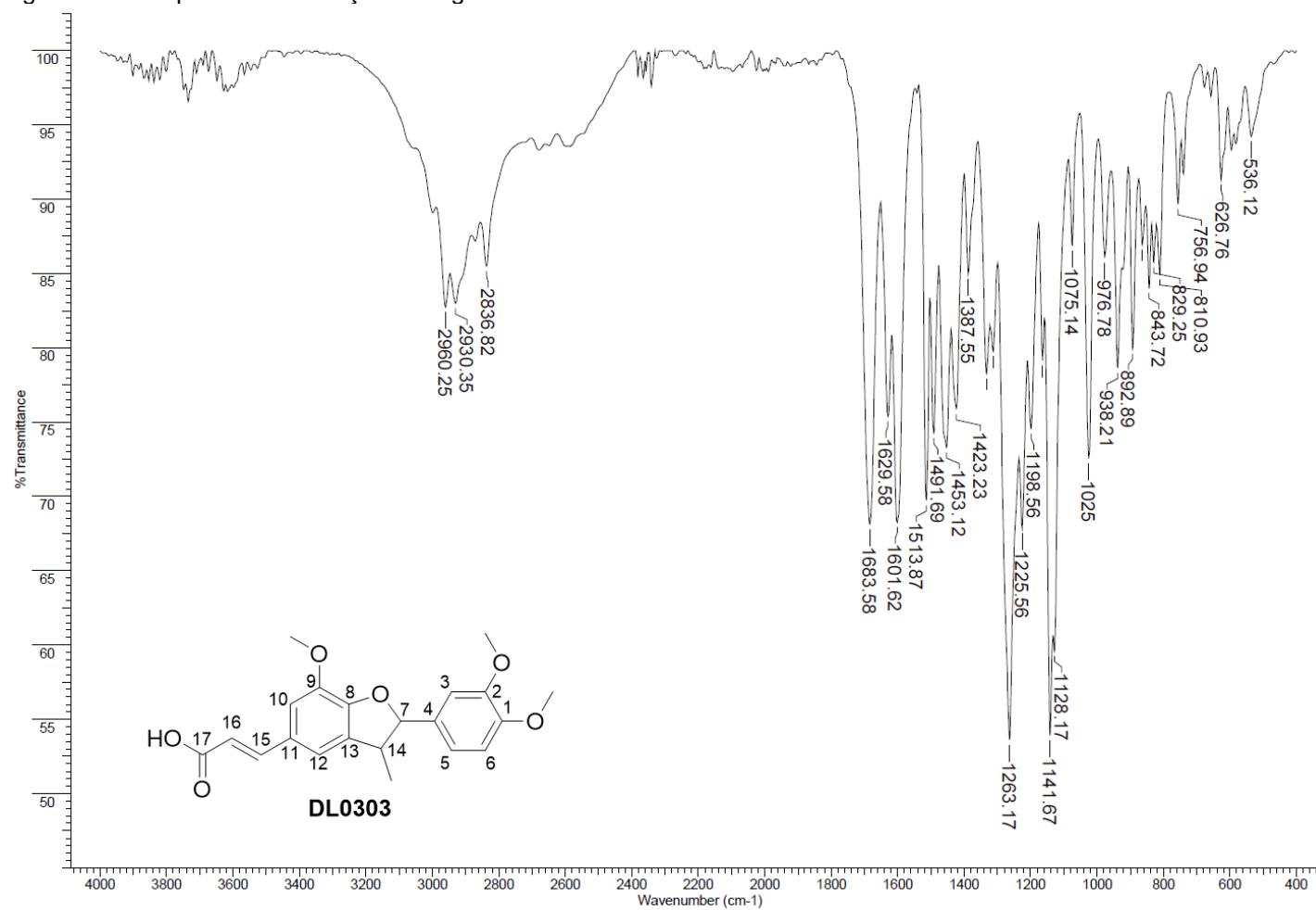
Figura 170 – Espectro de RMN de ^{13}C do derivado DL0103 (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Da autora.

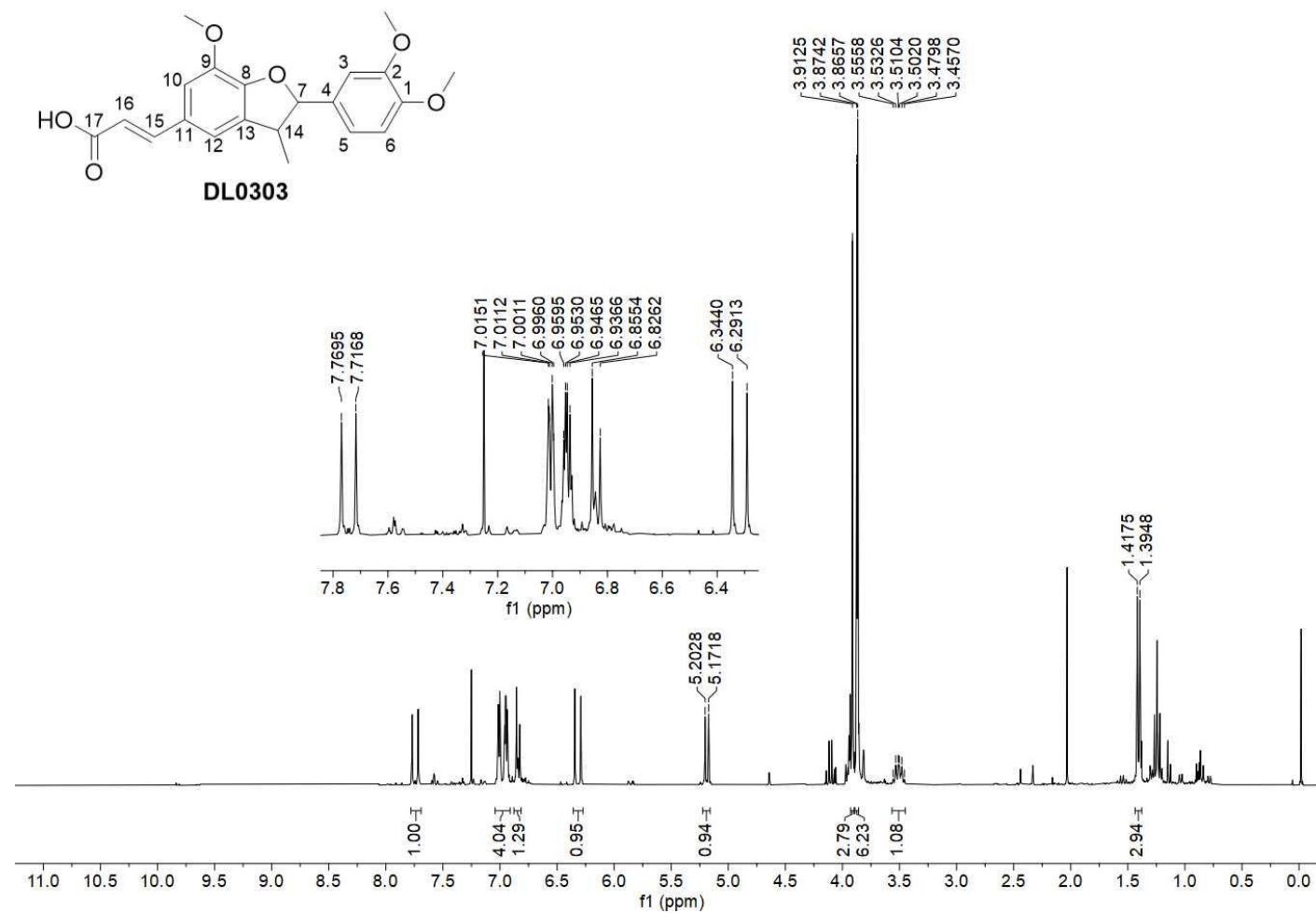
Figura 171 – Subespectro DEPT-135 do derivado DL0103 (CDCl₃, 75 MHz).

Fonte: Da autora.

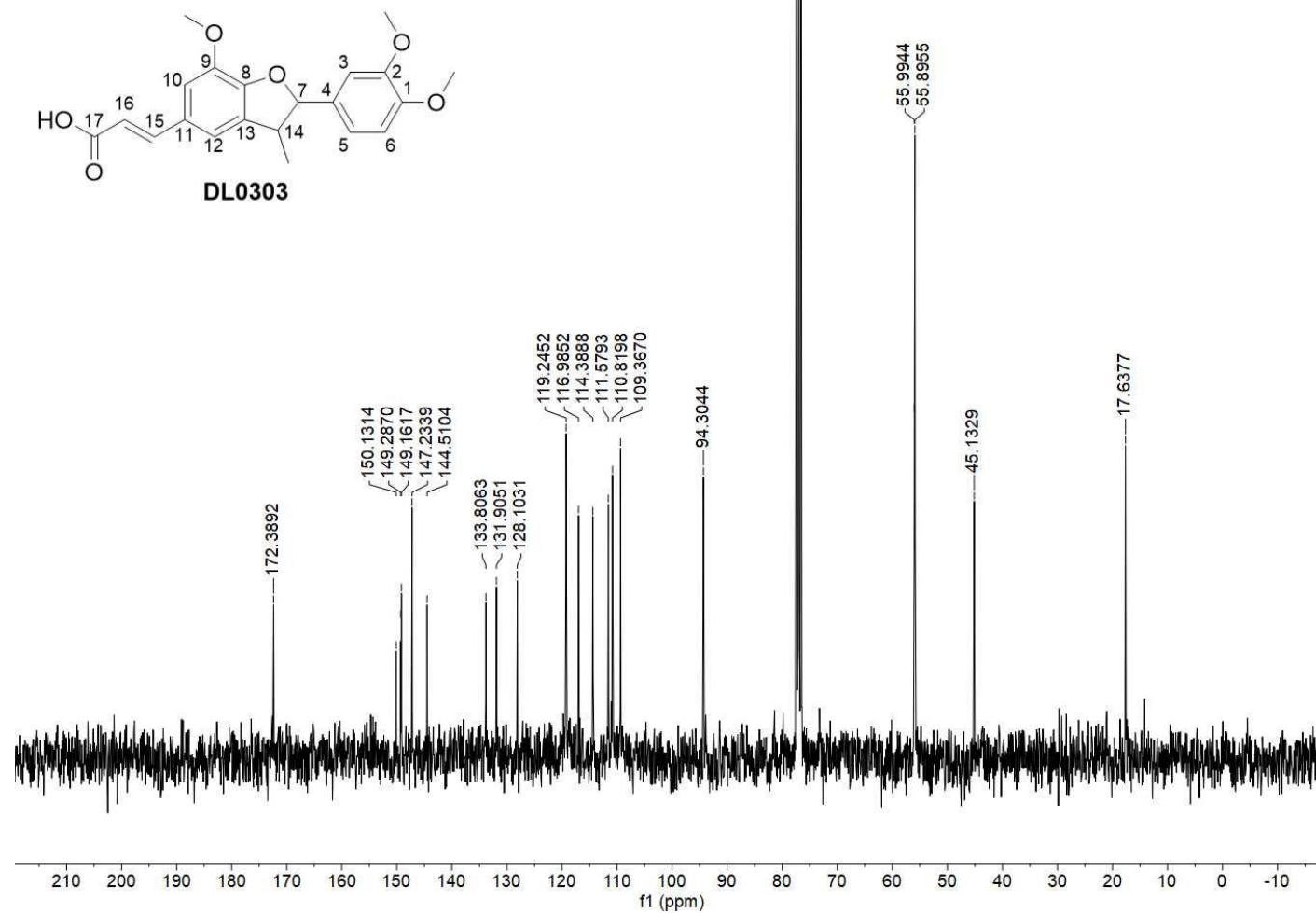
Figura 172 – Espectro de absorção na região do IV do derivado DL0303.



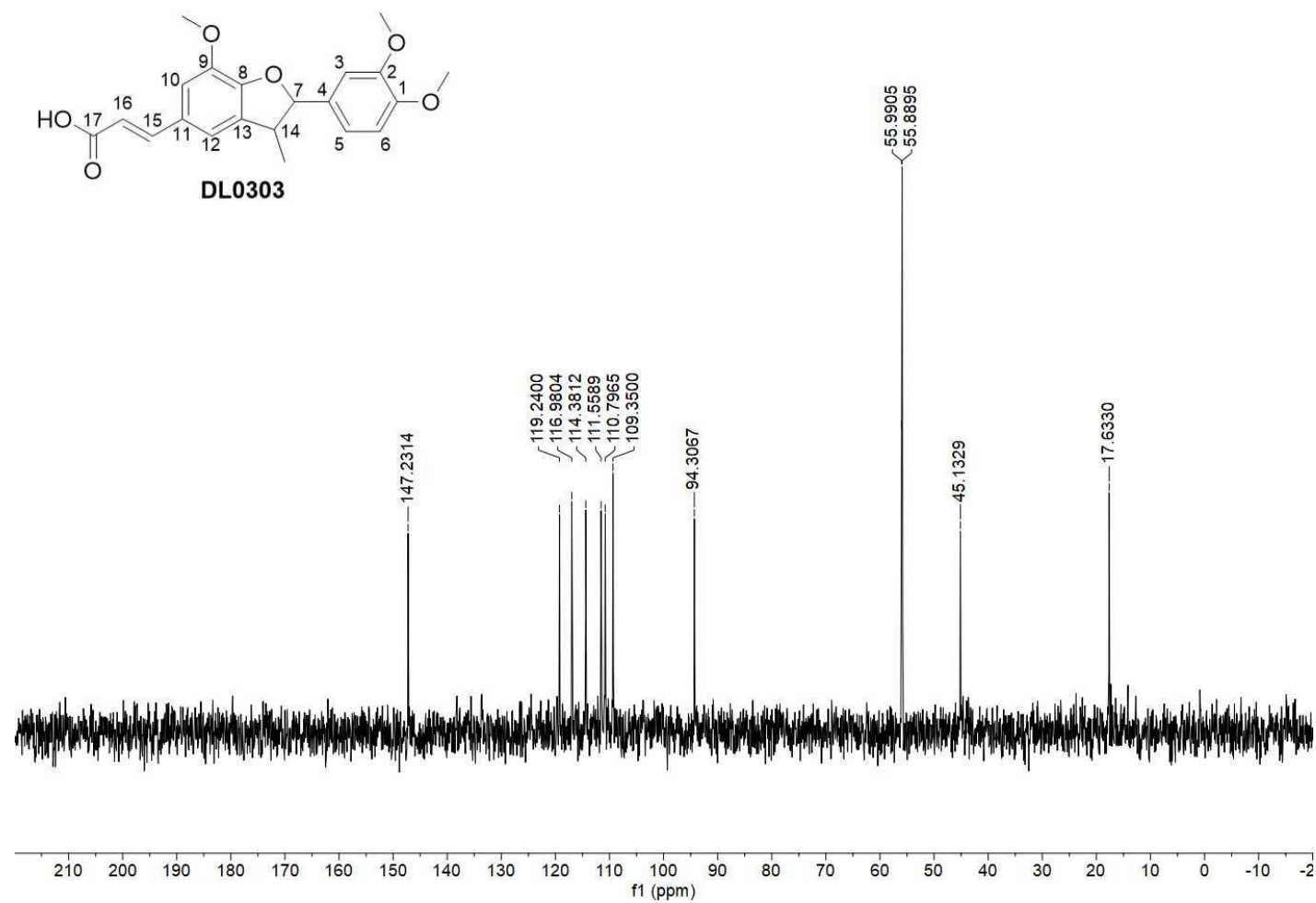
Fonte: Da autora.

Figura 173 – Espectro de RMN de ^1H do derivado DL0303 (CDCl_3 , 300 MHz).

Fonte: Da autora.

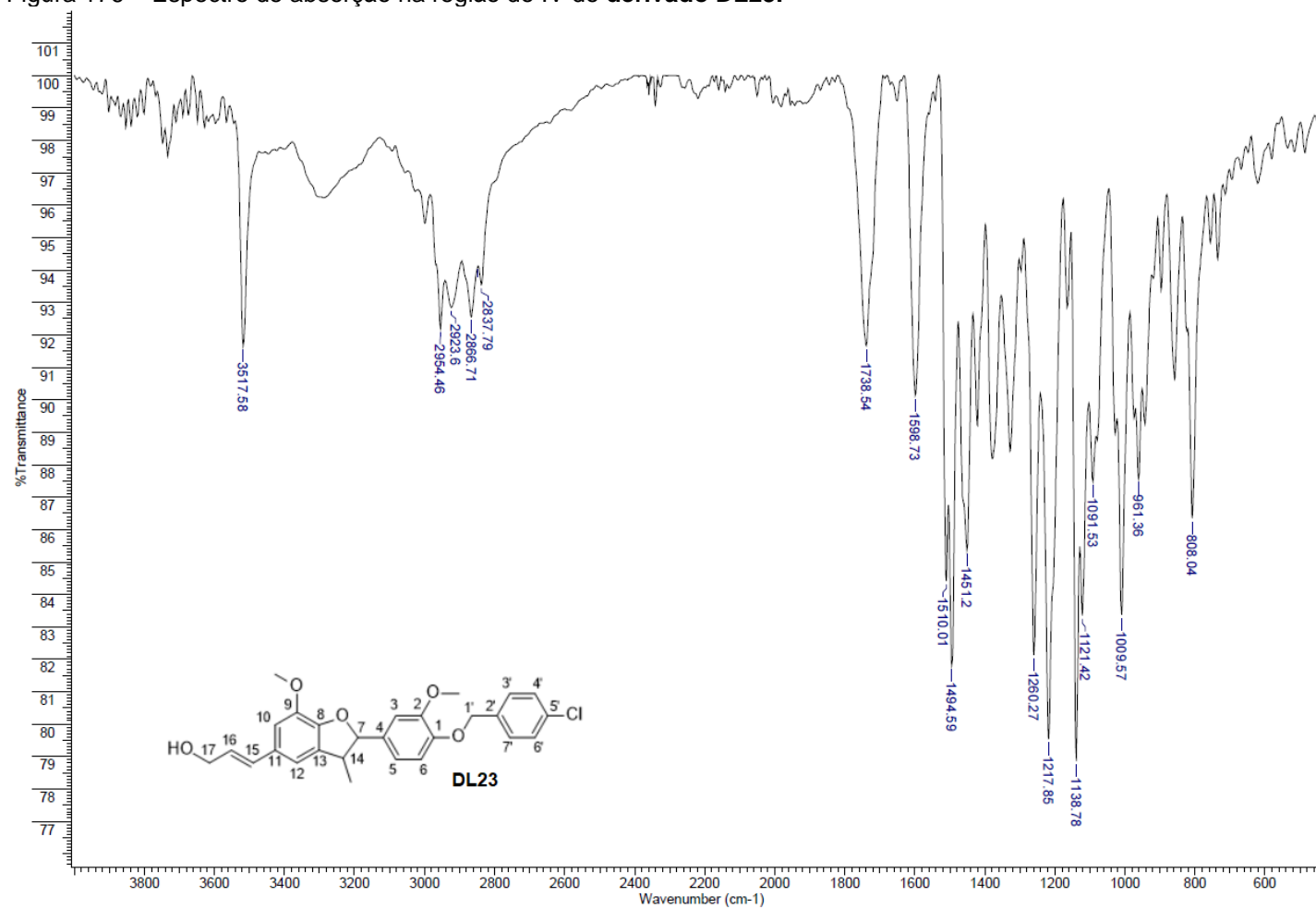
Figura 174 – Espectro de RMN de ^{13}C do derivado **DL0303** (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Da autora.

Figura 175 – Subespectro DEPT-135 do derivado DL0303 (CDCl₃, 75 MHz).

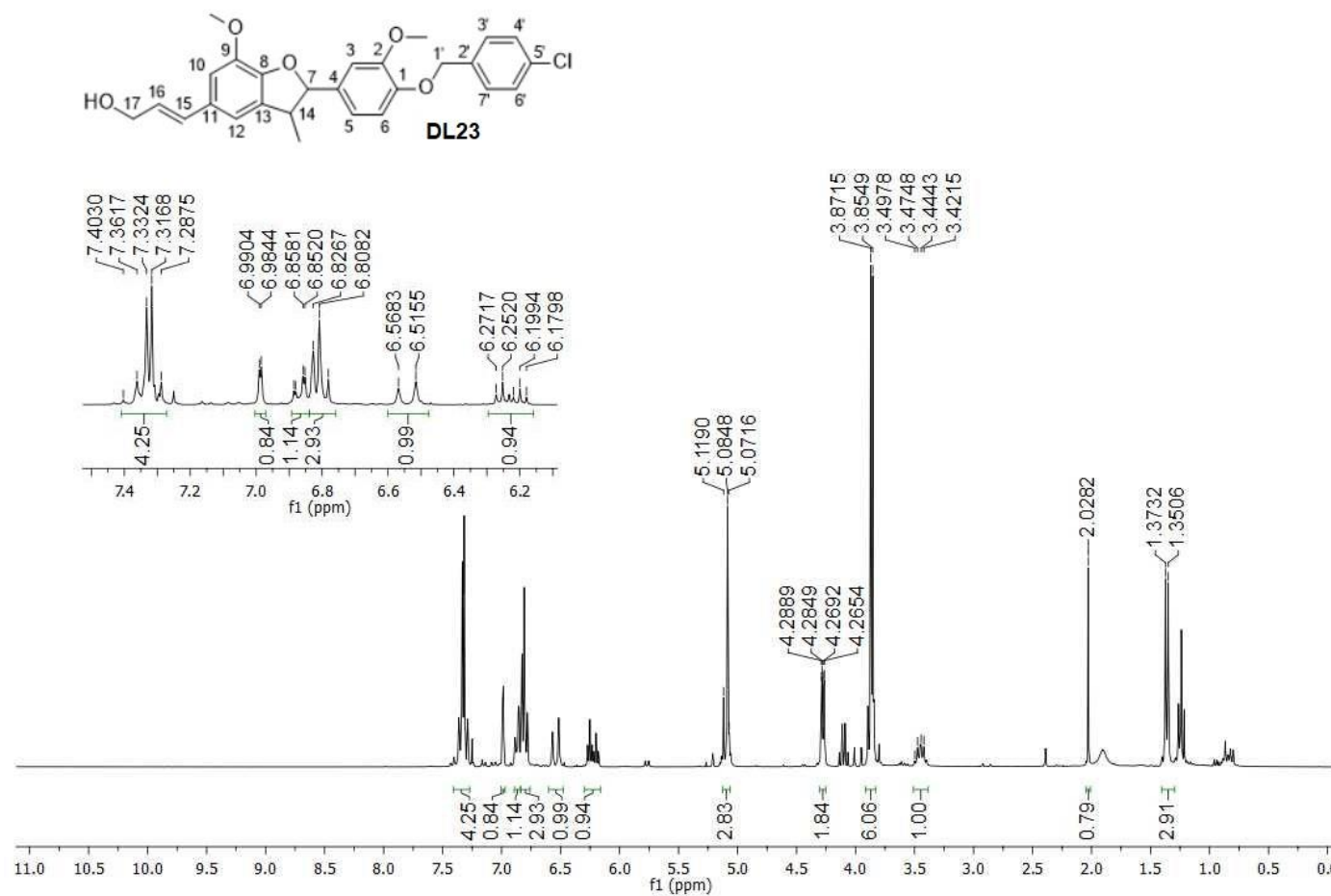
Fonte: Da autora.

Figura 176 – Espectro de absorção na região do IV do derivado DL23.

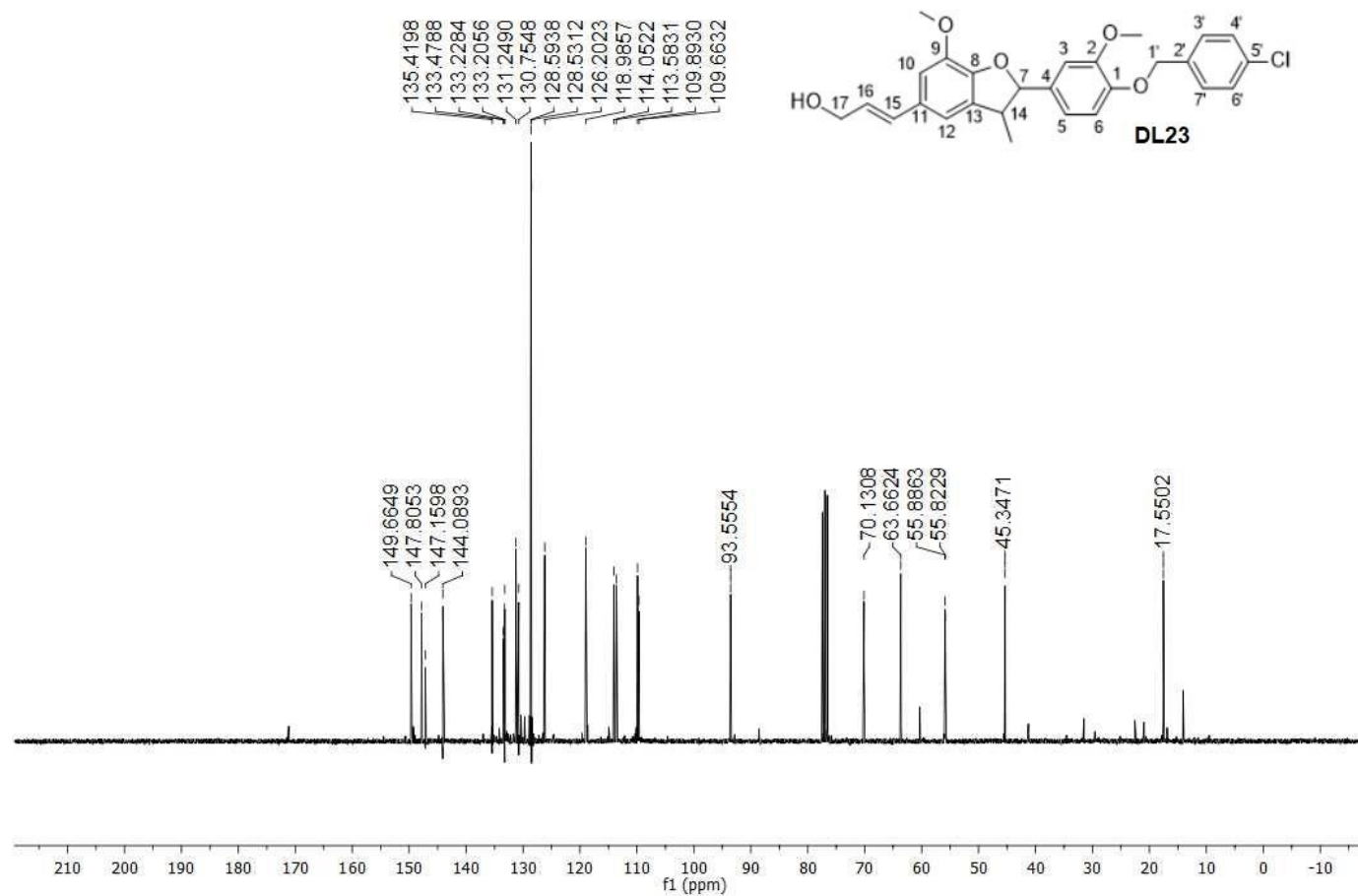


Fonte: Da autora.

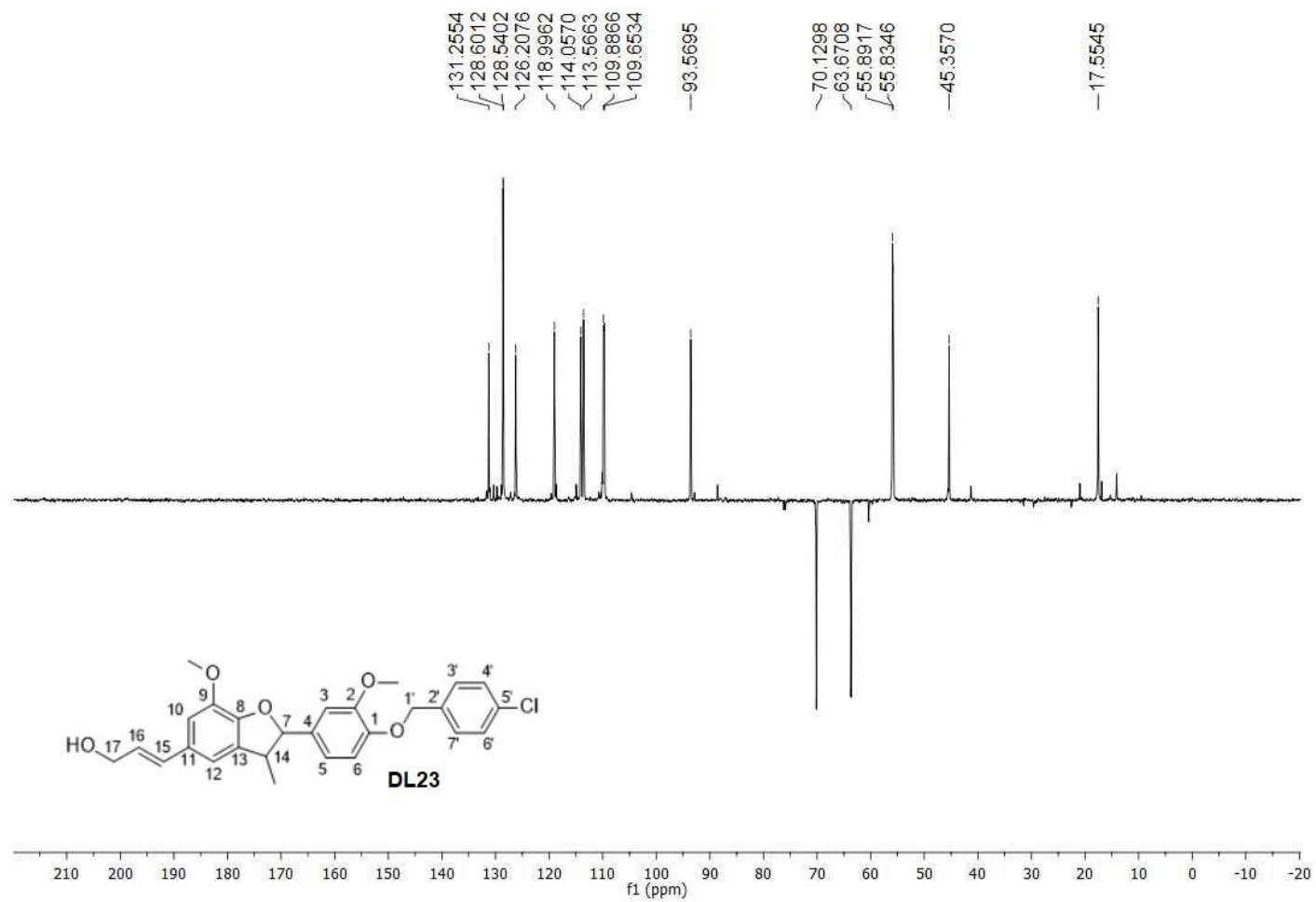
Figura 177 – Espectro de RMN de ^1H do derivado DL23 (CDCl_3 , 300 MHz).



Fonte: Da autora.

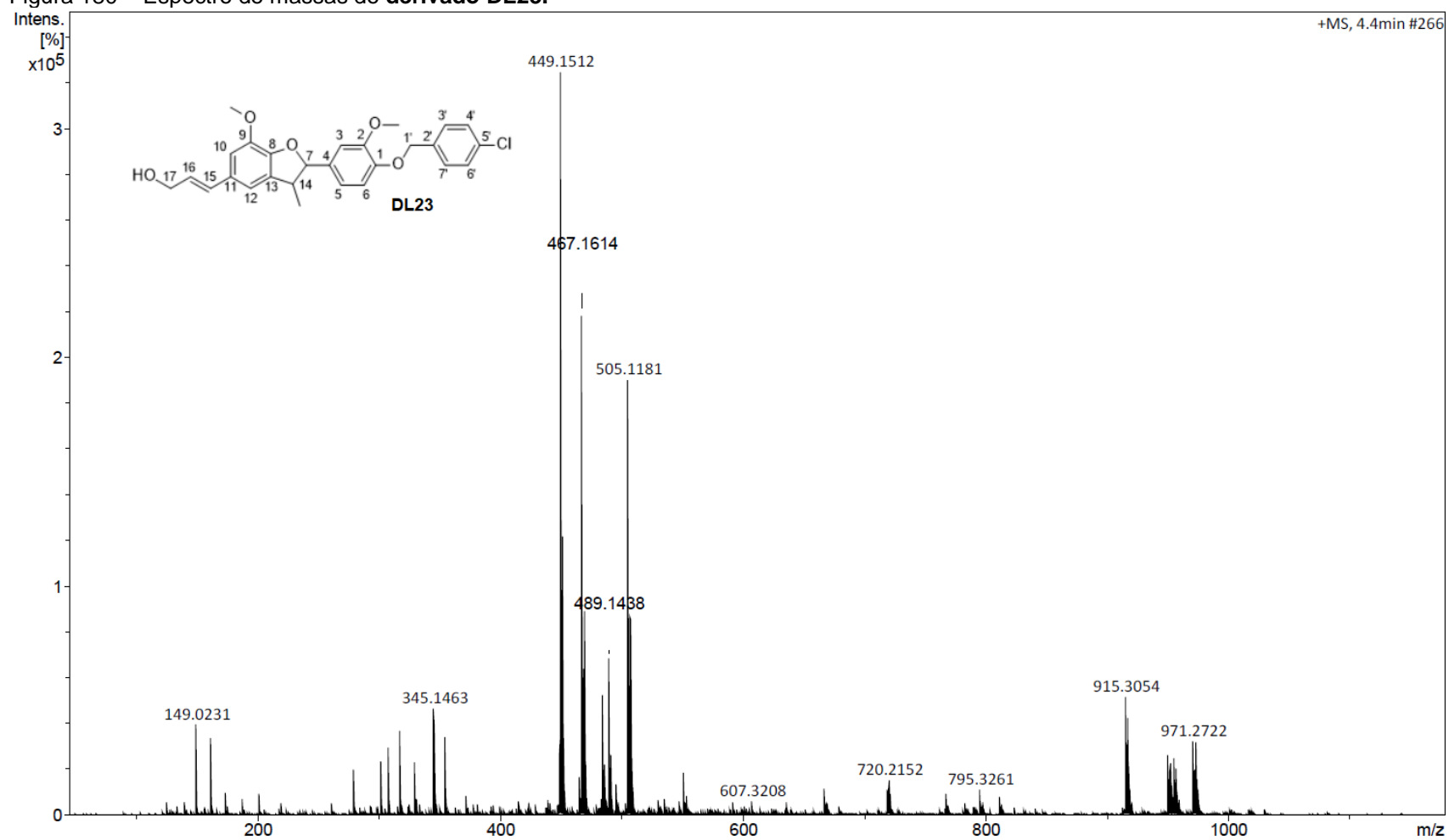
Figura 178 – Espectro de RMN de ^{13}C do derivado **DL23** (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Da autora.

Figura 179 – Subespectro DEPT-135 do **derivado DL23** (CDCl₃, 75 MHz).

Fonte: Da autora.

Figura 180 – Espectro de massas do derivado DL23.



Fonte: Da autora.

APÊNDICE B

Revista Brasileira de Farmacognosia
<https://doi.org/10.1007/s43450-021-00144-7>

REVIEW



Natural and Semi-synthetic Licarins: Neolignans with Multi-functional Biological Properties

Dalila Junqueira Alvarenga¹ · Eduardo de Figueiredo Peloso² · Marcos José Marques² ·
 Thiago Belarmino de Souza³ · Jamie Anthony Hawkes¹ · Diogo Teixeira Carvalho¹

Received: 21 January 2021 / Accepted: 17 February 2021
 © Sociedade Brasileira de Farmacognosia 2021

Abstract

Neolignans such as licarins are secondary metabolites found in many plant species which can be also obtained by organic synthesis and biosynthetic methodologies. This class of active plant principles has a dihydrobenzofuran nucleus derived from phenylpropanoids. They are extremely useful starting compounds which can be used in the semi-synthetic synthesis of analogues which may possess optimised and improved chemical and biological properties. Licarin A has been studied the most and has been shown to possess multi-functional biological properties ranging from cytotoxicity to antimicrobial activities and has even been used for the treatment of central nervous system complaints and metabolic disorders. In this review, the multi-functional biological properties of natural licarins and some of their semi-synthetic derivatives are discussed, along with the established mechanisms of action of these substances to demonstrate that they can be used as promising prototypes for the development of new medicinal drugs.

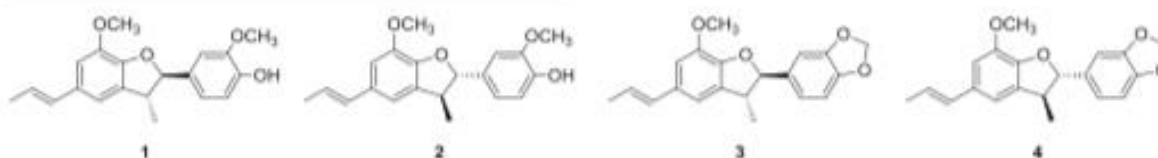
Keywords Antimicrobial · Antiparasitic · Benzofurans · Bioactive compounds · Cytotoxic · Triacylglyceride accumulation

Introduction

The search for new bioactive substances from plants is a current approach in the discovery of drugs, especially in tropical regions, which generally possess a wide biodiversity. This is evidenced by the fact that ~70% of the medicinal drugs approved for the treatment of diseases are directly derived from natural products or are synthetically produced analogues of these natural products (Araújo et al. 2014).

Licarins are natural heterocyclic products belonging to the neolignan class as first classified by Gottlieb (1978) and have great structural diversity and distinct biological activities. Of

the range of licarins that have been described, licarin A (2-methoxy-4-[7-methoxy-3-methyl-5-[(*E*)-prop-1-enyl]-2,3-dihydro-1-benzofuran-2-yl]phenol), in both of its (2*S*,3*S*)-(-) and (2*R*,3*R*)-(+)-enantiomeric forms (**1** and **2**) and licarin B (5-[7-methoxy-3-methyl-5-[(*E*)-prop-1-enyl]-2,3-dihydro-1-benzofuran-2-yl]-1,3-benzodioxole, also as (2,3) (±)-enantiomers (**3** and **4**), appear to be the most widely distributed in plants and the profusion of published work in various areas has proven their pharmacological potential, especially in the case of (±)-licarin A (Kim et al. 1991; Barbosa de Castro et al. 2013; Abourashed and El-Alfy 2016; Chiu et al. 2016; Wu et al. 2016).



Diogo Teixeira Carvalho
 diogo.carvalho@unifal-mg.edu.br

¹ Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG 37130-001, Brazil

² Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG 37130-000, Brazil

³ Escola de Farmácia, Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG 35400-000, Brazil

Licarin A, or *trans*-dehydrodiisoeugenol (**1** and **2**), is a neolignan with a dihydrobenzofuran structure found in numerous medicinal and edible species (*e.g.*, nutmeg). This neolignan may be obtained semi-synthetically by the oxidative dimerisation of the phenylpropanoid isoeugenol (Scheme 1). This has been demonstrated in the literature by various researchers including Chioccare et al. (1993), Rodrigues et al. (2017), Hernández-Vázquez et al. (2011), Vasudevan and Bhat (2011), Liu et al. (2013), Chen et al. (2013) and Mardhatillah et al. (2016).

In this review, the biological activities of natural licarins and similar semi-synthetic products are discussed along with their established mechanisms of action. This review only covers natural and semi-synthetic neolignans of the licarin-class; however, these structures can be produced synthetically in the laboratory to create related molecules which may have potential clinical benefit, although they are not the focus of this contribution.

Search Strategy

This study is a narrative review on natural and semi-synthetic licarins which was based on an extensive literature review using PubMed, Google Scholar, ScienceDirect, SciFinder and Scielo databases. The keywords used as search terms included the following (both individually and in various combinations thereof): licarins, neolignan, dehydrodiisoeugenol, eugenol, isoeugenol, antioxidant, antimicrobial activity, antibacterial, antimycobacterial, anti-inflammatory, antifungal activity, antiviral activity, antiparasitic activity, antiprotozoal activity, antiparasitic activity. Reference lists in the identified papers were also searched, and additional publications were subsequently traced online. Inclusion criteria were papers reporting the isolation or identification of licarins or neolignan compounds and their biological activities.

Discussion

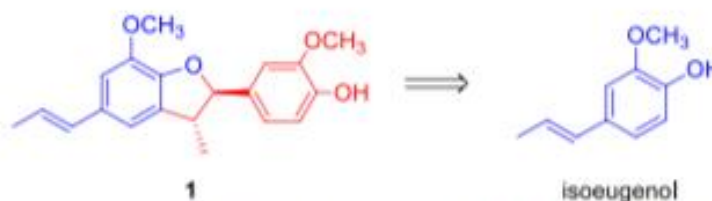
Licarins

Neolignans are heterocyclic compounds which are characterised by the fusion of the benzene and furan rings

(*i.e.*, benzofurans) to form more complex structures which have wide pharmacological properties (Shamsuzzaman 2015; Ha et al. 2020). They are commonly found as substructures within more complex structures which have wide pharmacological properties. Neolignans derived from a dihydrobenzofuran, eupomatenoid, are reduced structural analogues of benzofurans that possess asymmetry due to the presence of two chiral carbons, *e.g.*, compounds **1–4**. The bioactive neolignans which are known as licarins have this type of structural skeleton (Bertolini and Pineschi 2009; Liu et al. 2013; Shamsuzzaman 2015).

Due to the fact that some neolignans have chirality, they can be found in nature as enantiomerically pure forms or as a mixture of various stereoisomers. In this way, it is possible to find two enantiomeric forms of the same neolignan in the same plant species (Pereira et al. 2011a). Neolignans accumulate in wood as a response to mechanical injuries or the invasion of fungi or bacteria and licarins have been isolated from various plant species, such as the roots of *Krameria cytisoides* Cav., Krameriaceae; the leaves of *Magnolia ovata* (A. St-Hil.) Spreng., Magnoliaceae; and the seeds of nutmeg, *Myristica fragrans* Houtt., Myristicaceae (Abe et al. 2002; Singh et al. 2005; Liu et al. 2013; Sawasdee et al. 2013; Francis et al. 2019). Licarins have displayed various biological activities including anti-herpetic (Sawasdee et al. 2013), antibacterial (Singh et al. 2005), antimycobacterial (Léon-Díaz et al. 2010), anti-inflammatory (Murakami et al. 2005), antioxidant (Arellanes et al. 2011), trypanocides and leishmanicides (Souza et al. 2012).

When isolated from natural sources, licarins are generally obtained in a low yield; therefore, synthetic methods have been developed to obtain them in larger quantities. As an example, there are reports of obtaining (\pm)-licarin A (**1**) from isoeugenol by biosynthetic methodologies using peroxidases (Chioccare et al. 1993), green coconut (*Coccus nucifera*) water (Rodrigues et al. 2017), *Coriandrum sativum* cell culture (Hernández-Vázquez et al. 2011) and *Pseudomonas putida* cell culture (Vasudevan and Bhat 2011). As non-biosynthetic methods, the use of oxidising reagents such as silver oxide (Liu et al. 2013), cerium ammonium nitrate (Chen et al. 2013) and iron (III) chloride (Mardhatillah et al. 2016), have been reported as isoeugenol dimerisation agents. Aiba and Gottlieb (1975) proposed the synthesis of (\pm)-licarin B (**3**



Scheme 1. Retrosynthetic analysis for licarin A (**1**), which may be obtained semi-synthetically by the oxidative dimerisation of the phenylpropanoid isoeugenol. Reproduced from Alvarenga et al. (2020)

and **4**) by pyrolysis of a specific aryl cinnamyl ether. It is worth highlighting that all of these synthetic preparation methods produce licarins as a mixture of enantiomers. Pereira et al. (2011b) developed a chiral high-performance liquid chromatography method to resolve the mixture with an enantiomeric excess (EE) > 99.9% (Fig. 1).

Neolignans are the major constituents of *M. fragrans*, of which approximately 35.1% are benzofuranoid neolignans. About 32 compounds of this class of natural products have been isolated from the aril, seed, fruit, fruit pericarp and stem bark of this aromatic evergreen tree with a pleasant aroma and taste (Ha et al. 2020). The plant is well known as a commercial source of mace (aril) and nutmeg (seed), which have long been

widely used as culinary spices. In addition, various parts of *M. fragrans* have been used in traditional medicine for treating several diseases and widely cultivated for commercial purposes in many countries, including Indonesia, Thailand, Japan, China, South Africa and India.

In addition to (\pm)-licarins A and B, licarin C (7-methoxy-3-methyl-5-[(*Z*)-prop-1-enyl]-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-2,3-dihydro-1-benzofuran **5**), licarin D [(2*S*,3*S*)-2,3-dihydro-2-(3,4-dimethoxyphenyl)-7-methoxy-3-methyl-5-(*E*-propenyl) benzofuran **6**], isolicarin A (2-methoxy-4-[(2*S*,3*R*)-7-methoxy-3-methyl-5-[(*E*)-prop-1-enyl]-2,3-dihydro-1-benzofuran-2yl]phenol **7**), odoratisol A (3'-methoxy-licarin A; 2,6-dimethoxy-4-[(2*S*,3*S*)-7-methoxy-3-methyl-5-[(*E*-

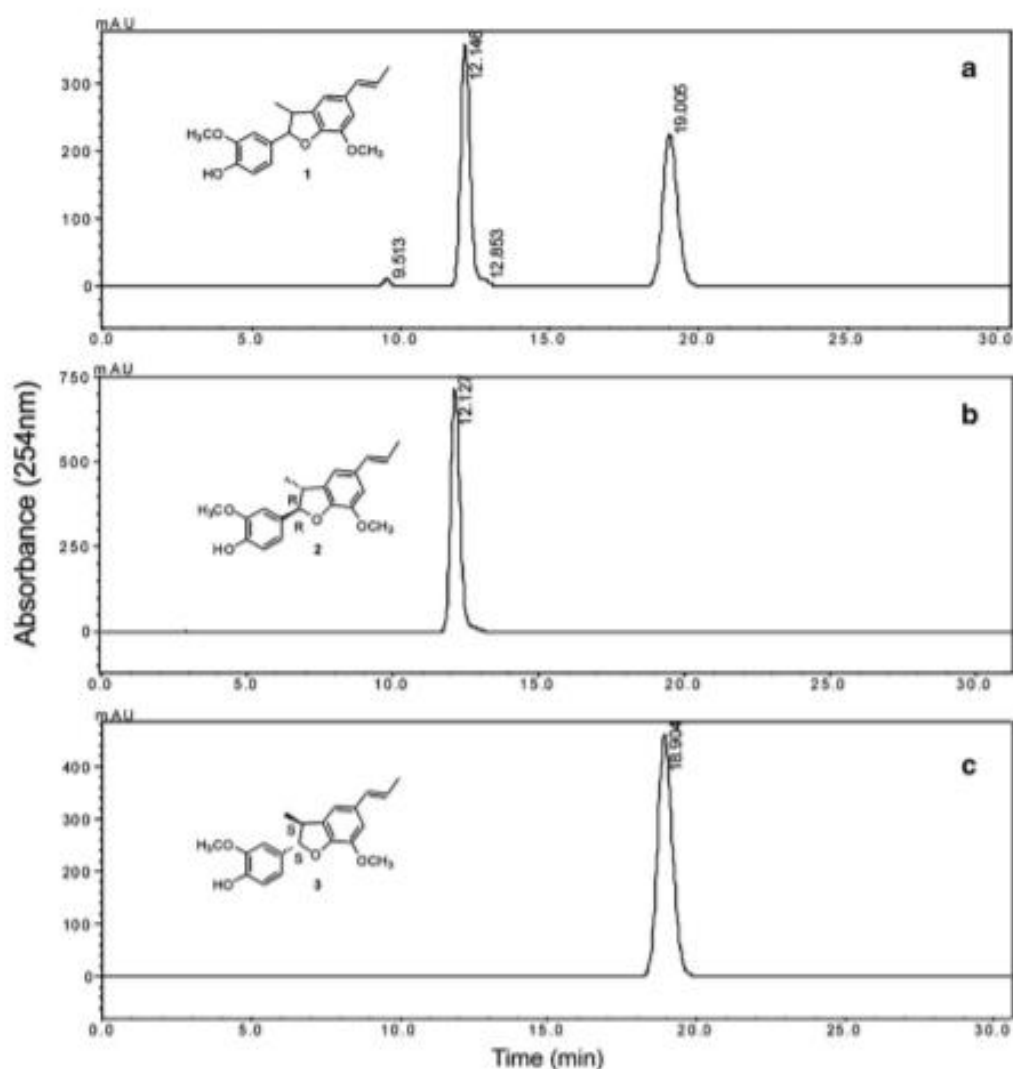
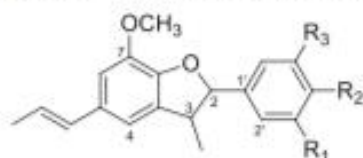


Fig. 1 Chiral HPLC chromatograms of (\pm)-licarin A (a), (+)-licarin A (b; Rt = 12.13 min) and (-)-licarin A (c; Rt = 18.90 min) at 254 nm with a PDA detection. Instrumental conditions: chiral HPLC with an analytical

CHIRALPAK AD (0.46 cm \times 25 cm) column; mobile phase (*n*-hexane:2-propanol 9:1, v/v) flow rate = 1.0 ml/min and samples volumes injections of 20 μ l. Reproduced from Pereira et al. (2011b)

prop-1-enyl]-2,3-dihydro-1-benzofuran-2-yl]phenol **8**), 3'-methoxy-licarin B (**9**) and maceneolignan B [(2*R*,3*R*)-3'-methoxy-licarin B **10**] has been isolated from *M. fragrans*, *inter alia* (Ha et al. 2020). The enantiomer levorotatory (2*S*,3*S*)-(-) of licarin B (**3**) have been also described as licarin E (Kwon et al. 2011). (±)-Licarins A and B are, until now, the most explored in evaluations of their biological potential.



- 5** 2,3 *trans* R₁=R₂=R₃=OCH₃
6 2*S*,3*S* R₁=R₂=OCH₃; R₃=H
7 2*S*,3*R* R₁=H, R₂=OH; R₃=OCH₃
8 2*S*,3*S* R₁=R₃=OCH₃; R₂=OH
9 2*S*,3*S* R₁=OCH₃; R₂=R₃=OCH₂O
10 2*R*,3*R* R₁=OCH₃; R₂=R₃=OCH₂O

Biological Potential of Licarins

Antimycobacterial Activity

Léon-Díaz et al. (2010) have published studies on the antimycobacterial activity of (-)-licarin A (**1**) and (-)-licarin B (**3**) which were isolated from the root of *Aristolochia taliscana* Hook & Arn., Aristolochiaceae, in which it was observed that compound **3** was moderately active against the H37Rv strains of *Mycobacterium tuberculosis* and mono-resistant variants, with a minimum inhibitory concentration (MIC) value of 25–50 µg/ml. In addition to being active against most strains of multi-resistant *M. tuberculosis* (MIC of 12.5–50 µg/ml), compound **1** also exhibited moderate activity against the *M. tuberculosis* H37Rv strain (MIC of 25 µg/ml) but was more active against mono and multi-resistant *M. tuberculosis* (MIC of 3.12–12.5 µg/ml). In addition, **1** also demonstrated activity against non-tuberculosis mycobacteria with MIC values of 6.25 µg/ml for *M. avium*, *M. smegmatis* and *M. fortuitum*, and an MIC of 3.12 µg/ml for *M. chelonae*.

Furthermore, Léon-Díaz et al. (2013) published results on the *in vivo* anti-tuberculosis activity of the isomer (-)-licarin A (**1**). The published data demonstrated a significant decrease in the bacterial load in the lungs of rodents which were infected with the *M. tuberculosis* H37Rv and multi-resistant strains after treatment with this neolignan. A notable decrease in pneumonia was also observed in the treated animals, especially in those infected with the *M. tuberculosis* H37Rv strain.

Recently, Jiménez-Arellanes et al. (2014) and Gómez-Cansino et al. (2017) have reviewed the potential of plant

metabolites as anti-*M. tuberculosis* agents. Muniyan and Jayaraman (2017) showed that licarin A was amongst the five most interesting compounds with antitubercular activity, showing potential against a wide variety of *M. tuberculosis*-resistant strains.

Antiparasitic Activity

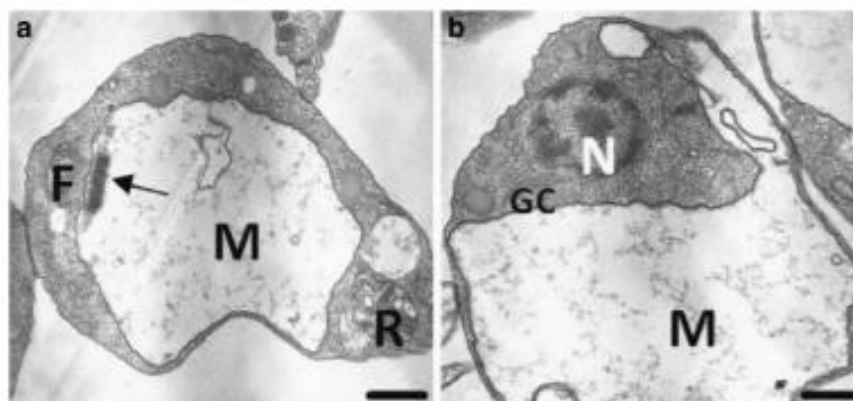
Chagas disease is a neglected tropical disease which is caused by *Trypanosoma cruzi* and affects approximately 8 million people in Latin America, with more than 25 million people at risk of contracting it (Rassi Jr. et al. 2010). Studies published by Abe et al. (2002) demonstrated that (-)-licarin A (**1**) has significant activity against epimastigote forms of *T. cruzi*, acting with an IC₅₀ of 62 µM. In addition, it was possible to demonstrate that licarin B has no activity against the parasite, which may suggest the importance of free phenolic hydroxyl groups for the trypanocidal activity of licarins.

Pereira et al. (2011a) reported important differences in the activity of licarin A due to its stereochemistry. These authors pointed out that (±)-licarin A, in a racemic form (**1** and **2**), has *T. cruzi* activity reduction (IC₅₀ of 127.17 µM) when compared to its isolated enantiomers. Specifically, it was observed that (-)-licarin A (**1**) showed greater potency (IC₅₀ of 23.5 µM) than (+)-licarin A (**2**; IC₅₀ of 87.7 µM), indicating that the absolute configuration directly affects its ability to interact with the parasite's molecular target of action.

Cabral et al. (2010) evaluated the trypanocidal effect of the (-)-licarin A (**1**) which itself was isolated from *Nectandra megapota mica* (Spreng.) Mez, Lauraceae, and then tested against the trypomastigote forms of *T. cruzi*, where they observed the induction of death of the parasite with a 24 h IC₅₀ of 960 µM. As observed by means of transmission electron microscopy (Fig. 2), the ultrastructure of the parasites was strongly affected by compound **1**. Parasites presented swollen mitochondria that generally occupied most of the cytoplasm and caused disorganisation of the internal mitochondrial cristae (Figs. 2a and b). In addition, some treated parasites presented condensed and disorganised kDNA (Fig. 2a).

Although the molecular target of action of (-)-licarin A (**1**) as a trypanocide has not yet been confirmed, evidence indicates that its antiparasitic action is due to its involvement in processes which are related to oxidative damage, which further increases the possibility of involvement of the trypanothione reductase enzyme according to Souza et al. (2012). This particular enzyme is essential for maintaining trypanothione in its reduced form of dihydrotrypanothione [T(SH)₂, N¹, N⁸-bis(glutathionyl) spermidine], and thus is capable of transferring reduced equivalents from NADPH to the different peroxidases contributing to maintaining a reduced intracellular environment in the parasite (Castro and Tomás 2008).

Fig. 2 Transmission electron microscopy of epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* (Y strain). (a and b) Treated for 24 h with 100 mM of (-)-licarin A (**1**). Parasites treated with these compounds presented a high cellular disorganization with organelles completely altered as well as mitochondrion (M) completely swollen. The rDNA also suffered alterations as pointed by the arrow in a. There was also an intense swelling of the mitochondrion (M). Reproduced from Cabral et al. (2010)



The effective action against the *Leishmania* parasite of (-)-licarin A (**1**) was observed in studies by N ris et al. (2013), in which it was possible to notice inhibition of the multiplication of the parasitic promastigote form with an IC_{50} of 29.4 μ M. For the amastigote form, which is present in infected macrophages, it was observed that after 72 h of exposure to the substance there was a relevant decrease in the survival rate of the parasites in the infected cells resulting in an IC_{50} of 14.4 μ M. Such results were better than that observed for the control drug used in the trial, meglumine antimoniate (glucantime). The leishmanicidal mechanism of action by which (-)-licarin A acts seems to be the induction of DNA fragmentation in parasites leading to a typical pattern of death by apoptosis.

Studies have shown that (\pm)-licarin A has significant activity against the parasite *Schistosoma mansoni* with a LD_{50} around 50 μ M (Pereira et al. 2011a; Meleti et al. 2020). However, when evaluating the licarin A enantiomers separately, a decrease in activity was observed when compared to the same action with the racemic mixture. The (-)-licarin A isomer (**1**) maintained some activity but the (+)-isomer (**2**) had no activity. This fact may indicate that the mixture of isomers acts synergistically, increasing the schistosomicidal effect of this particular (\pm)-licarin A racemic mixture. Additionally, Adekiya et al. (2020) studied the *Schistosoma* glucose transporter 4 (SGTP4) as a therapeutic target for licarin A and other natural products. They have shown the formation of a stable complex between licarin A and SGTP4, suggesting that this could explain the schistosomicidal activity observed with this compound.

Cytotoxic Activity

Hyperproliferative diseases can be caused by changes in cell signalling. Thus, intervention in these signalling pathways can lead to targets for the treatment and prevention of cancer. Based on this fact, Lee et al. (2004) evaluated the ability of

(-)-licarin A (**1**) to inhibit a phospholipase C (PLC) related to the signal transduction process between cell membranes and cell proliferation. Compound **1** showed a significant PLC inhibition capacity, with IC_{50} values of 15.8 ± 1.3 μ M in the tests performed. In addition, this substance demonstrated antiproliferative activity against different cell lines referring to colon, breast and lung cancer (IC_{50} of 5.0 μ M), indicating a relationship between the inhibition of the isoenzyme PLC with the ability to inhibit cancerous cell growth. In addition, Tsai et al. (2001) also reported the cytotoxic effect of licarin A extract from *Persea obovatifolia* (Hayata) Kosterm., Lauraceae, leaves against cancer cell lines P-388 (lymphoblastic murine leukaemia), KB16 (squamous cell carcinoma of the mouth) and HT-29 (colon adenocarcinoma).

Other researchers have observed that (-)-licarin A (**1**), from the seeds of *M. fragrans*, has an antiproliferative effect against four different lung cancer cell lines (A549, NCI-H23, NCI-H520 and NCI-H460). According to the concentration and time of evaluation, IC_{50} values of 20.03 ± 3.12 and 22.19 ± 1.37 μ M were obtained for cell lines NCI-H23 and A549, respectively (Maheswari et al. 2018). Treated cells with **1** showed elongated and distorted structures with larger number of vacuoles. Thus, its ability to induce cell autophagy was investigated. This fact was proven when performing expression analysis of a specific form of mRNA and protein LC-3 involved in the autophagy process, in which the increase of these markers demonstrated the induction of autophagy by (-)-licarin A (**1**) in lung cancer cells. In addition, compound **1** increased the level of p53 (tumour suppression protein) and reactive oxygen species, which can contribute to the activation of autophagy and apoptosis, culminating in cell death (Maheswari et al. 2018). However, additional studies are still needed to understand the regulatory mechanism of this activity. Table 1 shows the IC_{50} values found for (-)-licarin A (**1**) in studies involving different cancer cell lines.

Table 1 Comparison of reported cytotoxic activities (IC₅₀) of licarin A

Author	Oral cavity μM	Breast μM	Lung μM	Colon μM
Sawasdee et al. (2013)	39.5	139.7	51.2	-
Lee et al. (2004)	-	4.9	30.6	6.13
Maheswari et al. (2018)	-	-	21.0	-
Lin et al. (2015)	-	33.3	21.0	-

Antioxidant Activity

In the human body, reactive oxygen species play a crucial role in its defence mechanism; however, they are also responsible for the initiation of various cellular responses that can themselves impart harmful effects on the body such as biomolecular damage. It is essential therefore, to counteract these harmful effects through the use of antioxidants, and those from natural sources are of particular interest (Parveen et al. 2016). Studies by Hou et al. (2012) demonstrate that the seeds of *M. fragrans* remain intact for long periods of time without undergoing oxidative processes, which indicates the presence of antioxidant substances in their constitution. When the chemical components present in the seed of this species were isolated, the presence of licarins A and B was confirmed, amongst other active redox agents which interact with important cellular processes in which key enzymes such as cyclooxygenase, lipoxygenase, phospholipase A₂, NADH-oxidase or glutathione reductase are involved.

Similarly, natural scavengers from the root of *Machilus obovatifolia* (Hayata) Kaneh. & Sasaki, Lauraceae, were isolated to be evaluated for their antioxidant capacity, among them (-)-licarin A (1). In this research, Lin et al. (2015) observed that 1 had a considerable antioxidant activity (IC₅₀ values of 12.3 ± 1.1 μM) and could eliminate 50% of free radicals within 20 min during the standard ABTS discoloration test (using 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid). In the same year, Zhang et al. (2015) also demonstrated the antioxidant activity of (-)-licarin A (1) by a bioassay-guided isolation of constituents in nutmeg pericarp.

Sathya et al. (2020) evaluated the activity of compounds isolated from *M. fragrans* as antioxidants and inhibitors of the cholinesterase and α-glycosidase enzymes. It was demonstrated that (-)-licarin A (1) has a cholinesterase inhibitory activity and also acts as an antioxidant, with IC₅₀ values of 111.3 μM ± 0.07 and 24.74 μM ± 0.09, respectively. Barros et al. (2009) evaluated the antioxidant activity of (-)-licarin A (1) extracted from the leaves of *M. ovata*, where there was a significant concentration-dependent activity with an IC₅₀ of 172 μM. Also, an antioxidant effect from the extract of *Leucas aspera* (Willd.) Link, Lamiaceae, was observed, where it was later identified the presence of the racemic mixture of (±)-licarin A (Sadhu et al. 2003).

Neuroprotective Activity

In studies by Qu et al. (2014) and Ma et al. (2005), (-)-licarin A (1) from the bark of *Machilus thunbergii* Siebold & Zucc., Lauraceae, was described as a neuroprotective agent. The neuroprotective effect was evaluated in a model related to excessive exposure to glutamate, the main neurotransmitter in the central nervous system, in cultured cortical cells from rats (Qu et al. 2014). Compound 1 led to cell protection of 40% at a concentration of 1.0 μM. Although the mechanism of action has not been elucidated, it is suggested that protection against cell damage induced by glutamate is related to antioxidant activity. In this case, it was found that licarin A promoted a reduction in calcium influx that is normally related to glutamate-induced neurotoxicity and inhibited the subsequent exacerbated production of nitric oxide (NO) and peroxide at the level of the control cells. In addition, (-)-licarin A (1) preserves the activity of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione reductase in neuronal cells damaged by glutamate (Ma et al. 2004), thus avoiding a highly oxidative environment harmful to cells.

In the study by Ma et al. (2005), both (-)-licarins A (1) and B (3) were used to treat cells which were exposed to damage by hydrogen peroxide. Here, they showed protection rates of 30% and 60%, respectively, at a concentration of 30 μM. In addition, a high activity in the inhibition of platelet aggregation for these two substances was observed with an inhibition rate of 30% for both cases, which was higher than the positive control (aspirin) which showed 25%.

The ability of compounds 1 and 3 to cross the blood-brain barrier can be affected by a number of factors such as size, shape, structural groups, ligands, zeta potential and low bio-availability amongst others (Sweeney et al. 2018; Saint-Pol et al. 2020), and the possible side effects from natural products interacting with brain tissue would be a limiting factor in their clinical application (Scotti and Scotti 2018). Various reports suggest that only a limited number of phenolic compounds are capable of reaching the central nervous systems by crossing the blood-brain barrier (Faria et al. 2010, 2012, 2014; Ferri et al. 2015; Rasouli et al. 2020a, b).

Zhang et al. (2013) showed that (-)-licarin A (1) from the seeds of *M. fragrans* could cross this highly selective semi-permeable border of endothelial cells rapidly after intravenous administration at a single dose of 40 mg/kg to rats, and that it could be detected in all of the cerebral nuclei 8 min after administration.

Wu et al. (2016) studied the use of compounds obtained from the seeds of *Myristica fragrans* (nutmeg), concluding that the benzofuran-type neolignans showed moderate to high permeabilities across the blood-brain barrier. Therefore, it is a reasonable assumption to expect that synthetic modifications of licarins may be designed to further improve their

permeability to be beneficial neuroprotective agents. Finally, Zamilpa et al. (2014) have studied the action of *n*-hexane-soluble extract from *Aristolochia elegans* Mast. roots against the scorpion venom. They showed that licarin A is one of the main active constituents in this extract possessing antagonist action against the neurotropic effect of the venom.

Anti-Inflammatory Activity

Cao et al. (2013) reported a study where six dihydrobenzofuran-type neolignans including licarin A (**1**), licarin B (**3**) and 3-methoxy-licarin B (**9**) were isolated from the dry mature seeds of *M. fragrans*. These compounds showed inhibition in the production of nitrogen oxide (a reactive nitrogen species) in murine monocytes-macrophages (RAW2647) activated by lipopolysaccharides with IC_{50} values of 33.6 μ M, 53.6 μ M and 48.7 μ M, respectively. Nitrogen oxide is synthesised from L-arginine by the nitric oxide synthase enzyme in various mammalian tissues and cells, acting in defence against DNA damage and as a regulatory molecule in homeostatic activities (Kuo and Schroeder 1995). However, the excessive production of nitrogen oxide has pathological consequences, including the development of inflammation and induction of cell death (Mulligan et al. 1991).

In studies published by Murakami et al. (2005), the anti-inflammatory activity was evaluated by inhibiting the expression of COX-2 and activating the protein transcription factor NF- κ B, after cellular exposure to lipopolysaccharides. It was observed that (-)-licarin A (**1**) has an excellent anti-inflammatory capacity at a concentration of 0.1 μ M. The proposed mechanism for its action is related to the inhibition of NF- κ B activation by suppressing the phosphorylation-dependent proteolysis inhibitor I κ B- α , which is an important transcriptional factor involved in the expression of inflammatory mediators.

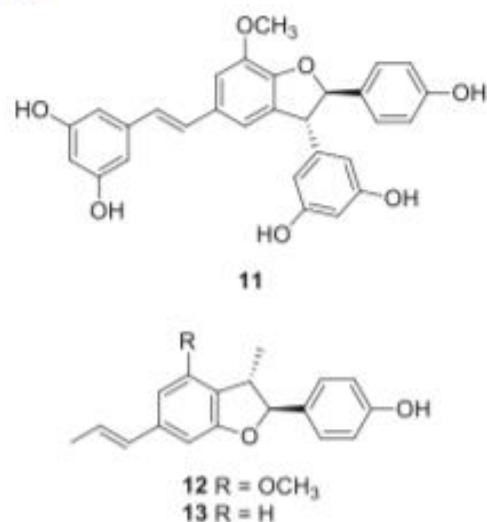
Matsui et al. (2015) evaluated (-)-licarin A (**1**) as an inhibitor in the activation of mast cells during processes of hypersensitivity and associated inflammation. When used at a concentration of 20 μ M, it was observed that this neolignan inhibited the release of histamine, prostaglandins and the secretion and production of tumour necrosis factor (TNF- α) in cells in response to antigens. Such action can be attributed to the suppression of some signalling pathways of the PCK α , and β II protein kinases as well as the p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK).

In another study, Morikawa et al. (2016) showed that licarin A acts as antagonist of the CC chemokine receptor 3, which plays an important role in allergic diseases. The mechanism of action is not yet fully known, but the results obtained highlight the potential of licarin A as an interesting prototype in the search for new drugs in the treatment of allergies and inflammatory processes.

Léon-Díaz et al. (2013) described a study where an anti-inflammatory effect was observed for (-)-licarin A (**1**), which was caused by inhibiting the activation of cyclooxygenase 2

(COX-2) and the subsequent inhibition of prostaglandin E2 production. This then reduced the progression of lung tissue destruction and increased the survival rate among the rodent test subjects.

In a published molecular docking study (Coy-Barrera 2020), 58 natural heterocyclic compounds were screened against nine crystallographic structures of the COX-2 enzyme which are responsible for the production of important inflammatory mediators, such as prostaglandins and thromboxanes. These substances were selected for study because they contain a benzofuran or dihydrobenzofuran ring, groups considered to be isosteres of the indole ring, which are proven to be important for the anti-inflammatory activity of many substances. Among the 58 substances studied, 13 compounds were neolignans of the licarin-type. Among the 4 substances that showed the greatest potential for COX-2 inhibition during the *in silico* studies, maximol (**11**) was shown to be an active COX-2 inhibitor at an IC_{50} value of 1.25 μ M. It is worth noting that there are other compounds that, whilst they are not referred to as licarins, do possess structurally identical 2-arylbenzofuran neolignan scaffolds. Such compounds are (+)-4-methoxy conocarpan (**12**) as reported by Hayashi and Thomson (1975) and Yang et al. (2019) and (\pm)-*trans*-dehydrodiisoeugenol (licarin A) as reported by Xu et al. (2020).



Anti-Viral Activity

Hongthong et al. (2016) evaluated the anti-HIV-1 activity of several neolignans isolated from the roots of *Dasympetalon sootepense* Craib, Annonaceae. Among the screened compounds only (+)-conocarpan (4-[(2*S*,3*S*)-3-methyl-5-[(*E*)-prop-1-enyl]-2,3-dihydro-1-benzofuran-2-yl]phenol **13**) was

found to be weakly active against HIV-1 RT with an IC_{50} value of 323.2 μ M. Sawasdee et al. (2013) evaluated the anti-herpetic activity of several substances of natural origin, including licarin A. This neolignan was tested against the two types of the herpes virus (HSV-1 and HSV-2), with MIC values of 66.7 μ g/ml for HSV-1 and 87.5 μ g/ml for HSV-2.

Diabetes

The receptor activated by gamma peroxisome proliferator (PPAR γ) is one of the study targets for new hypoglycaemic drugs since it regulates the gene expression of proteins which are involved in the control of glucose metabolism, lipids and proteins, and includes the regulation of insulin sensitivity (Memon et al. 2000). Saptarini et al. (2014) have demonstrated that licarin A acts as an agonist in the PPAR γ ligand binding domain with energy interaction energy and inhibition constant relatively close to the hypoglycaemic drug pioglitazone. Studies with licarin B have shown that it acts as a partial PPAR γ receptor agonist, confirmed by adipocyte differentiation assays and regulation of the expression of target genes and proteins. Furthermore, licarin B has been shown to lead an increase in insulin sensitivity by regulating the expression and translocation of GLUT4 (Shyni et al. 2016). GLUT 4 has an important role in glycaemic control, being the only insulin-sensitive glucose transporter that is located in vesicles in the cytosol of muscle and adipose tissue cells. Its targeting to the plasma membrane also occurs, via insulin signalling inducing the fusion of the vesicles containing GLUT 4 with the plasma membrane, thus increasing the transport of glucose into the cells, consequently, controlling blood glucose (Nazarian-Samani et al. 2018). Zhao et al. (2018) reported the antidiabetic potential of neolignans extracted from the fruits of *Viburnum ferdiae*. Some licarin-related compounds showed potency as α -glucosidase inhibitor and free radical scavengers; consequently the use of dihydrobenzofuran-type neolignans could be a positive route for the treatment of type 2 diabetes.

Miscellaneous Activities

Yoon et al. (2018) evaluated the ability of licarin A (**1**) to promote lipolysis for the treatment and prevention of obesity. In this study, the different biochemical involvement of **1** as a potential anti-obesity agent were demonstrated with the main ones being (i) induction of the formation of smaller lipid droplets, which reduces the stored amount of lipids and, consequently, a lower caloric release, in brown and beige adipocytes of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells; (ii) induction of the expression of uncoupling enzyme 1 and other thermogenic genes in C3H10T1/2 cells, which leads to greater energy demand and consequently the greater oxidation of stored lipids through protein kinase A (PKA); and (iii) activation of lipolysis via the activation of PKA which phosphorylates the perilipin proteins on the surface of lipid droplets facilitating the access of the hormone-sensitive lipase to the droplet, in addition to making this enzyme more active through its phosphorylation via PKA. Figure 3 illustrates fully differentiated C3H10T1/2 cells (Fig. 3a) as assayed in differentiation induction medium (MDI+; Fig. 3b), which increased triacylglyceride (TG) accumulation dramatically in comparison with the group without MDI (MDI-) with no TG accumulation. Rosiglitazone was used as positive control of browning (Rosi + MDI), which has been reported to induce white-to-brown fat conversion by stabilising PRDM16 protein, has also reduced TG accumulation by 11% (Fig. 3c). Treatment group with (-)-licarin A (**1**) in MDI showed attenuation of TG accumulation in C3H10T1/2 cells as evidenced by a 13% (Fig. 3d). The attenuation of TG accumulation may be caused by the inhibition of lipid storage by compound **1** (Yoon et al. 2018).

Shrestha et al. (2011) showed that licarin A possess antioxidant activity on low-density lipoprotein (LDL) and an inhibitory action on the enzyme cholesterol acyltransferase (ACAT). These interferences are known to be part of atherosclerosis and hypercholesterolemia treatment protocols. In addition to the activities previously described for licarins, the action of these

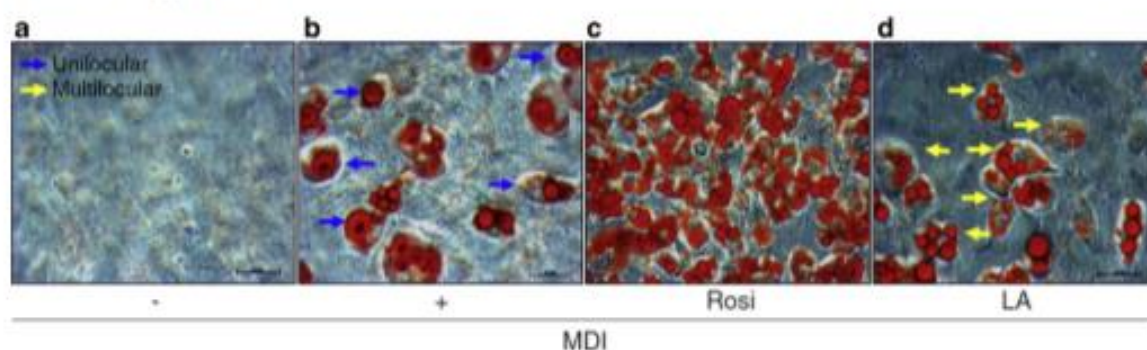


Fig. 3 Oil Red O staining images of fully differentiated C3H10T1/2 mesenchymal stem cells after 8 days of differentiation. (a) Cells maintained without MDI differentiation induction medium. (b) Cells maintained with MDI differentiation induction medium: 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 1 μ M dexamethasone and 10 μ g/ml insulin in DMEM

supplemented with 10% of FBS, followed by a maturation medium composed of DMEM, 10% of FBS and 10 μ g/ml insulin. (c) Control group: Rosiglitazone was used as positive control of browning (Rosi + MDI). (d) Treatment group: (-)-licarin A (**1**) in MDI. Reproduced from Yoon et al. (2018)

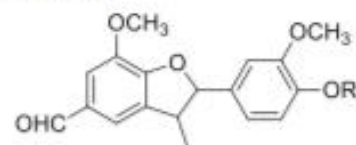
substances on other biological targets has also been described. Hattori et al. (1986) evaluated the antimicrobial activity of licarin A against several bacterial strains, finding a minimum inhibitory concentration value (MIC) of 12.5 $\mu\text{g/ml}$ for strains of *Streptococcus mutans* of serotype C, related to the formation of dental plaques and cavities. Park et al. (2017) discovered that licarin A and licarin B are able to inhibit *Streptococcus pneumoniae* sialidases, key virulence factors. This result indicates the potential of licarins as agents to develop antibacterial agents.

Park et al. (2004) disclosed that it was possible to identify the effect of licarin A extracted from *Aristolochia taliscana* roots in programmed cell death, since with an IC_{50} of 19.2 μM , the authors were able to induce apoptosis through caspase-3 activation. At the same time, Morikawa et al. (2018) demonstrated the inhibitory effect of seven neolignans, including (+)-licarin A (IC_{50} of 58.2 μM) which was extracted from *M. fragrans* in the degranulation of basophilic leukaemia cells (RBL-2H3) thus exhibiting a potent antiallergic effect. El-Alfy et al. (2019) reported the isolation and structural characterisation of chemical components which are present in nutmeg. Amongst the eleven isolated substances, four correspond to licarins A (1) and B (3), in addition to their 3'-methoxy derivatives 8 and 9. These substances were evaluated for the inhibition potential of fatty acid amide hydrolase (FAAH) and monoacylglycerol lipase (MAGL), serine proteases that degrade two endogenous cannabinoid receptor ligands (anandamide and 2-arachidonoylglycerol) which in turn act as messenger modulating neurotransmitters. Fatty acid amide hydrolase (FAAH) and monoacylglycerol lipase inhibiting substances have been extensively studied as regulators of several pathological conditions associated with the central nervous system, such as anxiety, depression and pain. The (-)-licarin A (1) and its methoxylated analogue (8) were the most active compounds as inhibitors of FAAH during *in vitro* assays, with IC_{50} values of 7.02 and 4.57 μM , respectively. Compound 8 was also evaluated *in vivo* and demonstrated the potential for treating anxiety in animals.

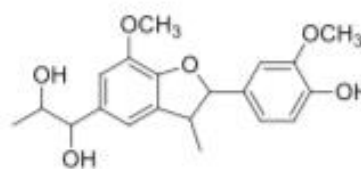
Semi-Synthetic Derivatives

In addition to natural licarins obtained from plants, there are various reports of their use in the synthesis of derivatives by structural modifications to improve their biological potential. There is evidence in the literature that the lipophilicity of molecules also affects the ability to cross cell walls and cytoplasmic membranes, while promoting damage that can result in cellular lysis (Penido et al. 2007; Parreira et al. 2010; Porto et al. 2012; Rojo-Arreola et al. 2014). In the studies by Oliveira et al. (2019) and Meleti et al. (2020), structural changes were made to licarin A, involving its propenyl chain and phenolic hydroxyl. Oliveira et al. (2019) synthesised four compounds with changes in these groups, licarin D (6), and compounds 14–16, which were tested against tumour cells. The trihydroxylated compound 16 was the most active at a

concentration of 50 μM against leukemic cancer cells (HL-60) while the trimethoxylated compound, licarin D (6), displayed marginal activity against breast cancer cells (MCF-7) at a concentration of 100 μM .

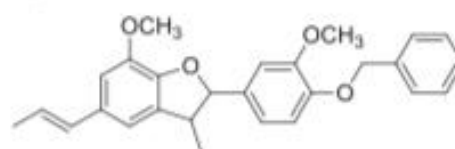


14 R = H
15 R = OCH₃

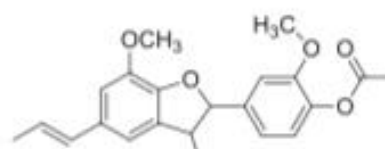


16

In the work of Meleti et al. (2020) the schistosomicidal and trypanocidal activity of licarin A and some derivatives were evaluated. In this case, simple chemical modifications were made to the phenolic hydroxyl of the licarin A, with the insertion of a methyl (6), benzyl (17) or acetyl substituent (18). As a result, licarin A was able to promote more than 50% of lysis to *Trypanosoma cruzi* cells at IC_{50} 100.8 μM . On the other hand, the acylated compound (18) was the most active, displaying worm viability reduction at 25 μM and mortality of all worms at 100 and 200 μM within 24 h. In this same test, licarin A (1) was the second most active, displaying worm viability reduction at 50 μM and mortality of 25% and 100% of worms in 24 h at concentrations of 100 and 200 μM , respectively.



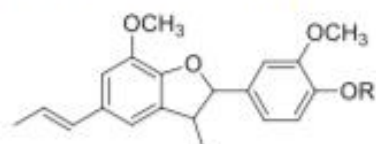
17



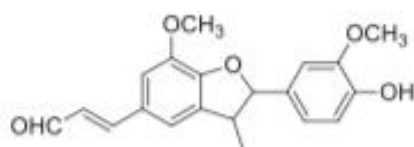
18

Souza et al. (2012) described synthesis of the licarin A derivatives 19–24 to evaluate their leishmanicidal,

trypanocidal and antimycobacterial potential. When evaluating these compounds against the epimastigote form of *Trypanosoma cruzi*, it was observed that compounds **23** and **24** were the most active with IC_{50} values of ~ 28 μ M. Compounds **19**, **23** and **24** showed the most promising results with IC_{50} values of 8.68, 15.0 and 14.1 μ M, respectively, as leishmanicidal agents. When evaluated against *M. tuberculosis*, the most active compounds were **23** and **24** and both gave a MIC value of 31.25 μ g/ml.

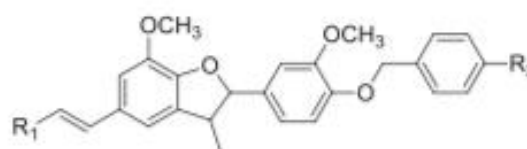


- 19** R = CH₂CH₂CH₃
20 R = CH₂CH₂CH₂CH₃
21 R = CH₂(CH₂)₅CH₃
22 R = CH₂CH=(CH₃)₂
23 R = CH(CH₃)CH=CH₂

**24**

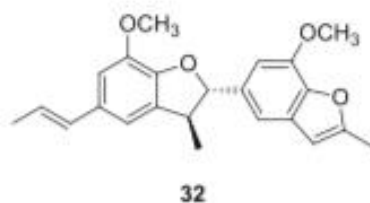
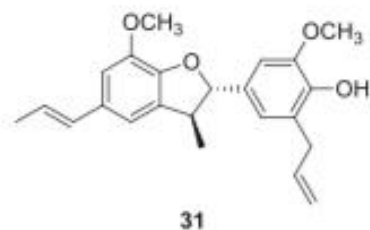
Alvarenga et al. (2020) synthesised a number of licaridin A derivatives and then evaluated the influence of the structural modifications on the antimycobacterial potential. In addition, the inhibiting effect on biofilm formation by fast-growing mycobacteria was investigated. Initially, the phenolic subunit and alkenyl side chain of licaridin A were modified to create derivatives with a higher partition coefficient (**25–28**), as the activity of a compound against mycobacteria seems to be strongly influenced by its hydrophobicity. Further, polar groups were inserted into the side chain to change the hydrophilic-lipophilic profile of the molecules (**29** and **30**). This study demonstrated that the hydroxylated compound **30** was more effective than the control drug, sulfamethoxazole, against *M. abscessus* and *M. fortuitum* and more active than clarithromycin (control drug) against *M. massiliense* with MIC values ranging between 9.76 μ g/ml and 19.53 μ g/ml, respectively. Compound **30** was also more active than licaridin A against *M. fortuitum* and *M. massiliense*. In relation to the inhibitory activity against biofilm formation, it was observed that licaridin A (**1**), in addition to compounds **29** and **30**, showed potential inhibitory effects with the

synthetic derivatives being more effective in inhibiting biofilm formation in relation to licaridin A (**1**). In addition, cytotoxicity studies against Vero cells showed a low toxicity of these compounds, proving that the chemical modifications carried out on licaridin A led to the discovery of potential prototypes for future optimisation.



- 25** R₁ = CH₃; R₂ = CN
26 R₁ = CH₃; R₂ = F
27 R₁ = CH₃; R₂ = Cl
28 R₁ = COH; R₂ = Cl
29 R₁ = CO₂H; R₂ = Cl
30 R₁ = CH₂OH; R₂ = Cl

Morais et al. (2020) produced a series of semi-synthetic derivatives of licaridin A using a simple and objective synthetic route. They then evaluated the trypanocidal activity of these compounds against *Trypanosoma cruzi* amastigotes and trypomastigotes. Chemical modifications were performed in the hydroxyl group and in the *ortho* position. The synthesised compounds **31** and **32** were more active (IC_{50} ranging from 5–28 μ M) than licaridin A (IC_{50} of 54.3 μ M) against trypomastigote forms of *T. cruzi*, suggesting that the acetylation of the hydroxyl group leads to a reduction in its trypanocidal potential. The allylic compound **31** was the most active against the trypomastigote forms of *T. cruzi* (IC_{50} 5 μ M) and presented a selectivity index of 9 considering the NCTC healthy cells evaluated (normal subcutaneous areolar and adipose tissue). The heterocyclic compound **32** was the second most active (IC_{50} 10.5 μ M) but it presented less cytotoxicity with a selectivity index of 19 considering NCTC cells. When evaluated against the intracellular amastigote forms of *T. cruzi*, all of the semi-synthetic derivatives (and licaridin A) were inactive up to a concentration of 100 μ M. The high lipophilicity of the substances was associated with the low oral bioavailability that compounds **31** and **32** presented in permeability tests with artificial membranes. These active compounds were selected for studies of the mechanism of action considering trypomastigote forms, in which it can be seen that the two substances led to an increase in the levels of ROS in trypomastigote forms, suggesting a mechanism of action associated with oxidative stress on the parasite.



Future Directions

When analysing the works that describe the mode of action of licarins, especially (-)-licarin A (**1**), it is noticed that many of its effects are connected to the modulation of oxidative processes with pro-oxidant or antioxidant activity depending on the concentration used. When its antiparasitic and cytotoxicity capacity were evaluated, its action is related to the development of oxidative stress due to the involvement as active redox agents with fundamental molecules for the maintenance of the reduced intracellular state, as well as the induction of apoptosis by different signalling pathways. Considering anti-inflammatory and antioxidant activities, the involvement of (-)-licarin A (**1**) is associated to the inhibition of the prostaglandin synthesis and signalling molecules such as nitrogen oxide, thus exercising protection against the damaging processes of free radicals in the tissues. However, the schistosomicidal effect may be related to the ability of compound **1** to exert an inhibitory action on cholinesterase, which is known to play a fundamental role in the nervous system of the parasitic helminths, as well as in muscle contractility or in other processes such as glucose uptake in the *Schistosoma mansoni* parasite responsible for the disease. In addition, (±)-licarins A and B (**1–4**) seem to play an important role in controlling obesity and glycaemia by inducing lipolysis via PKA and in increasing glucose transport into cells via GLUT 4, reinforcing its broad spectrum of biological effects for the development of future therapeutical applications for the treatment of metabolic syndrome, which includes high blood sugar, excess body fat around the waist and abnormal cholesterol levels.

Due to their multi-functional biological properties, licarins represent an important class of neolignans that can be used as promising prototypes for obtaining new bioactive substances in the search for new drug candidates. Studies are still needed to be able to further determine in detail their mechanisms of action, specifically including the mode of interactions of these substances with their biological targets.

Conclusions

Licarins are secondary metabolites of plant species and are classified as neolignans, which can be obtained by isolating them from plant species or by chemical synthesis. As the study of products from natural origin is of great importance for the development of new drug candidates, the evaluation of the biological activities of licarins over a number of years has shown its therapeutical potential. Licarin A has received the most attention regarding its biological properties, and there are promising results, whether as antimicrobial, antiparasitic, antioxidant, cytotoxic or for combating metabolism disorders and central nervous system complaints. In addition, preliminary studies of intestinal permeability (Yang et al. 2010) and distribution through the blood-brain barrier (Zhang et al. 2013) have attested that licarin A has an adequate pharmacokinetic profile to allow good absorption after oral use and bioavailability in the central nervous system. This could reasonably also be expected for its analogues. All these data strengthen the potential of this class of natural neolignans and their analogues as prototypes in the development of new pharmacological agents.

Although licarin A and licarin B, as well as their semi-synthetic derivatives, have undergone different biological studies, very few studies have attempted to explore their mechanisms of action. In addition, many of these studies have just evaluated the activity of crude extracts from licarin-rich plant species and not their bioactive constituents. As this review has shown, the biological activities of licarins have been investigated for quite some time with various encouraging results. However, none has been eventually used as a systemic therapy as yet. We believe that this time will come, but before then, we also believe that improvements in the *in vivo* evaluations for the licarins need to be accomplished. Modification for the exploration of semi-synthetic licarin derivatives by adding diverse chemical functionalities to the natural molecules in order to modify their pharmacokinetics to improve their absorption, distribution, biotransformation/metabolism and excretion is a challenge for the future investigations.

Acknowledgements The authors wish to thank CAPES for the financial support under the Finance Code 001.

Author contribution Conception and design of the study was carried out by DTC, DJA, EdFP, MJM, TBdS and JAH. Literature searching and data collection was performed by DJA, EdFP, MJM and TBdS. Analysis and interpretation of the literature search data was conducted by DTC, DJA, EdFP, MJM, TBdS and JAH. Drafting the manuscript was done by DTC, DJA, EdFP, MJM, TBdS and JAH. Critical revision of the manuscript was carried out by JAH and DTC. All the authors have read the final manuscript and approved the submission.

Funding This study was part financed by the CAPES, Brazil, under the Finance Code 001.

References

- Abe F, Nagafuji S, Yamauchi T, Okabe H, Maki J, Higo H, Akahane H, Aguilar A, Jiménez-Estrada M, Reyes-Chilpa R (2002) Trypanocidal constituents in plants 1. Evaluation of some Mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in Guaco, roots of *Aristolochia taliscana*. *Biol Pharm Bull* 25:1188–1191. <https://doi.org/10.1248/bpb.25.1188>
- Abourashed EA, El-Alfy AT (2016) Chemical diversity and pharmacological significance of the secondary metabolites of nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.). *Phytochem Rev* 15:1035–1056. <https://doi.org/10.1007/s11101-016-9469-x>
- Adekiya TA, Aruleba RT, Klein A, Fadaka AO (2020) *In silico* inhibition of SGTP4 as a therapeutic target for the treatment of schistosomiasis. *J Biomol Struct Dyn* 23. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1850363>
- Aiba CJ, Gottlieb OR (1975) Synthesis of (±)-licarin-B. *Phytochemistry* 14:253–255. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(75\)85049-7](https://doi.org/10.1016/0031-9422(75)85049-7)
- Alvarenga DJ, Matias LMF, Oliveira LM, Leão LPMO, Hawkes JA, Raimundo BVB, Castro LFD, Campos MMA, Siqueira FS, Santos TS, Carvalho DT (2020) Exploring how structural changes to new licarin A derivatives effects their bioactive properties against rapid growing mycobacteria and biofilm formation. *Microb Pathog* 144:104203. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104203>
- Araújo RCP, Neves FAR, Formaggio ASN, Kassuya CAL, Stefanello MEA, Souza VV, Pavan FR, Croda J (2014) Evaluation of the anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity and *in vivo* acute toxicity of *Annona sylvatic*. *BMC Complement Altern Med* 14:209. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-209>
- Arellanes MAJ, Cortés NRR, García I (2011) Actividad antioxidante y antimicrobiana del extracto hexánico y compuestos puros del rizoma de *Aristolochia taliscana*. *Rev Mex Cien Farm* 42:35–41. Available online at http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952011000300005. Accessed 14 May 2020
- Barbosa de Castro CC, Dias MM, Pessoa de Rezende T, Magalhães LG, Da Silva Filho AA (2013) Chapter 8: natural products with activity against *Schistosoma* species. In: Rai MK, Kon KV (eds) Fighting multidrug resistance with herbal extracts, essential oils and their components. Academic Press, London, pp 109–134. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398539-2.00008-2>
- Barros LJ, Barison A, Salvador MJ, Rd M-S, Cabral EC, Eberlin MN, Stefanello ME (2009) Constituents of the leaves of *Magnolia ovata*. *J Nat Prod* 72:1529–1532. <https://doi.org/10.1021/np900203y>
- Bertolini F, Pineschi M (2009) Recent progress in the synthesis of 2,3-dihydrobenzofurans. *Org Prep Proceed Int* 41:385–418. <https://doi.org/10.1080/00304949093240836>
- Cabral MMO, Barbosa-Filho JM, Maia GLA, Chaves MCO, Braga MV, De Souza W, Soares ROA (2010) Neolignans from plants in north-eastern Brazil (Lauraceae) with activity against *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol* 124:319–324. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.11.007>
- Cao G, Yang XW, Xu W, Li F (2013) New inhibitors of nitric oxide production from seeds of *Myristica fragrans*. *Food Chem Toxicol* 62:167–171. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.08.046>
- Castro H, Tomás AM (2008) Peroxidases of trypanosomatids. *Antioxid Redox Signal* 10:1593–1606. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2050>
- Chen P-Y, Wu Y-H, Hsu M-H, Wang T-P, Wang E-C (2013) Cerium ammonium nitrate-mediated the oxidative dimerization of *p*-alkenylphenols: a new synthesis of substituted (±)-*trans*-dihydrobenzofurans. *Tetrahedron* 69:653–657. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2012.11.006>
- Chioccare F, Sonia P, Rindone B, Pilati T, Brunow G, Pietikäinen P, Setälä H (1993) Regio- and diastereo-selective synthesis of demeric lignans using oxidative coupling. *Acta Chem Scand* 47:610–616. <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.47-0610>
- Chiu S, Wang T, Belski M, Abourashed EA (2016) HPLC-guided isolation, purification and characterization of phenylpropanoid and phenolic constituents of nutmeg kernel (*Myristica fragrans*). *Nat Prod Commun* 11:483–488
- Coy-Barrera E (2020) Discrimination of naturally-occurring 2-arylbenzofurans as cyclooxygenase-2 inhibitors: insights into the binding mode and enzymatic inhibitory activity. *Biomolecules* 10:176. <https://doi.org/10.3390/biom10020176>
- El-Alfy A, Abourashed EA, Patel C, Mazhari N, Jeon HA, Jeon A (2019) Phenolic compounds from nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.) inhibit the endocannabinoid-modulating enzyme fatty acid amide hydrolase. *J Pharm Pharmacol* 71:1879–1889. <https://doi.org/10.1111/jphp.13174>
- Faria A, Pestana D, Teixeira D, Azevedo J, Freitas V, Mateus N, Calhau C (2010) Flavonoid transport across RBE4 cells: a blood-brain barrier model. *Cell Mol Biol Lett* 15:234–241. <https://doi.org/10.2478/s11658-010-0006-4>
- Faria A, Mateus N, Calhau C (2012) Flavonoid transport across blood-brain barrier: implication for their direct neuroprotective actions. *Nutr Aging* 1:89–97. <https://doi.org/10.3233/NUA-2012-0005>
- Faria A, Meireles M, Fernandes I, Santos-Buelga C, Gonzalez-Manzano S, Dueñas M, de Freitas V, Mateus N, Calhau C (2014) Flavonoid metabolites transport across a human BBB model. *Food Chem* 149:190–196. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.095>
- Ferri P, Angelino D, Giannari L, Benedetti S, Ambrogini P, Del Grande P, Ninfali P (2015) Enhancement of flavonoid ability to cross the blood-brain barrier of rats by co-administration with α -tocopherol. *Food Funct* 6:394–400. <https://doi.org/10.1039/c4fo00817k>
- Francis SK, James B, Varughese S, Nair MS (2019) Phytochemical investigation on *Myristica fragrans* stem bark. *Nat Prod Res* 33:1204–1208. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1457670>
- Gómez-Cansino R, Guzmán-Gutiérrez SL, Campos-Lara MG, Espitia-Pinzón CI, Reyes-Chilpa R (2017) Natural compounds from Mexican medicinal plants as potential drug leads for anti-tuberculosis drugs. *An Acad Bras Cienc* 89:31–43. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720160298>
- Gottlieb OR (1978) Neolignans. In: Herz W, Grisebach H, Kirby GW (eds) Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe (Progress in the Chemistry of Organic Natural Products), vol 35. Springer, Vienna. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-8505-6_1
- Ha MT, Vu NK, Tran TH, Kim JA, Woo MH, Min BS (2020) Phytochemical and pharmacological properties of *Myristica fragrans* Houtt.: an updated review. *Arch Pharm Res* 43:1067–1092. <https://doi.org/10.1007/s12272-020-01285-4>
- Hattori M, Hada S, Watabiki A, Ihara H, Shu YZ, Kakiuchi N, Mizuno T, Namba T (1986) Studies on dental caries prevention by traditional medicines X. Antibacterial action of phenolic components from

- Maxe against *Spreptococcus mutans*. Chem Pharm Bull 34:3885–3893. <https://doi.org/10.1248/cpb.34.3885>
- Hayashi T, Thomson RH (1975) New lignans in *Conocarpus erectus*. Phytochemistry 14:1085–1087. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(75\)85192-2](https://doi.org/10.1016/0031-9422(75)85192-2)
- Hernández-Vázquez L, Olivera-Flores MTJ, Ruiz-Terán F, Ayala I, Navarro-Ocaña A (2011) Screening of plant cell cultures for their capacity to dimerize eugenol and isoeugenol: preparation of dehydrodieugenol. J Mol Catal B-Enzym 72:102–106. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.05.005>
- Honghong S, Kuhakam C, Jaipetch T, Piyachaturawat P, Jariyawat S, Suksen K, Limthongkul J, Nuntasoen N, Reutrakul V (2016) A new neolignan, and the cytotoxic and anti-HIV-1 activities of constituents from the roots of *Dasymaschalon sootepense*. Nat Prod Commun 11:809–813. <https://doi.org/10.1177/1934578X1601100628>
- Hou J, Wu H, Wang Y, Weng X (2012) Isolation of some compounds from nutmeg and their antioxidant activities. Czech J Food Sci 30:164–170. <https://doi.org/10.17221/509/2010-CJFS>
- Jiménez-Arellanes MA, Gutiérrez-Rebolledo G, Rojas-Tomé S, Meckes-Fischer M (2014) Medicinal plants, an important reserve of antimycobacterial and antitubercular drugs: an update. J Infect Dis Ther 2:185. <https://doi.org/10.4172/2332-0877.1000185>
- Kim YB, Park IY, Shin KH (1991) The crystal structure of licarin-B, (C₂₀H₃₀O₄), a component of the seeds of *Myristica fragrans*. Arch Pharm Res 14:1. <https://doi.org/10.1007/BF02857805>
- Kuo PC, Schroeder RA (1995) The emerging multifaceted roles of nitric oxide. Ann Surg 221:220–235. <https://doi.org/10.1097/0000658-199503000-00003>
- Kwon YY, Kim D, Kim J, Hwang JK (2011) Effects of licarin E on expression of matrix metalloproteinase-1 and type-1 procollagen in UVB-irradiated human skin fibroblasts. Phytother Res 25:1891–1894. <https://doi.org/10.1002/ptr.3521>
- Lee JS, Kim J, Kim BY, Lee HS, Ahn JS, Chang YS (2004) Inhibition of phospholipase C1 and cancer cell proliferation by lignans and flavans from *Machilus thunbergii*. Arch Pharm Res 27:1043–1047. <https://doi.org/10.1021/mp990478k>
- Léon-Díaz R, Meckes M, Saiz-Fernández S, Molina-Salinas GM, Vagas-Vilareal J, Torres J, Luna-Herrera J, Jiménez-Arellanes A (2010) Antimycobacterial neolignans isolated from *Aristolochia taliscana*. Mem Inst Oswaldo Cruz 105:45–51. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762010000100006>
- Léon-Díaz R, Meckes-Fischer M, Valdovinos-Martínez L, Campos MG, Hernández-Pando R, Jiménez-Arellanes MA (2013) Antitubercular activity and the subacute toxicity of (-)-licarin A in BALB/c mice: a neolignan isolated from *Aristolochia taliscana*. Arch Med Res 44:99–104. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2012.12.006>
- Lin S, Ko HH, Lee SJ, Chang HS, Lin CH, Chen IS (2015) Biological evaluation of secondary metabolites from the root of *Machilus abovatifolia*. Chem Biodivers 12:1057–1067. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201400196>
- Liu S, Wang G, Liang Z, Wang Q (2013) Synthesis of dihydrobenzofuran neolignans licarin A and dihydrocarinatin as well as related triazolylglycosides. Chem Res Chinese U 29:1119–1124. <https://doi.org/10.1007/s40242-013-3131-6>
- Ma CJ, Sung SH, Kim YC (2004) Neuroprotective lignans from the bark of *Machilus thunbergii*. Planta Med 70:79–80. <https://doi.org/10.1055/s-2004-815463>
- Ma CJ, Kim SR, Kim J, Kim YC (2005) Meso-dihydrogaairetic acid and licarin A of *Machilus thunbergii* protect against glutamate-induced toxicity in primary cultures of a rat cortical cells. Br J Pharmacol 146:752–759. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706380>
- Maheswari U, Ghosh K, Sadras SR (2018) Licarin A induces cell death by activation of autophagy and apoptosis in non-small cell lung cancer cells. Apoptosis 23:210–225. <https://doi.org/10.1007/s10495-018-1449-8>
- Mardhatillah A, Mutakin M, Levita J (2016) FeCl₃-catalyzed synthesis of dehydrodieugenol. Int J Chem 8. <https://doi.org/10.5539/ijc.v8n1p1>
- Matsui T, Ito C, Masubuchi S, Itoigawa M (2015) Licarin A is a candidate compound for the treatment of immediate hypersensitivity via inhibition of rat mast cell line RBL-2H3 cells. J Pharm Pharmacol 67:1723–1732. <https://doi.org/10.1111/jphp.12475>
- Meleti VR, Esperandim VR, Flauzino LGB, Prizantelli AH, Paula LAL, Magalhães LG, Cunha WR, Laurentiz RS, Pissurno APR, Nanayakkara NPD, Pereira AC, Bastos JK, Parreira RLT, Orenha RP, Silva MLA (2020) (±)-licarin A and its semi-synthetic derivatives: *in vitro* and *in silico* evaluation of trypanocidal and schistosomicidal activities. Acta Trop 202:105248. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105248>
- Memon RA, Tecott LH, Nonogaki K, Beigneux A, Moser AH, Granfield C, Feingold KR (2000) Up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR-alpha) and PPAR-gamma messenger ribonucleic acid expression in the liver in murine obesity: troglitazone induces expression of PPAR-gamma-responsive adipose tissue-specific genes in the liver of obese diabetic mice. Endocrinology. 141:4021–4031. <https://doi.org/10.1210/endo.141.11.7771>
- Morais TR, Conserva GAA, Varela MT, Costa-Silva TA, Thevenard F, Ponci V, Fortuna A, Falcão AC, Tempone AG, Fernandes JPS, Lago JHG (2020) Improving the drug-likeness of inspiring natural products—evaluation of the antiparasitic activity against *Trypanosoma cruzi* through semi-synthetic and simplified analogues of licarin A. Sci Rep 10:5467. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62352-w>
- Morikawa T, Hachiman I, Matsuo K, Nishida E, Ninomiya K, Hayakawa T, Yoshie O, Muraoka O, Nakayama T (2016) Neolignans from the arils of *Myristica fragrans* as potent antagonists of CC chemokine receptor 3. J Nat Prod 79:5–13. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00262>
- Morikawa T, Hachiman I, Ninomiya K, Hata H, Sugawara K, Muraoka O, Matsuda H (2018) Degranulation inhibitors from the arils of *Myristica fragrans* in antigen stimulated rat basophilic leukemia cells. J Nat Med 72:464–473. <https://doi.org/10.1007/s11418-017-1170-x>
- Mulligan MS, Hevel JM, Marletta MA, Ward PA (1991) Tissue injury caused by deposition of immune complexes is L-arginine dependent. Proc Natl Acad Sci 88:6338–6342. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.14.6338>
- Muniyan R, Jayaraman G (2017) Antimycobacterial activity of potential plant metabolites with emphasis on management of drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. Res J Biotechnol 12:75–86
- Murakami Y, Shoji M, Hirata A, Tanaka S, Yokoe I, Fujisawa S (2005) Dehydrodieugenol, an isoeugenol dimer, inhibits lipopolysaccharide-stimulated nuclear factor kappa B activation and cyclooxygenase-2 expression in macrophages. Arch Biochem Biophys 434:326–332. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.11.013>
- Nazarian-Samani Z, Sewell RDE, Lorigooini Z, Rafieian-Kopaei M (2018) Medicinal plants with multiple effects on diabetes mellitus and its complications: a systematic review. Curr Diabetes Rep 18:72. <https://doi.org/10.1007/s11892-018-1042-0>
- Néris PL, Caldas JP, Rodrigues YK, Amorim FM, Leite JA, Rodrigues-Mascarenhas S, Barbosa-Filho JM, Rodrigues LC, Oliveira MR (2013) Neolignan licarin A presents effect against *Leishmania (Leishmania) major* associated with immunomodulation *in vitro*. Exp Parasitol 135:307–313. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.07.007>
- Oliveira BHM, Silva LAA, Leite FF, Duarte GD, Duarte SS, Silva DKF, Sobral MV, Rodrigues LC (2019) Synthesis and tumoral test of (±)-4-O-demethylkadsurenin M a natural compound and analogues. Braz J Dev 5:19109–19123. <https://doi.org/10.34117/bjdv5n10-144>
- Park BY, Min BS, Kwon OK, Oh SR, Ahn KS, Kim TJ, Kim DY, Bae K, Lee HK (2004) Increase of caspase-3 activity by lignans from

- Machilus thunbergii* in HL-60 cells. *Biol Pharm Bull* 27:1305–1307. <https://doi.org/10.1248/bpb.27.1305>
- Park JY, Hwan Lim S, Ram Kim B, Jae Jeong H, Kwon HJ, Song GY, Bae Ryu Y, Song Lee W (2017) Sialidase inhibitory activity of diarylnonanoid and neolignan compounds extracted from the seeds of *Myristica fragrans*. *Bioorg Med Chem Lett* 27:3060–3064. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.05.055>
- Parreira NA, Magalhães LG, Morais DR, Caixeta SC, de Sousa JP, Bastos JK, Cunha WR, Silva ML, Nanayakkara NP, Rodrigues V, de Filho AAS (2010) Antiprotozoal, schistosomicidal, and antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*. *Chem Biodiversity* 7:993–1001. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200900292>
- Parveen A, Akash MS, Rehman K, Kyum WW (2016) Recent investigations for discovery of natural antioxidants: a comprehensive review. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 26:143–160. <https://doi.org/10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2016015974>
- Penido MLO, Resende DM, Vianello MA, Bordin MA, Jacinto AA, Dias WD, Montesano MA, Nelson DL, Coelho PMZ, Vasconcelos EG (2007) A new series of schistosomicidal drugs, the alkylaminoalkaneethiosulfuric acids, partially inhibit the activity of *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase. *Eur J Pharmacol* 570:10–17. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.05.028>
- Pereira AC, Magalhães LG, Gonçalves UO, Luz PP, Moraes AC, Rodrigues V, Guedes PMM, Silva Filho AA, Cunha WR, Bastos JK, Nanayakkara NP, Silva ML (2011a) Schistosomicidal and trypanocidal structure-activity relationships for (±)-licarin A and its (-) and (+)-enantiomers. *Phytochemistry* 72:1424–1430. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.04.007>
- Pereira AC, Magalhães LG, Januário AH, Pauletti PM, Cunha WR, Bastos JK, Nanayakkara DN, Silva ML (2011b) Enantiomeric resolution of (±)-licarin A by high-performance liquid-chromatography using a chiral stationary phase. *J Chromatogr A* 1218:7051–7054. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.07.093>
- Porto TS, Silva AA de, Magalhães LG, Santos RA dos, Furtado NAJC, Arakawa NS, Said S, Oliveira DCR de, Gregorio LE, Rodrigues V, Veneziani RC, Ambrosio SR (2012) Fungal transformation and schistosomicidal effects of pimaridimonic acid. *Chem Biodivers* 9:1465–1474. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201100336>
- Qu W, Xue J, Wu FH, Liang JY (2014) Lignans from *Saururus chinensis* with antiplatelet aggregation and neuroprotective activities. *Chem Nat Compd* 50:814–818. <https://doi.org/10.1007/s10600-014-1090-x>
- Rasouli H, Ghazvini SMBH, Yarani R, Ahntaş A, Jooneghani SGN, Ramalho TC (2020a) Deciphering inhibitory activity of flavonoids against tau protein kinases: a coupled molecular docking and quantum chemical study. *J Biomol Struct Dyn*. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1814868>
- Rasouli H, Yarani R, Pociot F, Popovi-Djordjevi J (2020b) Anti-diabetic potential of plant alkaloids: revisiting current findings and future perspectives. *Pharmacol Res* 155:104723. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104723>
- Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA (2010) Chagas disease. *Lancet* 375:1388–1402. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X)
- Rodrigues LC, Barbosa-Filho JM, Marques SDG, Borges FVP, Silva LAA, Laguna IHB, Mioso R (2017) Formation of bioactive benzofuran via oxidative coupling, using coconut water (*Cocos nucifera* L.) as biocatalyst. *Organic Comm* 10:72–78. <https://doi.org/10.25135/ocg.oc.10.16.11.449>
- Rojas-Arreola L, Long T, Asarnow D, Suzuki BM, Singh R, Caffrey CR (2014) Chemical and genetic validation of the statin drug target to treat the helminth diseases. *PLoS One* 9:e87594. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087594>
- Sadhu SK, Okuyama E, Fujimoto H, Ishibashi M (2003) Separation of *Leucas aspera*, a medicinal plant of Bangladesh, guided by prostaglandin inhibitory and antioxidant activities. *Chem Pharm Bull* 51:595–598. <https://doi.org/10.1248/cpb.51.595>
- Saint-Pol J, Gosselet F, Duban-Deweere S, Pottier G, Karamanos Y (2020) Targeting and crossing the blood-brain barrier with extracellular vesicles. *Cells* 9:851. <https://doi.org/10.3390/cells9040851>
- Saptarini N, Saputri FA, Levita J (2014) Molecular modeling study of PPAR α agonists: dehydro-di-isotegenol, macelignan, pioglitazone, netoglitazone, and rosiglitazone as antidiabetic drugs. *Int J Chem* 6:48–55. <https://doi.org/10.5539/IJCV.2014.06.01.048>
- Sathya S, Amarasinghe NR, Jayasinghe L, Araya H, Fujimoto Y (2020) Enzyme inhibitors from the aril of *Myristica fragrans*. *S Afr J Bot* 130:172–176. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.12.020>
- Sawasdee K, Chaowasku T, Lipipun V, Dufat T, Michel S, Likhitwitayawuid K (2013) New neolignans and a lignan from *Millettia fragrans*, and their anti-hepatic and cytotoxic activities. *Tetrahedron Lett* 53:4259–4263. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2013.05.144>
- Scotti L, Scotti MT (2018) *In silico* studies applied to natural products with potential activity against Alzheimer's disease. In: Roy K (ed) *Computational modelling of drugs against Alzheimer's disease*, vol 132. Humana Press, New York, pp 513–531. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7404-7_18
- Shamsuzzaman HK (2015) Bioactive benzofuran derivatives: a review. *Eur J Med Chem* 97:483–504. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.11.039>
- Shrestha S, Park J, Lee D, Cho JG, Lee DG, Cho MH, Jeong TS, Kang H, Baek N (2011) Inhibition of low density lipoprotein-oxidation, ACAT-1, and ACAT-2 by lignans from the bark of *Machilus thunbergii*. *J Appl Biol Chem* 54:63–66. <https://doi.org/10.3839/JABC.2011.011>
- Shyni GL, Sasidharan K, Francis SK, Das AA, Nair MS, Raghu KG (2016) Licarin B from *Myristica fragrans* improves insulin sensitivity via PPARs. *Nair MS, Raghu KG (2016) Baek N (2011) Inhibition of low density lipopro. RSC Adv* 6:79859–79870. <https://doi.org/10.1039/C6RA13055K>
- Singh G, Marimuthu P, Heluani CS, Catalan C (2005) Antimicrobial and antioxidant potentials of essential oil and acetone extract of *Myristica fragrans* Houtt. (Aral. Part). *J Food Sci* 70:141–148. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb07105.x>
- Souza VA, Nakamura CV, Corrêa AG (2012) Atividade antichagásica de lignanas e neolignanas. *Rev Virtual Quim* 4:197–207. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20120017>
- Sweeney MD, Sagare AP, Zlokovic BV (2018) Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol* 14:133–150. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.188>
- Tsai IL, Chen JH, Duh CY, Chen IS (2001) Cytotoxic neolignans and butanolides from *Machilus obovata*folia. *Planta Med* 67:559–561. <https://doi.org/10.1055/s-2001-16480>
- Vasudevan S, Bhat SV (2011) Biotransformation of isotegenol catalyzed by growing cells of *Pseudomonas putida*. *Biocatal Biotransf* 29:147–150. <https://doi.org/10.3109/10242422.2011.589898>
- Wu N, Xu W, Cao G-Y, Yang Y-F, Yang X-B, Yang X-W (2016) The blood-brain barrier permeability of lignans and malabaricones from the seeds of *Myristica fragrans* in the MDCK-*pllaMDR* cell monolayer model. *Molecules* 21:134. <https://doi.org/10.3390/molecules21020134>
- Xu WH, Su XM, Zhang XM, Qi JH, Wang D, Wang M, Liang Q (2020) Pleiocarpumlignan A, a new dinoolignan from *Piper pleiocarpum* Chang ex Tseng. *Nat Prod Res* 34:2809–2815. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1593167>
- Yang XW, Huang X, Ma L, Wu Q, Xu W (2010) The intestinal permeability of neolignans from the seeds of *Myristica fragrans* in the Caco-2 cell monolayer model. *Planta Med* 76:1587–1591. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1249810>

- Yang G, Ma H, Wu Y, Zhou B, Zhang C, Chai C, Cao Z (2019) Activation of TRPC6 channels contributes to (+)-conocarpan-induced apoptotic cell death in HK-2 cells. *Food Chem Toxicol* 129: 281–290. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.04.061>
- Yoon D, Imran KM, Kim Y (2018) Distinctive effects of licarin A on lipolysis mediated by PKA and on formation of brown adipocytes from C3H10T1/2 mesenchymal stem cells. *Toxicol Appl Pharm* 340:9–20. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.12.015>
- Zamilpa A, Abarca-Vargas R, Ventura-Zapata E, Osuna-Torres L, Zavala MA, Herrera-Ruiz M, Jiménez-Ferrer E, González-Cortazar M (2014) Neolignans from *Aristolochia elegans* as antagonists of the neurotropic effect of scorpion venom. *J Ethnopharmacol* 157:156–160. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.08.045>
- Zhang YB, Zhu LQ, Yang XW (2013) Cerebral nuclei distribution study of dehydrodiisoeugenol as an anxiogenic agent determined by RP-HPLC. *Fitoterapia* 84:47–53. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2012.09.022>
- Zhang CR, Jayashree E, Kumar PS, Nair MG (2015) Antioxidant and antiinflammatory compounds in nutmeg (*Myristica fragrans*) pericarp as determined by *in vitro* assays. *Nat Prod Commun* 10:1399–1402. <https://doi.org/10.1177/1934578X1501000822>
- Zhao C, Chen J, Shao J, Shen J, Li K, Gu W, Li S, Fan J (2018) Neolignan constituents with potential beneficial effects in prevention of type 2 diabetes from *Viburnum ferdiae* Hance fruits. *J Agr Food Chem* 66:10421–10430. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03772>

APÊNDICE C

Microbial Pathogenesis 144 (2020) 104203



Contents lists available at ScienceDirect

Microbial Pathogenesis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/micpath

Exploring how structural changes to new Licarin A derivatives effects their bioactive properties against rapid growing mycobacteria and biofilm formation



Dalila Junqueira Alvarenga^a, Laira Maria Faria Matias^a, Lucas Martins Oliveira^a, Luiz Paulo Melchior de Oliveira Leão^b, Jamie Anthony Hawkes^a, Breno Vilas Boas Raimundo^c, Livia de Figueiredo Diniz Castro^c, Marli Matiko Anraku de Campos^d, Fallon dos Santos Siqueira^d, Thiago dos Santos^b, Diogo Teixeira Carvalho^{a,*}

^a Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentos e Medicamentos, Universidade Federal de Alfenas, MG, 37130-001, Brazil

^b Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, SP, 14040-903, Brazil

^c Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Universidade Federal de Alfenas, MG, 37130-001, Brazil

^d Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal de Santa Maria, RS, 9710590, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Licarin A
Neolignans
Molecular modification
Rapid growing mycobacteria
Biofilm

ABSTRACT

Several species of rapidly growing mycobacteria (RGM) have been associated with biofilms in areas such as biomedical devices, water distribution systems, cosmetic surgery, and catheter-related blood infections. Biofilms which exhibit antimicrobial resistance such as those formed by the genus *Mycobacterium* pose a significant risk to health and are of particular interest to researchers. Licarin A (a neolignan found in numerous plant species e.g. nutmeg) has been reported to show a wide range of biological actions including anti-inflammatory, antioxidant, and antibacterial properties. The aim of this study was to prepare a set of Licarin A derivatives and investigate the impact of specific structural changes on its antimycobacterial ability, and its effect on the biofilm formation of RGM species. Initially, the phenolic sub-unit and alkenyl side chain of Licarin A were modified to create derivatives with a higher partition coefficient; as the activity of a compound against mycobacteria seems to be strongly influenced by its hydrophobicity. Further, polar groups were inserted into the side chain to change the hydrophilic-lipophilic profile of the molecules. Results showed variability in the susceptibility profile of mycobacteria against the Licarin A derivatives under analysis. A number of the derivatives showed significant inhibitory activity of planktonic growth of the three strains of mycobacteria used, with even lower MIC values than those observed with reference drugs and Licarin A itself. Cytotoxicity assays showed they also have low toxicity, confirming that structural modifications to the Licarin A have made improvements to its antimycobacterial properties.

1. Introduction

Rapidly growing mycobacteria (RGM) are responsible for most mycobacteriosis occurrences and have gained prominence in the clinical and scientific community due to their high lethal power in immunocompromised patients [1]. According to the United States National Institute of Health; biofilms are associated, to some degree, with 80% of all infections worldwide. Several species of RGM have already been associated with biofilms in biomedical devices and water distribution systems, having a great impact on human health [2,3]. In the

field of cosmetic surgery, cases of RGM infections are growing exponentially, especially in liposuction and mastoplasty procedures [4,5]. In addition, studies have reported that mycobacterial biofilms contribute to the pathogenesis of catheter-related blood infections [6].

Microorganisms of the Genus *Mycobacterium* have been prominent when it comes to antimicrobial resistance, especially when it is associated with biofilm formation [3]. This is because these microorganisms have a cell wall composed of four, well-defined layers of a core surface, consisting mainly of mycolic acids. Mycolic acids are present only in microorganisms of this genus and they provide mycobacterial resistance

* Corresponding author. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentos e Medicamentos, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Alfenas, MG, 37130-001, Brazil.

E-mail addresses: diogo.carvalho@unifal-mg.edu.br, diogotcarv@gmail.com (D.T. Carvalho).

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104203>

Received 30 January 2020; Received in revised form 5 March 2020; Accepted 10 April 2020

Available online 15 April 2020

0882-4010/ © 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

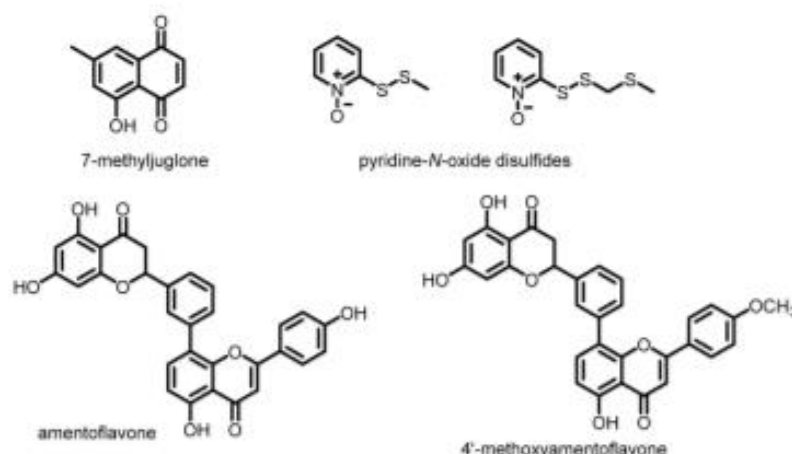


Fig. 1. Examples of natural products which are active against rapid growing mycobacteria.

to antimicrobials and biocides due to the high hydrophobicity they confer to the cell wall [7].

Natural products (i.e. from natural sources such as plants) are an important potential source of new antimicrobial substances. The main advantages when employing natural products in the search for new drugs are their innovative structural patterns and (usually) different mechanisms of pharmacological action. These characteristics have a positive impact on the research for new antimicrobial agents since they represent a way to tackle problems of microbial resistance to drugs as often happens with antimycobacterial compounds [8].

Some authors have reported natural products with antimycobacterial activity against RGM (Fig. 1). For instance, McGraw et al. [9] showed that 7-methyljuglone, a naphthoquinone found in the plant genus *Euclea*, inhibits the growth of both *Mycobacterium smegmatis* (MIC $1.57 \mu\text{g mL}^{-1}$) and *M. fortuitum* (MIC $22.14 \mu\text{g mL}^{-1}$). For clarification, the minimum inhibitory concentration (MIC) is the lowest concentration of a chemical which prevents the visible growth of a bacteria. O'Donnell et al. [10] described two pyridine-*N*-oxide disulfides from *Allium stipitatum* L. as active compounds against *M. fortuitum* (MIC $22.14 \mu\text{g mL}^{-1}$). It has also been reported that the two biflavonoids; amentoflavone and 4'-methoxyamentoflavone, which are both extracted from *Garcinia livingstonei*, inhibited the growth of *M. smegmatis* with MICs of 0.6 and $1.4 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively [11].

Licarin A, or *trans*-dehydrodiiisoeugenol (Compound 1 in Fig. 2), is a neolignan with a dihydrobenzofuran structure found in numerous medicinal and edible species (e.g. nutmeg). This neolignan may be obtained semi-synthetically by the oxidative dimerisation of phenylpropanoid isoeugenol, as reported by various authors [12,13]. It has been demonstrated that Licarin A shows a wide range of biological actions such as; anti-inflammatory [14], antioxidant [15], antitumor [16], antiprotozoan [17], antiviral [18] and antibacterial [19].

León-Díaz et al. [19] isolated Licarin A from *Aristolochia italicana*

and reported its antimycobacterial activity against *M. tuberculosis* H37Rv (MIC $25 \mu\text{g mL}^{-1}$) and a group of non-tuberculous mycobacteria (*M. smegmatis*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. avium* and *M. non-chromogenicum*) with MICs in the range of 6.25 – $3.12 \mu\text{g mL}^{-1}$. For completion, they also reported its cytotoxicity on murine macrophage (IC₅₀ $6.25 \mu\text{g mL}^{-1}$) and acute toxicity in mice ($> 1.7 \text{ mg mL}^{-1}$).

Flores et al. [20] evaluated the antibiofilm capacity of a number of commercial drugs such as sulfamethoxazole, amikacin, ciprofloxacin, clarithromycin, doxycycline and imipenem, all of which are commonly used to treat diseases caused by microorganisms of the genus *Mycobacterium*. The conclusion of the study was that although the drugs were effective against planktonic microorganisms, in most cases they were not effective when the microorganisms are presented in the form of a biofilm.

Biofilms of *M. massiliense* were inhibited by all of the drugs evaluated in the study only in the highest concentrations tested, whereas biofilms formed by *M. abscessus* were inhibited only by the highest concentrations of amikacin, ciprofloxacin and clarithromycin. *M. fortuitum*, in general, showed greater resistance to the inhibitory action of all the drugs evaluated.

Our research group has been studying the synthesis of, and the subsequent biological evaluation of new derivatives of eugenol or its analogues such as dihydroeugenol and isoeugenol [21–25]. To the best of our knowledge there are no studies reporting either the impact of structural manipulation of Licarin A on its anti-RGM potential or its ability in inhibiting biofilm formation by these mycobacteria. Therefore, the aim of this study was to prepare a set of Licarin A derivatives and evaluate how this would influence antimicrobial activity and biofilm formation by RGM species.

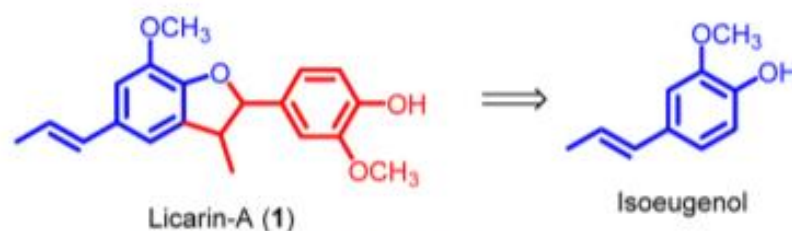


Fig. 2. Chemical structure of Licarin A and its main precursor, isoeugenol.

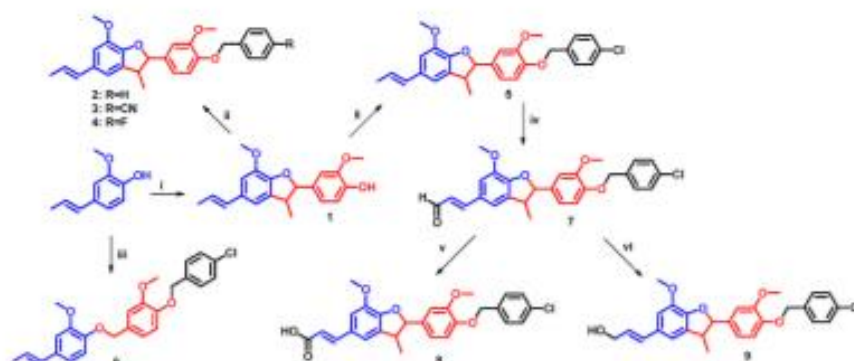


Fig. 3. Synthetic route to prepare the Licarin A derivatives, where reaction conditions were: i) Hydrogen peroxide, coconut water, 25 °C; ii) Respective benzyl halide, potassium carbonate, dimethylformamide, 70 °C; iii) 1-((4-chlorobenzyl)oxy)-4-(chloromethyl)-2-methoxybenzene, potassium carbonate, dimethylformamide; iv) 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone, water, 25 °C; v) Silver oxide, sodium hydroxide (4 mol.L⁻¹), 55 °C; vi) Sodium borohydride, ethanol, 25 °C.

2. Results and discussion

Taking into account the potential of the neolignan Licarin A as an antimycobacterial compound, we have designed and synthesised a series of compounds which are derivatised from Licarin A in order to investigate the impact of specific structural changes on its antimycobacterial ability against RGMs. The Licarin A derivatives (3-9) are new compounds and there are no published studies regarding the influence of structural modification of Licarin A on its antimicrobial profile against RGM. In addition, we report for the first time whether Licarin A and these products would be effective as inhibitors of mycobacterial biofilms.

Initially, we chose to modify the phenolic subunit and alkenyl side chain of Licarin A. The activity of a compound against mycobacteria seems to be strongly influenced by its hydrophobicity, given the massive presence of mycolic acids in the cell wall of these microorganisms [26]. Thus, the first rationale for the planned modifications was to change the hydrophobicity profile of Licarin A by creating derivatives with a higher partition coefficient. The synthetic route to obtain the target molecules (Fig. 3) followed well-known synthetic procedures. Initially the *O*-benzylated derivatives were synthesised, with the benzyl (2), 4-cyanobenzyl (3), 4-fluorobenzyl (4) and 4-chlorobenzyl (5) ethers synthesised in good yields from Licarin A by nucleophilic substitution with the respective benzyl halides. The 4-chlorobenzyl ether (5) was also used as a model for the preparation of an acyclic analogue (6) without the dihydrobenzofuran unit to investigate whether such a change would positively reflect on the antimycobacterial properties.

The susceptibility profile of the standard strains against a first round of new derivatives was evaluated using the "gold standard" technique indicated by the Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) [27], and the profile results of each standard strain can be observed in Table 1. A preliminary evaluation of mycobacterial susceptibility to

Licarin A (1) and the benzyl derivatives (2-6) showed that, despite the increase in hydrophobicity, as shown by the calculated partition coefficients, there was no improvement in their antimicrobial potential. On the other hand, as it was active against the three species with MIC values ranging from 9.76 to 39.06 µg/mL, our results corroborate findings regarding Licarin A activity published by León-Díaz et al. [19]. Therefore, this reinforces the clinical and scientific interest to study the antimycobacterial activity of this substance, as well as its synthetic derivatives, in order to increase the therapeutic arsenal against infections caused by these microorganisms.

Further, we intuitively decided to take the 4-chlorobenzyl ether (5), which was obtained with the highest yield and in the purest form, as a model for further modifications. This time, we rationalised that the insertion of polar groups in the side chain could affect antimycobacterial activity by balancing the hydrophilic-lipophilic profile of the molecules or including regions through which hydrogen interactions can occur. With this idea in mind, the side chain of the 4-chlorobenzyl ether (5) was oxidised with 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone following the work of Ilietsk et al. [28], leading to the α,β -unsaturated aldehyde (7) in high yield. This aldehyde was further subjected to oxidation and reduction reactions with silver oxide [29] and sodium borohydride [30,31] respectively, which led to the carboxylic acid (8) and the allylic alcohol (9) being produced. Where; ^aClogP_{ow,w} is the octanol-water partition coefficient predicted by Swiss ADME webtool [32]. ^bCytotoxicity on Vero cells. ^cResistance index for the reference drugs sulfamethoxazole and clarithromycin.

When observing the impact of these modifications on the antimycobacterial potential of derivatives (8) and (9), it can be concluded that they were favourable in view of the reduction of MIC values. Thus, it appears that the presence of a polar group, especially an alcoholic hydroxyl, may favour the interaction with bioreceptors involved in the susceptibility of the three studied species to these derivatives.

Table 1

^a Values of the calculated partition coefficients (ClogP), cytotoxicity (CC₅₀) and minimum inhibitory concentration (MIC) for Licarin A (1) and the synthesised derivatives (2-9).

Compound	ClogP _{ow,w} ^a	CC ₅₀ (µg mL ⁻¹) ^b	MIC (µg mL ⁻¹)		
			<i>M. abscessus</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. massiliense</i>
1	3.88	388	9.76	39.06	39.06
2	5.46	> 500	19.53	78.12	78.12
3	5.24	> 500	156.25	156.25	78.12
4	5.79	> 500	156.25	156.25	156.25
5	5.98	> 500	156.25	156.25	78.12
6	5.73	> 500	156.25	156.25	156.25
7	5.23	> 500	78.12	39.06	78.12
8	5.03	478	19.53	39.06	19.53
9	5.20	> 500	9.76	19.53	9.76
Sulfamethoxazole	0.90	-	32	128 ^c	8
Clarithromycin	2.37	-	1	32 ^c	16 ^c

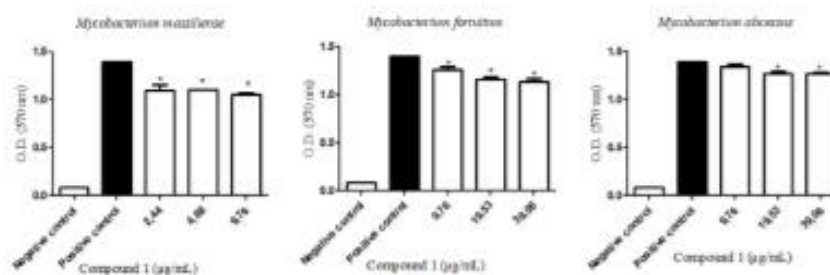


Fig. 4. Effect of different concentrations of compound (1) (Licarin A) on the inhibition of the biofilm formation of *M. massiliense*, *M. fortuitum* and *M. abscessus*. *Significant difference between the concentration tested and the positive control, indicating statistical differences when $p < 0.05$.

In general, it was possible to observe a great variability in the susceptibility profile of these mycobacteria against the Licarin A derivatives under analysis. This broad susceptibility profile is also observed when this assay is performed for clinical and diagnostic purposes. Flores et al. [20] determined the susceptibility profile of the same RGM used in our study in relation to clinical drugs, inferring that the wide variability that these microorganisms present reinforces the need to find new effective molecules in order to provide adequate treatment for mycobacteriosis. Furthermore, the same variability can be observed in the study by Siqueira et al. [33] with clinical isolates from patients diagnosed with mycobacteriosis, highlighting the resistance presented by RGMs to a broad spectrum of antimicrobials that are commonly used to treat infections caused by these microorganisms.

In this study, sulfamethoxazole and clarithromycin were used as reference drugs for antimycobacterial activity, and it should be noted that these two drugs have been nominated for Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) excellence awards for the treatment of infections caused by RGM. Considering the CLSI breaking points [34], we can observe from the results shown in Table 1, that *M. fortuitum* presented resistance to both drugs, just as *M. massiliense* presented resistance to clarithromycin. When observing the inhibitory activities of the new Licarin A derivatives synthesised in this study, we highlight that derivatives (8) and (9) showed significant inhibitory activity of planktonic growth of the three strains of mycobacteria used, with even lower MIC values than those observed with clarithromycin and sulfamethoxazole.

Regarding their composition; mycobacterial biofilms can be defined as groups of microorganisms (of the same or different species), surrounded by a self-produced polymer of extracellular polymeric substances (EPS), which are adhered to a surface [35]. Biofilms comprise of water, microorganisms, EPS (polysaccharides, proteins, lipids, DNA, RNA and ions) and residues from the colonised environment, all adhered to a solid surface [36].

In our study, it was possible to observe the formation of mycobacterial biofilms with the naked eye, both on the solid surface of the tubes used in macro-techniques, and on the air-liquid surfaces of the

tubes. These biofilms can be formed on the most diverse surfaces, including living tissues, hospital equipment, drinking or industrial water systems, or even natural aquatic systems [37]. In the case of mycobacteria, they can also form at air-liquid interfaces, since mycobacteria are aerobic microorganisms [38]. This capacity is due to the favourable conditions that the technique provides, where nutrients and oxygen are present. In this interface, microorganisms find access to abundant oxygen from the air above and nutrients in solution below [39]. Although there are several techniques for the isolated quantification of EPS, we used the quantification of biofilm biomass using crystal violet as a stain. This technique measures the amount of biomass formed, since the crystal violet has the ability to stain organic matter [40].

From a clinical perspective, bacterial biofilms in general have greater resistance when compared to planktonic microorganisms [41], which becomes a challenge for its successful treatment. It is clear that the therapeutic arsenal against these biofilm bacterial infections is limited, thus highlighting the potential importance of the results presented in our work. Licarin A and its three derivatives were able to inhibit the biofilms of the three mycobacterial species, proving the effectiveness of these molecules, whilst remaining safe (according to the data from the cytotoxicity tests).

Although biofilm development ability is not a general feature present in all clinical RGM isolates, numerous species of RGM have already been associated with biofilms in biomedical devices and water systems in hospital settings, having a major impact on human health [2]. Due to the pathogenicity and high resistance of RGM in sessile form, as well as due to the antimycobacterial potential presented by Licarin A and its derivatives against planktonic microorganisms, we evaluated the antibiofilm capacity of the derivatives with the best MIC values.

Given this, the antibiofilm activities of derivatives (1), (8) and (9) were determined, but none of them could destroy the previously formed mycobacterial biofilm. However, all three derivatives were able to inhibit biofilm formation to some degree (Figs. 4–6). It is suggested that the ability to inhibit biofilm formation and the ineffective destruction of pre-formed biofilms presented by the new derivatives is related to the fact that the biofilm tolerance to bioactive molecules is time dependent

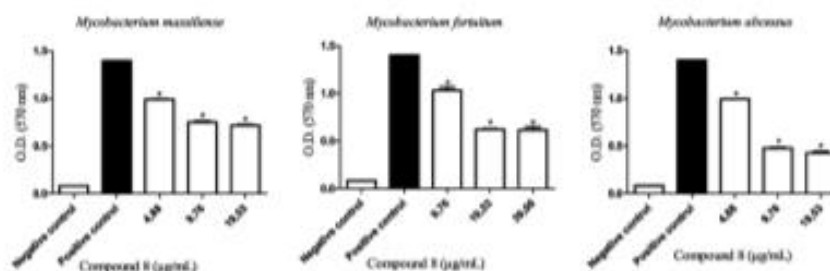


Fig. 5. Effect of different concentrations of derivative (8) on the inhibition of the biofilm formation by *M. massiliense*, *M. fortuitum* and *M. abscessus*. *Significant difference between the concentration tested and the positive control, indicating statistical differences when $p < 0.05$.

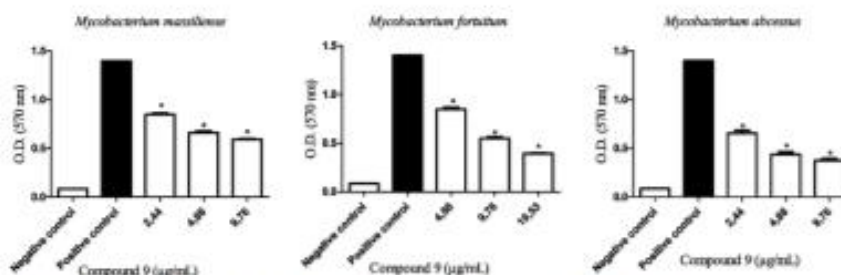


Fig. 6. Effect of different concentrations of derivative (9) on the inhibition of the biofilm formation by *M. massiliense*, *M. fortuitum* and *M. abscessus*. *Significant difference between the concentration tested and the positive control, indicating statistical differences when $p < 0.05$.

[42]. Thus, the derivatives would have a contact time seven times longer in the mycobacterial biofilm inhibition assay.

From a clinical point of view it is known that, *in vivo*, antimicrobials are capable of eradicating only planktonic forms released by biofilm, but they are unlikely to reach the inner populations of the structure to destroy them, which leads to a recurrence of infection after discontinuation of antimicrobial therapy until the biofilm is surgically removed [43]. Given this, and considering that the large amount of extracellular polymeric substances present in the biofilm structure significantly reduces the penetration of antimicrobial molecules, it is believed that the inactivity of Licarin A and its derivatives in destroying bacterial biofilms is due to the difficulty of the derivatives to penetrate the biofilm structure and to act on the internal bacterial populations, which are in a steady metabolic state [43,44]. This polymeric matrix produced in the sessile life form of the microorganism retains the largest amount of offending chemical agents, forming a physical barrier that abruptly prevents the action of these substances on cells [45,46].

In addition, we evaluated the inhibitory capacity of clarithromycin and sulfamethoxazole on mycobacterial biofilm formation to better establish the observations with the new molecules. The results demonstrated that both antimicrobial drugs have a limited ability to inhibit biofilm formation even at the highest concentrations tested (Figs. 7 and 8).

This behaviour can also be observed in other studies, including drugs other than those used in this study, such as amikacin, imipenem, ciprofloxacin and doxycycline [20,33].

Finally, we emphasise that derivatives (8) and (9) were more effective in inhibiting microbial film formation than Licarin A, and that the cytotoxicity assay with Vero cells (Table 1) showed they have low toxicity, confirming that structural modifications are important in the discovery of new bioactive molecules. In addition, we could observe a dose-dependent efficacy behaviour, since the higher the concentration of the derivatives under analysis, the greater the inhibition achieved. It is important to highlight that, to obtain the results, we used lower concentrations than the MIC obtained for the derivatives, to confirm that microorganisms would remain viable in planktonic form to develop

into sessile form. It is also important to note that these new derivatives showed better inhibitory activity on biofilm formation than the two reference drugs tested, while considering the resistance presented by the mycobacterial biofilms of the three strains to them.

Regarding the destruction of biofilms, it was highlighted by Ramasamy et al. [41] that certain drugs were not able to eradicate the biofilm structures. These results corroborate those obtained in our own tests with the Licarin A derivatives – as none of the molecules tested had the capacity to destroy mycobacterial biofilms after their formation. Several factors that involve the biological cycle of biofilms can explain the high resistance of this structure after it is formed. Among these factors, we can highlight the difficulty of penetrating the biofilm due to the increase in physical resistance caused by the presence of extracellular polymeric substances (EPS), which delay or even prevent the diffusion of the drug to act as also postulated by Lewis et al. [44].

Although in-depth pharmacological and molecular studies are needed to unravel the mechanisms by which these derivatives act on mycobacterial biofilms, it is well established that several substances become effective in inhibiting biofilm formation while blocking bacterial adhesion to surfaces, a crucial step in the biological cycle of this ecosystem [47]. In addition, disruption of bacterial cellular communication is a promising new prospect for inhibiting biofilm formation, by inhibiting molecules involved in bacterial communication inside the biofilm, known as quorum sensing [48].

3. Conclusions

The present work shows that nine new Licarin A derivatives were obtained and evaluated using *in vitro* tests against *M. massiliense*, *M. fortuitum* and *M. abscessus* species. Results showed that derivative (9), an allylic alcohol derivative, was more active than the reference drugs and it was more potent and less cytotoxic than Licarin A itself. In addition, the ability of Licarin A to inhibit biofilm formation by these mycobacteria is reported here for the first time. Derivatives (8) and (9) were also biofilm inhibitors, which will feature in further optimisation studies aiming at the development of new antimycobacterial agents.

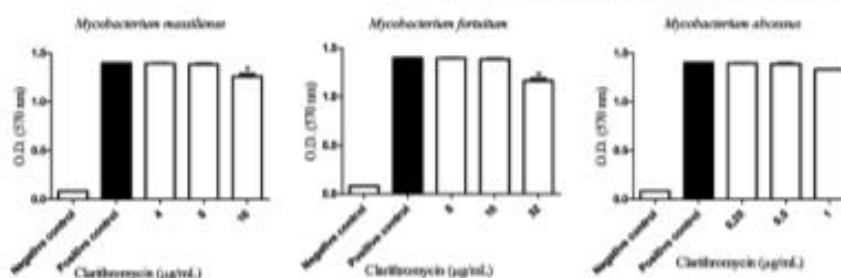


Fig. 7. Effect of different concentrations of clarithromycin (reference drug) on the inhibition of the biofilm formation by *M. massiliense*, *M. fortuitum* and *M. abscessus*. *Significant difference between the concentration tested and the positive control, indicating statistical differences when $p < 0.05$.

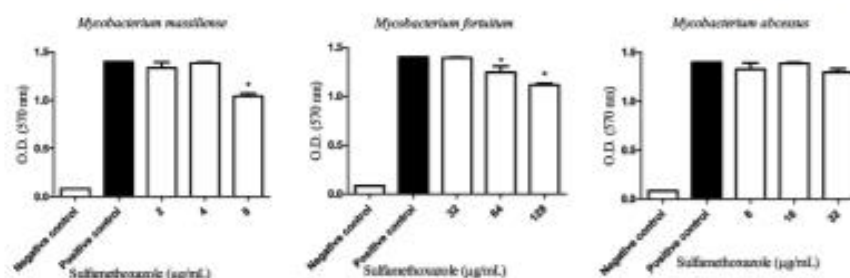


Fig. 8. Effect of different concentrations of sulfamethoxazole (reference drug) on the inhibition of the biofilm of *M. massiliense*, *M. fortuitum* and *M. abscessus*. *Significant difference between the concentration tested and the positive control, indicating statistical differences when $p < 0.05$.

4. Experimental

4.1. Chemistry

4.1.1. General techniques

Reagents and solvents used in this work were purchased from Sigma-Aldrich[®] and were used as purchased. Licarin A was obtained as previously described from isoeugenol by an oxidative coupling methodology with hydrogen peroxide and coconut water (from fresh green coconuts - *Cocos nucifera* L.) as reported by Rodrigues et al. [13]. Reactions were monitored by thin layer chromatography (TLC) on silica gel sheets (Macherey-Nagel, DC-Fertigfolien Alugram[®] XtraSil G/UV254). Column chromatography was used as the purification method using silica gel 60, 70–230 mesh (Sorbiline[®]). The melting point of the compounds were determined on a Microquímica MOAs 301. The structures of all compounds were confirmed by various spectroscopic techniques: i) FTIR spectra were recorded on a Shimadzu[®] Affinity 1 FTIR spectrometer using an ATR attachment; ii) NMR spectra were recorded on a Bruker[®] AC-300 spectrometer (300 MHz for ¹H NMR and 75 MHz for ¹³C NMR spectra). Chemical shifts (δ) were reported in parts per million (ppm) with reference to the deuterated solvent employed (CDCl₃). Coupling constants (J) were reported in Hertz (Hz); iii) High resolution mass spectra (HRMS) were obtained in a Bruker[®] Daltonics microTOF QII/ESI-TOF equipment. The values of logP were calculated using the Swiss ADME methodology provided by the Swiss Institute of Bioinformatics [32].

4.1.2. Synthesis

4.1.2.1. General procedure for the synthesis of Licarin A ethers (derivatives (2), (3), (4) & (5)). The general synthesis method used in this study was adapted from a method published by Coolen et al. [49]: To a round bottom flask was added Licarin A (100.0 mg, 0.31 mmol), dimethylformamide (1.0 mL) and potassium carbonate (339.0 mg, 2.45 mmol). This mixture was kept under magnetic stirring under reflux at 70 °C. After 30 min, the respective benzyl halide (1.23 mmol) was added and the reaction was followed by thin layer chromatography (TLC) using a solvent mixture of hexane/ethyl acetate (8.0:2.0 v/v). After 3 h, the solvent was eliminated by an air stream, the crude residue dissolved with ethyl acetate and the organic solution washed with a 0.5 mol.L⁻¹ NaOH solution (3 × 40.0 mL). The organic phase was dried with anhydrous sodium sulfate and the filtrate was concentrated by rotary evaporator. The crude product was obtained using column chromatography using a hexanes/ethyl acetate solvent mixture (8.0:2.0 v/v).

4.1.2.2. Synthesis of derivative (2). IUPAC Name: 2-(4-(benzyloxy)-3-methoxyphenyl)-7-methoxy-3-methyl-5-propyl-2,3-dihydro benzofuran.

Appearance: Light yellow solid. Yield: 58%; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.43–7.25 (m, 5H), 6.99 (d, J = 1.65 Hz, 2H), 6.98–6.82 (m, 2H), 6.76 (d, J = 6.6 Hz, 2H), 6.35 (dd, J = 15.69, 1.59 Hz, 1H),

6.16–6.03 (m, 1H), 5.14 (s, 2H), 5.09 (d, J = 9.33 Hz, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.47–3.39 (m, 1H), 1.86 (dd, J = 6.55, 1.53 Hz, 3H), 1.37 (d, J = 6.78 Hz, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 149.7, 148.2, 146.5, 144.1, 137.0, 133.2, 133.2, 132.1, 130.8, 128.4, 127.7, 127.2, 123.4, 119.1, 113.6, 113.2, 110.0, 109.2, 93.5, 70.9, 56.0, 55.8, 45.4, 18.3, 17.6. HRMS (ESI/Q-TOF) m/z calculated for C₂₇H₂₈O₄ (M + H)⁺: 417.2061, found 417.2060.

4.1.2.3. Synthesis of derivative (3). IUPAC Name: (E)-4-((2-methoxy-4-(7-methoxy-3-methyl-5-(prop-1-en-1-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-2-yl)phenoxy)methyl)benzotrile.

Appearance: Yellow solid. Yield: 55%; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.64 (d, J = 8.28 Hz, 2H), 7.53 (d, J = 8.16 Hz, 2H), 7.00 (d, J = 1.83 Hz, 1H), 6.87 (dd, J = 8.25, 1.83 Hz, 1H), 6.78–6.75 (m, 3H), 6.34 (dd, J = 15.7, 1.5 Hz, 1H), 6.15–6.03 (m, 1H), 5.18 (s, 2H), 5.09 (d, J = 9.33 Hz, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.48–3.38 (m, 1H), 1.85 (dd, J = 6.54, 1.38 Hz, 3H), 1.36 (d, J = 6.78 Hz, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 149.7, 147.4, 146.2, 144.0, 142.5, 134.0, 133.0, 132.3, 132.2, 130.8, 127.4, 123.5, 119.0, 118.7, 113.7, 113.2, 111.5, 110.0, 109.0, 93.3, 70.0, 55.9, 55.8, 45.5, 18.3, 17.6. HRMS (ESI/Q-TOF) m/z calculated for C₂₉H₂₇NO₄ (M + H)⁺: 442.2013, found 442.2011.

4.1.2.4. Synthesis of derivative (4). IUPAC Name: (E)-2-(4-((4-fluorobenzyl)oxy)-3-methoxyphenyl)-7-methoxy-3-methyl-5-(prop-1-en-1-yl)-2,3-dihydrobenzofuran.

Appearance: White solid. Yield: 74%; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.39–7.37 (m, 2H), 7.06–7.00 (m, 2H), 6.99 (d, J = 1.86 Hz, 1H), 6.88 (dd, J = 8.28, 1.89 Hz, 1H), 6.82 (d, J = 8.22 Hz, 1H), 6.77 (s, 1H), 6.75 (s, 1H), 6.35 (dd, J = 15.67, 1.62 Hz, 1H), 6.15–6.03 (m, 1H), 5.11–5.08 (m, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.49–3.39 (m, 1H), 1.86 (dd, J = 6.57, 1.53 Hz, 3H), 1.37 (d, J = 6.78 Hz, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 162.4, 149.8, 148.0, 146.5, 144.1, 133.5, 133.1, 132.8, 132.2, 130.8, 129.2, 129.1, 123.4, 119.0, 115.5, 115.2, 113.8, 113.2, 110.0, 109.2, 93.5, 70.4, 56.0, 55.9, 45.5, 18.3, 17.6. HRMS (ESI/Q-TOF) m/z calculated for C₂₇H₂₇FO₄ (M + H)⁺: 435.1966, found 435.1967.

4.1.2.5. Synthesis of derivative (5). IUPAC Name: (E)-2-(4-((4-chlorobenzyl)oxy)-3-methoxyphenyl)-7-methoxy-3-methyl-5-(prop-1-en-1-yl)-2,3-dihydrobenzofuran.

Appearance: White solid. Yield: 78%; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.37–7.30 (m, 4H), 7.00 (d, J = 1.89 Hz, 1H), 6.88 (dd, J = 6.58, 1.96 Hz, 2H), 6.82–6.75 (m, 3H), 6.35 (dd, J = 15.69, 1.59 Hz, 1H), 6.13–6.06 (m, 1H), 5.09 (m, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.49–3.39 (m, 1H), 1.86 (dd, J = 6.55, 1.56 Hz, 3H), 1.37 (d, J = 6.78 Hz, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 149.7, 147.8, 146.4, 144.0, 135.5, 133.5, 133.1, 132.1, 130.8, 128.6, 128.5, 128.1, 123.4, 119.0, 113.7, 113.2, 110.0, 109.2, 93.4, 70.2, 55.9, 55.8, 45.5, 18.3, 17.6. HRMS (ESI/Q-TOF) m/z calculated for C₂₇H₂₇ClO₄ (M + H)⁺: 451.1671, found 451.1670.

4.1.2.6. Synthesis of derivative (6). IUPAC Name: (E)-1-((4-chlorobenzyl)oxy)-2-methoxy-4-((2-methoxy-4-(prop-1-en-1-yl)phenoxy)methyl) benzene.

For the synthesis of derivative (6), Licarin A was reacted with 1-((4-chlorobenzyl)oxy)-4-(chloromethyl)-2-methoxybenzene, according to the procedure described in section 4.1.2.1.

Appearance: White solid. Yield: 53%; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.37–7.29 (m, 4H), 7.01 (d, $J = 1.77$ Hz, 1H), 6.89–6.76 (m, 5H), 6.31 (dd, $J = 15.72, 1.53$ Hz, 1H), 6.15–6.03 (m, 1H), 5.08 (s, 2H), 5.03 (s, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 1.85 (dd, $J = 6.55, 1.53$ Hz, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 149.8, 149.7, 147.5, 147.2, 135.6, 133.5, 131.7, 130.7, 130.5, 128.6, 128.5, 124.0, 119.8, 118.5, 114.4, 114.0, 111.3, 109.0, 71.2, 70.3, 55.9, 55.8, 18.3. HRMS (ESI/Q-TOF) m/z calculated for $\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{ClO}_4$ (M + K) $^+$: 463.1073, found 463.1089.

4.1.2.7. Synthesis of derivative (7). IUPAC Name: (E)-3-(2-(4-((4-chlorobenzyl)oxy)-3-methoxyphenyl)-7-methoxy-3-methyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-yl)acrylaldehyde.

The synthesis method used for derivative (7) was adapted from a method published by Iliński et al. [28] and was as follows: Distilled water (0.5 mL) and 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ) (50.0 mg, 0.22 mmol) were added in a round bottom flask. The suspension was left under magnetic stirring at room temperature for 5 min and then it was added to the benzyl ether (5) (50.0 mg, 0.11 mmol) as a solution in dichloromethane (2.0 mL). The reaction was followed by TLC using a solvent mixture of hexanes/ethyl acetate (7.0:3.0; v/v) and was found to be complete after 30 min. Ascorbic acid (40.0 mg, 0.22 mmol) was then added and the mixture kept under stirring for 10 min. The solids were removed by filtration, the filtrate washed with saturated sodium bicarbonate solution and the organic phase dried with anhydrous sodium sulfate. After evaporating the solvent in a rotary evaporator, the crude product was purified by silica gel column chromatographic column using a solvent mixture of hexanes/ethyl acetate (7.0:3.0 v/v).

Appearance: Orange solid. Yield: 87%; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 9.64 (d, $J = 7.71$ Hz, 1H), 7.44–7.27 (m, 5H), 7.02 (s, 1H), 7.00 (s, 1H), 6.96 (d, $J = 1.89$ Hz, 1H), 6.88 (dd, $J = 8.23, 1.95$ Hz, 1H), 6.84–6.79 (m, 1H), 6.64–6.56 (m, 1H), 5.19 (d, $J = 9.12$ Hz, 1H), 5.10 (s, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.55–3.46 (m, 1H), 1.41 (d, $J = 6.81$ Hz, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 193.5, 153.1, 150.6, 149.9, 148.1, 144.6, 135.4, 133.9, 133.6, 132.6, 128.7, 128.5, 128.1, 126.3, 119.0, 117.3, 113.9, 111.7, 110.0, 94.2, 70.3, 56.0, 45.0, 17.8. HRMS (ESI/Q-TOF) m/z calculated for $\text{C}_{27}\text{H}_{25}\text{ClO}_5$ (M + H) $^+$: 465.1464, found 465.1465.

4.1.2.8. Synthesis of derivative (8). IUPAC Name: (E)-3-(2-(4-((4-chlorobenzyl)oxy)-3-methoxyphenyl)-7-methoxy-3-methyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-yl)acrylic acid.

The synthesis method used for derivative (7) was adapted from a method published by Pearl et al. [29] and was as follows: The aldehyde (7) (100.0 mg, 0.22 mmol), and 20.2 mL of aq. sodium hydroxide (4.0 mol.L $^{-1}$) were added to a round bottomed flask, which was left under magnetic stirring until the aldehyde solubilised. Then, silver oxide (43.0 mg, 0.19 mmol) was added and the mixture was stirred under heating at 55 °C. The reaction was followed by TLC using a solvent mixture of hexanes/ethyl acetate (7.0:3.0 v/v). When complete, the mixture was cooled to room temperature, the solids separated by vacuum filtration and the filtrate acidified to pH2.0 with concentrated hydrochloric acid. This solution was extracted with ethyl acetate (3 \times 40.0 mL), the organic phase dried with anhydrous sodium sulfate and the pure product obtained after eliminating the solvent in a rotary evaporator.

Appearance: Yellow solid. Yield: 41%; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.74 (d, $J = 15.78$ Hz, 1H), 7.37–7.30 (m, 4H), 6.98 (dd, $J = 9.61, 1.77$ Hz, 3H), 6.88 (dd, $J = 8.29, 1.85$ Hz, 1H), 6.81 (d, $J = 8.25$ Hz, 1H), 6.31 (d, $J = 15.84$ Hz, 1H), 5.17 (d, $J = 9.21$ Hz, 1H), 5.10 (s, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.54–3.44 (m, 1H), 1.40 (d, $J = 6.78$ Hz,

3H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 172.4, 150.2, 149.9, 148.1, 147.2, 144.5, 135.4, 133.7, 133.6, 132.9, 128.7, 128.6, 128.1, 119.0, 116.9, 114.4, 114.0, 111.6, 110.0, 94.1, 70.3, 56.0, 45.1, 17.7. HRMS (ESI/Q-TOF) m/z calculated for $\text{C}_{27}\text{H}_{25}\text{ClO}_6$ (M + H) $^+$: 481.1413, found 481.1410.

4.1.2.9. Synthesis of derivative (9). IUPAC Name: (E)-3-(2-(4-((4-chlorobenzyl)oxy)-3-methoxyphenyl)-7-methoxy-3-methyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-yl)prop-2-en-1-ol.

The synthesis method used for derivative (9) was adapted from methods published by Mochalov et al. [30] and Ward et al. [31] and was as follows: The aldehyde (7) (100.0 mg, 0.22 mmol) and ethanol (2.0 mL) were added to a round bottomed flask, which was left stirring in an ice bath until the aldehyde solubilised. Then, sodium borohydride (8.3 mg, 0.22 mmol) was added dropwise over 10 min. After this time, the reaction was left at room temperature and was followed by TLC using a solvent mixture of hexanes/ethyl acetate (7.0:3.0 v/v). After completion of the reaction, the flask was placed back in an ice bath and 0.5 mL of hydrochloric acid (20% v/v) was added to achieve pH2.0. The solvent was removed on a rotary evaporator, the residue was suspended in distilled water and extracted with dichloromethane. Then the organic phase was washed with a saturated sodium chloride solution (3 \times 40.0 mL), dried with anhydrous sodium sulfate and the final product obtained after eliminating the solvent in a rotary evaporator.

Appearance: Yellow solid. Yield: 70%; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.36–7.28 (m, 4H), 6.98 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 6.86 (dd, $J = 8.26, 1.86$ Hz, 1H), 6.82–6.78 (m, 3H), 6.54 (d, $J = 15.84$ Hz, 1H), 6.27–6.17 (m, 1H), 5.11–5.09 (m, 3H), 4.27 (dd, $J = 5.88, 1.2$ Hz, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.49–3.42 (m, 1H), 2.02 (s, 1H), 1.36 (d, $J = 6.78$ Hz, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 149.6, 147.8, 147.1, 144.0, 135.4, 133.4, 133.2, 133.2, 131.2, 130.7, 128.6, 128.5, 126.2, 118.9, 114.0, 113.5, 109.8, 109.6, 93.5, 70.1, 63.6, 55.9, 55.8, 45.3, 17.5. HRMS (ESI/Q-TOF) m/z calculated for $\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{ClO}_5$ (M + H) $^+$: 467.1620, found 467.1614.

4.2. Biology

4.2.1. Microorganisms

Strains of *Mycobacterium abscessus* (ATCC 19977), *Mycobacterium fortuitum* (ATCC 6841) and *Mycobacterium massiliense* (ATCC 48898) were used in this study. The colonies were isolated in Löwesten-Jensen solid media (HiMedia Laboratories) and then cultured in Middlebrook 7H9 broth medium (Difco Laboratories) containing 0.2% (v/v) glycerol and 10% (v/v) OADC (oleic acid-albumin-dextrose-catalase).

4.2.2. Antimycobacterial susceptibility tests

The minimum inhibitory concentration (MIC) values were determined by a broth microdilution method, according to the standard protocol M24-A2 [27]. The assay was performed on 96-well sterile U-bottomed microplates containing 100 μL of Mueller-Hinton broth per well (MHB-Merck, Darmstadt, Germany). Clarithromycin and sulfamethoxazole were evaluated at the following concentrations: clarithromycin 0.06–64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and sulfamethoxazole 1–128 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The Licarin derivatives were evaluated at concentrations of 1250–9.76 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Initial stock solutions of the compounds were made in dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich) at 10 mg/mL, from which further dilutions were made in Mueller-Hinton broth (HiMedia Laboratories Pvt Ltd). Standardisation of the inoculum density for susceptibility testing was performed according to the McFarland 0.5 scale and the final inoculum density for this susceptibility test was 5×10^5 CFU/mL. 100 μL of the compounds was added to the first column of the plate and a serial dilution was performed, considering a dilution factor of 2. Finally, 100 μL of the bacterial inoculum was added. The negative control used was 100 μL of 2% DMSO solution in 100 μL of Mueller-Hinton broth. One orifice of plate was reserved for positive control or bacterial viability control, prepared with 100 μL of Mueller-Hinton broth and

100 μ L of bacterial inoculum. Reading of the plates was done after incubation for 72 h at 30 °C, and the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined using the indicator 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) (Vetec VR, Rio de Janeiro, Brazil). The formation of red staining in the orifices was interpreted as bacterial growth, whereas the non-formation of red staining was considered as inhibition of bacterial growth. Each test was performed in triplicate [50].

4.2.3. Antibiofilm activity

Licarin A and the synthesised products were tested individually for their ability to inhibit biofilm formation and to destroy the previously formed biofilm by a mycobacterial species. For this study, we used a "quantitative macro-technique" to form biofilms, which is a method that uses the biomass capacity of the biofilms to stain in the presence of violet crystal. This technique, proposed by Flores et al. [20], was actually adapted from the micro-technique originally proposed by Carter et al. [51]. This adaptation was necessary due to the potential risk of contamination that microorganisms of the genus *Mycobacterium* present. The production of aerosols by these bacilli becomes a limiting factor for the tests, since there is an increased risk of contamination of the equipment, such as microplate readers. Thus, the macro-technique allows the quantification of the biofilm (tube by tube) in total exhaust flow, thereby reducing the risk of contamination. In addition, readings on a conventional spectrophotometer become safer, since the sample is wrapped in parafilm® which prevents the volatilisation of the sample, as well as possible contamination by the analyst.

The activity of the synthesised Licarin A derivatives against planktonic microorganisms was evaluated through susceptibility tests using the broth microdilution technique to give us experimental parameters for the next stage. Considering that in the sessile form the microorganisms have greater resistance to antimicrobial agents than in the planktonic form, we proceeded to antibiofilm activity tests.

For the antibiofilm activity tests, we consider only the compounds with the best values determined during the first stage (the broth microdilution results). We evaluated the activity of the synthesised Licarin A derivatives in inhibiting mycobacterial biofilms and in destroying previously formed bacterial biofilms. The inhibition of mycobacterial biofilms were quantified and represented in graphs as shown above.

4.2.3.1. Biofilm formation inhibition test. Licarin A and the synthesised products were tested for their ability to inhibit biofilm formation. The concentration of each derivative used was equal to or lower than the previously determined MIC. In 5 mL polystyrene test tubes, 1 mL Middlebrook 7H9 medium containing 1×10^7 CFU/mL of each bacterial species to be tested and 1 mL of the diluted derivative to be evaluated was added. The tubes were covered with Parafilm® and incubated at 30 °C for 7 days. The results of biofilm destruction activity were quantified and discussed above, however as none of the compounds destroyed the bacterial biofilm, it was decided there was no practical purpose on including such graphs into this paper.

4.2.3.2. Biofilm destruction test. In the same test tubes used for the above assay, 1 mL Middlebrook 7H9 medium containing 1×10^7 CFU/mL of the bacterial species was added, and then the tubes were covered with Parafilm® and incubated at 30 °C for 7 days. After biofilm formation, 1 mL of each studied derivative was added to each tube at concentrations equal to or greater than the MICs. The test tubes were again covered with Parafilm® and incubated at 30 °C for a further 24 h.

4.2.3.3. Quantification of biofilms and statistical analysis. The biofilm quantification was performed using 0.1% crystal violet according to the method published by Flores et al. [20]. The absorbance was measured using a spectrophotometer to measure optical density (OD) at 570 nm (Spectrophotometer UV1800, Hitachi, Berkshire, United Kingdom). The cells which were weakly adhered to the formed biofilm were removed by washing with saline solution and the remaining dried at room

temperature for a few minutes. Then 2 mL of a Crystal Violet (0.1%) solution was added. The tubes were kept at rest for 10 min and then washed with saline solution to remove remaining planktonic cells and excess dye. 2 mL of ethanol (95%) was added to each test tube, kept for 15 min, and transferred to disposable cuvettes for reading. The biofilm formation was determined by the significant difference between the means of the obtained absorbance for the positive control (culture medium and bacterium) and the mean obtained for the negative control (culture medium). One-way ANOVA followed by Bonferroni's Multiple Comparison Test was used, considering a statistical difference when $p < 0.05$. GraphPad Prism software version 5.01 was used to perform the graphs.

4.2.3.4. Cytotoxicity test. The cytotoxic effect of compounds was assessed by the colorimetric resazurin assay [52]. Briefly, 1×10^3 Vero cells were seeded in a 96-well plate, maintained at 37 °C and 5% CO₂. Following overnight adherence, the cells were incubated for 72hr with the medium alone or with a two-fold serial dilution of each compound, covering a range of 31.25–500 μ g/mL. Then, the supernatants were removed, 200 μ L of fresh medium containing 10% resazurin 1 mM were added to each well and the plates incubated for 6 h. Absorbances were measured in a spectrophotometric microplate reader at 570 nm and 600 nm and the cell viability was calculated considering the difference in resazurin reduction between treated and nontreated cells. The CC₅₀, which corresponds to the concentration that reduces cell viability by 50%, was calculated by nonlinear regression. All experiments were run in triplicate and results are averages from at least two independent experiments.

Authors's statement

We state that this work has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder.

Declaration of competing interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

In the execution of this project, we thank the Brazilian Federal Agency - CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for granting financial aid through the Graduate Support Program (Programa de Apoio à Pós-Graduação - PROAP).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104203>.

References

- [1] N.M. Mortaniasih, D. Kusumaningrum, E.B. Koendhuri, Sondarsono, T. Kusniati, D.N. Dewi, Nontuberculous mycobacterial species and *Mycobacterium tuberculosis* complex coinfection in patients with pulmonary tuberculosis in Dr. Soetomo Hospital, Surabaya, Indonesia, *Int. J. Mycobacteriol.* 6 (1) (2017) pp9–13, <https://doi.org/10.4103/2212-5531.201894>.
- [2] N.Z. Martín-De-Hijas, D. García-Almeida, G. Ayala, B. Fernández-Roblas, I. Gadea, A. Cebrián, E. Gómez-Barrena, J. Esteban, Biofilm development by clinical strains of non-pigmented rapidly growing mycobacteria, *Clin. Microbiol. Infect.* 15 (10) (2009) pp931–936, <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02882>.
- [3] M.B. Pitombo, O. Lupi, R.S. Duarte, Infections by rapidly growing mycobacteria

- resistant to disinfectants: a rational matter? *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 31 (11) (2009) pp529–533, <https://doi.org/10.1590/s0100-72022009001100001>.
- [4] AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, Nota Técnica Conjunta N° 01/2009 - SVS/SAS e ANVISA. Infecções por micobactérias de crescimento rápido: fluxos de notificação, diagnóstico clínico, microbiológico e tratamento, (2009).
- [5] B.A. Brown-Elliott, R.J. Wallace, Clinical and taxonomic status of pathogenic non-pigmented or late-pigmented rapidly growing mycobacteria, *Clin. Microbiol. Rev.* 15 (4) (2002) pp716–746, <https://doi.org/10.1128/cmr.15.4.716-746.2002>.
- [6] G. El Helou, G.M. Viola, R. Hachem, X.Y. Han, Raad I, Rapidly growing mycobacterial bloodstream infections, *Lancet Infect. Dis.* 13 (2) (2013) pp166–174, [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70216-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70216-X).
- [7] M.M. Johnson, J.A. Odell, Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections, *J. Thorac. Dis.* 6 (3) (2014) pp210–220, <https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2013.12.24>.
- [8] M.A. Jiménez-Arellanes, G.A. Gutiérrez, S. Rojas-Tomé, M. Meckes-Fischer, Medicinal plants, an important reserve of antimycobacterial and antibacterial drugs: an update, *J. Infect. Dis. Ther.* 2 (6) (2014), <https://doi.org/10.4172/2332-0877.1000185>.
- [9] L.J. McGraw, N. Lad, T.M. Hlokwé, A.L. Michel, J.J. Meyer, J.N. Eloff, Purified compounds and extracts from *Fucoxia* species with antimycobacterial activity against *Mycobacterium bovis* and fast-growing mycobacteria, *Biol. Pharm. Bull.* 31 (7) (2008) pp1429–1433, <https://doi.org/10.1248/bpb.31.1429>.
- [10] G. O'Donnell, R. Poeschl, O. Zimhony, M. Gunaratnam, J.R.C. Moreira, S. Neidle, D. Evangelopoulos, S. Shukla, J.P. Malkinson, H.I. Boshoff, A. Lenaerts, S. Gibbons, Bioactive pyridine-*N*-oxide disulfides from *Adiantum* spathulatum, *J. Nat. Prod.* 72 (2009) pp360–365, <https://doi.org/10.1021/sp800572a>.
- [11] A.A. Kaikabo, J.N. Eloff, Antibacterial activity of two biflavonoids from *Garcinia livingstonei* leaves against *Mycobacterium avium* ssp. *parvum*, *J. Ethnopharmacol.* 138 (2011) pp253–255, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.06.023>.
- [12] S.Y. Liu, G.Q. Wang, Z.Y. Liang, Q.A. Wang, Synthesis of dihydrobenzofuran neolignans Licarin A and dihydrolicarinin as well as related triazolylglycosides, *Chem. Res. Chin. Univ.* 29 (6) (2013) pp1119–1124, <https://doi.org/10.1007/s40242-013-3131-6>.
- [13] L.C. Rodrigues, J.M. Barbosa-Filho, S.D.G. Marques, F.V.P. Borges, L.A.A. Silva, L.H.R. Lygusa, R. Minso, formation of bioactive benzofuran via oxidative coupling using coconut water (*Cocos nucifera* L.) as biocatalyst, *Org. Commun.* 10 (2) (2017) pp72–78, <https://doi.org/10.25135/org.oc.10.16.11.449>.
- [14] Y. Murakami, M. Shoji, A. Hirata, S. Tanaka, I. Yokoe, S. Fujiwara, Dihydrodioxugenol, an isoeugenol dimer, inhibits lipopeptidase-stimulated nuclear factor kappa B activation and cyclooxygenase-2 expression in macrophages, *Arch. Biochem. Biophys.* 434 (2) (2005) pp326–332, <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.11.013>.
- [15] M.A.J. Arellanes, N.R.B. Cortés, I. García, Actividad Antioxidante y Antimicrobiana Del Extracto Hexánico y Compuestos Puros del Rizoma de *Aristolochia Talismans*, *Rev. Mex. Ciencias Farm.* 42 (3) (2011) pp35–41 ISSN 1870-0195.
- [16] B.Y. Park, B.S. Min, O.K. Kwon, S.R. Oh, K.S. Ahn, T.J. Kim, D.Y. Kim, K. Bae, H.K. Lee, Increase of caspase-3 activity by lignans from *Machilus thunbergii* in HL-60 cells, *Biol. Pharm. Bull.* 27 (8) (2004) pp1305–1307, <https://doi.org/10.1248/bpb.27.1305>.
- [17] V.A. Souza, C.V. Nakamura, A.G. Carriés, Atividade Antichagásica de Lignanos e Neolignanos, *Rev. Viri. Quím.* 4 (3) (2012) pp197–207 ISSN 1984-6835.
- [18] K. Sawadee, T. Chaowakul, V. Lipipun, T.-H. Dufat, S. Michel, K. Likhitwitayawee, New neolignans and a lignan from *Melissa frugosa*, and their anti-hepatic and cytotoxic activities, *Tetrahedron Lett.* 54 (32) (2013) 4259–4263, <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2013.05.144>.
- [19] R. León-Díaz, M. Meckes, S. Saiz-Fernández, G.M. Molina-Salinas, J. Vargayo-Villaverde, J. Torres, J. Luna-Herrera, A. Jiménez-Arellanes, Antimycobacterial neolignans isolated from *Aristolochia tuberosa*, *Memórias Inst. Oswaldo Cruz* 105 (1) (2010) pp45–51, <https://doi.org/10.1590/S0074-02782010000100006>.
- [20] V.C. Flores, F.D.S. Siqueira, C.R. Miald, P.C. Bonex, V.A. Agertt, S.T. Stefanelli, G.G. Rossi, M.M.A. Campos, Antibiofilm effect of antimicrobials used in the therapy of mycobacteriosis, *Microb. Pathog.* 99 (2016) pp229–235, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.08.017>.
- [21] T.B. De Souza, I.S. Cakho, F.R. Paula, C.C. Rodrigues, D.T. Carvalho, D.F. Dias, Synthesis, activity, and molecular modelling studies of 1,2,3-triazole derivatives from natural phenylpropenoids as new trypanocidal agents, *Chem. Biol. Drug Des.* 95 (1) (2020) pp124–129, <https://doi.org/10.1111/cbdd.13628>.
- [22] T. Santos, C.M. Coelho, T.C. Elias, F.S. Siqueira, E.S.S.D. Nora, M.M.A. Campos, G.A.P. De Souza, L.F.L. Coelho, D.T. Carvalho, Synthesis and biological evaluation of new eugenol-derived 1,2,3-triazoles as antimycobacterial agents, *J. Braz. Chem. Soc.* 30 (7) (2019) pp1425–1436, <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190038>.
- [23] H. Azevedo-Barbosa, G.A. Ferreira-Silva, C.F. Silva, T.B. De Souza, D.F. Dias, A.C.C. De Paula, M. Ionta, D.T. Carvalho, Phenylpropenoid-based sulfonamide promotes cyclin D1 and cyclin E downregulation and induces cell cycle arrest at G1/S transition in estrogen positive MCF-7 cell line, *Toxicol. Virol.* 59 (2019) pp150–160, <https://doi.org/10.1016/j.toxvi.2019.04.023>.
- [24] T.M.M. Hipólito, G.T.L. Bastos, T.W.I. Barbosa, T.B. De Souza, L.F.L. Coelho, A.L.T. Dias, L.C. Rodrigues, M.H. Dos Santos, D.F. Dias, L.L. Franco, D.T. Carvalho, Synthesis, activity, and docking studies of eugenol-based glucosides as new agents against *Candida* sp., *Chem. Biol. Drug Des.* 92 (2) (2018) pp1514–1524, <https://doi.org/10.1111/cbdd.13338>.
- [25] L.F.S. Carvalho, D.J. Alvarenga, L.C.F. De Carmo, L.G. De Oliveira, N.C. Silva, A.L.T. Dias, L.F.L. Coelho, T.B. De Souza, D.F. Dias, D.T. Carvalho, Antibiofilm activity of new eugenol-benzotriazole hybrids against *Candida* spp., *J. Chem.* (2017) pp1–8, <https://doi.org/10.1155/2017/5207439> Article ID 5207439.
- [26] J. VAN-INGEN, M.J. BOERBEK, D. VAN SOOLINGEN, J.W. MOUTON, Resistance mechanisms and drug susceptibility testing of nontuberculous mycobacteria, *Drug Resist. Updates* 15 (3) (2012) pp149–161, <https://doi.org/10.1016/j.drug.2012.04.001>.
- [27] M24-A2, S. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard – Second Edition, Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI] vol. 31, ISSN, 2011 0273-3099.
- [28] T. Bifskä, S. Li, K. Lundquist, Synthesis of cinnamaldehydes, esters of cinnamic acids and acylals of cinnamaldehydes by oxidation of arylpropenes with 2,5-dicyano-5,6-dichlorobenzoquinone (DDQ), *Tetrahedron Lett.* 39 (16) (1998) pp2413–2416, [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(98\)08213-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(98)08213-5).
- [29] I.A. Pearl, Vanillic acid (L Silver oxide method), *Org. Synth. Collect.* 4 (1963) p972, <https://doi.org/10.15227/orgsyn.036.0101.1950.30.p101>.
- [30] S.S. Mochalov, A.A. Fedotov, E.V. Trofimova, N.S. Zefirov, Direct synthesis of ethers from aldehydes and ketones. One-pot reductive etherification of benzaldehydes, alkyl aryl ketones, and benzophenones, *Russ. J. Org. Chem.* 52 (4) (2016) pp503–512, <https://doi.org/10.1134/S1070428016040047>.
- [31] D.E. Ward, C.K. Rhee, Chemoselective reductions with sodium borohydride, *Can. J. Chem.* 67 (7) (1989) pp1206–1211, <https://doi.org/10.1139/v67-07-182>.
- [32] Swiss Institute of Bioinformatics, Swiss ADME webtool, Available online: <http://www.swissadme.ch>, Accessed date: 13 January 2020.
- [33] F.S. Siqueira, G.G. Rossi, A.K. Machado, C.F.S. Alves, V.C. Flores, V.D. Somavilla, V.A. Agertt, J.D. Siqueira, R.S. Dias, P.M. Capetti, M.R. Sagrillo, D.F. Back, M.M.A. De Campos, Sulfamethoxazole derivatives complexed with metals: a new alternative against biofilms of rapidly growing mycobacteria, *Biofiling* *J.* 34 (8) (2018) pp893–911, <https://doi.org/10.1080/08927014.2018.1514497>.
- [34] S. Hatakeyama, Y. Ohama, M. Okazaki, Y. Nakai, K. Moriya, Antimicrobial susceptibility testing of rapidly growing mycobacteria isolated in Japan, *BMC Infect. Dis.* 17 (1) (2017) pp197, <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2298-8>.
- [35] M. Vert, Y. Doi, K.-H. Hellwich, M. Hess, P. Hodge, P. Kubisa, M. Rinaudo, F. Schue, Terminology for bio-related polymers and applications (IUPAC recommendations 2012), *Pure Appl. Chem.* 84 (2) (2012) pp377–410, <https://doi.org/10.1351/PAC-REC-10-13-04>.
- [36] P. Gupta, S. Sarkar, B. Das, S. Bhattacharjee, P. Tribedi, Biofilm, pathogenesis and prevention – a journey to break the wall – a review, *Arch. Microbiol.* 198 (1) (2016) pp1–15, <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1148-6>.
- [37] R.M. Douglas, biofilm formation: a clinically relevant microbiological process, *Clin. Infect. Dis.* 33 (8) (2001) pp1387–1392, <https://doi.org/10.1086/325972>.
- [38] A. Ojha, G.F. Hatfull, The role of iron in *Mycobacterium avium* biofilm formation: the cosachalin siderophore is essential in limiting iron conditions for biofilm formation but not for planktonic growth, *Mol. Microbiol.* 66 (2) (2007) pp468–483, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05935.x>.
- [39] A. Kosa, P.D. Hallett, C.D. Moon, A.J. Spiers, Characterization of a novel air-liquid interface biofilm of *Pseudomonas fluorescens* SBW25, *Microbiology* 155 (2009) pp1397–1406, <https://doi.org/10.1099/mic/0.025064-0>.
- [40] S. Stapanovic, D. Vukovic, I. Dakic, B. Savic, M. Svalic-Vlahovic, A modified micro-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation, *J. Microbiol. Methods* 40 (2) (2000) pp175–179, [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(99\)00322-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(99)00322-6).
- [41] M. Ramasamy, J. Lee, Recent nanotechnology approaches for prevention and treatment of biofilm-associated infections on medical devices, *Biomol. Res. Int.* 16 (2016) pp1–17, <https://doi.org/10.1155/2016/1851242>.
- [42] J.A. Lemire, J.J. Harrison, R.J. Turner, Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications, *Nat. Rev. Microbiol.* 11 (6) (2013) pp371–384, <https://doi.org/10.1038/nrmicro3028>.
- [43] R. Ghosh, S. Das, A. De, H. Kaha, M.J. Saha, P.K. Maiti, Post-site infections by nontuberculous mycobacteria: a retrospective clinical-microbiological study, *Int. J. Mycobacteriol.* 6 (1) (2017) pp34–37, <https://doi.org/10.4103/2212-5531.201901>.
- [44] K. Lewis, Biddle of biofilm resistance, *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (4) (2011) pp999–1007, <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.999-1007.2001>.
- [45] D.S. Trentin, R.B. Giordani, A.J. Macedo, Biofilmes Bacterianos Patogênicos: aspectos Gerais, *Impartância Clínica e Estratégias de Combate*, *Rev. Liberato* 14 (22) (2013) pp113–238, <https://doi.org/10.33514/liberato.2013v14n22.p213>.
- [46] K. Lewis, Persister cells: molecular mechanisms related to antibiotic tolerance, *Handb. Exp. Pharmacol.* 211 (2012) pp121–133, https://doi.org/10.1007/978-3-642-28951-4_8.
- [47] K. Bazaka, M.V. Jacob, V.K. Truong, F. Wang, W.A. Proshomal, J.Y. Wang, A.V. Ellis, C.C. Berndt, R.J. Crawford, E.P. Ivanova, Plasma-enhanced synthesis of bioactive polymeric coatings from monoterpenic alcohols: a combined experimental and theoretical study, *Biomacromolecules* 11 (8) (2010) pp2016–2026, <https://doi.org/10.1021/bm100369u>.
- [48] V. Lazar, Quorum sensing in biofilms - how to destroy the bacterial citadels or their cohesion? *Journal of Anastrobe* 17 (6) (2011) pp280–285, <https://doi.org/10.1016/j.anastrobe.2011.03.023>.
- [49] H.E.A.C. Corlen, J.A.M. Mourais, P.W.N.M. Van Leeuwen, Substrate selective catalysis by rhodium metallobonds, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) pp1906–1913, <https://doi.org/10.1021/ja00133a012>.
- [50] M.C.C. Ayres, M.S. Brandão, G.M. Vieira-Junior, J.C.A.S. Menor, H.B. Silva, M.J.S. Soares, M.H. Charves, Atividade Antibacteriana de Plantas Úteis e Constituintes Químicas da Raiz de *Copernicia pruriens*, *Rev. Bras. Farmacogn.* 18 (1) (2008) pp90–97, <https://doi.org/10.1590/S0102-495X2008001000017>.
- [51] G. Carter, M. Wu, D.C. Drummond, L.E. Bermudez, Characterization of biofilm formation by clinical isolates of *Mycobacterium avium*, *J. Med. Microbiol.* 52 (9) (2003) pp747–752, <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05224-0>.
- [52] A.L. Mazzoni, L.F. Diniz, K.R. Gonçalves, R.S. Windshlinger, T. Araújo, I. Bilsim, M.T. Bahia, Synergic effect of allopurinol in combination with nitroheterocyclic compounds against *Trypanosoma cruzi*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 63 (6) (2019), <https://doi.org/10.1128/AAC.02301-19> e02301-19.