UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA DO RECONHECER

ESTUDO DE CHALCONAS E AURONAS SINTÉTICAS QUANTO AO POTENCIAL ANTIMICOBACTERIANO E ANTI-INFLAMATÓRIO PARA O TRATAMENTO DA TUBERCULOSE PULMONAR GRAVE

YASMIN VIANA MARTINS

CAMPOS DOS GOYTACAZES
SETEMBRO 2026

ESTUDO DE CHALCONAS E AURONAS SINTÉTICAS QUANTO AO POTENCIAL ANTIMICOBACTERIANO E ANTI-INFLAMATÓRIO PARA O TRATAMENTO DA TUBERCULOSE PULMONAR GRAVE

YASMIN VIANA MARTINS

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia com ênfase em Biologia Celular.

Orientadora: Drª Thatiana Lopes Biá Ventura Simão

Coorientadora: Drª Michelle Frazão Muzitano

CAMPOS DOS GOYTACAZES
SETEMBRO 2026

FICHA CATALOGRÁFICA
UENF - Bibliotecas
Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

M386 Martins, Yasmin Viana.

ESTUDO DE CHALCONAS E AURONAS SINTÉTICAS QUANTO AO POTENCIAL ANTIMICOBACTERIANO E ANTI-INFLAMATÓRIO PARA O TRATAMENTO DA TUBERCULOSE PULMONAR GRAVE. / Yasmin Viana Martins. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2026.

204 f. : il.
Inclui bibliografia.

Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2026.
Orientadora: Thatiana Lopes Biá Ventura Simão.
Coorientadora: Michelle Frazão Muzitano.

1. Chalconas . 2. Auronas . 3. Imunopatologia . 4. Tuberculose pulmonar . 5. Terapia dirigida ao hospedeiro . I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

ESTUDO DE CHALCONAS E AURONAS SINTÉTICAS QUANTO AO POTENCIAL ANTIMICOBACTERIANO E ANTI-INFLAMATÓRIO PARA O TRATAMENTO DA TUBERCULOSE PULMONAR GRAVE

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia com ênfase em Biologia Celular.

Aprovada em 03 de setembro de 2026.

Comissão examinadora:

Drª Rebeka da Conceição Souza – UENF

Doutora em Biociências e Biotecnologia

Dr Shaft Corrêa Pinto – UFRJ

Doutor em Química de Produtos Naturais

Drª Valdirene Moreira Gomes – UENF

Doutora em Ciências (Biologia Molecular)

Drª Michelle Frazão Muzitano – UFRJ

Doutora em Química de Produtos Naturais

Coorientadora

Drª Thatiana Lopes Biá Ventura Simão – UFRJ

Doutora em Biociências e Biotecnologia

Orientadora

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia do Reconhecer, do Centro de Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, sob coorientação da Profª Drª Michelle Frazão Muzitano e orientação da Profª Drª Thatiana Lopes Biá Ventura Simão.

Apoio:

- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
- FAPERJ- Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro
- CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor do meu destino, meu guia e socorro presente na hora da angústia, aos meus amados pais, Rildo e Rosângela, ao meu noivo Allan Cayqui e aos meus companheiros de laboratório.

AGRADECIMENTOS

Ao concluir mais uma importante etapa da minha trajetória acadêmica e pessoal, sinto-me profundamente grata por estar cercada de pessoas tão especiais, que contribuíram de diferentes formas para que este sonho se tornasse realidade. A todos que me apoiaram, incentivaram e acreditaram em mim, mesmo nos momentos mais desafiadores, deixo o meu mais sincero agradecimento.

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me sustentado até aqui, concedendo-me força, coragem e perseverança nos momentos de dificuldade. Por ter renovado minha fé quando as incertezas surgiram e por ter colocado em meu caminho pessoas extraordinárias, que me auxiliaram e encorajaram a superar cada obstáculo encontrado ao longo dessa jornada.

À UENF, pela excelência na formação acadêmica proporcionada durante todos esses anos, pelos conhecimentos e amizades construídos, que contribuíram para minha formação profissional e pessoal.

À minha orientadora, Prof.ª Dr.ª Thatiana Simão, pela confiança depositada em mim, pela oportunidade de integrar o grupo de pesquisa do LBR e por todos os ensinamentos compartilhados ao longo desta trajetória. Agradeço pela orientação dedicada, pelo incentivo constante e pelas inúmeras oportunidades de aprendizado e desenvolvimento. Sua contribuição foi fundamental para a realização deste trabalho e para o meu crescimento acadêmico e profissional.

À minha coorientadora, Prof.ª Dr.ª. Michelle Muzitano por ter me aceitado como aluna, pelo apoio, incentivo e contribuições valiosas durante todo meu doutorado. Agradeço também por todo o conhecimento compartilhado. Sua participação foi essencial em cada etapa desta conquista.

À Prof.ª Dr.ª Elena Lassounskaia, pela parceria neste e em outros projetos, pelos ensinamentos, sugestões, correções e pela valiosa colaboração ao longo deste desafiador percurso.

Aos professores Drª Rebeka da Conceição, Dr. Shaft Corrêa e Drª Valdirene Moreira, por terem aceitado compor a banca examinadora e pelas relevantes contribuições para o aprimoramento deste trabalho. Ao Dr. Sanderson Calixto, pela cuidadosa revisão da minha tese.

Aos meus queridos amigos do LBR, Dr. Vinícius Mussi, Dr. Sanderson Calixto e Dra. Ana Caroline Mafra, pela amizade, companheirismo, incentivo, ajuda nos

experimentos e por todos os momentos compartilhados ao longo dessa jornada. Sou imensamente grata a Deus por ter encontrado vocês ao longo dessa jornada acadêmica e pessoal, na qual a colaboração e o apoio mútuo sempre estiveram presentes. Obrigada por cada ensinamento, conselho e tempo dedicados a mim, pelas conversas valiosas e pelos melhores almoços durante um árduo dia de experimento. Vocês foram mais que companheiros de laboratório; são amigos que pretendo levar para sempre em minha vida.

Aos alunos de iniciação científica Fábio Hugo Siqueira e Júlia Costa, por todo o apoio e companheirismo durante os experimentos. Estendo também meus agradecimentos a todos os colegas de laboratório, pela convivência e pelas experiências compartilhadas.

A todos os colaboradores, em especial, ao Dr. Guilherme Caleffi e ao Dr. Paulo Roberto da Costa, pela disponibilização das chalconas e auronas e importantes contribuições científicas para este estudo. E ao grupo de pesquisa coordenado pela Prof.ª Dr.ª Nelilma Romeiro e ao Riccardo Manganeli / UNIPD, por toda colaboração e contribuição, especialmente no capítulo 2 desta tese.

Ao corpo técnico, científico e administrativo do LBR, especialmente aos técnicos Verônica Lanes, Rita Escocard, Núbia Alencar, Juliana Silva e Fernando Lopes pelo suporte e auxílio prestados.

Aos meus amigos da graduação, em especial Sarah Rodrigues, Davi Tavares, Juliana Madureira e Izabelli Martins, pelo apoio, incentivo e amizade ao longo de todos esses anos.

Aos meus pais, Rosangela e Rildo Martins, por estarem ao meu lado em todos os momentos, oferecendo amor, apoio e incentivo incondicionais. Obrigada por cada abraço acolhedor, por suas orações incansáveis e por nunca deixar de acreditar em mim, mesmo quando eu mesma duvidava. Obrigada por estarem presentes, tornando essa caminhada mais fácil. Sou imensamente grata pelo seu amor e por todo o esforço dedicado à minha formação.

Ao meu noivo, Allan Cayqui Franklin, por caminhar ao meu lado em todos os momentos desta jornada, compartilhando comigo os desafios, as incertezas e também as conquistas. Obrigada pelo amor, pela paciência, pelo apoio incondicional e por acreditar em mim, mesmo quando eu mesma duvidei da minha capacidade. Sua presença trouxe força nos dias difíceis, tranquilidade nos momentos de ansiedade e alegria a cada pequena vitória alcançada. Esta conquista também é sua, pois foi construída com seu incentivo, sua compreensão e seu companheirismo.

Aos meus familiares e amigos que oraram, torceram e vibraram por cada conquista. Em especial, ao meu pastor, Luís Viana, e à minha avó, Joceli Viana (*in memoriam*), pelo amor, cuidado, preocupação e apoio ao longo da minha vida.

Aos meus amigos Joyce Rangel, Andresa Calil, Brenda Viana, Jéssica Viana, Thuany, Monique Montezuma, Laís Rangel e Ana Laura, pela amizade sincera, pelos momentos compartilhados, pelas palavras de incentivo e pelas orações que me fortaleceram durante essa jornada.

À FAPERJ e à CAPES, pela concessão da bolsa de pós-graduação, fundamental para a realização deste trabalho.

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização desta conquista. Esta tese também carrega um pouco de cada um de vocês.

SUMÁRIO

SUMÁRIO DE FIGURAS XII
SUMÁRIO DE TABELAS XIV
SUMÁRIO DE ESQUEMAS XV
LISTA DE ABREVIATURAS XVI
RESUMO XX
ABSTRACT XXI
1. INTRODUÇÃO 1
1.1. A tuberculose 1
1.2. O micro-organismo 3
1.3. Resposta imune e imunopatogenia da TB..... 6
1.4. Tratamento atual da TB e o desenvolvimento de novos fármacos..... 11
1.5. Tratamento adjuvante direcionado ao hospedeiro..... 17
1.6. Produtos naturais e derivados no tratamento da TB..... 20
1.7. Chalconas e Auronas..... 23
1.7.1. Chalconas..... 23
1.7.2. Auronas..... 27
2. JUSTIFICATIVA 30
3. OBJETIVOS 31
3.1. Objetivo geral 31
3.2. Objetivos específicos 31
4. MATERIAIS E MÉTODOS 31
4.1. Obtenção das auronas 32
4.2. Cultivo celular e tratamento com os derivados de auronas..... 32
4.3. Quantificação da produção de óxido nítrico (NO)..... 33
4.4. Avaliação da viabilidade celular em cultura de macrófagos 33
4.5. Cultivo micobacteriano..... 34
4.6. Avaliação da atividade antimicobacteriana..... 35
4.7. Infecção experimental de camundongos C57BL/6 com a cepa hipervirulenta de *Mycobacterium tuberculosis*.....35
4.7.1. Tratamentos com grupos experimentais 37
4.7.2 Obtenção de células pulmonares, determinação da carga bacilar e avaliação ex vivo da produção de mediadores inflamatórios..... 37

4.7.3. Avaliação macroscópica e histopatológica 39
4.7.4. Coloração por Hematoxilina-Eosina (H&E)..... 39
4.7.5. Coloração de Ziehl-Neelsen..... 40
4.7.6. Análise morfométrica do tecido pulmonar..... 40
4.8. Análise estatística..... 40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 41
5.1. CAPÍTULO I – Manuscrito submetido "Antimycobacterial and Anti-Inflammatory Activities of Chalcone Derivatives for Adjuvant Treatment of Severe Pulmonary Tuberculosis: *In vitro* and *In silico* Approaches"..... 41
Abstract..... 41
5.1.1. Introduction..... 42
5.1.2. Results and Discussion..... 43
5.1.2.1. Design and Synthesis of the Compounds..... 43
5.1.2.2. Screening of Chalcone Derivatives for Inhibition of *M. tuberculosis* H37Rv Growth in Bacterial Culture and for Modulation of Cell Viability and NO Production in LPS-Stimulated RAW 264.7 Macrophages..... 48
5.1.2.3. Effect of Chalcone Derivatives on the Growth of a Highly Virulent *M. tuberculosis* Clinical Isolate in Bacterial Culture..... 52
5.1.2.4. Evaluation of the Chalcone Derivatives as Bactericidal or Bacteriostatic Agents Against *M. tuberculosis* H37Rv Strain..... 53
5.1.2.5. Effect of Chalcone Derivatives on the Intracellular Growth of *M. tuberculosis* in Infected Macrophage Cultures..... 54
5.1.2.6. Effect of Chalcone Derivatives on DPPH Radical Scavenging Activity and iNOS Expression in LPS-Activated Macrophages..... 55
5.1.2.7. Inhibitory Effect of Chalcone Derivatives on TNF-α and lL-1β Production in LPS-Stimulated Macrophages..... 57
5.1.2.8. Structure–Activity Relationship (SAR) and ADMET Studies..... 59
5.1.3. Conclusion..... 63
5.1.4. Experimental Section.....64
5.1.4.1. Reagents..... 64
5.1.4.2. Synthesis of Chalcone Derivatives..... 64
General Procedure for the Synthesis of Chalcones 1-13, 15-19, 22, 29-35.....64
Procedures for the Synthesis of Aldehydes (43a-e) 64
Procedure for the Synthesis of 2-bromo-1-(4-methoxyphenyl)ethan-1-one (41).....65

Procedure for the Synthesis of 1-(4-methoxyphenyl)-2-(triphenyl-l5-phosphaneylidene)ethan-1-one (42) 66
General Procedure for the Synthesis of Chalcones 14, 20-21, 23-24……..…66
***In Vitro* Methods……..……..……..66**
5.1.4.3. Mycobacterial Culture……..……..……..66
5.1.4.4. Evaluation of Antimycobacterial Activity Against Mtb Growth in Broth……..…66
5.1.4.5. MIC_{90} and Minimal Bactericidal Concentration (MBC) Determination……..…67
5.1.4.6. Infection of Macrophage Cultures and Evaluation of Intracellular Activity of Derivatives against Mycobacterial Growth……..……67
5.1.4.7. Cell Culture and Anti-inflammatory Assays……..…67
5.1.4.8. Quantification of Inflammatory Mediators (NO, TNF-α, and lL-1β)…….. …68
5.1.4.9. Viability Assay……..……..…68
5.1.4.10. Antioxidant Activity……..……68
5.1.4.11. Detection of iNOS by Western Blot……..…68
***In silico* Methods……..……69**
5.1.4.12. Structure-Activity Relationship (SAR) and ADMET Studies……69
5.1.4.13. Statistical Analysis……..……..69
Supporting Information……..……..……69
Acknowledgements.....69
Conflict of Interest……..…70
Table of Contents.....70
5.1.5. References.....70
5.2. CAPÍTULO II – Avaliação do potencial terapêutico da chalcona 27 em modelo animal de tuberculose pulmonar grave.....77
5.2.1. Avaliação do efeito da chalcona 27 no crescimento bacteriano nos pulmões de camundongos C57Bl/6 infectados pela cepa hipervirulenta M299.....77
5.2.2. Avaliação do efeito da chalcona 27 na patologia dos pulmões de camundongos infectados.....80
5.2.3. Análise do perfil de citocinas produzidas *ex vivo* pelas células dos pulmões dos camundongos infectados sob efeito do tratamento com a chalcona 27.....91
5.3. CAPÍTULO III - Efeito das auronas no crescimento de *M. tuberculosis* H37Rv em cultura bacteriana, na produção de NO por macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS e na viabilidade celular..... 95
6. CONCLUSÕES..... 101
7. REFERÊNCIAS..... 104

8. ANEXOS 127
8.1 Certificado de aprovação CEUA do projeto de pesquisa..... 127
8.2. Material suplementar referente ao capítulo 2..... 128

SUMÁRIO DE FIGURAS

INTRODUÇÃO.....1

FIGURA 1. Representação esquemática da estrutura da parede celular micobacteriana..... 5

FIGURA 2. Ciclo de eventos após infecção por *M. tuberculosis* e progressão da doença..... 7

Figura 3. Representação esquemática da constituição, organização e estruturação do granuloma na TB 9

Figura 4. Estrutura química dos fármacos de primeira linha utilizados no tratamento da TB sensível e dos fármacos centrais utilizados no tratamento da TB resistente..... 13

Figura 5. Estrutura química de anti-inflamatórios convencionais estudados e/ou utilizados no contexto da abordagem adjuvante associada ao tratamento padrão anti-TB.....19

Figura 6. Estrutura básica das chalconas.....23

Figura 7. Rota biossintética comum das chalconas..... 25

Figura 8. Estrutura básica das auronas..... 27

RESULTADOS e DISCUSSÃO.....41

CAPÍTULO I

Figure 9. Chalcones with dual anti-Mtb and anti-inflammatory activities.....43

Figure 10. Structures of the synthesized chalcones.....45

Figure 11. Structures of the synthesized *chalcones-like*……46

Figure 12. Effect of chalcone derivatives on the intracellular growth of *M. tuberculosis* H37Rv in RAW 264.7 macrophages and on the toxicity for macrophages evaluated by the LDH release assay. 54

Figure 13. Effect of chalcones 24, 27, and isoniazid (INH) on *M. tuberculosis* H37Rv strain growth in THP-1-derived macrophages 56

Figure 14. Effect of chalcone derivatives on DPPH radical scavenging activity and on iNOS expression in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages..... 57

Figure 15. Inhibitory effect of chalcone derivatives on TNF-α and IL-1β production in LPS-stimulated macrophages.....59

CAPÍTULO II

Figura 16. Efeito da chalcona 27, ibuprofeno ou rifampicina no crescimento intracelular de *M. tuberculosis* nos pulmões dos camundongos C57Bl/6 infectados.....80

Figura 17. Efeito do tratamento com a chalcona 27, ibuprofeno ou rifampicina na macropatologia pulmonar induzida pela cepa *M. tuberculosis* hipervirulenta nos pulmões dos camundongos C57Bl/6 infectados.....83
Figura 18. Análise histopatológica de camundongos C57BL/6 controle e animais não infectados e tratados com chalcona 27……..…….……85
Figura 19. Análise histopatológica dos pulmões dos camundongos C57BL/6 infectados sem ou sob tratamento por 15 e 30 dias com a chalcona 27, ibuprofeno ou rifampicina.....90
Figura 20. Efeito do tratamento com a chalcona 27, rifampicina e ibuprofeno sobre a área de pneumonia nos pulmões dos animais infectados ……91
Figura 21. Análise da produção de citocinas e óxido nítrico (NO) pelas células pulmonares dos animais infectados sobre efeito do tratamento com chalcona 27, rifampicina ou ibuprofeno.....95

CAPÍTULO III

Figura 22. Estruturas químicas das auronas sintetizadas.....96

SUMÁRIO DE TABELAS

INTRODUÇÃO.....1

Tabela 1. Principais fármacos anti-TB em uso clínico e seus alvos celulares e mecanismos de ação.....15

RESULTADOS E DISCUSSÃO.....41

CAPÍTULO I

Table 2. Inhibitory effects of chalcone derivatives on the growth of *M. tuberculosis* H37Rv in culture, on NO production by LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages, and on cell viability by the MTT method..... 51

Table 3. Minimum inhibitory concentration of chalcone derivatives against highly virulent *M. tuberculosis* strain (M299) in bacterial culture.....52

Table 4. Inhibitory effects of chalcone derivatives on the growth of replicating *M. tuberculosis* H37Rv in culture, by REMA (Resazurin Microtiter Assay) and Charcoal Agar Resazurin Assay (CARA).....53

Table 5. Stereoelectronic descriptors calculated for the chalcone and chalcone-like compounds.....62

Table 6. In silico ADMET properties of the most active chalcones and rifampicin.....63

CAPÍTULO II

Tabela 7. Efeito dos derivados de auronas contra *Mycobacterium tuberculosis*, produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS e na viabilidade celular.....97

SUMÁRIO DE ESQUEMAS

MATERIAIS E MÉTODOS.....31

Esquema 1. Síntese das auronas.....32

RESULTADOS E DISCUSSÃO.....41

CAPÍTULO I

Scheme 2. Synthesis of chalcone derivatives via aldol condensation reactions.....47

Scheme 3. Synthesis of chalcone derivatives via Wittig reactions.....47

Scheme 4. Preparation of aldehydes 43a-e.....48

LISTA DE ABREVIATURAS

- **ADC** – Albumina, dextrose e catalase
- **ADMET** – Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxidade
- **AG** – Arabinogalactano
- **AIDS** – Síndrome da imunodeficiência adquirida
- **AINE** (NSAID) – Anti-inflamatório não esteroidal
- **ATCC** – *American Type Culture Collection*
- **BAAR** – Bacilo álcool-ácido resistente
- **BCRJ** – Banco de Células do Rio de Janeiro
- **BSA** – Albumina sérica bovina
- **Caco-2** – Linhagem celular Caco-2
- **CC_{50}** – Concentração citotóxica 50%
- **CEUA** – Comissão de Ética no Uso de Animais
- **UFC** – Unidade formadora de colônia
- **cLogP** – Logaritmo calculado do coeficiente de partição
- **COX-2** – Ciclooxigenase-2
- **CYP3A** – Isoenzima da subfamília do citocromo P450
- **DMEM-F12** – Mistura 1:1 do Meio Eagle modificado por Dulbecco e do meio Ham´s F12
- **DMF** – Dimetilformamida
- **DMSO** – Dimetilsulfóxido
- **D.O.** – Densidade ótica
- **DP** – Desvio padrão
- **DPPH** – 2,2-Difenil-1-picril-hidrazil
- **TB-DR** – Tuberculose resistente a fármacos
- **ELISA** – Ensaio de imunoadsorção ligado à enzima

- **eV** – Elétron-volt
- **SFB** – Soro fetal bovino
- **H&E** – Hematoxilina e eosina
- **HBA** – Aceitador de ligação de hidrogênio
- **HBD** – Doador de ligação de hidrogênio
- **HDT** – Terapia direcionada ao hospedeiro
- **HEPAT** – Hepatotoxidade
- **hERG** – Gene relacionado ao canal de potássio humano Ether-à-go-go
- **HIA** – Absorção intestinal humana
- **HIV** – Vírus da imunodeficiência humana
- **HOMO** – Orbital molecular ocupado de maior energia
- **HRP** – Peroxidase de raiz-forte ou *horseradish*
- **IC_{50}** – Concentração inibitória para 50%
- **IFN-γ** – Interferon-gama
- **IL** – Interleucina
- **IL-1β** – Interleucina-1 beta
- **iNOS** – Óxido nítrico sintase induzível
- **INH** – Isoniazida
- **i.p.** – Intraperitoneal
- **i.t.** – Intratraqueal
- **CLSI** – Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais
- **JAK/STAT** – Janus quinase/Transdutor de sinal e ativador da transcrição
- **kDa** – Quilodalton
- **LDH** – Lactato desidrogenase
- **L-NMMA** – NG-monometil-L-arginina
- **LogP** – Coeficiente de partição

- **LOX** – Lipoxigenase
- **LPS** – Lipopolissacarídeo
- **LTB_4** – Leucotrieno B_4
- **LUMO** – Orbital molecular desocupado de menor energia
- **MBC_{99}** – Concentração bactericida mínima 99%
- **TB-MDR** – Tuberculose multifármaco-resistente
- **MIC** – Concentração inibitória mínima
- **MMFF** – Campo de força da mecânica molecular
- **MOI** – Multiplicidade de infecção
- **MSA** – Área superficial molecular
- **MTBC** – Complexo *Mycobacterium tuberculosis*
- **Mtb** – *Mycobacterium tuberculosis*
- **MTT** – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
- **MUTAGEN** – Mutagenicidade
- **MW** – Massa molecular
- **NADPH** – Fosfato de icotinamida adenina dinucleotídeo
- **NF-κB** – Fator nuclear kappa B
- **NO** – Óxido nítrico
- **NOS** – Óxido nítrico sintase
- **nRot** – Número de ligações rotacionáveis
- **NSAIDs** – Anti-inflamatórios não esteroidais
- **NBT** - Nitroazul de tetrazólio
- **OADC** – Ácido oleico, albumina, dextrose e catalase
- **OMS (WHO)** – Organização Mundial da Saúde
- **PAMPs** – Padrões moleculares associados a patógenos
- **PARP1** – Poli(adenosina difosfato-ribose) polimerase 1

- **PAS** – Ácido para-aminossalicílico
- **PBS** – Solução salina tamponada com fosfato
- **PfPK5** – Proteína quinase 5 de *Plasmodium falciparum*
- **PGL** – Glicolipídios fenólicos
- **PIM** – Manosídeos de fosfatidilinositol
- **pKA** – Constante de dissociação ácida (pKa)
- **PM3** – Método paramétrico 3
- **PMA** – Forbol 12-miristato 13-acetato
- **PtpA** – Fosfatase tirosina-proteína A
- **PZA** – Pirazinamida
- **REMA** – Ensaio de microtitulação com resazurina
- **REPR** – Toxidade reprodutiva
- **RIF** – Rifampicina
- **RMN** – Ressonância magnética nuclear
- **ROS** – Espécies reativas de oxigênio
- **RPMI** – Meio Roswell Park Memorial Institute
- **SAR** – Relação estrutura-atividade
- **SDS** – Dodecil sulfato de sódio
- **IS (SI)** – Índice de seletividade
- **TB** – Tuberculose
- **TBS-T** – Solução salina tamponada com Tris acrescida de Tween 20
- **TDM** – Trealose dimicolato
- **THP-1** – Linhagem celular monocítica humana
- **TLR** – Receptor do tipo Toll
- **TNF-α** – Fator de necrose tumoral alfa
- **TPSA** – Área superficial polar topológica

- **TB-XDR** – Tuberculose extensivamente resistente
- **ZN** – Ziehl-Neelsen
- **μ** – Momento dipolar

RESUMO

A tuberculose (TB) pulmonar grave está associada a uma resposta inflamatória exacerbada, capaz de promover lesões necróticas e sequelas pulmonares. Nesse contexto, compostos com atividade dual antimicobacteriana e anti-inflamatória podem representar uma estratégia promissora para o tratamento adjuvante da doença. Este estudo avaliou o potencial antimicobacteriano e anti-inflamatório de 34 derivados sintéticos de chalconas e quatro derivados de auronas, bem como o potencial terapêutico do composto mais promissor em modelo murino de TB pulmonar. Os derivados foram avaliados quanto à citotoxicidade, atividade frente às cepas laboratorial H37Rv e hipervirulenta M299 de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), à atividade bactericida e à capacidade de inibir o crescimento intracelular de Mtb em macrófagos murinos e humanos. A atividade anti-inflamatória foi investigada em macrófagos estimulados com lipopolissacarídeo (LPS), por meio da avaliação da produção de óxido nítrico (NO), da expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e das citocinas TNF-α, IL-1β e IL-10. Estudos *in silico* foram empregados para investigar relações entre características estruturais, propriedades farmacológicas e perfil ADMET dos compostos. O derivado selecionado foi posteriormente avaliado quanto à eficácia terapêutica em camundongos C57BL/6 infectados com a cepa hipervirulenta M299 de Mtb, considerando-se a carga bacilar pulmonar, a extensão da patologia pulmonar, o desenvolvimento de áreas necróticas e marcadores inflamatórios. Entre as chalconas, os derivados **18, 24, 27, 28, 29 e 35** apresentaram atividade seletiva contra Mtb H37Rv (MIC_{50} < 10 μM), enquanto **24, 27 e 28** também foram ativos contra a cepa hipervirulenta M299. Os derivados **24 e 27** apresentaram atividade bactericida (MIC_{90} e MBC_{99} < 15 μM) e reduziram significativamente o crescimento intracelular de Mtb em macrófagos murinos e humanos, com efeito sustentado por 10 dias para o derivado **27**. Esses compostos também reduziram a produção de óxido nítrico, a expressão de iNOS e os níveis de TNF-α e IL-1β, com efeito comparável ao ibuprofeno. Entre as auronas, os derivados **36 e 37** inibiram o crescimento de Mtb H37Rv, com MIC_{50} de 9,4 e 7,8 μM, respectivamente. Estudos *in silico* indicaram perfil farmacológico favorável para o derivado **27**, selecionado para avaliação terapêutica em camundongos C57BL/6 infectados com Mtb M299. O tratamento com **27** reduziu a carga bacilar pulmonar, com efeito comparável ao da rifampicina após 30 dias, e promoveu, após 15 dias, redução de 52% na área de patologia pulmonar, além de atenuar o desenvolvimento de áreas necróticas. O tratamento também reduziu os níveis de TNF-α, IL-1β e NO e aumentou os níveis de IL-10 nas células pulmonares avaliadas *ex vivo*. Em conjunto, os resultados demonstram o potencial dual antimicobacteriano e anti-inflamatório do derivado de chalcona **27**, que apresentou eficácia tanto *in vitro* quanto *in vivo*, destacando-se como protótipo promissor para o desenvolvimento de novos agentes destinados ao tratamento adjuvante da TB pulmonar grave. Este estudo constitui ainda a primeira descrição das atividades antimicobacteriana e anti-inflamatória do derivado **27**.

PALAVRAS-CHAVE: Chalconas, Auronas, Imunopatologia, Tuberculose pulmonar e Terapia dirigida ao hospedeiro.

ABSTRACT

Severe pulmonary tuberculosis (TB) is associated with an exacerbated inflammatory response capable of promoting necrotic lesions and pulmonary sequelae. In this context, compounds with dual antimycobacterial and anti-inflammatory activity may represent a promising strategy for the adjunctive treatment of the disease. This study evaluated the antimycobacterial and anti-inflammatory potential of 34 synthetic chalcone derivatives and four aurone derivatives, as well as the therapeutic potential of the most promising compound in a murine model of pulmonary TB. The derivatives were evaluated for cytotoxicity, activity against the laboratory H37Rv and hypervirulent M299 strains of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), bactericidal activity, and the ability to inhibit intracellular Mtb growth in murine and human macrophages. Anti-inflammatory activity was investigated in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated macrophages by evaluating nitric oxide (NO) production, inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression, and the cytokines TNF-α, IL-1β, and IL-10. *In silico* studies were performed to investigate the relationships between structural features, pharmacological properties, and the ADMET profiles of the compounds. The selected derivative was subsequently evaluated for therapeutic efficacy in C57BL/6 mice infected with the hypervirulent M299 strain of Mtb, considering pulmonary bacterial burden, the extent of pulmonary pathology, development of necrotic areas, and inflammatory markers. Among the chalcones, derivatives **18, 24, 27, 28, 29, and 35** showed selective activity against Mtb H37Rv (MIC_{50} < 10 μM), while **24, 27, and 28** were also active against the hypervirulent M299 strain. Derivatives **24 and 27** exhibited bactericidal activity (MIC_{90} and MBC_{99} < 15 μM) and significantly reduced intracellular Mtb growth in murine and human macrophages, with a sustained effect for 10 days observed for derivative **27**. These compounds also reduced nitric oxide production, iNOS expression, and TNF-α and IL-1β levels, with effects comparable to those of ibuprofen. Among the aurones, derivatives **36 and 37** inhibited Mtb H37Rv growth, with MIC_{50} values of 9.4 and 7.8 μM, respectively. *In silico* studies indicated a favorable pharmacological profile for derivative **27**, which was selected for therapeutic evaluation in C57BL/6 mice infected with Mtb M299. Treatment with **27** reduced pulmonary bacterial burden, with an effect comparable to that of rifampicin after 30 days, and, after 15 days, promoted a 52% reduction in the area of pulmonary pathology, in addition to attenuating the development of necrotic areas. Treatment also reduced TNF-α, IL-1β, and NO levels and increased IL-10 levels in pulmonary cells evaluated *ex vivo*. Collectively, these findings demonstrate the dual antimycobacterial and anti-inflammatory potential of chalcone derivative **27**, which exhibited efficacy both *in vitro* and *in vivo*, highlighting it as a promising lead compound for the development of new agents for the adjunctive treatment of severe pulmonary TB. Furthermore, this study represents the first description of the antimycobacterial and anti-inflammatory activities of derivative **27**.

KEYWORDS: Chalcones, Aurones, Immunopathology, Pulmonary tuberculosis, Host-directed therapy.

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa que permanece como um grave problema de saúde pública mundial desde 1993, apresentando elevada taxa de morbidade/mortalidade. Em 2023, a TB retomou o posto de principal causa de morte no mundo por um único agente infeccioso, atribuída oficialmente à doença pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2015 e impactada brevemente pela pandemia de COVID-19 em 2020. A TB também foi a principal causa de morte em indivíduos HIV-positivos e uma das principais causas de morte devido à resistência antimicrobiana, figurando entre as 10 principais causas de morte (WHO, 2025).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2024, foram estimados 10,7 milhões de casos incidentes de TB e 1,23 milhão de mortes por TB, dentre os quais 160 mil indivíduos eram HIV-positivos (WHO, 2025). O relatório 2025 da OMS também demonstrou que a maior incidência ocorre em homens adultos (com idade ≥15 anos), com uma estimativa de 5,8 milhões de casos em 2024, comparado a estimativa de 3,7 milhões de casos entre mulheres adultas na mesma faixa etária e 1,2 milhão de casos entre crianças (com idade entre 0 e 14 anos).

O Brasil está entre os trinta países com maior número de casos anuais de TB. Em 2025, o país notificou 84.368 novos casos de TB, com cerca de 6376 óbitos em decorrência da mesma em 2024 (BRASIL, 2026). O Estado do Rio de Janeiro está entre os 3 Estados com maiores índices de mortalidade (4,8 óbitos/100 mil hab.) e de incidência (70,6 casos por 100 mil hab.) do país (BRASIL, 2026). Após as disrupções impostas pela pandemia de COVID-19, os indicadores globais de TB no país permanecem aquém das métricas necessárias para o cumprimento das estratégias estabelecidas no programa *End TB* da OMS para a eliminação da doença até 2030 (WHO, 2025).

Estima-se que um quarto da população mundial esteja infectado pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) de forma latente (WHO, 2024). Embora 90% dos indivíduos infectados permaneçam assintomáticos ao longo da vida, eles representam um amplo reservatório para o surgimento de novos casos ativos de TB (GETAHUN et al., 2015; MIGLIORI et al., 2021), e abrangem aproximadamente 1–2% de infecções latentes resistentes e com potencial de transmissão (KNIGHT et al., 2019).

A tuberculose apresenta predomínio da forma pulmonar, responsável pela maior parte dos casos notificados e pela manutenção da cadeia de transmissão da doença. Nesses casos, os indivíduos acometidos costumam manifestar tosse seca ou produtiva com duração igual ou superior a três semanas, frequentemente acompanhada de febre de padrão vespertino, sudorese noturna, perda de apetite, cansaço e emagrecimento acentuado (BRASIL, 2026; CDC, 2025; WHO, 2025).

Em contrapartida, a tuberculose extrapulmonar ocorre com maior frequência em indivíduos imunossuprimidos, especialmente pessoas vivendo com HIV, além de crianças, idosos e pacientes em uso de terapias imunossupressoras. Essa forma resulta da disseminação hematogênica ou linfática do *Mycobacterium tuberculosis* e é classificada com base no local da infecção. As principais formas incluem: tuberculose linfática (linfonodos), tuberculose pleural (derrame pleural) e tuberculose meníngea (meningite tuberculosa) (ALEMU et al., 2020; VIDYARAJ et al., 2025).

A infecção por Mtb resulta em um espectro de manifestações clínicas e patológicas, culminando em desfechos clínicos distintos. Esta heterogeneidade está interrelacionada com características do próprio indivíduo infectado (suscetibilidade e imunodeficiências, mecanismos imunes desencadeados e variações gênicas que codificam ou regulam a resposta imune), como também com fatores intrínsecos da cepa infectante (virulência e dose de infecção) e fatores ambientais (CHANDRASEKARAN et al., 2017; HUNTER, 2020; KUDRYAVTSEV et al., 2024).

Entre os fatores que mantêm o manejo e controle da TB fortemente desafiadores estão a baixa adesão e o abandono precoce do tratamento da TB, determinantes que sustentam e corroboram com o surgimento e a disseminação de formas resistentes da doença. O aumento da prevalência de TB resistente a medicamentos e o surgimento de genótipos altamente virulentos de Mtb desafiam o tratamento da doença (WEI et al., 2024), aumentando o risco de desenvolvimento de patologia pulmonar grave, mesmo em indivíduos imunocompetentes (TRAM et al., 2018; RACHOW et al., 2019; SOEDARSONO et al., 2023). Além disso, as opções terapêuticas atuais para casos resistentes são limitadas e frequentemente resultam em piores desfechos, exibem maior duração e diversas reações adversas (PEDERSEN et al., 2023; YADAV et al., 2023). Esse cenário se agrava com a presença de diversos fatores de risco determinantes que aumentam a suscetibilidade a TB, incluindo coinfecções (como HIV e COVID-19), comorbidades (como diabetes), desnutrição, tabagismo, consumo abusivo de álcool, nível de poluição atmosférica, intensa mobilidade populacional e condições

socioeconômicas desfavoráveis, os quais, em conjunto, tem um papel significativo na prevalência e controle da doença (MONTGOMERY et al., 2025; WHO, 2025).

Além disso, a ausência de acesso oportuno a diagnóstico acurado e a inexistência de uma vacina amplamente eficaz para adultos, agravam este cenário (CHIN et al., 2023; AN et al., 2025).

A Organização Mundial da Saúde ressalta que o acesso universal a diagnóstico rápido e preciso, associado à instituição de esquemas terapêuticos padronizados, efetivos e de qualidade para TB sensível, constitui a principal estratégia para prevenir o surgimento e a disseminação de cepas resistentes de *Mycobacterium tuberculosis*. Paralelamente, a OMS e outras iniciativas globais têm enfatizado a necessidade de ampliar o investimento em pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos antituberculose mais eficazes, menos tóxicos e acessíveis, a fim de fortalecer o arsenal terapêutico disponível frente à resistência emergente.

1.2 O micro-organismo

As micobactérias pertencem ao gênero *Mycobacterium*, da família Mycobacteriaceae, filo Actinobacteria (ordem Actinomycetales), que atualmente compreende mais de 200 espécies validadas descritas no *International Code of Nomenclature of Prokaryotes (*OREN et al., 2025). De modo geral, esse gênero inclui patógenos de elevada relevância clínica e pode ser divido em grandes complexos: (i) o complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), que abrange diversas espécies intimamente relacionadas, como *M. tuberculosis* e *M. bovis*, responsáveis por doenças em humanos e animais; e (ii) as micobactérias não tuberculosas (MNT), constituídas por numerosas espécies oportunistas, como *M. avium*, *M. kansasii* e *M. abscessus*, associadas a infecções pulmonares, cutâneas e sistêmicas, especialmente em hospedeiros imunossuprimidos (MATSUMOTO et al., 2025).

O complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) inclui *M. tuberculosis, M. africanum, M. bovis, M. caprae, M. microti, M. pinnipedii* e *M. canettii*, bem como linhagens adaptadas a hospedeiros específicos, como as denominadas *M. orygis, M. mungi* e *M. suricattae*. Apesar de compartilharem um ancestral comum e mais de 99% de identidade genética, sucessivas deleções e inserções de DNA (FORRELLAD et al., 2013) resultam em diferenças marcantes destas espécies em termos de patogenicidade,

tropismo por hospedeiros, distribuição geográfica, características fenotípicas e de indução de patogenia (SILVA-PEREIRA et al., 2024; SZACAWA et al., 2025).

M. tuberculosis é o principal agente etiológico da TB humana um bacilo aeróbio estrito, álcool-ácido resistente, não esporulado, não capsulado, imóvel e com capacidade de sobreviver e se multiplicar no interior dos macrófagos do hospedeiro, o que lhe permite evadir do sistema imunológico e persistir por décadas no hospedeiro (TEIXEIRA et al., 2018; SACHAN et al., 2023). Apresenta crescimento lento, com tempo de geração de 15 a 20 horas e formação de colônias visíveis em meios sólidos específicos, como Löwenstein–Jensen ou Middlebrook, em geral, em 21 dias de incubação. As colônias apresentam aspecto rugoso, seco, não pigmentado, de coloração creme ou branco-acinzentadas (MISHRA et al., 2022; WARNER et al., 2025).

A parede celular micobacteriana (**Figura 1**) apresenta uma organização complexa, composta por uma membrana citoplasmática interna, seguida por uma camada de peptidoglicano covalentemente ligado a arabinogalactanos esterificados por ácidos micólicos de cadeia longa. Externamente, encontra-se uma micomembrana rica em glicolipídeos e lipoglicanos específicos, como trealose monocolatos (TMM) e dimicolatos (TDM), fosfatidilinositol manosídeos (PIMs) e seus derivados estruturalmente relacionados: lipomanano (LM), lipoarabinomanano (LAM) e dimicoceratos de ftiocerol (DIM), não covalentemente ligados, que exercem papel central na virulência micobacteriana, modulando respostas imunes e favorecendo a evasão e persistência do bacilo (LY e LIU, 2020). O glicolipídeo de superfície, trealose 6,6′-dimicolato (TDM, “cord factor”) é um importante fator de virulência, capaz de induzir uma resposta inflamatória robusta e a formação de granulomas, mesmo na ausência de outros componentes bacterianos (SANTAMARIA et al., 2025). Mais superficialmente, pode ser encontrada uma cápsula predominantemente de polissacarídios neutros, como o α-glucano e em menores quantidades arabinomananas, mananas, proteínas e lipídeos. A permanência da cápsula aderida à superfície celular depende das condições de crescimento, embora exiba um papel significativo na modulação inicial da infecção favorecendo a sobrevivência intracelular (ABRAHAS e BERSA 2018; KALSCHEUER et al., 2019).

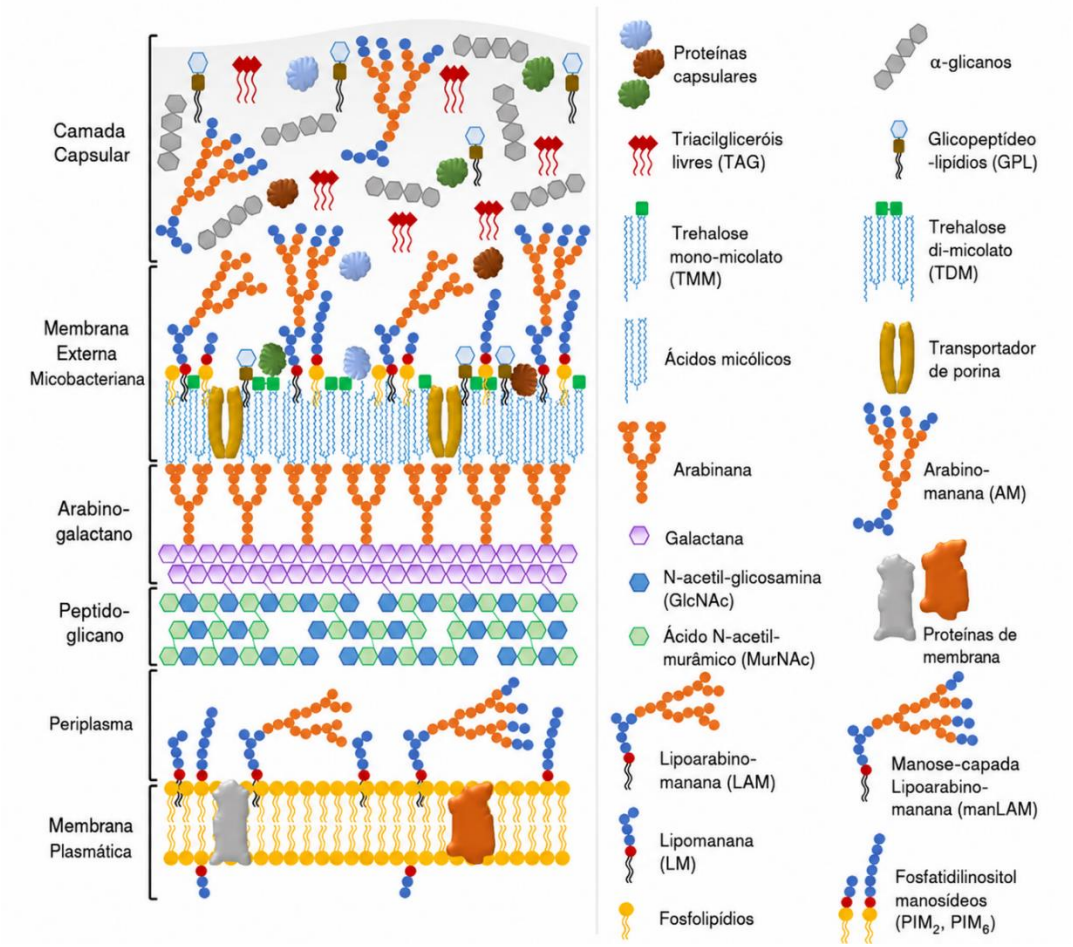


Figura 1 - Representação esquemática da estrutura da parede celular micobacteriana. A figura ilustra a organização das diferentes camadas que compõem o envelope micobacteriano, incluindo a membrana plasmática, o periplasma, a camada de peptidoglicano, o arabinogalactano, a membrana externa micobacteriana (micomembrana) e a camada capsular. Também estão representados os principais componentes estruturais e glicolipídicos, como ácidos micólicos, arabinana, arabinomanana (AM), lipoarabinomanana (LAM), lipoarabinomanana com resíduos de manose (ManLAM), lipomanana (LM), trealose monomicolato (TMM), trealose dimicolato (TDM), glicopeptidolipídios (GPL), triacilgliceróis livres (TAG), α-glicanos, fosfolipídios, proteínas capsulares, proteínas de membrana e transportadores de porina. Figura adaptada de HERMANN et al., 2020.

A complexa arquitetura da parede celular de Mtb é fundamental para a viabilidade do bacilo. A elevada proporção de ácidos micólicos, cerca de 50–60% do peso seco bacilar), confere à parede celular um caráter fortemente hidrofóbico, responsável pela propriedade de resistência ao álcool-ácido, pela baixa permeabilidade a antibióticos, desinfetantes e nutrientes contribuindo para o crescimento lento do bacilo, pela maior capacidade de sobrevivência em ambientes hostis e cronicidade da infecção (XU et al., 2022).

A síntese e o acúmulo de lipídeos derivados de ácidos micólicos contribuem para a formação de uma matriz extracelular (biofilmes) ao redor de bacilos persistentes

particularmente em áreas necróticas, sendo associados à tolerância a antibióticos e à persistência da infecção. Os biofilmes de Mtb são constituídos de polissacarídeos, proteínas, DNA e lipídios (JACOBO-DELGADO et al., 2023; LIU et al., 2024).

A evolução de Mtb e a resistência aos fármacos anti-TB decorrem, em sua maioria, de mutações cromossômicas espontâneas em genes-alvo ou em genes que regulam a ativação, o efluxo ou o metabolismo dos fármacos, não existindo evidências de aquisição rotineira de genes de resistência por transferência horizontal. As mutações são transmitidas hereditariamente e selecionadas sob pressão terapêutica quando conferem vantagem adaptativa, sem comprometer funções essenciais da célula (SHUKLA et al., 2024; ATAVLIYEVA et al., 2024; ZEIN-EDDINE et al., 2025).

M. tuberculosis também pode apresentar resistência fenotípica, em que bacilos geneticamente suscetíveis tornam-se transitoriamente menos sensíveis ou tolerantes à fármacos devido a estados fisiológicos específicos. A resistência fenotípica pode ser observada em subpopulações persistentes em fase não replicativa (latência), em condições de hipóxia, acidose, limitação nutricional, estresse oxidativo, em biofilmes, bacilos sob profunda reprogramação metabólica, remodelamento da parede celular, contribuindo para o prolongamento da duração do tratamento e para o risco de recidiva (GOLD et al., 2016; KERNIEN et al., 2024).

1.3. Resposta imune e imunopatogenia da TB

A principal forma de transmissão da TB ocorre por via aérea, onde indivíduos saudáveis inalam aerossóis contendo Mtb, eliminados por indivíduos com TB pulmonar ativa durante a respiração, fala, tosse ou espirros (CHAI et al., 2020). Embora a transmissão interpessoal por via aérea represente praticamente a totalidade dos casos de infecção, outras formas de transmissão são documentadas, mesmo que consideradas excepcionais. Entre elas destacam-se a transmissão congênita (vertical), resultante da disseminação transplacentária ou da aspiração e ingestão de líquido amniótico contaminado durante o parto; a transmissão decorrente de acidentes laboratoriais, associados à exposição ocupacional a aerossóis contendo Mtb; a inoculação percutânea, geralmente relacionada a acidentes com materiais perfurocortantes ou procedimentos invasivos; e a transmissão por transplante de órgãos ou tecidos provenientes de doadores com tuberculose ativa ou infecção não diagnosticada (CANTWELL et al., 1994; FELLAG et al., 2020; PRASAD et al., 2024; WHO, 2025).

Após a infecção inicial (**Figura 2**), o hospedeiro pode apresentar desfechos diferentes: aproximadamente 5% dos indivíduos infectados conseguem erradicar o Mtb do organismo, outros 5–10% podem progredir para TB ativa, enquanto cerca de 90% dos indivíduos permanecem em estado de infecção latente (LTBI) ao longo da vida, no qual o recrutamento inicial de células inatas, especialmente macrófagos e neutrófilos, seguido pela ativação de células imunes adaptativas, conduzem a formação de granulomas pulmonares a fim de conter o crescimento e a disseminação bacilar (LYU et al., 2024).

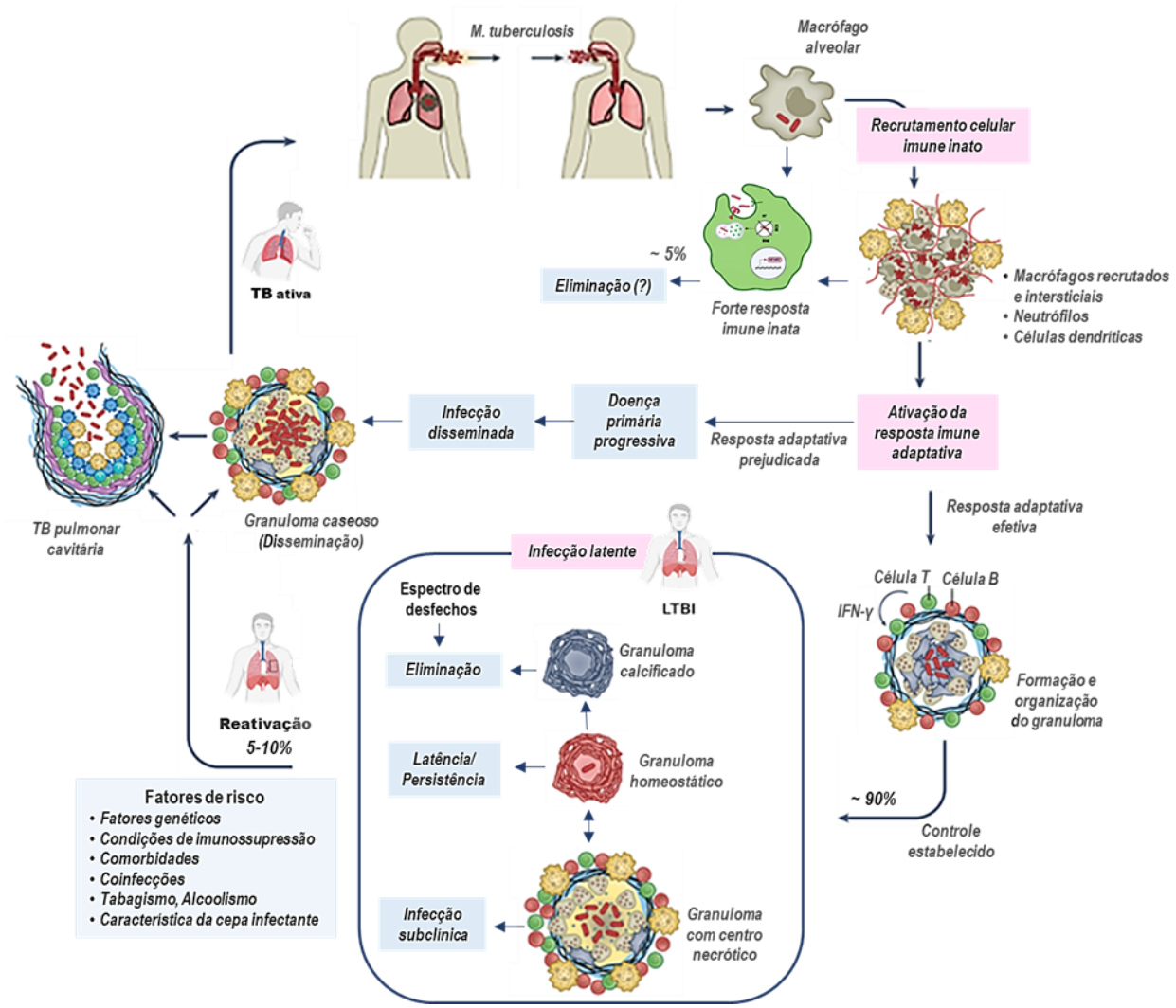


Figura 2 - **Ciclo de eventos após infecção por *M. tuberculosis* e progressão da doença** (Adaptado de CHANDRA et al., 2022).

Diversos fatores podem, contudo, favorecer a reativação para a forma ativa da doença e sua progressão, incluindo comorbidades, coinfecções, desnutrição, tabagismo

e condições de imunossupressão, além de características da cepa infectante. A progressão da TB pode culminar no desenvolvimento de patologia necrótica e resultar em cavitação, promovendo a perda de volume e déficits pulmonares crônicos, além da transmissão bacilar (CHANDRASEKARAN et al., 2017, DARTOIS e RUBIN, 2022).

A resposta imune inata à infecção por Mtb decorre do reconhecimento e fagocitose dos bacilos inalados por macrófagos alveolares, e outras populações mieloides residentes e recrutadas para o pulmão, (RAVESLOOT-CHÁVEZ et al., 2021). O reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) de Mtb ocorre por meio de diferentes receptores, tais como receptores do tipo Toll (principalmente TLR2 e TLR4), receptores tipo NOD (ex. NOD2), receptores de lectina do tipo C (ex. receptor de manose, DC-SIGN), receptores do complemento, receptores *scavenger* (ex. SR-A1 e SR-B1), e receptores Fc (FcgR). O reconhecimento do patógeno induz as células imunes inatas a produzirem uma variedade de mediadores inflamatórios, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), interleucina-1β (IL-1β), proteases, óxido nítrico (NO), espécies reativas de oxigênio (ROS) (STAMM et al., 2016; ZIHAD et al., 2023; LIU et al., 2025), e quimiocinas que em conjunto promovem o recrutamento adicional de células inflamatórias para o foco infeccioso, em especial monócitos, células dendríticas e neutrófilos, que cooperam na contenção inicial da infecção e ativação da resposta adaptativa subsequente (MAYER-BARBER, 2015; MVUBU, 2025).

A indução da resposta imune adaptativa ocorre por meio da apresentação de antígenos micobacterianos por células dendríticas (CDs) às células T *naive* nos linfonodos de drenagem (SCHRAGER et al., 2016; KIM e SHIN, 2022). Células TCD4$^+$ efetoras, constituem o eixo central da proteção, diferenciando-se majoritariamente em células Th1 produtoras de IFN-γ, que, em sinergia com IL-12 e TNF-α, aumentam a capacidade microbicida dos macrófagos e são fundamentais para a organização e manutenção do granuloma (PANTELEEV et al., 2015; TZELEPIS et al., 2018). Outros subtipos linfocitários contribuem para o controle da infecção. Células T CD8$^+$ exercem funções citotóxicas por meio da liberação de perforina e granzimas, e produzem IFN-γ e TNF, contribuindo para a eliminação de células infectadas e controle da carga bacilar, especialmente em fases mais tardias da doença. Células T CD4$^+$ do subtipo Th17, produzem IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22, induzindo a expressão de quimiocinas, favorecendo o recrutamento de neutrófilos e à amplificação da resposta inflamatória (PANTELEEV et al., 2015; NIKITINA et al., 2018; VATS et al., 2024).

As células imunes recrutadas para o sítio ativo da infecção formam um granuloma, marcador histopatológico da TB, consistindo numa estrutura compacta e organizada (**Figura 3**), composta por um núcleo central de macrófagos infectados por Mtb, macrófagos epitelioides, macrófagos espumosos ricos em lipídeos e células gigantes multinucleadas, neutrófilos, circundados por camadas de linfócitos T e B, e, em muitos casos, por uma cápsula periférica de fibroblastos, colágeno e componentes da matriz extracelular, que contribuem para o confinamento espacial do foco infeccioso (CRONAN, 2022). Esse processo frequentemente resulta em latência, caracterizada por um equilíbrio entre a morte das células infectadas e o recrutamento celular para o granuloma (ASHENAFI e BRIGHENTI, 2022).

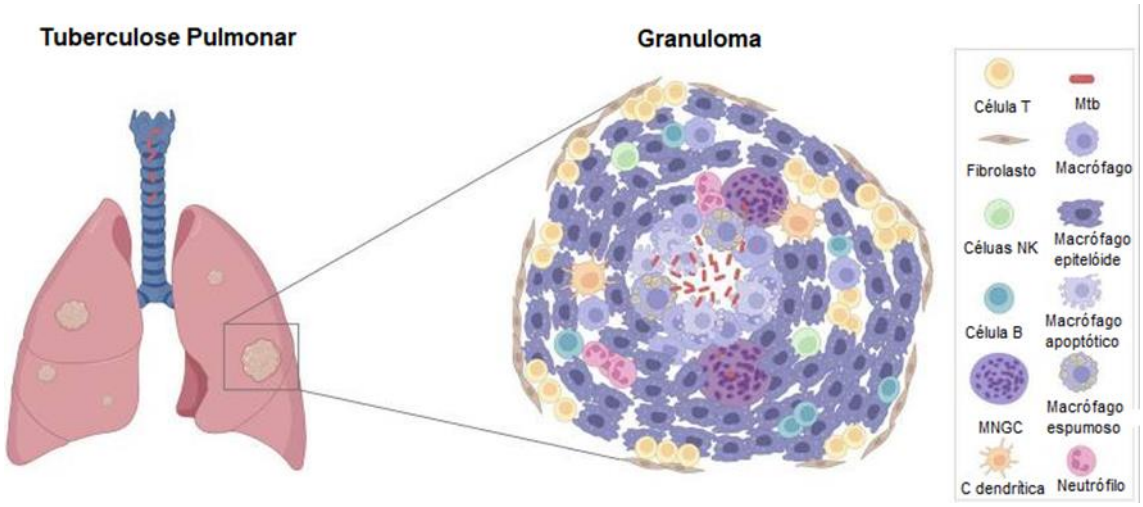


Figura 3 - Representação esquemática da constituição, organização e estruturação do granuloma na TB (Adaptado de HUNTER et al., 2023).

É importante ressaltar que Mtb desenvolveu múltiplas estratégias de evasão imune, destacando-se a capacidade de bloquear ou retardar a maturação do fagossomo e sua fusão aos lisossomos, modular a produção de espécies reativas, subverter vias de apoptose e autofagia em macrófagos, remodelar o microambiente imune e induzir um fenótipo de macrófago espumoso por meio do aumento do acúmulo de lipídios do hospedeiro, sustentando a persistência bacteriana (SASINDRAN et al., 2011; AGUILERA, 2020; CHANDRA et al., 2022).

Desta forma, o granuloma pode exibir heterogeneidade morfológica e constituir um nicho especializado, favorecendo a sobrevivência intracelular, quanto possibilitando

a persistência bacilar extracelular na região necrótica central (EHLERS et al., 2012; AMARAL et al., 2016; CRONAN, 2022).

Apesar da resposta imune pró-inflamatória ser essencial contra a infecção por Mtb, o desenvolvimento de uma resposta inflamatória inadequada e excessiva, marcada pelo influxo constante de células e pela hiperativação da via inflamatória, contribui para a progressão da patologia pulmonar, levando à inflamação granulomatosa necrosante e à cavitação (ALMEIDA et al., 2017; DE MELO et al., 2019; DOZ-DEBLAUWE, 2024).

A morte necrótica de macrófagos infectados resulta na liberação de sinais de dano, como ATP extracelular, que, ao se ligar aos receptores purinérgicos P2X7 em células mieloides, ativa o complexo do inflamassoma NLRP3, e consequentemente conduz a produção de IL-1β e IL-18, contribuindo para a exacerbação da inflamação e do dano pulmonar (AMARAL *et al*., 2014; FAYSAL et al., 2025; ALMEIDA-SANTOS et al., 2025). Este evento favorece o recrutamento massivo de neutrófilos para o sítio infeccioso, culminando na compressão mecânica e degradação da parede capilar e o colapso da microvasculatura. Neutrófilos acumulados no tecido sofrem NETose, gerando armadilhas extracelulares (NETs), que, embora contribuam para o controle bacteriano, também promovem dano vascular e necrose intragranulomatosa. Estas células também sofrem necrose e liberam diferentes componentes microbicidas e citotóxicos (DE MELO et al., 2019; ZLATAR et al., 2024).

A formação de cavidades no parênquima ocorre quando células T sensibilizadas reconhecem antígenos micobacterianos liberados pela necrose de células infectadas, culminando em uma reação de hipersensibilidade perifocal com necrose maciça que conduz a cavitação (HUNTER et al., 2020).

A infecção por cepas Mtb resistentes e/ou virulentas está frequentemente associada à indução de necrose, constituindo áreas de acesso limitado às células imunes e antibióticos (RIAZ et al., 2025), o que possibilita a infecção de novas células permissivas e sucessivos ciclos de replicação e disseminação, além de atuar como reservatório de bacilos extracelulares, permitindo a formação de biofilme e facilitando a transmissão (LERNER et al., 2017; KROESEN et al., 2021).

Nesse contexto, terapias direcionadas ao hospedeiro, voltadas à modulação da resposta inflamatória e à redução dos danos teciduais, têm despertado interesse crescente na última década como estratégias adjuvantes à quimioterapia convencional no tratamento da tuberculose (TIWARI et al., 2023).

1.4. Tratamento atual da TB e o desenvolvimento de novos fármacos

A OMS estabeleceu o tratamento da TB sensível a medicamentos em um regime de seis meses com fármacos de primeira linha (**Figura 4**), preconizando uma fase de terapia diretamente observada e intensiva (DOT) de dois meses contendo isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol, seguida de uma fase de manutenção de quatro meses com isoniazida e rifampicina (WHO, 2025).

Nos últimos anos, o regime encurtado de 4 meses, incluindo rifapentina em alta dose e moxifloxacino, foram incorporados em diretrizes internacionais recentes, como as orientações ATS/CDC/ERS/IDSA 2024 e documentos do CDC de 2025 em virtude da eficácia em proporção significativa de pacientes com TB pulmonar sensível e para crianças com TB não grave (LOPES et al., 2025; SAUKKONEN et al., 2025). Nos casos de TB resistente à isoniazida (TB-Hr) mas suscetível à rifampicina, o esquema terapêutico envolve o uso de rifampicina, etambutol, pirazinamida e levofloxacino (WHO, 2025). Não obstante, a OMS ressalta que a prescrição de esquemas padronizados de qualidade, supervisionados e baseados em testes de suscetibilidade é a estratégia mais eficaz para prevenir o surgimento e a disseminação de formas resistentes de Mtb.

No Brasil, a partir de 2009, o Programa Nacional de Controle da Tuberculose implementou a introdução do etambutol na fase intensiva após quase três décadas de uso de regime tríplice para adultos e adolescentes com 10 anos ou mais.

Indivíduos acometidos por tuberculose resistente a medicamentos (TB-DR) requerem tratamento com esquemas terapêuticos que incluem fármacos de segunda e terceira linha (**Figura 4**) (WHO, 2025). Em 2024, foram estimados, mundialmente, 390 mil casos de tuberculose multirresistente ou resistente à rifampicina (TB-MDR/RR) e 25 mil casos de tuberculose pré-extensivamente resistente (pré-XDR-TB) ou extensivamente resistente (XDR-TB), dos quais 42% e 96%, respectivamente, foram inseridos em tratamento. No Brasil, foram reportados 1.400 casos de tuberculose multirresistente ou resistente à rifampicina (TB-MDR/RR) e 14 casos de tuberculose pré-extensivamente resistente ou extensivamente resistente (pré-XDR-TB/XDR-TB), dos quais 60% e 100%, respectivamente, foram inseridos em tratamento (WHO, 2025).

A OMS recomenda regimes específicos conforme o perfil de resistência, distinguindo a TB resistente à rifampicina (TB-RR), a TB multirresistente (TB-MDR, caracterizada pela resistência simultânea à rifampicina e à isoniazida), a TB resistente à isoniazida, a TB pré-extensivamente resistente (TB-pré-XDR, definida pela resistência à

rifampicina associada à resistência a qualquer fluoroquinolona) e a TB extensivamente resistente (TB-XDR, caracterizada pela resistência à rifampicina, a qualquer fluoroquinolona e a pelo menos um dos fármacos bedaquilina ou linezolida). Os esquemas terapêuticos apresentam custos substancialmente mais elevados, e estão associados à maior frequência de eventos adversos (WHO, 2025; GLOBAL DRUG FACILITY, 2025; CHERAGHI et al., 2025).

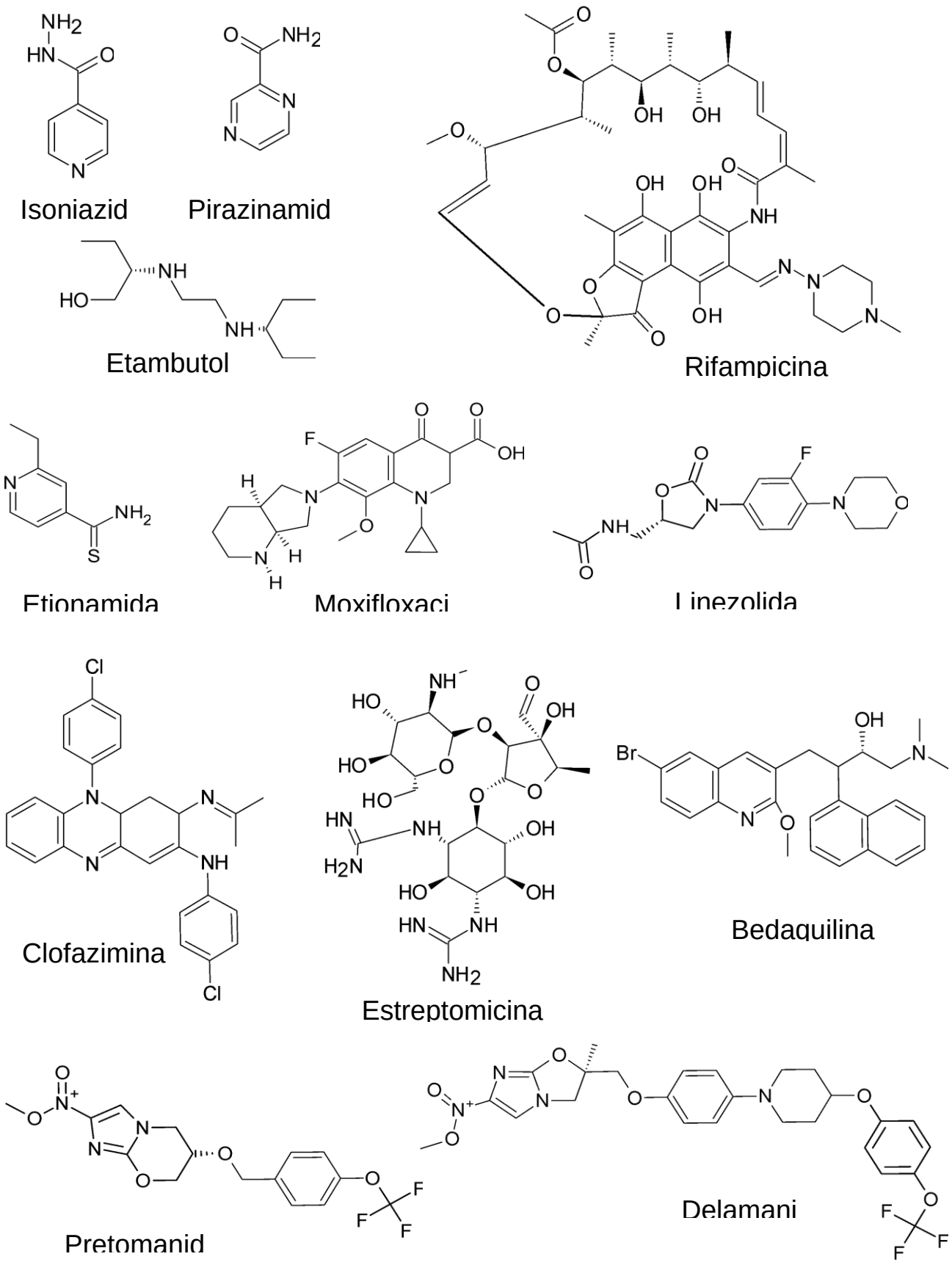


Figura 4. Estrutura química dos fármacos de primeira linha utilizados no tratamento da TB sensível e dos fármacos centrais utilizados no tratamento da TB resistente.

A partir de 2018, a recomendação da OMS de esquemas totalmente orais para o tratamento da TB multirresistente ou resistente à rifampicina (TB-MDR/RR), representou um avanço significativo e fármacos injetáveis como aminoglicosídeos e polipeptídeos, foram praticamente eliminados das recomendações iniciais (WHO, 2025). Existem três categorias principais para manejo da TB resistente, a primeira categoria consiste em dois esquemas totalmente orais, com duração de seis meses, à base de bedaquilina, pretomanida e linezolida (com ou sem moxifloxacino), conhecidos por regimes BPaL/BPaLM, indicados para indivíduos com TB-MDR/RR, com ou sem resistência a fluoroquinolonas.

A segunda categoria abrange esquemas orais curtos, com duração aproximada de nove meses, destinados a pacientes com TB MDR/RR sem resistência a fluoroquinolonas. Por fim, a terceira categoria, uma alternativa de último recurso, inclui esquemas terapêuticos mais prolongados, com duração entre 18 e 20 meses, que podem incluir um fármaco injetável, como a amicacina (RAVIKOTI et al., 2025; WHO, 2025).

O Brasil implementou o esquema BPaL para tratamento da TB resistente a medicamentos. Esse esquema consiste em um regime terapêutico curto, com duração de seis meses, indicado para formas graves e resistentes da doença, utilizando a combinação de três fármacos: Bedaquilina, Pretomanida e Linezolida. Sua adoção no país tem registrado marcos relevantes, incluindo a conclusão do tratamento e a alta clínica dos primeiros pacientes, que apresentaram evolução clínica favorável e adequada adesão terapêutica (ENSP/Fiocruz, 2025).

A taxa global de sucesso terapêutico para TB-RR ou TB-MDR foi aproximadamente 63% na coorte de 2023, com expressivas variações regionais, enquanto para a TB-XDR, os desfechos permanecem limitados a 30–40% em muitos programas nacionais. O regime BPaLM tem alcançado taxas de sucesso de 85–90% em ensaios clínicos e em cenários de implementação real, impulsionando a substituição progressiva de fármacos injetáveis (CHERAGHI et al., 2025; WHO, 2025).

O desenvolvimento de novos fármacos ou a otimização de agentes já estabelecidos para TB exibe alta complexidade, longa duração e elevado custo financeiro, com taxa de sucesso baixa desde a identificação inicial até a aprovação regulatória (KUFA et al., 2025). Essa dificuldade decorre da necessidade de candidatos que demonstrem potência antimicrobiana *in vitro* e eficácia *in vivo* contra bacilos replicantes, persistentes e em estado de baixa replicação, capacidade esterilizante

pulmonar e perfil de segurança adequado, mantendo equilíbrio entre o benefício clínico e efeitos adversos, incluindo toxidade cumulativa, interações medicamentosas e impacto na qualidade de vida (FERNANDES et al., 2022; GARGATE et al., 2025; ZHAO et al., 2025).

O *pipeline* de desenvolvimento de fármacos anti-TB conta com cerca de 28 candidatos em fases clínicas I–III, representando o momento mais promissor para inovação terapêutica em TB desde a era dos fármacos de primeira-linha (TAG PIPELINE REPORT 2023–2025; WHO 2025). Contudo, o cenário atual da doença torna imprescindível a busca contínua por substâncias seguras e capazes de atuar na TB resistente a medicamentos.

As principais características e aspectos farmacológicos relevantes dos fármacos atualmente empregados no tratamento da tuberculose são apresentados de forma sucinta na **Tabela 1**.

Tabela 1. Principais fármacos anti-TB em uso clínico e seus alvos celulares e mecanismos de ação.

Fármaco	Classe / uso principal	Alvo celular / mecanismo de ação	Referências
Isoniazida	Hidrazida/ 1ª linha, TB sensível	Pró-fármaco ativado por KatG; inibe principalmente a enoyl- ACP redutase (InhA), bloqueando a síntese de ácidos micólicos	Kufa et al., 2025
Rifampicina	Rifamicinas/1ª linha, TB sensível, TB-Hr	Ligação à subunidade β da RNA- polimerase DNA- dependente (rpoB), inibindo a transcrição de RNA	Zhao et al., 2025
Rifapentina	Rifamicinas/ 1ª linha (esquema 4 meses) e tratamento preventivo	Alvo similar à rifampicina (rpoB), meia- vida prolongada	Zhao et al., 2025; Cross et al., 2025
Rifabutina	Rifamicinas/ Alternativa à rifampicina em TB-DS (HIV, interações)	Inibe RNA- polimerase (RpoB), com menos interações CYP3A do que rifampicina.	Zhao et al., 2025;
Pirazinamida	Pirazinocarboxamida/ 1ª linha (fase intensiva TB-DS)	Pró-fármaco ativado pela enzima PncA; mecanismo multifatorial (induz perturbação da função da coenzima A e no potencial de membrana em ambientes ácidos, inibe tradução e acidificação intracelular)	Kufa et al., 2025
Etambutol	Etilenodiamina/ 1ª linha (fase intensiva TB-DS)	Inibe arabinosil-transferases (embCAB), bloqueando a	Kufa et al., 2025

		síntese de arabinogalactano da parede celular.	
Estreptomicina	Aminoglicosídeo/ 2ª linha (uso restrito, última opção)	Liga- se à subunidade 30S ribossomal, causando erro de leitura e inibindo a síntese proteica.	Kufa et al., 2025
Amicacina, Canamicina	Aminoglicosídeos (TB-DR, uso restrito, última opção)	Ligam- se à 30S ribossomal, inibindo síntese proteica; hoje reservados a situações especiais, pois injetáveis e tóxicos.	Kufa et al., 2025
Capreomicina	Polipeptídeo (TB-DR, uso restrito, última opção)	Atua na síntese proteica por interação com rRNA 16S/23S (complexo ribossomal); uso hoje muito limitado.	Cross et al., 2025
Levofloxacino, moxifloxacino	Fluoroquinolonas (Regimes TB-DR e esquemas encurtados)	Inibem DNA girase (gyrA/gyrB) e, em menor grau, topoisomerase IV, bloqueando replicação de DNA.	Cross et al., 2025
Linezolida	Oxazolidinona (TB-DR, BPaL/BPaLM)	Liga- se ao domínio peptidil transferase do rRNA 23S na subunidade 50S, inibindo a iniciação da síntese proteica	Zhao 2025; Kufa et al., 2025
Clofazimina	Fenazina (TB-DR)	Interfere na cadeia de transporte de elétrons e gera espécies reativas de oxigênio; também se intercala em DNA. Inibição da proliferação bacteriana	Kufa et al., 2025; Cross et al., 2025
Delamanida	Nitroimidazol (TB-DR)	Pró-fármaco ativado por nitroredutases; inibe síntese de ácidos micólicos e induz a geração de espécies reativas de nitrogênio	Cross et al., 2025
Pretomanida	Nitroimidazol (BPaL/BPaLM)	Pró-fármaco ativado pela enzima Ddn; induz a geração de espécies reativas de nitrogênio que lisam componentes de parede celular	Ravikoti et al., 2025
Bedaquilina	Diarilquinolina (pilar da TB-DR)	Inibe a subunidade c da ATP sintase micobacteriana (atpE), bloqueando a síntese de ATP	Kufa et al., 2025
Cicloserina / Terizidona	Isoxazolidinona/ 2ª linha (TB-DR)	Inibem D- alanina racemase (alr) e D- alanina ligase (ddl), bloqueando síntese de peptidoglicano	Kufa et al., 2025
Etionamida / Protionamida	Tioamidas (2ª linha)	Pró-fármacos ativados por EthA; inibem InhA , bloqueando síntese de ácidos micólicos (mecanismo semelhante à isoniazida)	Kufa et al., 2025

Imipenem/Cilastatina, Meropenem + clavulanato	Carbapenêmicos (DR- TB em regimes longos)	Inibem transpeptidases e síntese de parede celular	Kufa et al., 2025
Ácido p- aminossalicílico (PAS)	Aminosalicilato/ TB-DR (uso restrito, última opção)	Analógico estrutural do PABA; interfere na ação da enzima diidropteroato sintase e na via de ácido fólico	Kufa et al., 2025

1.5. Tratamento adjuvante direcionado ao hospedeiro

As terapias direcionadas ao hospedeiro (*Host-Directed Therapies* – HDT) representam uma abordagem complementar essencial em casos graves de TB associados à inflamação e à destruição tecidual (YOUNG et al., 2020). As HDTs visam modular componentes específicos da resposta imune do hospedeiro, incluindo vias inflamatórias, autofagia, produção de peptídeos antimicrobianos e metabolismo celular, a fim de prevenir ou minimizar o desenvolvimento da necrose pulmonar, potencializar a eficácia da quimioterapia convencional, sem excluir a ação direta sobre o controle bacilar (FAN et al., 2025).

Atualmente, a OMS recomenda o uso adjuvante de dexametasona e prednisolona (**Figura 5**) para pacientes com meningite tuberculosa e derrame pericárdico tuberculoso, formas de TB extrapulmonar (MAYOSI et al., 2014; WHO, 2025). O papel benéfico do uso adjuvante de fármacos anti-inflamatórios na melhora da função pulmonar e das taxas de sobrevida de pacientes com TB pulmonar grave tem sido apoiado por estudos pré-clínicos e clínicos (KAUFMANN et al., 2017; KRUG et al., 2021; CUBILLOS-ÂNGULO et al., 2022). Baixas doses de ácido acetilsalicílico (**Figura 5**), um anti-inflamatório não esteroidal (AINE), foram associadas à melhora da sobrevida em pacientes com TB pulmonar sensível (LEE et al., 2019).

Estudos descreveram o potencial do ibuprofeno (**Figura 5**) de reduzir a carga de Mtb e a patologia pulmonar em modelos animais de TB (EISEN et al., 2013; VILAPLANA et al., 2013). Além disso, o estudo piloto de fase IIA randomizado (NCT02781909), mostrou que o ibuprofeno (400 mg/dia por 2 meses) utilizado como tratamento adjuvante em 28 pacientes com pré-XDR-TB e TB-XDR exibiu excelente perfil de segurança e reduziu significativamente marcadores inflamatórios sistêmicos no plasma, incluindo a razão monócito/linfócito (meses 2 e 5), níveis de IFN-γ e escore gênica de inflamação patológica. Esses achados sustentam o racional para estudos maiores com doses

otimizadas, considerando que a imunopatologia contribui significativamente para o dano tecidual em TB resistente (FONSECA et al., 2025).

Diversos alvos potenciais para HDTs na infecção por Mtb têm sido sugeridos, como antagonistas de TNF-α, importante fator de lesão pulmonar associado a progressão do granuloma, cavitação e expressão de metaloproteinases de matriz (MMP); inibidores de MMPs, em particular MMP-1, -3 e -9, associadas a danos pulmonares e remodelação tecidual; inibidores da poli(ADP-ribose) polimerase (PARP), que amplifica e mantém a inflamação crônica induzindo mediadores inflamatórios que autoestimulam sua própria ativação; neutralização de espécies reativas; inibidores de fosfodiesterases, regulando negativamente a NOS2 (KRUG et al., 2021).

Estratégias imunoterapêuticas atuais têm priorizado a resposta imune celular (modulação de macrófagos, Th1, autofagia), mas também exploram a amplificação da ação de peptídeos antimicrobianos endógenos e o controle de MMPs e citocinas pró-dano tecidual. Ensaios clínicos recentes demonstraram que HDTs, como estatinas (sinvastatina), metformina, inibidores de JAK (tofacitinib), nitazoxanida e anti-inflamatórios não esteroides, podem reduzir a inflamação, auxiliar na esterilização pulmonar e encurtar a duração do tratamento, particularmente em casos de TB resistente, em que regimes convencionais ainda falham em 20–40% dos casos (PARIHAR et al., 2019; MI et al., 2024).

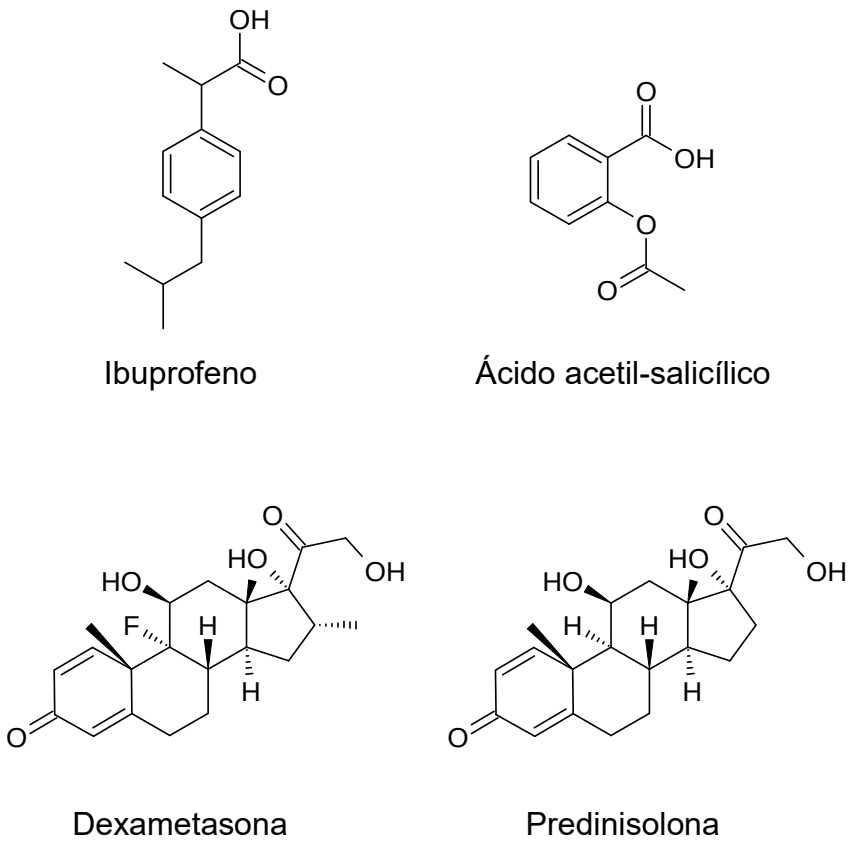


Figura 5. Estrutura química de anti-inflamatórios convencionais estudados e/ou utilizados no contexto da abordagem adjuvante associada ao tratamento padrão anti-TB.

A implementação segura de HDTs exige ensaios clínicos rigorosos que avaliem a eficácia da terapia combinada a ação antimicrobiana, como também o impacto na imunopatologia, na função pulmonar e na recorrência tardia (mínimo 18–24 meses de acompanhamento), considerando o tempo adequado de intervenção (fase inicial vs. fase de manutenção) e o perfil do paciente (TB sensível, TB resistente, presença de comorbidades e coinfecções). Embora ainda em fase experimental para casos graves de TB pulmonar, HDTs podem, no futuro, simplificar regimes anti-TB, reduzir sequelas e melhorar a qualidade de vida dos pacientes (MI et al., 2024; TIAN et al., 2025). Ressalta-se que a abordagem adjuvante atua em alvos altamente conservados no hospedeiro contornando as vias utilizadas pelos fármacos convencionais, o que reduz significativamente o risco de desenvolvimento de resistência ao tratamento (TIAN et al., 2025).

1.6. Produtos naturais e derivados no tratamento da TB

Os produtos naturais (PNs) são substâncias químicas ou metabólitos, frequentemente pequenas moléculas, produzidos por plantas, micro-organismos, fungos e animais, que desempenham um papel central na medicina ao longo da história, constituindo a base terapêutica de inúmeras práticas tradicionais, e continuam oferecendo uma fonte de moldes estruturais para a descoberta e o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos (DOMINGO-FERNÁNDEZ et al., 2024).

A farmacologia moderna continua a utilizar substancialmente os produtos naturais, sendo cerca de 9,7% dos fármacos aprovados globalmente entre 2014–2024 (56 de 579) produtos naturais ou derivados diretos, incluindo 23% dos fármacos baseados em pequenas moléculas e 6% de novas entidades biológicas (ex. adjuvantes para vacinas, proteínas imunomodulatórias). No contexto de medicamentos antibacterianos, 70% dos antibióticos em uso clínico foram obtidos de produtos naturais, derivados ou miméticos estruturais, abrangendo praticamente todas as classes principais (β-lactâmcos, macrolídeos, aminoglicosídeos, tetraciclinas e glicopeptídeos), o que reforça a relevância estratégica da farmacognosia na descoberta de novos agentes antimicrobianos em um cenário de resistência crescente (WOO et al., 2023; BUTLER et al., 2026).

As substâncias isoladas de fontes naturais destacam-se por apresentarem elevada complexidade e diversidade química, refletidas na arquitetura molecular e nas propriedades físico-químicas, permitindo explorar regiões do espaço químico pouco acessíveis as substâncias sintéticas. Ademais, por exibirem um processo evolutivo moldado, os PNs frequentemente incorporam elementos estruturais otimizados para interações específicas com macromoléculas biológicas, conferindo-lhes relevância funcional e favorecendo a seletividade frente a alvos celulares. Frequentemente também exibem características compatíveis com o uso farmacológico, incluindo perfis adequados de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME). Ainda assim, apesar do reconhecido potencial terapêutico dos produtos naturais, apenas uma pequena parcela de sua diversidade química tem sido sistematicamente investigada para fins de desenvolvimento de novos medicamentos (DOMINGO-FERNÁNDEZ et al., 2024).

A importância dos produtos naturais no âmbito do tratamento contra TB pode ser verificada desde os quatro fármacos de primeira linha em uso clínico desenvolvidos a partir de fontes naturais, destacando as rifamicinas isoladas primeiramente da

actinobactéria *A. mediterranei*, quanto para os diversos fármacos de segunda linha derivados de fontes naturais, incluindo a cicloserina, obtida pela primeira vez de actinomicetos *S. orchidaceous*, e a estreptomicina, amicacina e capreomicina isolada de *S. griseus* (ABDJUL et al., 2025).

Estudos antimicobacterianos com produtos naturais têm sido amplamente descritos em revisões recentes, que compilam centenas de moléculas isoladas de plantas, micro-organismos e fontes marinhas com atividade *in vitro* promissora contra Mtb, em culturas em meio de cultivo específico e em cultura de macrófagos infectados. Em geral, as substâncias com potencial anti-TB destacado, exibem MIC inferior a 10 µg/mL, pertencendo as mais diferentes classes químicas, como flavonoides, alcaloides, terpenoides, naftoquinonas, lactonas sesquiterpênicas e peptídeos naturais, em sua maioria atuam com nível de seletividade favorável (IS > 10) e os mecanismos de ação, quando descritos, podem estar dirigidos a alvos clássicos (como InhA, DprE1 e ATP sintase) ou a vias ainda pouco exploradas (PAULOS et al., 2025; ABDJUL et al., 2025).

Entre as substâncias naturais mais promissoras identificadas nos últimos anos, destacam-se: o alcaloide hapalindole A e rufomicina I, isolados de cianobactérias, que apresentaram MIC < 0,6 µM contra Mtb H37Rv, elevada seletividade e potencial como protótipos-líderes para candidatos a fármacos contra TB-MDR atuando por mecanismos não convencionais, incluindo inibição da enzima farnesil difosfato sintase, responsável por catalisar a síntese de farnesil difosfato, essencial para síntese de arabinogalactanos. Os alcaloides tiliacorina e 2′-nortiliacorina, isolados de *Tiliacora triandra* apresentaram MIC 3,1 µg/mL (5,4 µM e 5,5 µM respectivamente) diretamente contra suspensões de cepas Mtb MDR, enquanto o alcaloide globospiramina isolado de *Voacanga globosa* exibiu MIC 6,25 µg/mL (8,5 µM) contra isolados resistentes de Mtb. A naftoquinona plumbagina isolada de *Diospyros anisandra* apresentou MIC 1,56 µg/mL contra a cepa de referência *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (sensível aos fármacos de primeira linha) e IS > 64. (PONNUSAMY et al., 2024; PAULOS et al., 2025). A flavanona (2S)-narigenina isolada de *F. nervosa* exibiu MIC 2,8 µg/mL/10 µM contra a cultura de Mtb H37Rv (CHEN et al., 2010), enquanto o flavonol quercetina e a piroxantona artonin F isolada de *A. rigida* exibiram MIC 6,25 µg/mL (20,7 µM e 12,4 µM) frente a mesma cepa (SASIKUMAR et al., 2018; NAMDAUNG et al., 2006).

Contudo, o estudo do potencial de substâncias naturais em modelos animais de TB é escasso, o que enfatiza a necessidade de aprofundamento das avaliações, tendo em vista o papel dos produtos naturais como fonte estratégica de substâncias

promissoras para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos anti-TB, incluindo combinações adjuvantes destinadas a melhorar a eficácia, reduzir a toxidade e enfrentamento da resistência emergente (AMINGAD e HAKKIMANE, 2025; GOYAL et al., 2025). Destacam-se neste âmbito os estudos com quercetina e a curcumina. O tratamento intraperitoneal (i.p.) com o flavonol quercetina (45mg/kg, 12x/ 5º dia e 2x/6º e 7º dia pós-infecção) de camundongos C57Bl/6J infectado pela veia caudal com 2 x 10^7 de Mtb H37Rv foi observada delimitação nítida da necrose caseosa no tecido conjuntivo e efeito hepatoprotetor contra TB (BUTOV et al., 2015). Camundongos BALB/c infectados com Mtb H37Rv aerolizada (~110 UFC/animal) e tratados i.p. com nanopartículas de curcumina (100mg/kg/dia, 15 dias pós-infecção por 75 dias) em conjunto com isoniazida (50 mg/L *ad libitum*) exibiram redução drástica da hepatotoxidade induzida pelo antibiótico, como também o tempo necessário para o alcance da imunidade esterilizante e o risco de reativação (TOUSIF et al., 2017).

Embora os produtos naturais exibam diversas vantagens e ocupem uma posição relevante na geração de novos fármacos, existem dificuldades e complexidades em relação a parâmetros físico-químicos, processos de obtenção e de purificação em larga escala, que levaram ao avanço das ferramentas de semi-síntese e de síntese química, desempenhando um papel fundamental na pesquisa e na indústria farmacêutica (CAMPOS et al., 2019; BHARATE et al., 2024). As inovações em química sintética permitem explorar arcabouços naturais como protótipos-líderes explorando a relação estrutura-atividade (SAR), mecanismos de ação, otimização de parâmetros ADMET e estabilidade (ATASANOV et al., 2021).

Sob este prisma, diferentes substâncias derivadas de produtos naturais foram descritas com potencial anti-TB relevante frente a cepas de Mtb sensíveis e resistentes, incluindo validação de alvos, estudos de SAR e de biodisponibilidade oral e, em alguns estudos, o potencial em modelos animais de TB foi avaliado. Entre estes, podem ser citados derivados de cumarina, de terpenoides, de quinonas e alcaloides (JAGATAP et al., 2022; CITARELLA et al., 2024; NICULESCU et al., 2024). Não obstante, os flavonoides semissintéticos e análogos sintéticos são amplamente estudados quanto a inúmeras propriedades farmacológicas, incluindo o potencial antimicobacteriano, com valores de MIC < 10 μM e, em alguns casos, MIC < 1 μM (RABAAN et al., 2022; SABARATHINAM et al., 2023).

1.7 Chalconas e Auronas

1.7.1 Chalconas

As chalconas constituem cetonas aromáticas α,β-insaturadas, apresentando um esqueleto 1,3-diaril-2-propen-1-ona, no qual dois anéis aromáticos estão ligados por uma cadeia aberta de três carbonos contendo uma insaturação conjugada no carbono 3 (MISHRA et al., 2024). Também são denominadas benzilacetofenonas ou benzilidenoacetofenonas, e apresentam um sistema de elétrons π deslocalizados em seus anéis aromáticos, esta característica contribui para muitas propriedades físico-químicas e farmacológicas. Estruturalmente, representam o núcleo dos flavonoides de cadeia aberta, atuando como precursores biossintéticos da classe, para flavonas, flavonóis e isoflavonas. As chalconas são caracterizadas por baixo peso molecular (aproximadamente 300–600 g/mol), ausência de quiralidade e maior lipofilicidade (Log P ≈ 5–7). A presença da porção α,β-insaturada (–CO–CH=CH–) possibilita a coloração característica da classe, variam do amarelo ao laranja. As chalconas podem se apresentar sob a forma de isômeros geométricos cis (Z) ou trans (E), sendo esta última conformação a mais estável termodinamicamente (RUDRAPAL et al., 2021).

Na classe das chalconas, diferentemente do observado para outras subclasses de flavonoides, adota-se um sistema de numeração assimétrico para os dois anéis aromáticos que compõem a estrutura 1,3-diaril-2-propen-1-ona, seguindo a regra C-313.2 da IUPAC (RAUTER et al., 2018). O anel aromático diretamente ligado ao grupo carbonila (anel A) é numerado com algarismos acompanhados de apóstrofo (1′, 2′, 3′, 4′, 5′, 6′), enquanto o anel aromático mais distante da carbonila (anel B), recebe a numeração simples (1, 2, 3, 4, 5, 6) (**Figura 6**). Essa convenção deve-se ao fato das primeiras chalconas descritas terem sido interpretadas e comparadas a derivados de acetofenonas, nos quais esse padrão de numeração é empregado para distinguir o anel diretamente ligado ao grupo carbonila (DHALIWAL et al., 2022).

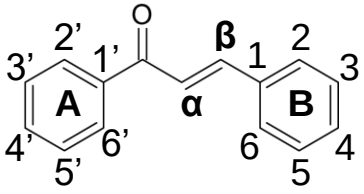


Figura 6. Estrutura básica das chalconas.

As chalconas podem ser encontradas naturalmente em diversas plantas ou sintetizadas com diferentes arranjos de substituintes (FERREIRA et al., 2018). O grande interesse químico-farmacológico nas chalconas e seus derivados decorre da disponibilidade de diversas rotas sintéticas, de sua estrutura relativamente simples e de múltiplas propriedades biológicas descritas, incluindo ação anti-inflamatória, antimicobacteriana, antiviral, antioxidante, antidiabética e neuroprotetora (VENTURA et al., 2015; SHIH et al., 2018; SALEHI et al., 2021). A presença da dupla ligação conjugada ao grupo carbonila tem sido associada às propriedades farmacológicas das chalconas (SHALABY et al., 2023). Fármacos baseados em chalconas, como a metochalcona (utilizada agente colerético), a sofalcona (agente gastroprotetor e anti-infeccioso de uso sistêmico) e a hesperidina-metil chalcona (para tratamento de varicoses venosas linfáticas crônicas), já foram aprovados para uso clínico por agências governamentais de países específicos (XU et al., 2024; ADHIKARI et al., 2025).

As chalconas pertencem ao grande grupo dos fenóis vegetais e estão distribuídos em plantas medicinais e de uso na alimentação, como espécies das famílias Fabaceae, Asteraceae e Moraceae, explicando o frequente isolamento em estudos de fitoquímica e o interesse como protótipos de produtos naturais bioativos (RUDRAPAL et al., 2021).

Do ponto de vista biossintético, as chalconas resultam de uma rota mista (**Figura 7**) que integra o metabolismo derivado do ácido chiquímico (via do shikimato) e a via do acetato (malonil-CoA). Na via do shikimato, o ácido chiquímico é convertido a L-fenilalanina, um aminoácido aromático precursor para a formação de compostos C6–C3; a fenilalanina sofre desaminação gerando ácido cinâmico, que em seguida é hidroxilado, formando o ácido p-cumárico. Este intermediário é então convertido em p-cumaroil-CoA pela 4-coumarato-CoA ligase, estabelecendo o doador da unidade fenilpropanoide que será condensado a unidades de malonil-CoA para biossíntese das chalconas (TOHGE et al., 2013; RUDRAPAL et al., 2021).

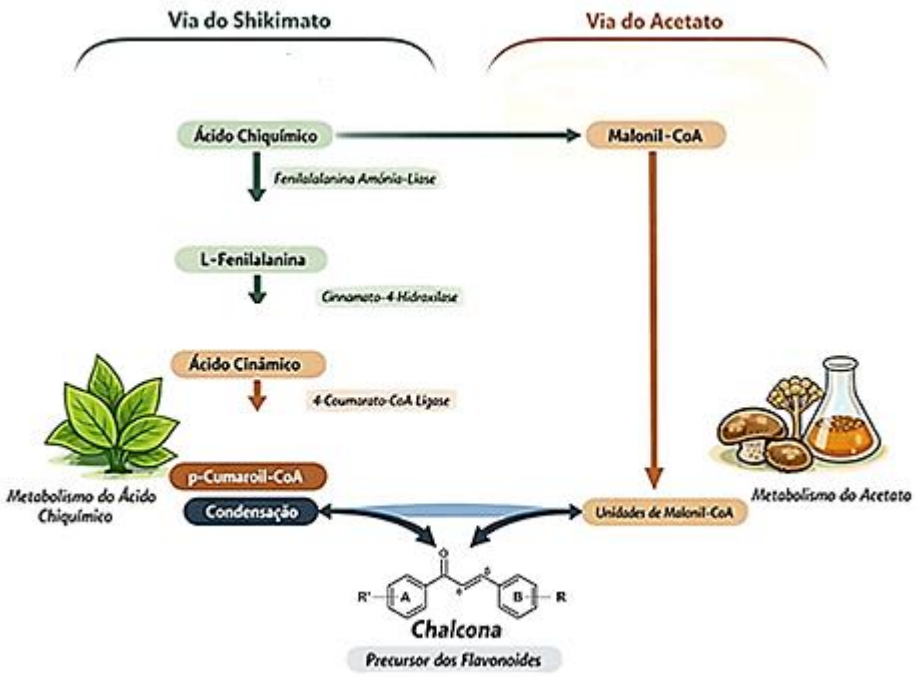


Figura 7. Rota biossintética comum das chalconas. (Adaptado de RUDRAPAL et al., 2021).

A síntese química de chalconas é classicamente realizada por reações de condensação entre aldeídos aromáticos e acetofenonas, em meio básico (NaOH, KOH ou $Ba(OH)_2$), constituindo uma variação da condensação de Claisen–Schmidt amplamente empregada na obtenção de sistemas α,β-insaturados conjugados (GOYAL et al., 2021). Diversas revisões recentes ressaltaram a permanência desse método como o mais utilizado na preparação de chalconas e derivados, em virtude da simplicidade operacional, do uso de reagentes prontamente disponíveis e da compatibilidade com ampla variedade de substituintes aromáticos (RAJENDRAN et al., 2022; MEZGEBE et al., 2023). Apresentam rendimentos amplamente variáveis, em função da natureza dos substituintes e das condições empregadas, porém frequentemente elevados quando se otimizam o solvente, a base e a temperatura, especialmente com o uso de KOH ou bases suportadas (YADAV e WAGH, 2020).

No contexto da TB, revisões da literatura destacaram as chalconas quanto à capacidade de inibir o crescimento de Mtb por diferentes mecanismos, apresentando baixos valores de MIC em faixa micromolar para diversos derivados. Rodrigues-Silva e colaboradores (2022) selecionaram 37 chalconas com $MIC_{90} < 20$ µM, em sua maioria contra Mtb H37Rv, e IS > 10, destacando que a natureza e a posição dos substituintes nos anéis aromáticos e a lipofilicidade fortemente influenciam a ação anti-Mtb. Os

principais alvos foram relacionados à parede celular: InhA (validado experimentalmente), DprE1, KasA, sobrevivência bacilar: PknB, metabolismo de colesterol: FadA5 e replicação: DNA girase. A revisão de Sabarathinam et al. (2023) reúne 14 derivados de chalconas com potente ação anti-Mtb e discute o perfil *drug-likeness* e ADME destacando a presença de propriedades compatíveis com os fármacos orais disponíveis, ressaltarando que derivados moderadamente lipofílicos tendem a apresentar maior atividade contra Mtb, assim como modificações estruturais relacionadas a halogenação, introdução de heterociclos e substituintes metoxilas. Embora diferentes trabalhos publicados descrevam chalconas sintéticas, especialmente as híbridas e/ou heterocíclicas, com MIC de 1–5 µM, os estudos de mecanismo de ação são limitados e apresentam baixa validação. No âmbito da avaliação de chalconas em modelos animais de TB, Marrapu e colaboradores (2011) descreveram uma redução moderada da carga bacilar nos pulmões de camundongos Swiss infectados por via intravenosa (10^7 UFC/mL) com Mtb H37Rv e tratados oralmente com 100 mg/kg por 28 dias.

Paralelamente à atividade antimicobacteriana, as chalconas são amplamente reconhecidas como potentes agentes anti-inflamatórios, capazes de modular moléculas e vias centrais da resposta imune, como NF-κB, JNK, proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e de reduzir a expressão de mediadores inflamatórios clássicos (YADAV et al., 2010). O papel das chalconas naturais e sintéticas, na supressão de NF-κB culmina na diminuição da produção de TNF-α, IL-1β, IL-6, óxido nítrico (NO) e prostaglandina E_2, por meio da inibição da expressão de iNOS e COX-2 e da atenuação da geração de espécies reativas de oxigênio (ZHANG et al., 2024, VILLA et al., 2024).

Um aspecto particularmente vantajoso no contexto de tratamento da TB pulmonar grave é a possibilidade de selecionar uma única molécula, exibindo dual ação, antimicobacteriana e anti-inflamatória, alinhado ao conceito da HDT. Nosso grupo de pesquisa descreveu pela primeira vez, o potencial de dupla atividade, anti-Mtb e anti-inflamatória, de chalconas substituídas, promissoras para o tratamento da TB pulmonar grave, além de parâmetros farmacocinéticos satisfatórios e a modulação eletrônica e estérica dos anéis aromáticos como um fator determinante para a potência (VENTURA et al., 2015). Em adição, o melhor protótipo, a chalcona 5C foi avaliado em modelo murino de TB pulmonar grave, apresentando excelente capacidade de reduzir a imunopatologia e a carga bacilar pulmonar (SIMÃO, 2015), incentivando a otimização e obtenção de novas chalconas a partir dos protótipos líderes.

1.7.2 Auronas

Auronas constituem uma subclasse distinta de flavonoides, estruturalmente relacionada às flavonas, caracterizada por um núcleo benzofuranônico (2-benzofuran-3-ona) conjugado a um anel aromático via uma dupla ligação exocíclica, formando as chamadas 2-benzilidenobenzofuran-3-onas, se apresentam também como cetonas αβ-insaturadas. Desta forma, diferentemente das chalconas e demais flavonoides, as auronas apresentam na porção C3 da estrutura básica uma furanona (**Figura 8**).

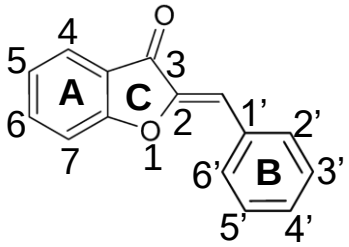


Figura 8. Estrutura básica das auronas.

A arquitetura π-conjugada confere às auronas propriedades eletrônicas peculiares, incluindo intensa coloração e fluorescência, contribuindo com a pigmentação amarela em flores de diversas espécies, além de favorecer interações específicas com alvos biológicos. Embora mais de 100 auronas com diferentes estruturas tenham sido descritas, o grupo é menos abundantes que outras classes de flavonoides e de distribuição esporádica nas plantas (NAKAYAMA, 2022), as auronas já foram isoladas de diferentes plantas, como *Antirrhinum majus* e espécies das famílias Asteraceae e Fabaceae, e podem ser obtidas por rotas sintéticas e semi-sintéticas robustas, o que tem ampliado seu emprego como plataforma estrutural na química medicinal contemporânea. As auronas podem ser encontradas com diferentes padrões de substituição por hidroxilas, metoxilas e glicosiladas (MAZZIOTTI et al., 2021; JOHN et al., 2024).

A biossíntese de auronas tem a chalcona como precursor, podendo ser catalisada por peroxidases à aurona ou pela enzima aurona sintase, um homólogo da polifenol oxidase (PPO) (SANCHEZ-GONZALEZ e ROSAZZA, 2006). Diferentes abordagens de síntese foram propostas para obtenção de auronas como a ciclização de chalconas em condições oxidantes, rearranjo do anel de heterocíclico de flavonas na presença de nucleófilos à base de nitrogênio, reações de anelação de alquinilfenóis ou halofenóis substituídos, como também a funcionalização do anel benzofurano a partir da reação de

benzaldeídos contendo diferentes substituições com o ácido cloroacético (MAZZIOTTI et al., 2021).

As auronas são descritas pelas atividades antibacteriana de amplo espectro, antifúngica incluindo antibiofilmes de *Candida* sp., antimalária, antioxidante, antitumoral, além de exibir propriedades inibitórias de enzimas exploradas por infecções virais (*Influenza* e vírus da hepatite C) e atividade anti-inflamatória (KIM et al., 2021; JOHN et al., 2024). A diversidade de propriedades biológicas decorre, em grande parte, da plasticidade estrutural do núcleo benzofuranônico e da possibilidade de diferentes padrões de substituição nos anéis aromáticos, o que permite ajustes das propriedades físico-químicas e farmacodinâmicas (SAROHA et al., 2025).

Auronas com potencial anti-TB exibem menor descrição na literatura comparada à classe das chalconas, contudo, atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos possui representatividade (YANG et al., 2020). No âmbito da ação antimicobacteriana, Reynolds et al. (2012) descreveram 3 auronas a partir de um *screening* envolvendo 63 auronas como inibidoras de quinases ou sítios de ligação de quinases de Mtb (MIC_{90} de 1,7 - 3,5 µg/mL). A partir de uma série de auronas e análogos, azaauronas e *N*- acetilazaauronas, nove análogos foram os mais potentes contra Mtb H37Rv e isolados clínicos de Mtb MDR e XDR, com MIC_{99} de 0,4 a 2,0 µM, e atividade preliminarmente relacionada a inibição do complexo citocromo *bc1* micobacteriano (CAMPANIÇO et al., 2019). Yang e colaboradores (2020) um *screening* com 146 derivados de auronas contra Mtb CDC1551, selecionando 6 auronas com MIC de 6,25 a 50 µM no ensaio de REMA, duas auronas com IS> 10, e três destas exibiram MIC de 25 a 50 µM contra Mtb intracelular em macrófagos derivados de THP-1 infectados. Em modelo murino de BALB/c infectado por aerossol com Mtb CDC1551 (5×10^5 UFC/mL), o tratamento i.p. com cada uma das quatro auronas (5mg/kg/dia) por 12 dias, após 28 dias da infecção, reduziu significativamente a carga bacilar nos pulmões dos animais tratados, fornecendo evidência de eficácia *in vivo* (YANG et al., 2020). Os autores descreveram que o sistema de anéis das auronas permanece pouco explorado quanto a atividade anti-TB em comparação com outros flavonoides, o que ressalta a importância da inclusão desta classe em nossos estudos.

A atividade anti-inflamatória das auronas tem sido documentada em modelos *in vitro* e em animais, com destaque para a modulação da via de sinalização NF-κB. Estudos com auronas sintéticas demonstraram que determinados derivados são capazes de suprimir significativamente a resposta inflamatória induzida por LPS em

monócitos humanos THP-1 e em macrófagos RAW 264.7, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF-α, IL-1β e IL-8, e de de óxido nítrico (NO) (PARK et al., 2017; MAZZIOTTI et al., 2021). Adicionalmente, 3 novas auronas sintéticas exibiram atividade antidiabética e neuroprotetores em modelos de diabetes neurodegenerativa induzida por streptozotocina em ratos Sprague-Dawley tratados separadamente por via oral com cada aurona (40 mg/kg) por 28 dias. A atividade observada foi correlacionada a reversão do estresse oxidativo e neuroinflamação, diminuição de citocinas inflamatórias e aumento de sistemas antioxidantes endógenos, o que reforça o potencial modulador sistêmico da inflamação (AYAZ et al., 2024).

A possibilidade de explorar, em um mesmo esqueleto benzofuranônico, a inibição de alvos metabólicos micobacterianos e a modulação de vias inflamatórias centrais de derivados de auronas podem possibilitar a otimização racionalcomo candidatos a fármacos multialvo, com potencial para integrar estratégias de terapia dirigida ao hospedeiro em associação aos esquemas anti-TB convencionais (HUANG et al., 2024).

2. JUSTIFICATIVA

A tuberculose (TB) permanece como um problema de saúde pública mundial, sendo a principal causa de morte por um único agente infeccioso e em indivíduos HIV-positivo (WHO, 2025). Cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes representam um desafio clínico relevante, culminando em esquemas terapêuticos prolongados, de maior toxidade, menores taxas de cura e pior prognóstico, sendo a TB-RR classificada pela OMS como patógeno de prioridade crítica (WHO, 2025).

Formas graves de TB pulmonar, geralmente associadas à infecção por cepas resistentes e/ou hiperviruentas, caracterizam-se por intensa resposta inflamatória do hospedeiro, com produção exacerbada de mediadores inflamatórios, formação de necrose caseosa e destruição progressiva do parênquima pulmonar (ALMEIDA et al., 2017; YUK et al., 2024). Esse processo imunopatológico favorece o desenvolvimento de sequelas pulmonares permanentes, mesmo após a eliminação bacteriana.

Terapias direcionadas ao hospedeiro (HDTs), incluindo abordagens adjuvantes anti-inflamatórias, constituem uma estratégia promissora para o tratamento da TB grave, capazes de modular a resposta imune inflamatória exacerbada, favorecer o reparo ou prevenção à lesão necrótica tecidual e potencializar a eficácia dos antibióticos convencionais (MI et al., 2024; CHUNXIAO et al., 2026). Esta abordagem já faz parte do manual de manejo e tratamento de casos de meningite tuberculosa e de derrame pericárdico tuberculoso. Neste contexto, a identificação de substâncias com atividade dual, antimicobacteriana e imunomoduladora, pode representar uma alternativa relevante para o desenvolvimento de terapias adjuvantes mais eficazes

Flavonoides bioativos, como as chalconas e auronas, apresentam amplo espectro de atividades biológicas, incluindo ações antimicrobianas, anti-inflamatória e antioxidante, entre outros (HUANG et al., 2024). Estudos do nosso grupo demonstraram que derivados sintéticos de chalconas exibem potencial terapêutico in vitro e em modelos experimentais de TB pulmonar grave (SIMÃO, 2015), o que incentivou a otimização e das estruturas mais potentes e seletivas e a obtenção de novas substâncias. Derivados de auronas, apresentando os grupos substituintes descritos previamente na chalcona mais promissora, podem auxiliar na obtenção de melhores protótipos com atividade *dual,* para esta classe química com menor descrição de atividades biológicas neste âmbito.

A investigação de novos candidatos a fármacos, incluindo abordagens pré-clínicas associadas a estudos *in vitro* e *in silico*, apresenta elevada relevância científica e pode contribuir para as estratégias terapêuticas adjuvantes da TB pulmonar grave.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial de 27 derivados de chalconas, 7 análagos de chalconas e 4 derivados de auronas quanto à capacidade dual, antimicobacteriana e anti-inflamatória, bem como o impacto do tratamento com a substância mais ativa na imunopatologia induzida em camundongos por cepa Mtb hipervirulenta.

3.2. Objetivos específicos

● Avaliar a viabilidade celular da cultura de macrófagos RAW 264.7 frente ao tratamento com as chalconas e auronas;

● Avaliar a capacidade das chalconas e auronas em inibir a produção de mediadores pró-inflamatórios (NO, IL-1β e TNF-α) em modelo de macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS;

● Investigar o mecanismo de ação dos derivados mais ativos em inibir a produção de NO através da verificação do potencial antioxidante destas no sequestro do radical DPPH e na expressão enzimática da iNOS;

● Avaliar a capacidade das chalconas e auronas em inibir o crescimento de cepas Mtb com diferentes níveis de virulência em cultura bacteriana e em macrófagos infectados;

● Caracterizar o mecanismo de ação inibitória dos derivados mais ativos contra Mtb H37Rv;

● Investigar *in silico* a relação estrutura-atividade e propriedades ADMET para os derivados mais ativos contra cepa Mtb H37Rv;

● Avaliar o efeito terapêutico da substância mais ativa, com atividade *dual in vitro*, em modelo murino de TB pulmonar grave induzida em camundongos C57Bl/6 por cepa Mtb hipervirulenta, avaliando efeitos na imunopatologia pulmonar, crescimento bacilar e modulação da resposta imune induzida pela bactéria.

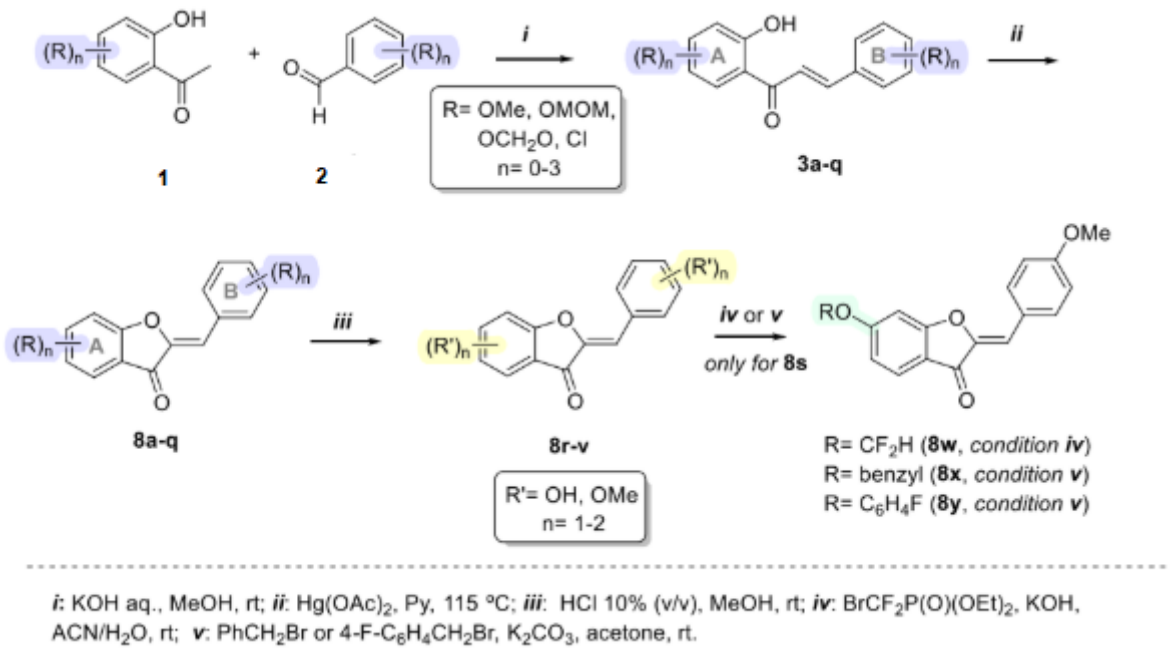
4. MATERIAIS E MÉTODOS

Esta seção compreende os materiais e métodos relativos ao capítulo II e III dos resultados e discussão, visto que o capítulo I foi compilado no formato de manuscrito em fase de submissão constando sua própria seção metodológica.

4.1. Obtenção das auronas

As auronas sintéticas foram obtidas através de uma colaboração entre o Laboratório de Produtos Bioativos/UFRJ e Laboratório de Biologia do Reconhecer/UENF com o Laboratório de Química Bioorgânica/IPPN/UFRJ coordenado pelo Prof Dr. Paulo Roberto Ribeiro Costa e Prof Dr. Guilherme Caleffi. A estratégia de síntese das auronas consistiu na ciclização oxidativa de 2'-hidroxichalconas na presença de acetato de mercúrio, conforme descrito e caracterizado por Caleffi et al., (2023). Após a síntese, as auronas foram ressuspendidas em dimetilsulfóxido (DMSO) para obtenção de uma solução estoque de 50 mM. As soluções foram aliquotadas e armazenadas a −20 °C, protegidas da luz, até sua utilização nos ensaios biológicos.

Esquema 1. Síntese das auronas (Adaptado de CALEFFI et al., 2023).



4.2. Cultivo celular e tratamento com os derivados de auronas

A linhagem murina de macrófago RAW 264.7 (ATCC/VA, USA) foi cultivada em meio DMEM-F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco/Invitrogen,

NY, EUA), 50 µg/mL de gentamicina (Gibco BRL) e 25 µg/mL de anfotericina B (Sigma-Aldrich), sendo mantida em estufa a 37 °C, sob atmosfera contendo 5% de CO_2 (RIBEIRO et al., 2014).

Para os experimentos, as células RAW 264.7 foram plaqueadas num volume de 100 µL/poço em placas de 96 poços na densidade de 5×10^5 células/mL, utilizando meio DMEM-F12 suplementado com 2% de SFB, sem adição de antibióticos. As células foram incubadas na presença ou ausência dos derivados de auronas (0.8, 4, 20 e 100 µM) e/ou lipopolissacarídeo (LPS; 1 µg/mL Sigma-Aldrich, EUA). As placas sob tratamento foram incubadas em estufa a 37 °C e 5% de CO_2. Após 24 h de incubação, os sobrenadantes das culturas foram coletados para a avaliação dos parâmetros inflamatórios e da citotoxidade (VENTURA, 2015).

4.3. Quantificação da produção de óxido nítrico (NO)

A produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos foi determinada de forma indireta por meio da quantificação de nitrito (NO_2^-), um dos principais produtos estáveis da degradação do NO (ZHAI et al., 2008), utilizando o método de Griess. Para isso, 50 µL do sobrenadante das culturas de macrófagos RAW 264.7, previamente estimuladas por LPS e tratadas com os derivados de auronas conforme descrito no item 4.2, foram dispostos junto a 50 µL do reagente de Griess (1% de sulfanilamida e 0,1% de dicloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina em solução de ácido fosfórico a 5%) em microplaca de 96 poços (Sigma-Aldrich). Após 10 minutos de incubação, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, a absorbância foi determinada a 570 nm utilizando um leitor de microplacas (Epoch UV-Vis, BioTek, EUA). A concentração de nitrito foi calculada a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio expressa em µM foi obtida após o decréscimo da absorbância correspondente aos poços contendo apenas os reagentes, sem células (GRIESS, 1864).

O inibidor não seletivo das isoformas da sintase do óxido nítrico (NOS), acetato de NG-metil-L-arginina (L-NMMA), foi empregado como um controle farmacológico, na concentração de 20 µg/mL (80,6 µM). Essa concentração foi selecionada por apresentar atividade inibitória satisfatória, sem induzir citotoxidade, conforme descrito por Simão (2015). A concentração de nitrito obtida para cada grupo experimental foi comparada aos controles, negativo (macrófagos não estimulados e não tratados), e positivo (macrófagos estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) e não tratados).

4.4. Avaliação da viabilidade celular em cultura de macrófagos

A viabilidade da cultura de macrófagos RAW 264.7 após o tratamento com os derivados de auronas foi determinada pelo ensaio colorimétrico do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), baseado na capacidade de células metabolicamente viáveis de reduzir o sal de tetrazólio à cristal de formazan por meio da atividade de enzimas desidrogenases e oxirredutases dependentes de NADPH (MOSMANN, 1983). Após 24 h de incubação nas condições experimentais descritas no item 4.2 foram adicionados 10 µL de solução de MTT (5 mg/mL; Sigma-Aldrich) a cada poço, seguindo-se de incubação por 2 h a 37 °C a5% de CO_2. Posteriormente, o sobrenadante foi cuidadosamente removido e os cristais de formazan formados foram solubilizados com 100 µL de isopropanol acidificado com HCl (4 mM). A absorbância foi determinada a 570 nm em um leitor de microplacas (Epoch UV-Vis, BioTek, EUA).

Os resultados de absorbância foram utilizados para determinar o percentual de viabilidade celular, comparado ao controle negativo de viabilidade celular, a cultura de macrófagos estimulada e não tratada, acrescida de Triton X-100 a 1% (10 µL/poço) e ao controle negativo, constituído por macrófagos estimulados, não tratados e incubados nas mesmas condições experimentais. Considerando que os derivados de auronas foram preparados em dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma-Aldrich), o solvente foi adicionado ao grupo controle na mesma concentração final empregada para as amostras tratadas, a fim de excluir possíveis efeitos decorrentes do veículo.

4.5. Cultivo micobacteriano

As cepas de *Mycobacterium tuberculosis* foram previamente genotipadas e gentilmente cedidas pelo Dr. Philip Suffys, do Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil). Foram utilizadas a cepa laboratorial *M. tuberculosis* H37Rv e a cepa *Beijing* (Mtb M299), esta é um isolado clínico proveniente de um paciente com TB em Moçambique, caracterizado como hipervirulenta de acordo com (RIBEIRO et al., 2014).

As micobactérias foram cultivadas em meio líquido Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA), suplementado com 10% de ADC (albumina, dextrose e catalase; Difco Laboratories), 0,05% de Tween 80 e 0,2% de glicerol. As culturas foram incubadas a 37 °C, por 7 dias, até atingirem a fase de crescimento exponencial (mid-log), sendo então utilizadas experimentalmente. O crescimento micobacteriano foi monitoramento através da medida de densidade óptica (D.O 600nm), por espectrofotometria (Biospectro – modelo SP-220) (VENTURA et al., 2015). A

concentração bacteriana foi então padronizada por meio da determinação da densidade óptica (DO) a 600 nm, utilizando espectrofotômetro (Biospectro®, modelo SP-220).

Para experimentação, a suspensão de Mtb foi ajustada para DO_{600} = 0,100, correspondendo a aproximadamente 2 × 10^7 bacilos/mL para ambas as cepas Mtb. Para a dispersão dos grumos, as suspensões foram submetidas a três ciclos sucessivos de agitação em vórtex (Biomatic), intercalados com exposição ao banho ultrassônico por 1 minuto (Ultrasonic Maxi Cleaner 800, Unique), obtendo-se uma suspensão bacteriana uniforme (VENTURA et al., 2015).

4.6. Avaliação da atividade antimicobacteriana

A atividade antimicobacteriana dos derivados de auronas foi determinada durante a fase exponencial de crescimento da cepa de Mtb, utilizando asuspensão bacteriana previamente padronizada conforme descrito no item 4.5.

Para os ensaios, 50 µL da suspensão bacteriana (1 × 10^7 UFC/mL) foram distribuídos em placas de microtitulação de 96 poços, seguidos da adição de 50 µL das soluções dos derivados de auronas preparadas em concentração duas vezes superior (2×) à concentração final desejada. As concentrações finais avaliadas foram de 0.8, 4, 20 e 100 µM, totalizando um volume final de 100 µL por poço. As placas foram incubadas a 37 °C por 5 dias, e poseriormenteincubadas por 3 h com 10 µL por poço da solução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT). Após esse período, foram adicionados 100 µL de tampão de lise contendo 20% (p/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 50% (v/v) de *N,N*-dimetilformamida (DMF) (Sigma-Aldrich), promovendo a solubilização dos cristais de formazan e a degradação dos bacilos. O crescimento de Mtb foi determinado pela leitura da absorbância a 570 nm, conforme metodologia descrita por CAVIEDES et al. (2002).

Como controle positivo de crescimento, foram utilizados poços contendo apenas a suspensão bacteriana em meio Middlebrook 7H9 suplementado, sem tratamento. O controle negativo consistiu em poços contendo exclusivamente o meio de cultura suplementado, sem adição de bactérias. Para comparação de potencial de atividade inibitória, a rifampicina, fármaco de 1ª linha para o tratamento da TB pulmonar foi acrescido em curva de concentrações de 0,003 e 1,2 Mm (VENTURA et al., 2015).

4.7. Infecção experimental de camundongos C57BL/6 com a cepa hipervirulenta de *Mycobacterium tuberculosis*

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6, livres de patógenos específicos (Specific Pathogen Free – SPF), com idade entre 6 e 8 semanas, provenientes do Biotério Central do Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Os animais foram mantidos em microisoladores acondicionados em estantes ventiladas no biotério de nível de biossegurança 3 (NB-3) do Laboratório de Biologia do Reconhecer (CBB/UENF), sob a responsabilidade da Profª. Drª. Elena Lassounskaia e Profª Drª. Thatiana Simão.

Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pela Comissão Interna de Biossegurança da UENF (C-CIBio-17/06, 2025) e pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UENF), sob o protocolo nº 653/2025 (Anexo I).

O modelo de TB pulmonar grave foi estabelecido conforme Almeida et al. (2017). Para o estabelecimento do modelo experimental, utilizou-se a cepa hipervirulenta Mtb M299 (genótipo *Beijing*), previamente cultivada e padronizada conforme descrito no item 4.5. O inóculo bacteriano de aproximadamente 100 UFC em um volume final de 50 µL por animal foi preparado e a concentração bacilar foi confirmada por meio da semeadura do mesmo volume aplicado por animal em placas de ágar Middlebrook 7H10 suplementada.

Previamente à infecção, os camundongos foram anestesiados por via intraperitoneal com 90 a 120 µL, de acordo com o peso corporal de uma solução de xilazina (Anasedan®, 15 mg/kg; Vetbrands) e cetamina (Dopalen®, 110 mg/kg; Vetbrands), diluídas em PBS estéril. A eficácia da anestesia foi confirmada pela verificação da ausência de reflexos de retirada e de resposta à estimulação.

A infecção foi realizada por via intratraqueal após a exposição da traqueia por meio de uma pequena incisão transversal de aproximadamente 0,5 cm na região cervical, e inoculação de 50 µL da suspensão bacteriana, (~ 100 UFC), entre os anéis cartilaginosos traqueais, utilizando seringa hipodérmica de 0,3 mL (Terumo®, São Paulo, Brasil). Os animais do grupo controle receberam o mesmo volume de PBS estéril (1×) pela mesma via de administração. Ao término do procedimento, a incisão foi suturada e os animais permaneceram sob observação até a completa recuperação anestésica.

Após a infecção, os animais foram distribuídos em grupos de 6 animais por microisolador e monitorados diariamente quanto às condições clínica e de bem-estar. Foram avaliados parâmetros como peso corporal, mobilidade, comportamento e padrão respiratório. Os animais que apresentaram sinais clínicos compatíveis com os critérios de desfecho desfavorávelestabelecidos no protocolo experimental foram submetidos à

eutanásia por inalação de dióxido de carbono (CO_2), conforme as recomendações da CEUA, visando minimizar o sofrimento animal.

4.7.1. Tratamentos com grupos experimentais

Para o estabelecimento da infecção pelo Mtb e o desenvolvimento da resposta imune, o tratamento com os animais foi iniciado após 15 dias da infecção, por via intraperitoneal (20 µL/animal), alternando o lado de aplicação no abdômen, diariamente durante um período de 15 a 30 dias de tratamento. Seguem os grupos experimentais de acordo com o protocolo a que foram submetidos:

Grupo 1 - Animais não infectados (controle).

Grupo 2 - Animais não infectados que receberam aplicação intraperitoneal diária do derivado **27** (20 mg/kg).

Grupo 3 - Animais infectados por Mtb e não tratados.

Grupo 4 - Animais infectados por Mtb que receberam aplicação intraperitoneal diária do derivado **27** (20 mg/kg).

Grupo 5 - Animais infectados por Mtb que receberam aplicação intraperitoneal diária de rifampicina (10 mg/kg).

Grupo 6 - Animais infectados por Mtb que receberam aplicação intraperitoneal diária de ibuprofeno (40 mg/kg).

Após o período de 15 e 30 dias de tratamento os animais foram eutanasiados por exposição em câmara de CO_2 e foram analisados os seguintes parâmetros: carga bacilar (UFC) no pulmão, alterações teciduais e celulares no pulmão (macropatologia e histopatologia/ morfometria), relação entre o peso dos pulmões e o número de células contabilizados e produção de citocinas *ex vivo* a partir das células pulmonares.

4.7.2 Obtenção de células pulmonares, determinação da carga bacilar e avaliação ex vivo da produção de mediadores inflamatórios

Os lóbulos do pulmão direito (cranial, médio, caudal e retrocava) e o lóbulo esquerdo dos camundongos pertencentes aos diferentes grupos experimentais foram coletados assepticamente, pesados e transferidos para placas de Petri (21 cm^2; JProlab) contendo 3 mL de meio RPMI-1640 (Gibco/Invitrogen, NY, USA). Em seguida, os lóbulos direito foram fragmentados mecanicamente com auxílio de pinças curvas e mantidos em gelo até o processamento.

Posteriormente, o homogenato foi incubado a 37 °C por 40 min sob constante agitação, com a solução de digestão tecidual composta por 0,5 µg/mL colagenase tipo IV (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e 0,1 µg/mL de DNase I pancreática bovina tipo IV (Roche Diagnostics; 1 mg/mL). Após a digestão enzimática, os fragmentos pulmonares foram ainda submetidos a dissociação mecânica por meio de dez ciclos de homogeneização utilizando seringas estéreis de 10 mL. Os homogenatos obtidos foram filtrados em filtros celulares (cell strainer) com poros de 40 µm (BD Biosciences, CA, USA), removendo-se os resíduos de tecido não dissociado.

Uma fração do homogenato livre de matriz tecidual (100 µL) foi destinada à determinação da carga bacilar pulmonar por meio de diluições decimais seriadas, seguidas de semeadura em placas contendo meio Middlebrook 7H10 suplementado com OADC. As placas foram vedadas e incubadas a 37 °C por 21 dias, quando então foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC).

O volume remanescente do homogenato foi utilizado para a obtenção de células pulmonares. Inicialmente, as hemácias foram removidas por adição de tampão de lise (0,144 M NH_4Cl; 0,0169 M Tris base; pH 7,4) na proporção de 1:4 vol/vol do homogenato por 5 min à 37ºC. Em seguida, as suspensões celulares foram lavadas com 10 mL de PBS estéril suplementado com 10% de SFB. Após centrifugação a 300 g por 5 min a 18 ºC, o pellet de células foi ressuspendido em meio RPMI-1640 contendo 10% de SFB e 0,05 mg/mL de gentamicina, permanecendo em gelo até a realização dos procedimentos subsequentes.

A viabilidade celular foi verificada pelo teste de exclusão com azul de Trypan a 0,2% preparado em paraformaldeído a 1%, após incubação por um minuto. As células viáveis foram quantificadas em câmara de Neubauer e a suspensão celular foi ajustada para a concentração final de 5×10^5 células/mL. Posteriormente, as células foram cultivadas *ex vivo* por 48 ha 37 °C 5% de CO_2, para avaliação da produção espontânea de mediadores inflamatórios.

Após 48 h, os sobrenadantes foram coletados, filtrados em filtros de poro 0.22 µm e armazenados a -80 °C até o momento das análises. As concentrações das citocinas pró-inflamatórias IL-1β e TNF-α, bem como da citocina anti-inflamatória IL-10, foram determinadas por ensaio imunoenzimático do tipo sanduíche (ELISA), utilizando kits comerciais (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), conforme as instruções do fabricante. A produção de óxido nítrico (NO) foi estimada pela quantificação dos níveis de nitrito no sobrenadante através do ensaio de Griess, conforme descrito no item 4.3.

4.7.3. Avaliação macroscópica e histopatológica

A avaliação das alterações macroscópicas e histopatológicas do pulmão foram realizadas em 30 e 45 dias após a infecção experimental.

A macropatologia baseou-se na avaliação do peso pulmonar dos animais de cada grupo tratado, obtido em balança analítica e posteriormente comparado com o peso pulmonar dos animais somente infectado. A massa relativa pulmonar foi calculada pela razão entre o peso individual do pulmão dos animais infectados (tratados ou não) e a média do peso pulmonar dos animais do grupo controle não infectado. Para as análises histológicas, o lóbulo superior esquerdo do pulmão, o fígado e o baço de cada animal foram coletados, fixados em solução de formol tamponada a 10% por, no mínimo, 96 h logo após, os pulmões foram fotografados utilizando escala métrica padronizada para registro das alterações morfológicas visíveis. Os órgãos foram então fixados em blocos de parafina para realização de cortes histológicos e coloração por hematoxilina-eosina (H&E), eZiehl-Neelsen (VENTURA, 2015).

4.7.4. Coloração por Hematoxilina-Eosina (H&E)

As análises histopatológicas foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Eulógio Carlos Queiroz de Carvalho, do Laboratório de Sanidade Animal do Hospital Veterinário da Universidade Estadual do Norte Fluminense. O lóbulo superior esquerdo do pulmão de cada animal foi coletado aos 30 e 45 dias após a infecção e fixados em formol tamponado a 10%. Após a fixação, os tecidos foram lavados em água corrente, desidratados em série crescente de etanol (70%, 80%, 90% e 100%), diafanizados em xilol e incluídos em parafina histológica por meio de processamento automatizado (VENTURA, 2015; CALIXTO, 2022).

Os blocos de parafina foram seccionados em micrótomo (Leica Microsystems), obtendo-se cortes com espessura entre 4 e 5 µm. As secções foram estendidas em banho-maria, montadas em lâminas histológicas e submetidas à desparafinização em xilol, seguida de reidratação em concentrações decrescentes de etanol.

A coloração com hematoxilina permite evidenciar estruturas nucleares enquanto a eosina cora componentes citoplasmáticos e da matriz extracelular. Após a coloração, as lâminas foram novamente desidratadas, diafanizadas em xilol e reunida permanentemente à lamínula, utilizando meio de montagem Permount®.

4.7.5. Coloração de Ziehl-Neelsen

Uma parte dos cortes histológicos também foi submetida à coloração de Ziehl-Neelsen, iniciando-se pela aplicação de carbolfucsina aquecida durante 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente e submetida à solução álcool-ácido a 1% até a obtenção da coloração adequada.

Após nova lavagem em água corrente, os cortes foram contracorados com uma solução de azul de metileno, desidratados, diafanizados em xilol e montados permanentemente com Permount®. As lâminas foram examinadas em microscópio óptico (Zeiss AxioPlan), visando à identificação e distribuição de BAAR no parênquima pulmonar.

4.7.6. Análise morfométrica do tecido pulmonar

Os cortes corados foram avaliados em microscópio óptico (Axioplan 2, Carl Zeiss, Alemanha), e as imagens capturadas por câmera digital Axiocam MRc5 (Carl Zeiss). Para a análise morfométrica, foram obtidas imagens com aumento de 100× e processadas no software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA).

As imagens foram convertidas para escala de preto e branco, permitindo a diferenciação entre áreas aeradas, correspondentes aos espaços alveolares, e áreas ocupadas pelo tecido pulmonar. Foram analisados dez campos aleatórios por seção pulmonar para cada animal. A porcentagem de área não aerada foi determinada a partir da razão entre a área de tecido e a área total analisada. A extensão da pneumonia foi estimada pela subtração da média da área tecidual observada no grupo controle (não infectado) da área observada nos grupos infectados sob tratamento ou não, sendo os resultados expressos como percentual de área inflamada.

4.8. Análise estatística

Os resultados obtidos foram plotados no Microsoft Excel e posteriormente analisados utilizando o software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os dados apresentados foram expressos como média ± desvio padrão da média (DP)**.** Diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$, utilizando a análise de variância de um único parâmetro, One-way ANOVA e o pós-teste de Tukey. Os valores de CC_{50}**,** MIC_{50} e IC_{50} foram

determinados por regressão não linear utilizando curvas log(concentração) versus resposta obtidas a partir de três experimentos independentes. O índice de seletividade (IS) foi calculado pela razão entre a concentração citotóxica 50% (CC_{50}) e a concentração inibitória mínima (MIC_{50}) frente a Mtb (CC_{50}/MIC). Para a avaliação dos resultados *in vivo*, foi empregada análise de variância de duas vias (two-way ANOVA), seguida do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

5. RESULTADOS e DISCUSSÃO

5.1. CAPÍTULO I – Manuscrito submetido "Antimycobacterial and Anti-Inflammatory Activities of Chalcone Derivatives for Adjuvant Treatment of Severe Pulmonary Tuberculosis: *In Vitro* and *In Silico* Approaches"

Yasmin Viana Martins [a], Juliane da Silva Falcão [b], Felipe Cerqueira Demidoff [b], Naiara Inacio da Silva [b], Stella Schuenck Antunes [c,d], Sanderson Dias Calixto [a], Vinícius de Oliveira Mussi [a], João Vitor Rocha Reis [e], Marlon Heggdorne de Araújo [c,e], Elena Lassounskaia [a], Paulo Roberto Ribeiro Costa [b], Nelilma Correia Romeiro [d], Francesca Boldrin [e], Riccardo Manganelli [e], Guilherme S. Caleffi [b]*, Michelle Frazão Muzitano [c,e]*, Thatiana Lopes Biá Ventura Simão [a]*

[a] Laboratório de Biologia do Reconhecer, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 28013-602, RJ, Brazil, [b] Laboratório de Química Bioorgânica, Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais Walter Mors, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 21941-902, RJ, Brazil, [c] Laboratório de Produtos Bioativos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Macaé, Macaé, 27930-560, RJ, Brazil; [d] Laboratório Integrado de Computação Científica (LICC), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Macaé, Macaé, 27930-560, RJ, Brazil; [e] Department of Molecular Medicine, University of Padova, Padova, 35121, Italy

Abstract: Severe pulmonary tuberculosis (TB) is often associated with a harmful inflammatory response requiring host-directed therapies (HDT) to prevent irreversible necrotic lung damage and to enhance the antibiotics' efficacy within affected tissue. To identify dual-action candidates with both antimycobacterial and anti-inflammatory properties, a library of 27 chalcone derivatives and 7 chalcones-like was synthesized. Prototypes **24** (**LQB-774**) and **27** (**LQB-778**) emerged as superior leads, exhibiting potent bactericidal activity (MIC_{90}/MBC_{99} < 15 μM) against both laboratory (H37Rv) and hypervirulent (Beijing M299) Mtb strains. Notably, compound **27** sustained its inhibitory effect for 10 days in infected human THP-1 macrophages. Mechanistically, these derivatives significantly reduced nitric oxide production via targeted iNOS suppression and decreased the production of critical pro-inflammatory cytokines (TNF-α and IL-1β), with potencies comparable or superior to ibuprofen. Structure-activity relationship (SAR) analysis revealed that structural rigidification and bioisosteric replacement are key drivers for optimized pharmacological performance. Combined with favorable *in silico* ADMET profiles, chalcones **24** (**LQB-774**) and **27** (**LQB-778**) represent robust dual-target prototypes for adjuvant treatment of severe pulmonary TB, simultaneously targeting the pathogen and the macrophage proinflammatory response.

Keywords: Chalcones • Inflammation • *Mycobacterium tuberculosis* • Structure-activity relationships • Biological activity

5.1.1. Introduction

In 2023, tuberculosis (TB) regained its status as the leading infectious cause of global deaths, responsible for approximately 1.23 million deaths annually, including 0.15 million individuals living with HIV and 10.7 million estimated cases [1]. About one-quarter of the global population is estimated to be latently infected with *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), the etiological agent of human TB [1]. Although 90% of the infected individuals remain asymptomatic, they constitute a broad reservoir for the emergence of new active TB cases [2], encompassing approximately 1–2% of latent resistant TB infections with potential for transmission [3].

The rising prevalence of drug-resistant (DR) TB and the emergence of highly virulent Mtb genotypes challenge the treatment of the disease [4]. Current therapeutic options are limited and often lead to worse outcomes, longer treatment duration, and varied adverse reactions [5]. Furthermore, it is known that infections with hypervirulent and resistant Mtb strains heighten the risk of developing severe pulmonary pathology in immunocompetent individuals [6,7].

The protective immune response against Mtb is crucial for eradicating or controlling the bacterial replication within granulomas. Phagocytic cells, particularly macrophages and neutrophils, are predominantly present in response to Mtb infection [8]. Recognition of the pathogen by these cells stimulates the release of pro-inflammatory mediators, including tumor necrosis factor-alpha (TNF-α), interleukin-1β (IL-1β), proteases, nitric oxide (NO), and reactive oxygen species (ROS), which help control Mtb infection. This process often results in latency, defined by a balance between infected cell death and cellular recruitment onto the granuloma [9,10].

However, several studies have reported that an inadequate inflammatory response, characterized by persistent cellular infiltration and excessive inflammatory activation, promotes progressive lung pathology, leading to necrotizing granulomatous inflammation and cavitation [11,12,13]. Necrotic lesions, a hallmark pathological feature of TB, constitute areas of limited access for immune cells and poor antibiotic diffusion. Additionally, these lesions can serve as reservoirs of extracellular bacilli, promoting biofilm formation and facilitating transmission [14].

The development of new drugs and strategies for the treatment of TB is urgently needed. Host-directed therapies (HDT) are an essential complementary approach to improve treatment outcomes in TB cases associated with inflammation-induced tissue pathology [15]. The goal is to prevent or minimize the development of pulmonary necrosis and enhance Mtb clearance, thereby increasing patient survival through a combination of immunomodulatory agents and conventional antibiotic therapy [16]. The beneficial role of adjunctive use of anti-inflammatory drugs in improving lung function and survival rates in patients with severe TB has been supported by preclinical and clinical studies [15-19]. Currently, the WHO recommends the initial adjuvant use of dexamethasone and prednisolone for patients with TB meningitis and those with tuberculous pericardial effusion [20]. Low-dose acetylsalicylic acid, a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID), was associated with improved survival among patients with pulmonary TB susceptibility [21]. In addition, studies have described the potential of ibuprofen to reduce Mtb load and lung pathology in animal models of TB [22,23], and a notable decrease in inflammatory markers in the plasma of DR-TB patients [24].

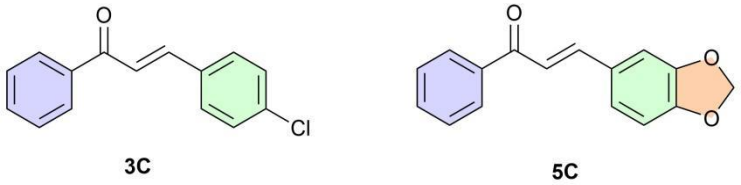
Compounds exhibiting both antimycobacterial and anti-inflammatory activities can offer an advantage in treating severe pulmonary TB. Chalcones are α,β-unsaturated

aromatic ketones, characterized by a 1,3-diaryl-2-propen-1-one structure, consisting of two aromatic rings connected by an open three-carbon chain with unsaturation at carbon 3. They can be found naturally in various plants or synthesized with different substituent arrangements and structural patterns [25]. The significant chemical-pharmacological interest in chalcones and their derivatives stems from the availability of diverse synthetic routes, relative simplicity of scaffolds, and a broad spectrum of biological activities, including anti-inflammatory, antimycobacterial, antiviral, antioxidant, antidiabetic, and neuroprotective properties [25-28]. The presence of a double bond in conjunction with the carbonyl moiety has been associated with the pharmacological properties of chalcones [29]. Chalcone-based drugs, such as metochalcone (choleretic), sofalcone (an anti-infective for systemic use), and hesperidin-methylchalcone (for the treatment of chronic venous lymphatic varicosis), have been permitted for clinical use [30,31].

Our previous work identified substituted chalcones, such as compounds **3C** and **5C**, as promising prototypes with dual anti-Mtb and anti-inflammatory activities, alongside satisfactory pharmacokinetic parameters [28]. The structure-activity relationship (SAR) analysis of the initial series indicated that the electronic and steric modulation of the aromatic rings was a determining factor for potency (**Figure 9**).

Figure 9. Chalcones with dual anti-Mtb and anti-inflammatory activities.

The present study was designed as a rational evolution of our previous findings [28], aiming to systematically explore a broader chemical space of α,β-unsaturated systems. Herein, we describe the strategic design and synthesis of a new library of 34



chalcone derivatives, including heterocyclic bioisosteres (pyridine, furan, thiophene) and analogues with extended conjugated chains. Our goal was to identify dual-action lead compounds that directly inhibit the growth of *M. tuberculosis* strains of differing virulence, while simultaneously modulating the detrimental host inflammatory response. To provide a robust SAR framework, experimental results were integrated with comprehensive *in silico* analyses of molecular descriptors and ADMET properties, aiming to support the development of simplified adjuvant therapies for severe TB.

5.1.2. Results and Discussion

5.1.2.1. Design and Synthesis of the Compounds

A total of 34 compounds were rationally designed and synthesized, building upon the insights gained from our previous work [28] to expand the SAR systematically. The library was strategically designed to probe the effects of steric bulk, lipophilicity, fine-tuned electronic modulation, and bioisosterism on the dual antimycobacterial and anti-inflammatory activities (**Figures 10** and **11**).

The series began with compound **1**, the fundamental unsubstituted chalcone framework, which serves as a crucial baseline for evaluating the impact of subsequent structural modifications. In contrast, chalcones **2** and **3** were designed to explore the influence of increased molecular size and lipophilicity, properties known to affect cell permeability and target binding. These compounds were built on more complex skeletons

by incorporating extra aromatic rings that mimic the structures of naphthalene (**2**) and phenanthrene (**3**).
The next group of compounds (**4**–**6**, **8**) consists of chalcones featuring a methylenedioxy group on either their A or B ring. This motif, present in our previous hit compound **5C** [28], was further explored to validate its contribution to the biological activity. These compounds also contain methoxy and/or hydroxy groups at the C-2 position, allowing for a deeper understanding of the electronic and hydrogen-bonding landscape required for potency. Additionally, to assess the impact of halogen atoms, which can enhance metabolic stability and modulate binding interactions through halogen bonds, halogenated chalcones with chlorine or bromine substituents at the *para* and *meta* positions (**7**, **11**, **12**, **22**, **25**, and **26**) were also designed, since they are present in our previous hit compound **3C** [28].

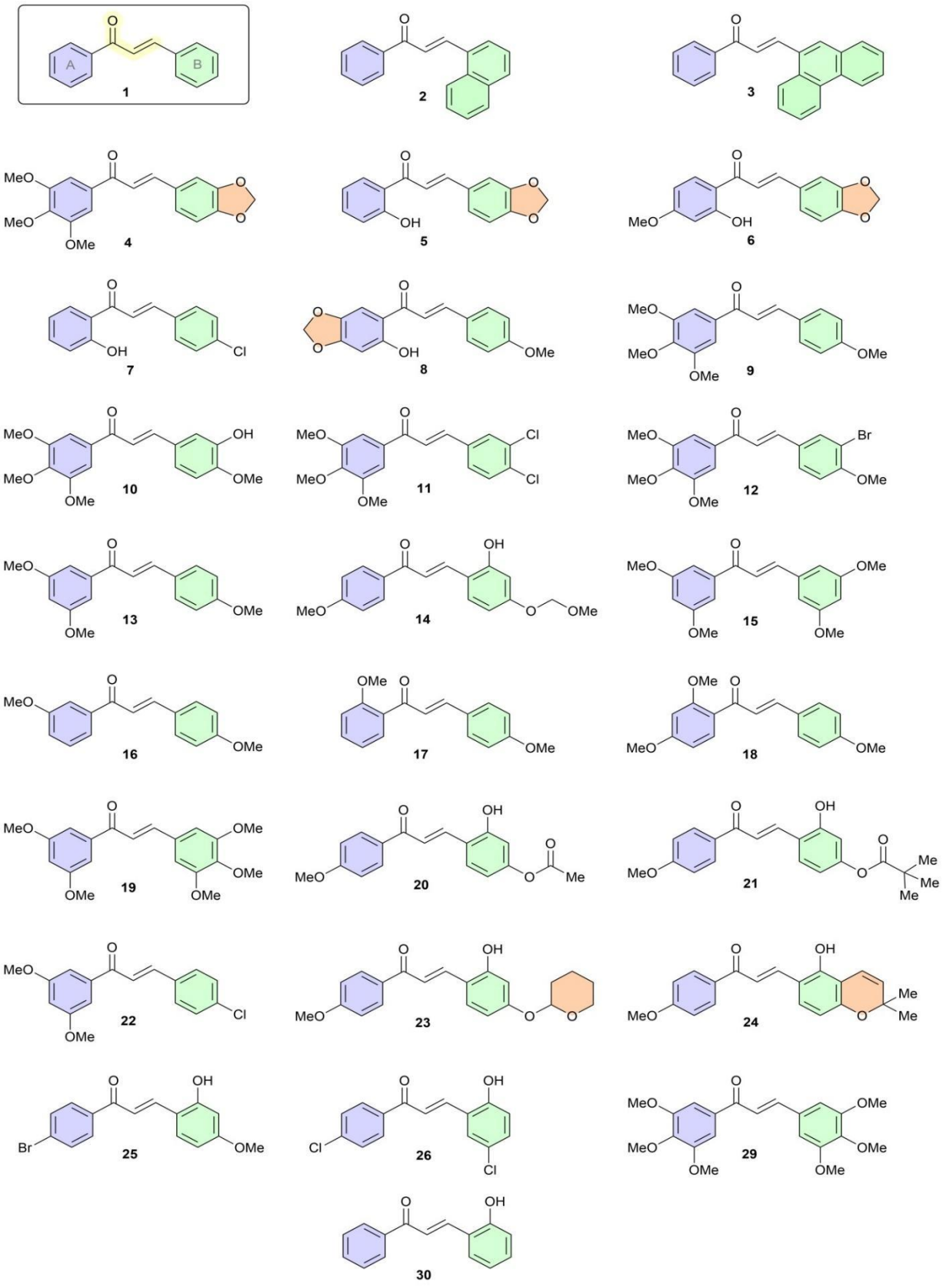


Figure 10. Structures of the synthesized chalcones.

The remaining chalcones were prepared with various methoxy group patterns on rings A and B (**9**–**10**, **13**, **15**–**19**, **29**) to fine-tune the electronic properties and

conformational flexibility of the molecular scaffold. Furthermore, to investigate the importance of the free hydroxyl for activity (**30**) and to explore a potential prodrug strategy, the C-4 hydroxy group of the 2,4-dihydroxy-4'-methoxychalcone was protected with various groups. This sub-series includes the methoxymethyl ether (**14**), acetate (**20**), and pivalate (**21**) esters, the tetrahydropyranyl ether (**23**), and a cyclized benzopyran (**24**), each offering different steric profiles and cleavage liabilities *in vivo*.

Among the synthesized compounds, seven exhibit structural characteristics similar to chalcones but were classified as chalcone-like compounds due to key variations in their chemical structure (**Figure 11**). In a critical strategic move to explore bioisosterism, compounds **27** and **28** incorporate a pyridine ring as a replacement for the B-ring, introducing a hydrogen bond acceptor and modifying the compound's pKa. Analogues with furan (**31**), thiophene (**32**), and pyrrole (**33**) rings were also synthesized to evaluate the influence of different five-membered heterocycles upon the biological profile compared to the classic phenyl ring. Finally, to probe the role of the conjugated system, compounds **34** and **35** feature an open-chain system extended by two carbons, creating a five-carbon dienone structure that alters the geometry and Michael acceptor reactivity of the core scaffold.

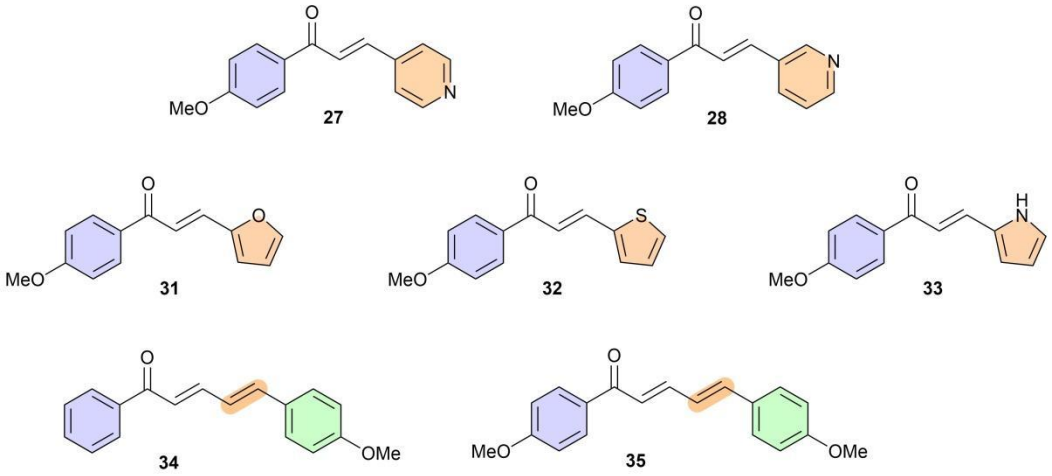


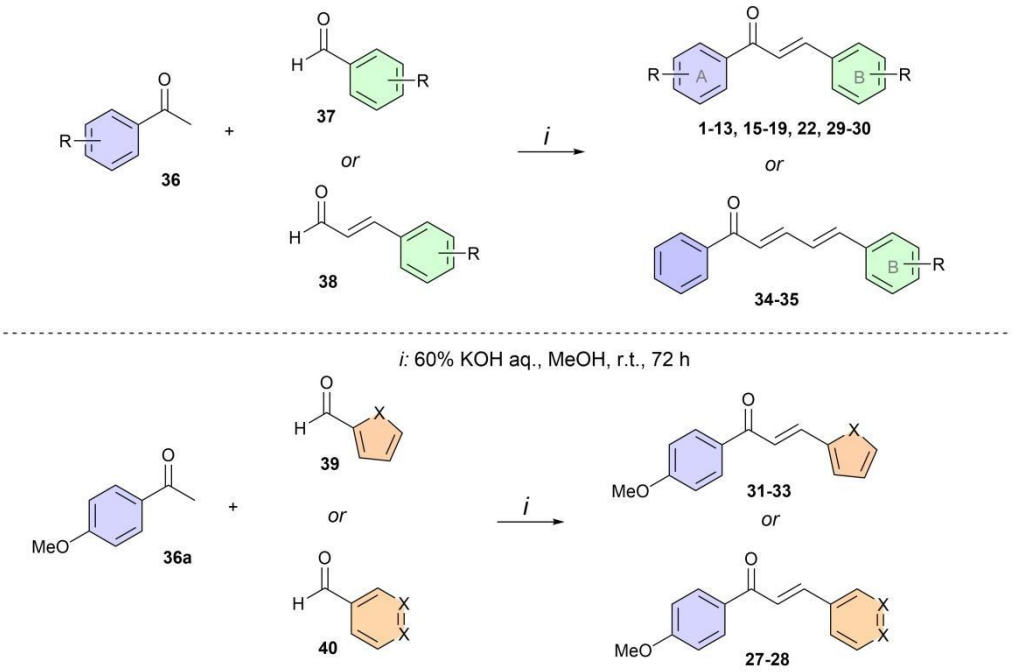
Figure 11. Structures of the synthesized *chalcones-like.*

The synthesis of the target chalcone derivatives was accomplished using two primary and complementary strategies, as depicted in **Schemes 2-4**. The majority of the chalcones were prepared via the classical Claisen-Schmidt aldol condensation, a robust and efficient method to form the α,β-unsaturated ketone core. This reaction was performed between appropriately substituted acetophenones (**36**) and aromatic (**37**, **38**) or heteroaromatic (**39**, **40**) aldehydes. The reactions were typically carried out using a 60% aqueous solution of potassium hydroxide in methanol at room temperature for 72 h. This straightforward methodology provided the desired products in good to excellent yields after purification (**Scheme 2**) [32].

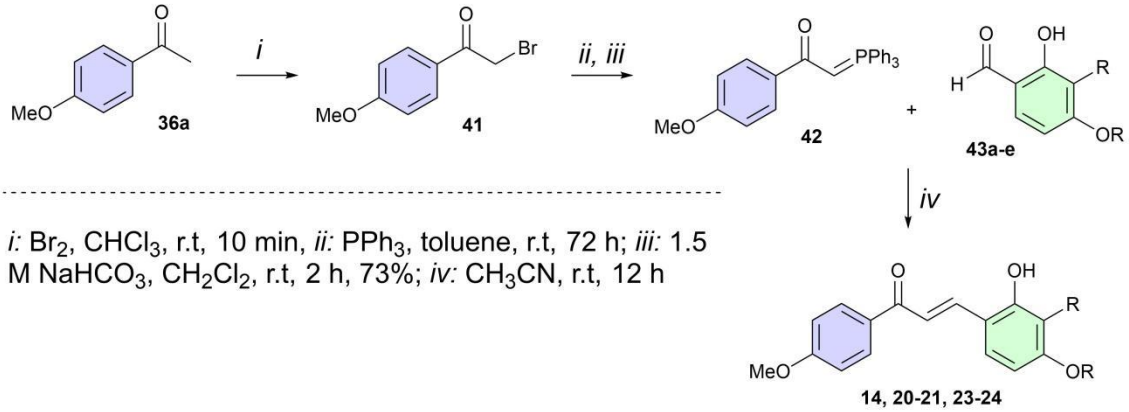
For a specific subset of compounds (**14**, **20**, **21**, **23** and **24**), particularly those derived from substrates sensitive to the strongly basic conditions of the aldol condensation, the Wittig reaction was employed as a milder and more controlled alternative (**Scheme 3**). This multi-step route began with the α-bromination of acetophenone **36a** to yield intermediate **41**. Subsequent reaction with triphenylphosphine produced the corresponding phosphonium salt, which was deprotonated *in situ* with a 1.5 M aqueous solution of Na_2CO_3 to generate the phosphorus ylide **42** [33]. The final step

involved the reaction of this ylide with a series of prepared aldehydes (**43a-e**) to furnish the target chalcones [34].

Scheme 2. Synthesis of chalcone derivatives *via* aldol condensation reactions.



Scheme 3. Synthesis of chalcone derivatives *via* Wittig reactions.

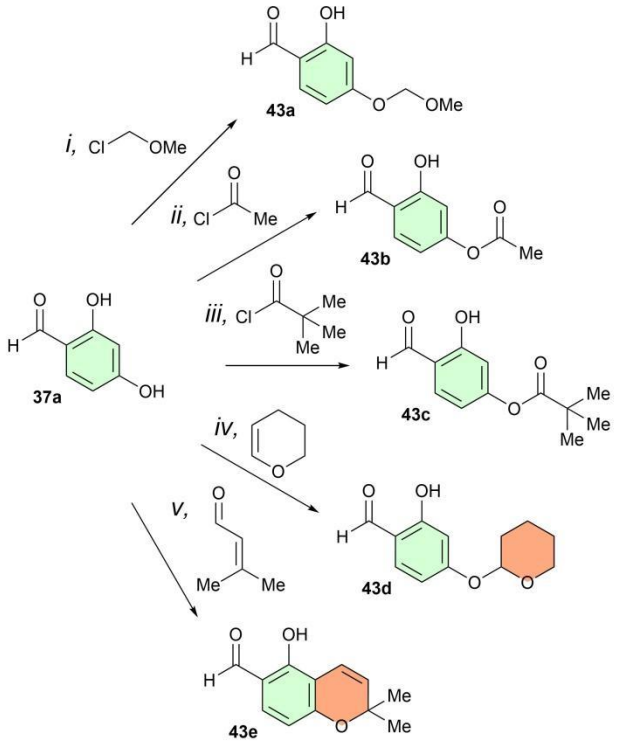


The requisite aldehydes **43a-e** were themselves prepared through various established methods, as shown in **Scheme 4**. Aldehydes **43a-c** were obtained *via* nucleophilic substitution on the precursor **37a** using chloromethyl methyl ether [35], acetyl chloride [36], and pivaloyl chloride [37], respectively. Meanwhile, compound **43d** was prepared *via* the acid-catalyzed nucleophilic addition of a hydroxyl group from 2,4-dihydroxybenzaldehyde to 3,4-dihydropyran (DHP) [38]. Aldehyde **43e** was synthesized via a 1,4-conjugate addition followed by an intramolecular electrophilic aromatic substitution [39]. All synthesized compounds were fully characterized, and their structures were confirmed by spectroscopic data provided in the Supporting Information.

All compounds were evaluated for their anti-inflammatory and antimycobacterial properties, in comparison to the unsubstituted chalcone (compound **1**) and compounds

3C (4-chlorochalcone) and **5C** (3,4-methylenedioxy-chalcone), which were previously reported with satisfactory results for the analyzed properties [28].

Scheme 4. Preparation of aldehydes **43a-e.**



i: K_2CO_3, Acetone, r.t, 12 h, 50%; *ii:* DMAP, Et_3N, CH_2Cl_2, r.t, 2 h, 39%; *iii:* Et_3N, CH_2Cl_2, r.t, 16 h, 62%; *iv:* PPTSA, CH_2Cl_2, r.t, 3 h, 77%; *v:* Pyridine, 140 ºC, 12 h, 25%.

5.1.2.2. Screening of Chalcone Derivatives for Inhibition of *M. tuberculosis* H37Rv Growth in Bacterial Culture and for Modulation of Cell Viability and NO Production in LPS-Stimulated RAW 264.7 Macrophages

Synthesized compounds (**2**–**35**) were initially evaluated for their antimycobacterial potential against the standard laboratory *M. tuberculosis* strain H37Rv in bacterial culture using the MTT method. Rifampicin, the most important first-line anti-TB drug, was used as a reference standard.

The minimum inhibitory concentrations (MIC_{50}), obtained from a concentration-response curve of each derivative, are listed in **Table 2**. The results indicated twenty-three analogues showing MIC_{50} values lower than 10 µM (0.2-1.8 µg/mL), considered a potency criterion against Mtb laboratory strain under replicating growth conditions [40,41].

The identification of pharmacologically relevant antimycobacterial compounds requires, in addition to low MIC values, the investigation of their effect on cell viability. To further develop a novel anti-TB drug, an effective and safe therapeutic candidate must present minimal or no cytotoxicity to host cells [41]. Adverse impacts on the metabolism and functions of alveolar cells and hepatocytes have been reported for anti-TB drugs [42,43], constituting a significant cause of drug failure in the early development process [44].

In this work, we investigated the ability of chalcone-treated RAW 264.7 macrophages, which are the frontline innate immune cells primarily infected by Mtb, to

metabolize MTT. The concentration required for derivatives to reduce cell viability by 50% (CC_{50}) is described in **Table 2** and was considered an acceptable safety threshold, with $CC_{50} \geq 70$ μM serving as a benchmark. Seventeen derivatives showed adequate CC_{50} values, indicating low interference with cell viability.

To check the selective inhibitory effects of chalcone compounds on Mtb growth, the relationship between MIC_{50} and CC_{50} was delineated through the selectivity index (SI), calculated by dividing CC_{50} by the MIC_{50} of the derivatives (**Table 2**), in order to check the selective inhibitory effects of these compounds on Mtb growth. Thus, nine compounds (**2**, **13**, **18**, **22**, **24**, **27**–**29**, and **35**) selectively inhibited the growth of the laboratory *Mtb* strain in suspension, with $MIC_{50} \leq 10$ μM and favorable SI values, ranging from 13.4 to 71.4. Compounds with an SI > 10 are considered promising for further investigation [40,41]. It is noteworthy that the most potent and selective compounds, particularly the lead prototypes **24** and **27**, followed by derivatives **18**, **28**, **29**, and **35**, exhibited biological activity statistically equivalent to that of rifampicin ($p > 0.05$).

In this study, nine compounds (**2**, **13**, **18**, **22**, **24**, **27–29**, and **35**) showed the most potent inhibitory activity against Mtb H37Rv, being approximately 2 to 9-fold more potent ($p < 0.001$) than previous leads **3C** and **5C** [28], and the unsubstituted chalcone (**1**), while maintaining a high selectivity index. The presence of an α,β-unsaturated ketone, electron-donor groups at positions 2 and/or 4 in ring A [45], and compounds containing heterocyclic rings were reported as generally necessary for anti-Mtb activity [41].

The antimycobacterial activity of the chalcone compounds investigated in this study is reported for the first time, expanding the pharmacological utility of these specific scaffolds. Nevertheless, derivative **2** was previously reported to have no detectable activity against the PtpA protein of *M. tuberculosis* [46]. However, derivative **18**, also known as metochalcone (Vesidryl®), is clinically marketed as a choleretic drug, and its antifungal activity against *Candida* species has been documented [47]. Chalcone **27** has been identified as a selective inhibitor of PfPK5, a cyclin-dependent kinase that regulates DNA synthesis in *Plasmodium falciparum* [48]. Additionally, derivatives **28** and **29** showed activity against *Trypanosoma brucei rhodesiense* [49] and *H. pylori* [50], respectively.

Nitric oxide plays a central role in the host's immune response against Mtb infection [51], and its production via inducible nitric oxide synthase (iNOS) is up-regulated in alveolar macrophages [52], granuloma-associated macrophages [53], and peripheral blood monocytes [54]. However, the failure to control ROS generation in macrophages contributes to lung damage and dysfunction in TB [55].

To identify compounds with immunomodulatory potential, advantageous for adjuvant TB treatment, we also assessed their ability to inhibit NO production in an LPS-induced inflammation model using RAW macrophages.

Twelve chalcone derivatives (**2**, **3**, **6**, **8**, **13**, **18**, **22**, **24**, **27**, **28**, **29**, and **33**) inhibited NO production in LPS-stimulated RAW macrophages, with minimal or no interference with cell viability ($CC_{50} > 70$ μM) and IC_{50} values below 25 μM (**Table 2**). Notably, the most active and selective chalcone derivatives were 2 to 40-fold more potent than N^G-monomethyl-*L*-arginine acetate (*L*-NMMA), a non-selective NOS inhibitor. All twelve compounds exhibited greater inhibitory activity on NO production compared to the chalcone **3C**, previously described [28], and unsubstituted chalcone (**1**). Among these compounds, only derivatives **22** and **29** exhibited potency similar to that of chalcone **5C** [28] ($p > 0.05$), while the others were less active.

The α,β-unsaturated carbonyl moiety is essential for the anti-inflammatory activity of chalcones. The addition of polar substituents, such as –OH and $–OCH_3$, to both rings of the chalcone scaffold enhances the inhibitory effect against NO production [56].

This is the first time that the NO inhibitory activity of these twelve derivatives has been reported, except for compounds **6** and **29**. Derivative **6** was identified as a weak inhibitor of NO production in LPS-activated RAW 264.7 macrophages; however, it was tested at lower concentrations (4-30 μM) and lower LPS stimulus (0.1 ug/mL) [57]. In contrast, derivative **29** was reported to inhibit NO production in LPS/IFN-activated murine macrophages [58]. Additionally, compound **29** was described to inhibit LTB4 biosynthesis and 5-LO activity in LPS-induced human neutrophils as well as to reduce TNF-α levels in exudates from mouse air pouches injected with zymosan [59].

Thus, eight chalcone derivatives (**2**, **13**, **18**, **22**, **24**, **27**, **28**, and **29**), which displayed promising dual activity against Mtb H37Rv and NO production, were selected for further antimycobacterial and anti-inflammatory investigations.

Table 2. Inhibitory effects of chalcone derivatives on the growth of *M. tuberculosis* H37Rv in culture, on NO production by LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages, and on cell viability by the MTT method.

Chalcones	Mtb H37Rv MIC_{50} (μM)	MTT CC_{50} (μM)	SI CC_{50}/MIC_{50}	NO IC_{50} (μM)
1	50.4 ± 1.5	> 100	2.0	38.8 ± 1.2 [j]
2	5.3 ± 1.1 [a]	70.9 ± 1.1 [a]	13.4	22.0 ± 1.1 [l]
3	33.9 ± 1.3 [b]	> 100	2.9	17.6 ± 1.1 [m]
4	64.0 ± 1.1 [c]	22.5 ± 1.4 [b]	0.4	7.6 ± 1.3 [a-d]
5	25.5 ± 1.2 [d]	> 100	3.9	41.5 ± 1.2 [j]
6	23.5 ± 1.1 [d,e]	> 100	4.3	21.5 ± 1.1 [l,m]
7	11.9 ± 1.1 [f,g]	70.9 ± 1.2 [a]	6.0	76.2 ± 1.2
8	30.8 ± 1.2 [b]	> 100	3.2	8.2 ± 1.2 [a-d]
9	2.8 ± 0.3 [a,h]	26.6 ± 1.2 [c]	9.5	5.9 ± 1.4 [b-e]
10	1.3 ± 0.6 [h]	28.1 ± 1.2 [c,d]	21.6	5.7 ± 1.3 [d-f]
11	4.1 ± 1.3 [a]	25.9 ± 1.2 [b,e]	6.3	9.9 ± 1.2 [a-c]
12	0.6 ± 0.3 [h,i]	9.8 ± 1.8 [f]	16.3	5.9 ± 1.2 [c-e]
13	4.5 ± 1.0 [a,j]	> 100	22.2	22.1 ± 1.2 [l]
14	15.7 ± 1.1 [k]	22.0 ± 1.5 [b]	1.4	20.4 ± 1.1 [l,m]
15	5.5 ± 0.9 [a]	7.2 ± 1.4 [f,g]	1.3	1.8 ± 1.1 [l,n,o]
16	3.6 ± 1.0 [a,l]	32.9 ± 1.2 [h]	9.1	20.5 ± 1.3 [l,m]
17	1.5 ± 0.5 [h,j,l,m]	32.6 ± 1.2 [h]	21.7	19.5 ± 1.3 [l,m]
18	1.8 ± 0.2 [h,j,l,m]	79.7 ± 1.4	44.3	10.0 ± 1.1 [a-c]
19	4.1 ± 1.0 [a,m,n]	5.0 ± 1.3 [g]	1.2	2.6 ± 1.2 [e,h,n]
20	2.4 ± 0.6 [a,i,m,h]	31.9 ± 1.1 [d,h]	13.3	4.6 ± 1.4 [e,d,g,n]
21	6.9 ± 1.0 [a]	8.6 ± 1.1 [f,g]	1.2	6.0 ± 1.1 [a-c,f-h]
22	6.0 ± 1.3 [a]	>100	16.7	5.6 ± 1.3 [e,d,g,i]
23	21.2 ± 1.3 [e]	30.0 ± 1.3 [c,d,h]	1.4	9.6 ± 1.5 [a-c,f,i]
24	1.9 ± 0.4 [i,j,l,m,h]	70.3 ± 1.1 [a,h]	37.0	11.5 ± 1.2 [a]
25	2.4 ± 0.3 [a,i,m,h]	32.0 ± 1.2 [h]	13.3	10.5 ±1.1 [a]
26	10.4 ± 0.9 [f]	29.6 ± 2.0 [c-e,h]	2.8	5.4 ± 1.2 [d,h,o]
27	1.4 ± 1.2 [i,j,l,n,h]	> 100	71.4	19.2 ± 1.1 [l,m]
28	2.0 ± 0.8 [i,j,l,n,h]	> 100	50.0	18.1 ± 1.8 [l,m]
29	1.6 ± 1.0 [i,j,l,n,h]	> 100	62.5	1.2 ± 1.1 [n]
30	2.4 ± 1.1 [a,i,m,h]	27.3 ± 1.2 [c,e]	11.4	4.2 ± 1.3 [d,e,h,n]
31	14.8 ± 1.2 [g,k]	> 100	6.8	34.3 ± 1.2 [k]
32	6.7 ± 1.3 [a]	54.7 ± 1.2	8.2	37.5 ± 1.1 [j,k]
33	66.9 ± 1.2 [c]	> 100	1.5	9.9 ± 1.1 [a-c]
34	24.6 ± 1.6 [d]	> 100	4.1	>100
35	2.0 ± 1.0 [i,j,l,n,h]	> 100	50.0	>100
Rifampicin[a]	0.1 ± 0.2 [h]	X	X	X
***L*-NMMA[b]**	X	X	X	46.7 ± 2.1

[a] Standard anti-TB drug; [b] Non-selective nitric oxide inhibitor; Mean value ± SD; n = 3; X – not defined. Values in the same column with different superscript letters (a–o) are significantly different ($p < 0.001$).

5.1.2.3. Effect of Chalcone Derivatives on the Growth of a Highly Virulent *M. tuberculosis* Clinical Isolate in Bacterial Culture

Highly virulent Mtb strains, particularly those from the *Beijing* genetic lineage, are widely associated with increased transmissibility and drug resistance, a significant treatment challenge [60]. Unlike the laboratory strain H37Rv, hypervirulent Mtb strains survive and replicate more rapidly within macrophages, inducing higher levels of necrotic death in these cells [61].

To further understand the robustness of the antimycobacterial activity of the chalcone derivatives, the compounds preliminarily selected were evaluated against a highly virulent Mtb clinical isolate (M299), belonging to the *Beijing* genotype [61]. Five derivatives (**2**, **18**, **24, 27,** and **28**) were active against the hypervirulent strain (**Table 3**). Of these, three compounds (**24**, **27**, and **28**) stood out, with $MIC_{50} \leq 10$ µM and SI values ranging from 11.4 to 26.3. Notably, only compounds **24** and **27** maintained their inhibitory potential against both Mtb strains. While the reference drug rifampicin showed a significant 15-fold reduction in activity against the hypervirulent strain, prototypes **24** and **27** demonstrated remarkable robustness, retaining their potency within the same order of magnitude. These findings indicated that the position of the nitrogen atom in ring B (pyridine-based bioisosteres **27** and **28**) critically influences activity against Mtb strains with distinct virulence patterns and suggest that there may be an interaction with targets conserved or overexpressed in hypervirulent lineages.

Identifying new compounds active against clinically relevant Mtb strains is crucial for anti-TB drug development [62]. However, few studies target chalcone-bearing scaffolds [28] or hybrids [63,64] from this perspective. Notably, derivatives **24** and **27** showed greater activity ($p < 0.001$) than compounds **3C** and **5C** [28]. Derivative **28** was more active than **3C** ($p < 0.001$) and displayed comparable activity to **5C** ($p > 0.05$).

Table 3. Minimum inhibitory concentration of chalcone derivatives against highly virulent *M. tuberculosis* strain (M299) in bacterial culture.

Chalcones	Mtb M299 MIC_{50} (µM)	SI CC_{50}/MIC_{50}
2	26.1 ± 1.3	2.7
13	> 100	1.0
18	19.8 ± 1.4	4.0
22	> 100	1.0
24	$3.9 \pm 1.2^{a,b}$	18.0
27	$3.8 \pm 1.1^{a,b}$	26.3
28	8.8 ± 1.3^{a}	11.4
29	> 100	1.0
Rifampicin[a]	1.5 ± 0.1^{b}	X

[a] Standard anti-TB drug; Mean value ± SD; n = 3; X – not defined. Values in the same column with different superscript letters (a–b) are significantly different ($p < 0.001$).

Based on the results, chalcones **2**, **18**, **24**, **27**, and **28** were selected for further studies regarding their anti-inflammatory and antimycobacterial potential due to the combination of low cytotoxicity (SI ≥ 10), high activity against the growth of *M. tuberculosis*, and significant inhibition of NO production, especially chalcones **24**, **27**, and **28**.

5.1.2.4. Evaluation of the Chalcone Derivatives as Bactericidal or Bacteriostatic Agents Against *M. tuberculosis* H37Rv Strain

The characterization of antimycobacterial compounds, in relation to their bactericidal or bacteriostatic mechanism, is an important approach to early drug development [65]. To determine whether the most active chalcones exhibited bactericidal or bacteriostatic activity, we assessed their MIC_{90} against Mtb H37Rv using the Resazurin Microtiter Assay (REMA) and determined the MBC_{99} by the Charcoal Agar Resazurin Assay (CARA). The liquid broth MIC_{90} assay does not distinguish between bactericidal and bacteriostatic action. Therefore, CARA is applied in parallel to predict the minimum bactericidal concentration, which can eliminate ≥ 99% of bacilli (MBC99). According to this assay, an MBC_{99} greater than 4-fold higher than the MIC_{90} indicates that an active compound against replicating Mtb may be bacteriostatic rather than bactericidal [66].

Chalcones **24** and **27** exhibited lower MIC_{90} values compared to other derivatives and compound **5C** (**Table 4**). Additionally, chalcone derivatives **2**, **18**, **24**, **27**, and **28** exhibited bactericidal activity, with the lead prototypes **24** and **27** showing the most significant effects. The isomer of the chalcone **27**, compound **28**, showed a 2-fold lower bactericidal effect, emphasizing the importance of the nitrogen position in ring B for anti-Mtb activity. Rifampicin exhibited a greater bactericidal effect than chalcone derivatives.

Table 4. Inhibitory effects of chalcone derivatives on the growth of replicating *M. tuberculosis* H37Rv in culture, by REMA (Resazurin Microtiter Assay) and Charcoal Agar Resazurin Assay (CARA).

Chalcones	Mtb H37Rv (REMA) MIC_{90} (μM)	Mtb H37Rv (CARA) MBC_{99} (μM)
2	20	20
18	20	40
24	10	10
27	15	15
28	20	40
5C[b]	20	80
Rifampicin[a]	0.5	1

[a] Standard anti-TB drug; [b] Antimycobacterial chalcone previously described [28].

5.1.2.5. Effect of Chalcone Derivatives on the Intracellular Growth of *M. tuberculosis* in Infected Macrophage Cultures

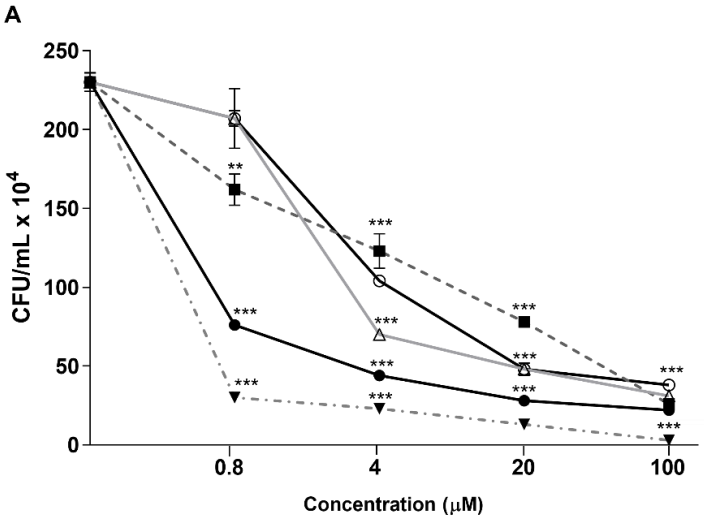
Infected macrophages can provide a replication niche for Mtb, which evades innate immunity and exploits various subcellular compartments, affecting drug accumulation and efficacy [62,67,68]. For more accurate anti-TB drug development, it is essential to incorporate i*n vitro*-based screens that verify the intracellular killing efficacy of compounds while preserving cellular integrity [62,68].

To assess the intracellular killing potential of chalcone derivatives against Mtb, RAW 264.7 macrophages were infected with the strain H37Rv at a low multiplicity of infection (MOI) of 1:1 to preserve macrophage integrity throughout the assay. All selected chalcones (**2, 18, 24, 27**, and **28**) significantly inhibited the intracellular growth of Mtb H37Rv. A substantial reduction of the intracellular bacillary load (80%–95% inhibition) was observed for derivatives **2**, **24**, **27**, and **28** at the highest concentrations (**Figure 12A**). Compounds **24** and **28** reduced intracellular CFU counts by 67% to 90% even at lower concentrations (**Figure 12A**), demonstrating high efficacy.

Chalcones **24**, **27**, and **28** exhibited the lowest MIC_{50} values, indicating inhibitory potential comparable to rifampicin (**Figure 12B**). None of the derivatives were cytotoxic to macrophages (CC_{50} > 100 µM) as demonstrated by the lactate dehydrogenase (LDH) release assay (**Figure 12B**).

In this study, chalcone **2** showed a similar inhibitory potential against intracellular Mtb ($p > 0.05$) to compound **3C** [28], whereas the others were 1.5- to 15-fold more active. Only chalcones **24**, **27**, and **28** exhibited potential comparable to that of **5C** [28].

Interestingly, derivatives **24**, **27**, and **28** exhibited antimycobacterial potential against extracellular Mtb in broth (**Table 2**) that was not significantly different from their activity against intracellular bacteria. In contrast, chalcones **2** and **18** were more active ($p < 0.001$) in the former context. This suggests that the activity of derivatives **24**, **27**, and **28** may involve a bacterial target that is vulnerable between these physiological states or greater intramacrophage accumulation or modulation of macrophage functions, as well as a more challenging action of chalcones **2** and **18** against Mtb exposed to various stressing conditions within macrophages.



B

Chalcones	MIC_{50} (µM)	CC_{50} (µM)
2	9.6 ± 1.4^a	> 100
18	8.3 ± 1.2^a	> 100
24	0.8 ± 0.4^b	> 100
27	3.4 ± 1.4^b	> 100
28	0.8 ± 0.2^b	> 100
Rifampicin	1.9 ± 1.1^b	> 2

Figure 12. Effect of chalcone derivatives on the intracellular growth of *M. tuberculosis* H37Rv in RAW 264.7 macrophages and on the toxicity for macrophages evaluated by the LDH release assay. RAW 264.7 macrophages were infected with *M. tuberculosis* H37Rv at a multiplicity of infection (MOI) ratio of 1:1 and treated with chalcones (0.8, 4, 20, and 100 µM) or rifampicin (0.004 to 2 µM) for 4 days. Bacterial

intracellular growth in the presence of derivatives was determined by bacterial CFU counts on agar plates (**A**), and macrophage toxicity was evaluated by the LDH release assay (**B**). Values are presented as mean ± standard deviation (SD), and significant differences compared to the positive control (infected and untreated macrophages, 236.0 ± 8.5 CFU/mL×10^4) were indicated as follows: $p < 0.001$ (***) and $p< 0.01$ (**). MIC values in the same column with different superscript letters (a–b) are significantly different ($p < 0.01$).

In parallel, chalcones **24** and **27,** which exhibited the lowest MBC_{99} values, were also evaluated in THP-1-derived macrophages infected with *M. tuberculosis* H37Rv (**Figure 13**). In this assay, the activity profile was monitored until day 10 after a single treatment on day 0, using 4-fold MIC_{90} values for the derivatives. This concentration was previously standardized to achieve improved inhibitory activity while preserving cell viability. Chalcone **27** showed a better activity profile than chalcone **24** and maintained its inhibitory activity throughout the 10 days in a human macrophage model. It is important to consider that intracellular Mtb susceptibility to drugs can vary between the macrophage cell lines commonly used in infection assays and experimental conditions [62]. The sustained efficacy of 27 reinforces its potential for future investigation in long-term TB infection models.

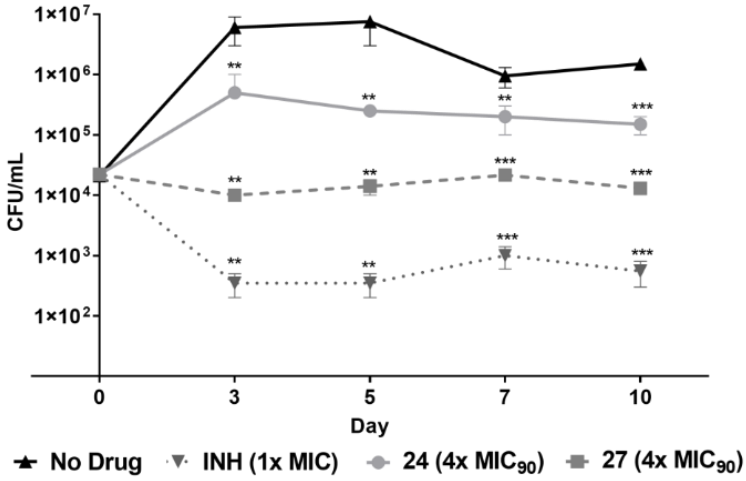


Figure 13. Effect of chalcones **24**, **27**, and isoniazid (INH) on *M. tuberculosis* H37Rv strain growth in THP-1-derived macrophages. THP-1 macrophages were infected and treated with chalcones **24** and **27** at 4× MIC_{90} (40 µM for **24** and 60 µM for **27**) and isoniazid at 1× MIC_{90} (0.063 µg/mL). The intracellular viability of the bacteria was determined by CFU counting. Values were reported as mean ± error. The mean value of each group was significantly different from that of the controls, as indicated in the graph, following the two-way ANOVA analysis. $p < 0.001$ (***) and $p < 0.01$ (**) compared to no drug.

5.1.2.6. Effect of Chalcone Derivatives on DPPH Radical Scavenging Activity and iNOS Expression in LPS-Activated Macrophages

Given the detrimental roles of reactive oxygen species (ROS) and NO, therapeutic interventions that limit host-mediated oxidative stress have been incorporated into HDT approaches for severe TB cases [55,69]. To investigate the mechanism by which chalcone derivatives reduce the NO production by LPS-stimulated macrophages (**Table 2**), we employed two complementary approaches. First, we evaluated the effect of the derivatives on the reduction in DPPH absorbance, a stable free radical used in the antioxidant assay. Second, the ability of the most active derivative to suppress iNOS expression in the LPS-stimulated macrophages was assessed by Western blots.

The derivatives (**2**, **18**, **24**, **27**, and **28**) demonstrated negligible or poor ability to scavenge the DPPH radical compared to the control, consisting only of the DPPH solution (**Figure 14A**), except for chalcone **24** at the highest concentration, which reduced about 46% of the accumulated DPPH radical. Chalcones exhibited IC_{50} ≥ 100 μM, indicating a low antioxidant capacity compared to BHT, which had an IC_{50} value of 9.9 ± 1.6 μM (**Figure 14B**).

Although chalcones and its analogues have shown notable antioxidant potential, this is largely affected by the aryl groups and their substitution patterns. A weaker radical scavenging ability has been associated with the number and position of methoxyl groups in chalcones [70]. In contrast, free hydroxyl substituents enhance the antioxidant potential by supporting the hydrogen transfer mechanism [71,72] as well as 1-naphthyl substitutions at ring B [73]. These features can be related to the low antioxidant activity observed in the derivatives evaluated in our study.

Within this context, we investigated the capacity of chalcone derivatives to suppress iNOS expression in LPS-stimulated RAW 264.7 culture. To check for equal loading or normalize loading differences, α-tubulin, a constitutive protein, was used as internal control.

The selected derivatives (**2, 18, 24, 27**, and **28**) suppressed iNOS expression almost completely, at 20 μM (**Figure 14C**). Notably, derivative **24** demonstrated significant suppression in both tested concentrations. These results indicated that the inhibitory effect of chalcone derivatives on NO production is mainly due to suppression of iNOS expression. The compounds **3C** and **5C** [28] were also predominantly iNOS inhibitors.

Diverse natural and synthetic chalcones exhibiting different substituent groups at specific positions are described for their ability to downregulate both iNOS expression and activity [28,56,74] and/or to module implied inflammatory pathways such as NF-κB, AP-1, and MAPK [56,75]. The α,β-unsaturated carbonyl portion of chalcones plays an essential role in iNOS signaling pathway [56].

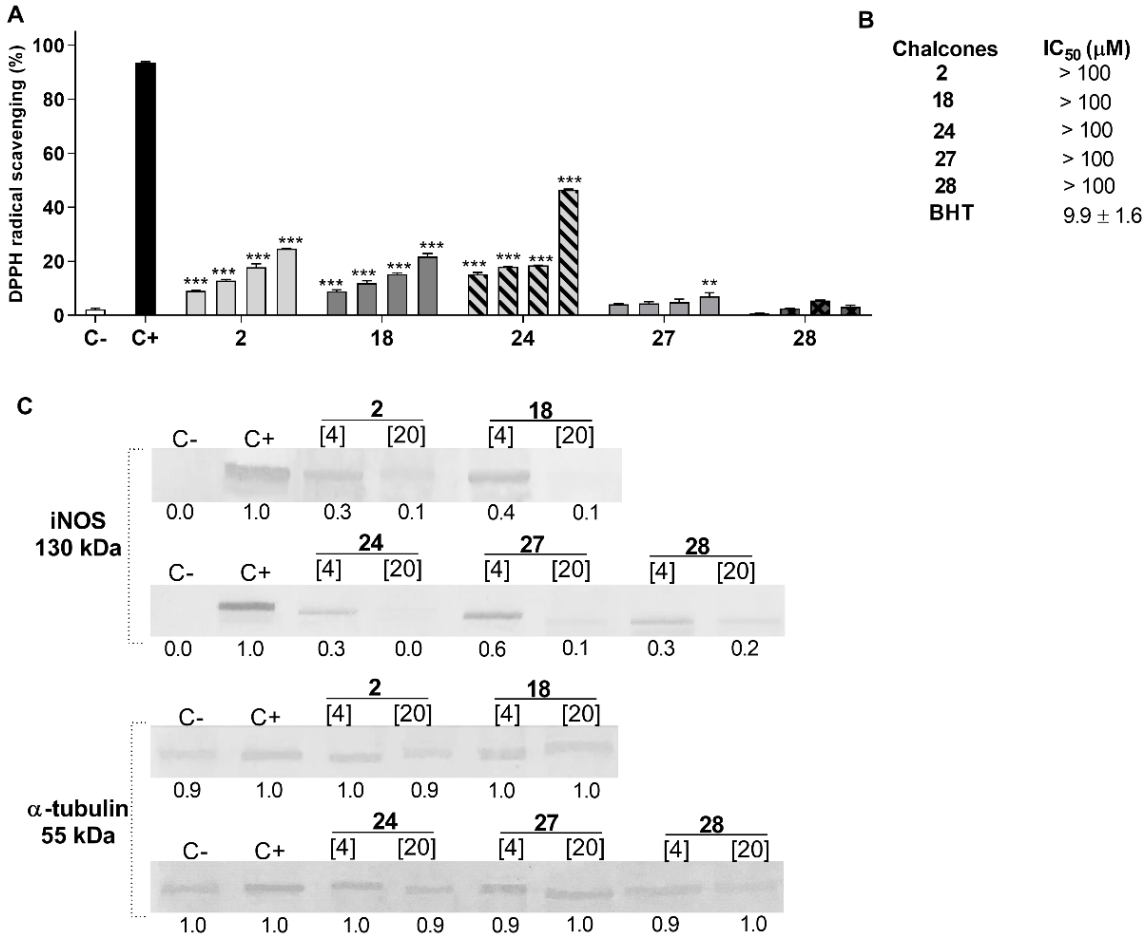


Figure 14. Effect of chalcone derivatives on DPPH radical scavenging activity and on iNOS expression in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. (**A**) Chalcone derivatives and BHT were diluted in methanol at concentrations of 0.8, 4, 20, and 100 μM. Next, DPPH solution (0.25 mg/mL) was added at a 1:1 (vol/vol) ratio. Methanol served as the positive control (C+), while a solution containing only DPPH acted as the negative control (C-) for DPPH radical scavenging. For each chalcone, four bars represent results at ascending concentrations. Results were expressed as a percentage of DPPH radicals scavenging relative to the negative control (C-). Values are shown as mean ± SD. Groups differing from the C- were considered significant at $p < 0.01$ (**), and $p < 0.001$ (***). (**B**) The half-maximal inhibitory concentrations (IC_{50}) for DPPH scavenging by the derivatives were determined from the concentration–response curve using nonlinear regression analysis. (**C**) The iNOS protein levels in LPS-stimulated RAW 264.7 cells treated or untreated with chalcones (4 and 20 μM) were analyzed by western blot. The images reflect two independent experiments with similar results. Immunoreactive band intensities were quantified by densitometric analysis using ImageJ software. Each band was compared to the respective positive control (C+, LPS-stimulated cells) on the same membrane. Unstimulated cells were used as the negative control (C-). The positive control condition was defined as 1.0. Other conditions were normalized accordingly. Validation of the results was performed using the constitutive protein α-tubulin as a loading control.

5.1.2.7. Inhibitory Effect of Chalcone Derivatives on TNF-α and IL-1β Production in LPS-Stimulated Macrophages

Monocytes and macrophages exposed to Mtb concomitantly up-regulate the synthesis of critical inflammatory cytokines, particularly TNF-α and IL-1β, which contribute to the immunity and host resistance against Mtb [76,77]. However, systemic dysregulation of TNF-α production by myeloid cells, mainly peripheral blood monocytes, was reported in severe TB cases [78] and is closely associated with disease severity, lung necrosis,

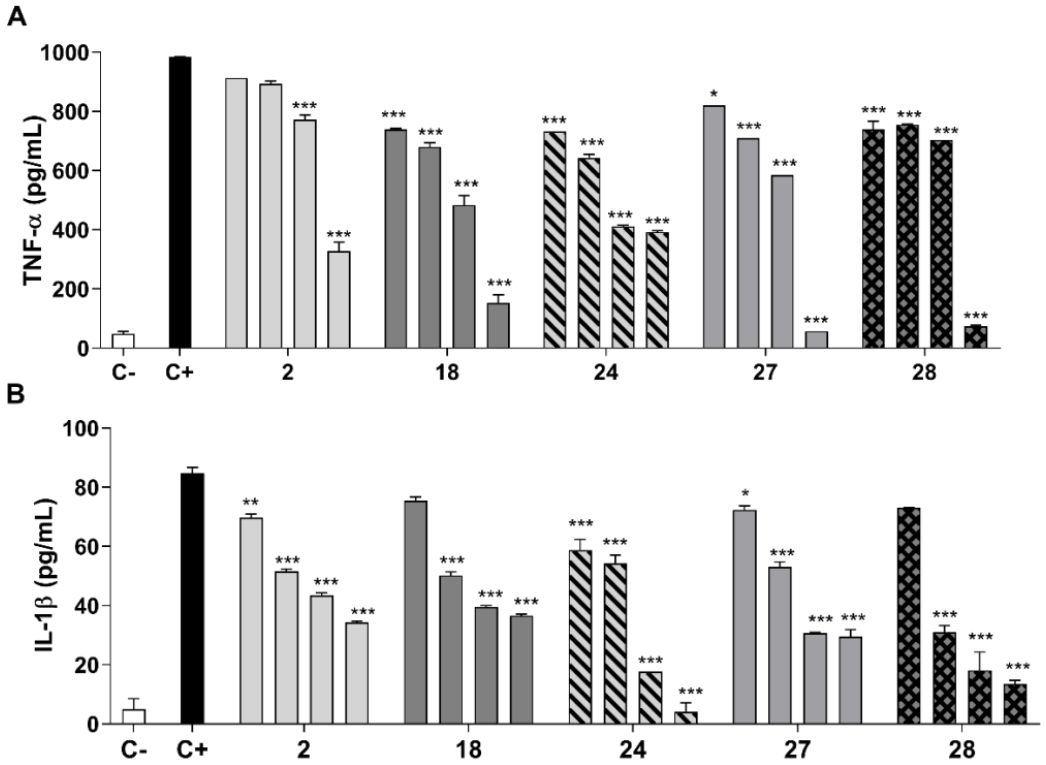
cavitation, and cachexia [79,80]. Likewise, higher serum IL-1β levels were correlated with exacerbated neutrophilic inflammation aggravating lung injury in TB patients [13,81].

Within this context, we investigated the potential of chalcone derivatives to inhibit the production of TNF-α and IL-1β in LPS-stimulated macrophages. Four derivatives (**18**, **24**, **27**, and **28**) significantly inhibited TNF-α production even at lower concentrations (**Figure 15A**). Compounds **18** and **24** were the most active, achieving 54% to 89% inhibition at the highest concentrations (**Figure 15A**) and the lowest IC_{50} values (**Figure 16C**). All derivatives showed substantial inhibition of IL-1β production (51%–98% inhibition) at the highest concentrations (**Figure 15B**). Compounds **24** and **28** were the most potent inhibitors of IL-1β production, presenting $IC_{50} < 5$ μM (**Figure 15C**).

Building on these findings, the results indicated that most chalcone derivatives exhibited greater ability to inhibit IL-1β production than to inhibit TNF-α and NO production (**Table 2**). However, compound **18** showed higher inhibitory activity ($p < 0.001$) against TNF-α and NO, while compound **2** exhibited similar potential against both IL-1β and NO production (**Figure 16C** and **Table 2**).

Furthermore, compounds **18** and **24** inhibited TNF-α production comparably to ibuprofen ($p > 0.05$), a reference NSAID also known to downregulate NF-κB, JAK/STAT, and poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) signaling in macrophages [82]. Notably, derivative **28** was 5-fold more potent than ibuprofen ($p < 0.05$) in the inhibition of IL-1β production (**Figure 15C**), while three derivatives (**18**, **24**, and **27**) exhibited a similar potential.

Previous research has highlighted chalcone derivatives as promising agents for inhibiting TNF-α and IL-1β production [31,56]. Compared to the previously reported chalcones **3C** (IC_{50} 46.6 ± 4.6 μM) and **5C** (IC_{50} 57.9 ± 4.9 μM) by Ventura et al. 2015 [28], all tested derivatives were approximately 2 to 20-fold more active against IL-1β, except for chalcone **2**, which exhibited a similar potential to **5C** (IC_{50} 48.1 ± 7.6 μM) against TNF-α, other derivatives were 2 to 20-fold more active than compounds **5C** and **3C** (IC_{50} 60.5 ± 4.7 μM).



C

	TNF-α IC_{50} (μM)	IL-1β IC_{50} (μM)
2	42.0 ± 5.0	20.5 ± 3.7[a]
18	7.2 ± 1.3[a]	17.7 ± 3.5[a]
24	8.2 ± 1.4[a]	3.9 ± 1.8[b,c]
27	20.6 ± 2.7[b]	9.8 ± 1.7[b]
28	22.5 ± 1.9[b]	2.7 ± 1.5[c]
Ibuprofen	2.1 ± 0.8[a]	14.4 ± 1.2[a,b]

Figure 15. Inhibitory effect of chalcone derivatives on TNF-α and IL-1β production in LPS-stimulated macrophages. RAW 264.7 macrophages (**A**) and J774A.1 macrophages (**B**) were stimulated with LPS in the presence or absence of chalcones (0.8, 4, 20, and 100 μM) or ibuprofen for 24 h in order to quantify TNF-α (**A**) and IL-1β (**B**) levels in culture supernatants using the sandwich ELISA. Untreated cells and the LPS-stimulated macrophages were used as negative (C-) and positive (C+) controls, respectively. The four bars for each compound represent results at ascending concentrations. Values are reported as mean ± standard deviation (SD), and groups significantly different from the C+ are indicated as $p < 0.001$ (***), $p < 0.01$ (**), and $p < 0.05$ (*). (**C**) Values relative to inhibitory concentration 50% (IC_{50}) of chalcone derivatives on TNF-α and IL-1β production. Different superscript letters within the same line (a–c) are significantly different ($p < 0.01$).

5.1.2.8. Structure–Activity Relationship (SAR) and ADMET Studies

A SAR study of the chalcone derivatives was conducted in an attempt to correlate physicochemical properties with *in vitro* activity. The analysis of the 2D structures of the compounds with lower MIC_{50} values in the H37Rv strain suggested that the inhibitory effect of the chalcones is related to the addition of four methoxy groups, two at *meta* and one at the *para* position in ring A and one at the *para* position in ring B (compounds **9**, **10**, **12**, and **29**). Although compound **4** also exhibits the three methoxy groups at ring A, the addition of the 3,4-metilenodioxi group at ring B impaired the antimycobacterial activity. However, it is important to note that the presence of another methoxy group at

the *meta* position in ring B (compound **29**) is required for a selective inhibitory effect on Mtb growth. In addition, the presence of a pyridine ring (compounds **27** and **28**) and a cyclized benzopyran (compound **24**) proved to be essential for antimycobacterial activity against both Mtb strains tested, in bacterial culture and in intracellular growth of Mtb H37Rv. Pyridine-containing compounds are potent and promising against *M. tuberculosis* [83], and several clinically used drugs, such as isoniazid, ethionamide, and prothionamide, contain a pyridine ring [84].

In addition, analysis of the stereoelectronic calculated properties (**Table 5; Supplementary figure S1**) suggests a slight tendency of higher potency with increased number of rotational bonds (nRot), in this work mostly represented by substituents on rings A/B of the chalcones, as exemplified by compounds **10**, **12**, **18** and **29**. Furthermore, a more negative value of the HOMO orbital energy (E_{homo}) is present in some potent compounds (**12**, **27**, **28, 29** and **35**). HOMO energy is a molecular descriptor related to the ionization potential of a compound, and elevated HOMO values (less negative) indicate a greater ability of electron donation to a suitable acceptor [85]. HOMO and LUMO energies, as well as their energy gap (E_{gap}) usually provide useful descriptors to predict the effects of different substituents on new molecules, based on the energies and shapes of molecular orbitals [86]. Nevertheless, it is more suitable to suggest that the observed MIC_{50} values against the H37Rv strain are the result of a more complex and peculiar combination of molecular flexibility (nRot), which is correlated to descriptors related to the shape of the compounds, *e.g.* molecular weight (MW), molecular surface area (MSA) and molecular volume (MV), and of electronic parameters, such as E_{homo}, each probably contributing a little and balancing the compounds' biological effect, either by providing an adequate fit to the biological target's binding cavity or by donating electron density to a biological partner *via* its LUMO orbital, or both, combined.

This structural diversity among the most active compounds suggests a dual strategy for anti-Mtb activity: while the flexibility (nRot) and high molecular volume of methoxylated derivatives (e.g., **29** and **35**) may optimize the crossing of the complex mycobacterial cell wall, the structural rigidification of **24** provides an entropic advantage by pre-organizing the scaffold for target binding. Furthermore, the pyridine ring in **27** and **28** likely acts as a specific electronic anchor, possibly engaging in key hydrogen bonding that is conserved across different Mtb lineages.

In addition, an overall analysis of the chemical structures suggested that the inhibitory effect of the chalcone derivatives on NO production is associated with the introduction of two methoxy groups at the *meta* positions, in the concomitance or absence of an additional methoxy group at the *para* position of the ring A (compounds **13**, **22**, and **29**). Furthermore, the presence of the other three methoxy groups at the same position in ring B is required to improve potency, as observed for compound **29**, which presented the best IC_{50} values. The insertion of a single chlorine atom or a methoxy group at the *para* position on ring B (compounds **22** and **13**) also resulted in inhibition of NO production.

However, the presence of a chlorine substituent was 4 times more effective. For the other derivatives tested exhibiting methoxy substituents at the same position in ring A (compounds **4**, **9**, **10**, **11**, **12**, **15**, **19**), higher toxicity (CC_{50} values below 30 µM) was observed, associated with different substitution patterns on ring B. Analysis of the calculated descriptors showed that the inhibition of NO production is correlated, mostly, to nROT and MSA, both intercorrelated, as well as the topological polar surface area (TPSA), MW and MV, as exemplified by compounds **15**, **19, 20** and **29**, indicating again that molecular shape can make a difference in the biological activity profile (**Table 5; Supplementary figure S2**).

The correlation between NO inhibition and descriptors such as MSA and MW suggests that the anti-inflammatory profile is strongly influenced by the compounds' ability to accumulate within the macrophage environment. In this context, the high E_{homo} values observed for the lead prototypes indicate that their mechanism of iNOS suppression is not merely a byproduct of molecular shape, but a fine-tuned electronic interaction that interferes with the inflammatory signaling cascade.

Although the SAR based on the 2D structures of the compounds of the most active derivatives (compounds **18** and **24**) against TNF-α production was not very helpful, these chalcones showed higher TPSA, MW, MSA, MV and E_{homo} values, compared to the least potent compounds **2**, **27** and **28** (**Table 5**). Since the chalcone-like derivatives (compounds **27** and **28**) did not improve the inhibitory effect on TNF-α production, it corroborates that this pharmacological property is inherent to the classic chalcone function [87]. Finally, although no clear correlation between the calculated descriptors and inhibition of IL-1β production of all tested compounds was possible, it is worth of note that the inclusion of a heterocyclic pyridine ring, particularly at the 3-position (compound **28**), and the presence of a cyclized benzopyran (compound **24**) were associated with higher inhibition of IL-1β production. The superior potency of **28** over **27** in modulating IL-1β production highlights the sensitivity of the biological target to the spatial orientation of the hydrogen bond acceptor. The higher dipole moment of **28** (position 3) suggests a more favorable electrostatic complementarity within the binding site compared to the position 4 isomer (**27**). This degree of specificity confirms that the heterocyclic substitution was successful not only in maintaining antimycobacterial potency but also in refining the immunomodulatory response.

Table 5. Stereoelectronic descriptors calculated for the chalcone and chalcone-like compounds.

ID	MW[a]	MAS[b]	MV[c]	TPSA[d]	E_{HOMO}[e]	E_{LUMO}[e]	E_{GAP}[f]	Dipole	LogP[g]	HBA[h]	HBD[h]	nRot[i]
1	208.26	264.53	251.82	17.07	-9.38	-0.82	8.14	2.75	3.81	1	0	3
2	258.32	313.21	305.39	17.07	-8.89	-0.75	8.30	2.67	4.79	1	0	3
3	308.38	357.54	357.39	17.07	-8.74	-1.11	8.19	2.86	5.93	1	0	3
4	342.35	395.04	377.95	63.24	-9.05	-0.99	8.39	2.19	3.33	6	0	6
5	268.27	299.11	290.48	55.77	-9.09	-1.12	8.62	3.36	3.64	4	1	3
6	284.27	319.82	304.56	76.00	-8.94	-0.75	8.20	3.6	3.14	5	2	3
7	258.7	294.83	280.66	37.30	-9.35	-1.11	8.45	1.95	4.43	2	1	3
8	298.29	341.06	325.28	65.00	-8.90	-0.62	8.12	4.20	3.67	5	1	4
9	328.36	398.23	378.84	54.01	-9.00	-0.88	7.87	3.13	3.5	5	0	7
10	344.36	407.11	388.96	74.23	-8.80	-0.93	8.19	1.14	2.78	6	1	7
11	367.23	399.3	382.62	44.77	-9.26	-1.15	8.69	1.91	4.73	4	0	6
12	407.26	423.05	403.19	54.01	-9.13	-0.94	8.06	2.94	4.24	5	0	7
13	298.34	360.59	345.27	44.77	-8.94	-0.77	8.28	3.11	3.91	4	0	6
14	314.34	375.75	357.23	65.00	-8.92	-0.51	8.11	5.94	3.63	5	1	7
15	328.36	393.30	376.68	54.01	-9.10	-0.80	8.26	4.94	3.89	5	0	7
16	268.31	328.34	314.02	35.54	-9.00	-0.81	8.50	3.91	3.9	3	0	5
17	268.31	332.48	315.09	35.54	-8.89	-0.58	8.40	3.93	3.88	3	0	5
18	298.34	358.23	344.11	44.77	-8.80	-0.54	8.26	5.63	3.91	4	0	6
19	358.39	433.30	411.2	63.24	-9.15	-0.96	8.00	3.04	3.48	6	0	8
20	326.35	392.17	371.48	72.84	-9.25	-0.63	7.63	4.74	3.65	5	1	7
21	354.4	433.10	411.91	72.84	-9.17	-0.48	8.14	4.06	4.65	5	1	7
22	302.76	346.22	331.89	35.54	-9.17	-0.97	8.19	1.88	4.53	3	0	5
23	354.4	419.79	404.24	65.00	-8.90	-0.40	8.17	5.75	4.53	5	1	6
24	338.4	397.51	389.85	55.77	-8.77	-0.77	8.41	3.31	4.75	4	1	4
25	333.18	335.03	319.16	46.53	-8.99	-0.59	8.19	4.71	4.41	3	1	4
26	293.15	315.60	299.67	37.3	-9.15	-0.70	8.31	3.69	4.90	2	1	3
27	239.27	292.90	279.10	39.20	-9.42	-1.05	8.82	3.00	2.58	3	0	4
28	239.27	294.78	279.90	39.20	-9.42	-0.91	8.61	4.77	2.45	3	0	4
29	388.42	464.28	442.34	72.47	-9.18	-1.04	8.32	2.26	3.07	7	0	9
30	224.26	276.73	262.73	37.3	-9.12	-0.73	8.18	4.58	3.57	2	1	3
31	198.22	252.14	233.05	30.21	-9.13	-0.81	7.97	3.57	2.89	2	0	3
32	214.29	260.35	243.54	17.07	-9.44	-1.12	8.32	3.93	3.53	1	0	3
33	197.24	255.29	236.52	32.86	-8.80	-0.54	8.24	5.01	2.79	2	1	3
34	264.32	338.07	318.87	26.3	-8.71	-0.92	8.33	3.24	4.39	2	0	5
35	294.35	369.15	350.01	35.54	-8.69	-0.88	8.63	3.88	4.44	3	0	6

[a] Molecular weight, [b] Molecular surface area, [c] Molecular volume, [d] Topologic polar surface area, [e] Energy of the highest occupied molecular orbital and the lowest unoccupied molecular orbital, [f] Dipole moment (Debye), ELUMO - EHOMO, [g] Logarithm of the octanol/water partition coefficient, [h] Number of hydrogen bond acceptors and donors (HBA and HBD) and [i] Number of rotatable bonds (nRot).

Collectively, the SAR analysis demonstrates that the 'dual-action' profile of these chalcone derivatives is governed by a balance between lipophilic accumulation and specific electronic affinity. Derivatives **24** and **27** emerge as the most balanced prototypes, transcending the traditional chalcone requirements by combining structural rigidity and bioisosteric heterocyclic replacement. This strategic combination results in molecules that are simultaneously robust against hypervirulent *M. tuberculosis* and potent modulators of the host's inflammatory storm, fulfilling the essential criteria for a successful host-directed therapy (HDT) candidate.

In addition to potency and selectivity, bioactive compounds must possess desirable pharmacokinetic properties to succeed in the drug discovery pipeline [88]. Integrating computational methods to evaluate ADMET (absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity) properties during the early stages of drug development can significantly reduce attrition rates and offer a more cost-effective and time-efficient approach [89]. Therefore, the most active derivatives with dual biological activities, anti-inflammatory and antimycobacterial, compounds **2**, **18**, **24**, **27**, and **28**, were submitted to *in silico* analysis of ADMET parameters (**Table 6**). All the chalcones demonstrated a good drug-likeness profile for oral bioavailability and adhered to Lipinski's rule of five (LogP ≤ 5, MW ≤ 500, HBD ≤ 5, and HBA ≤ 10) (**Table 5**). A lower risk of predicted mutagenicity was observed for chalcones compared to rifampicin, a first-line anti-TB drug. In addition, derivatives **2**, **24**, **27**, and **28** did not exhibit any predicted risk for hERG-related cardiotoxicity.

Table 6. *In silico* ADMET properties of the most active chalcones and rifampicin.

Chalcones	HIA[a]	Caco-2	hERG inhibitor[b]	Hepatotoxicity	Mutagenicity	Rule of 5
2	Good	Good	No	Yes	No	Pass
18	Good	Good	Yes	Yes	No	Pass
24	Good	Good	No	Yes	No	Pass
27	Good	Good	No	Yes	No	Pass
28	Good	Good	No	Yes	No	Pass
Rifampicin	Good	Medium	Yes	Yes	Yes	No

[a] Human intestinal absorption, [b] Human ether-a-go-go-related gene

5.1.3. Conclusion

In summary, this study identifies novel chalcone derivatives as potent dual-action candidates for host-directed therapy (HDT) of severe pulmonary tuberculosis. Through a progressive screening funnel, we identified lead prototypes **24** (**LQB-774**) and **27** (**LQB-778**), which surpassed previous benchmarks (**3C** and **5C**) by demonstrating remarkable robustness against the hypervirulent *M. tuberculosis* strain of the Beijing genotype (strain M299), where even the first-line drug rifampicin showed significant loss of potency.

The biological evaluation revealed that these compounds are not merely bacteriostatic but exert a direct bactericidal effect that is maintained within the challenging intracellular environment of both murine (RAW 264.7) and human (THP-1) macrophages. Notably, compound **27** (**LQB-778**) exhibited sustained antimycobacterial efficacy over a 10-day infection period.

Mechanistically, we proved that the anti-inflammatory profile is driven by targeted suppression of iNOS expression rather than by nonspecific radical scavenging. The ability of these leads to inhibit critical pro-inflammatory cytokines, particularly IL-1β, with potencies comparable to ibuprofen, highlights their potential to mitigate the neutrophilic-driven lung injury characteristic of severe pulmonary TB.

Structure-activity relationship (SAR) analysis confirmed that structural rigidification and bioisosteric heterocyclic replacement are the key chemical drivers for this optimized pharmacological profile. Combined with a favorable *in silico* ADMET and drug-likeness parameters, prototypes **24** (**LQB-774**) and **27** (**LQB-778**) stand out as promising chemical scaffolds for the development of novel adjuvant agents with dual antituberculosis and anti-inflammatory activities, which may be beneficial in the treatment of severe pulmonary TB.

5.1.4. Experimental Section

5.1.4.1. Reagents

Cell culture reagents were obtained from Gibco/Invitrogen (Life Technologies, CA, USA). Middlebrook 7H9 broth, 7H10 and 7H11 agar, and enrichment supplements (OADC and ADC) were purchased from Difco Laboratories and Becton Dickinson (Sparks, MD, USA). Key reagents, including glycerol (G9012), Tween 80 (P1764), lipopolysaccharide (LPS-L4391), NG-monomethyl-L-arginine acetate (L-NMMA-M7033), rifampicin (R7382), isoniazid (I3377), ibuprofen (I4883), BHT (B1378), MTT (M2128), PMA (P8139), and unsubstituted chalcone (136123) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The activated charcoal (744-44-0), and resazurin (DAL1100) were also obtained from Invitrogen/Thermo Fisher Scientific (Grand Island, NY, USA). Chalcones, rifampicin, and ibuprofen were dissolved in DMSO, whereas BHT was dissolved in methanol. Other reagents were prepared in sterile phosphate-buffered saline (PBS) and filtered through 0.22 µm membranes. Anti-iNOS and α-tubulin monoclonal antibodies were purchased from BD Biosciences (610328, CA, USA) and Santa Cruz Biotechnology Inc. (sc-5286, CA, USA), respectively.

5.1.4.2. Synthesis of Chalcone Derivatives

General Procedure for the Synthesis of Chalcones 1-13, 15-19, 22, 29-35:

A mixture of the appropriate acetophenone (5 mmol) and KOH (37.5 mmol) in MeOH/H_2O (2:1, 25 mL) was magnetically stirred at rt for 10 minutes. The resulting solution was treated with the corresponding benzaldehyde (5 mmol), then stirred overnight at rt. Upon completion, the reaction was quenched with 1M HCl and extracted with AcOEt (2 x 75 mL). The combined organic layers were washed with brine (100 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by recrystallization from chloroform/hexane to give the corresponding chalcone.

Procedures for the Synthesis of Aldehydes (43a-e):

2-hydroxy-4-(methoxymethoxy)benzaldehyde (**43a**): To a solution of 2,4-dihydroxybenzaldehyde (7.3 mmol, 1.01 g, 1 equiv.) in acetone (20 mL) was added K_2CO_3 (9.48 mmol, 1.31 g, 1.3 equiv.) and chloromethyl methyl ether (8.77 mmol, 0.66 mL, 1.2 equiv.) at room temperature. The resulting mixture was stirred overnight. After this time, the mixture was treated with H_2O (50 mL) and extracted with AcOEt (3 x 50 mL). The

combined organic layers were washed with H_2O (50 mL) and saturated aqueous NaCl (50 mL). The organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated under reduced pressure. The crude product was then purified by column chromatography (20:80 ethyl acetate/hexane) to afford the desired product as a white solid (665 mg, 50% yield).

4-formyl-3-hydroxyphenyl acetate (**43b**): To a solution of 2,4-dihydroxybenzaldehyde (21.72 mmol, 3 g) and DMAP (2.17 mmol, 0.265 g, 10 mol %) in dichloromethane (100 mL) at 0 °C was added triethylamine (Et_3N, 23.89 mmol, 2.42 g, 1.1 equiv.). Acetyl chloride (23.89 mmol, 1.87 g, 1.1 equiv.) was then added dropwise. The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. The mixture was poured into cold water, and the organic layer was separated. The organic layer was then washed sequentially with water and brine, dried over anhydrous Na_2SO_4, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography (eluting with 30% ethyl acetate in hexane) to afford the desired product.

4-formyl-3-hydroxyphenyl pivalate (**43c**): To a suspension of 2,4-dihydroxybenzaldehyde (8.7 mmol, 1.2 g, 2.4 equiv.) in dichloromethane was added triethylamine (Et_3N, 3.59 mmol, 0.5 mL, 1 equiv.) and pivaloyl chloride (3.57 mmol, 0.44 mL, 1 equiv.) at -8 °C. The mixture was then allowed to warm to room temperature and stirred for 16 h. After this time, the reaction mixture was washed sequentially with 1 M HCl (2 mL), H_2O (2 mL), and saturated aqueous $NaHCO_3$ (2 mL). The organic layer was then dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (10:90 ethyl acetate/hexane) to afford the desired product as a white solid (493 mg, 62%).

2-hydroxy-4-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)benzaldehyde (**43d**): To a suspension of 2,4-dihydroxybenzaldehyde (10 mmol, 1.38 g, 1 equiv.) in CH_2Cl_2 was added pyridinium p-toluenesulfonate (PPTSA, 1 mmol, 250 mg, 10 mol %) and 3,4-dihydro-2H-pyran (DHP, 17.5 mmol, 1.47 g, 1.75 equiv.). The mixture was stirred at room temperature for 3 h. After this time, the reaction mixture was washed with saturated aqueous $NaHCO_3$ (2 x 200 mL) and brine (200 mL). The organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated under reduced pressure. The crude product was then purified by column chromatography (25:75 ethyl acetate/hexane) to afford the product as a colorless oil (1.72 g, 77%).

5-hydroxy-2,2-dimethyl-2H-chromene-6-carbaldehyde (**43e**): A mixture of 2,4-dihydroxybenzaldehyde (7.24 mmol, 1 g), 3-methyl-2-butenal (14.48 mmol, 1.39 mL, 2 equiv.), and pyridine (14.48 mmol, 1.17 mL, 2 equiv.) was heated at 140 °C for 12 h. The reaction mixture was then treated with 2 N HCl and extracted with AcOEt (3 x 20 mL). The combined organic layers were washed with brine (50 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4, and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (5:95 ethyl acetate/hexane) to afford the desired product as a pale-yellow solid (365 mg, 25% yield).

Procedure for the Synthesis of 2-bromo-1-(4-methoxyphenyl)ethan-1-one (41):

To a solution of 1-(4-methoxyphenyl)ethan-1-one (25 mmol, 3.75 g, 1 equiv.) in $CHCl_3$ (50 mL) was added Br_2 (25 mmol, 1.29 mL, 1 equiv.) dropwise over 10 min. After the addition was complete, the mixture was diluted with Et_2O (400 mL) and washed sequentially with saturated aqueous $NaHCO_3$ (2 x 100 mL) and brine (3 x 100 mL). The organic layer was dried over anhydrous Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure to afford the crude product as a brown oil, which was used in the next step without further purification.

Procedure for the Synthesis of 1-(4-methoxyphenyl)-2-(triphenyl-l5-phosphaneylidene)ethan-1-one (42):

To a solution of 2-bromo-1-(4-methoxyphenyl)ethan-1-one (25 mmol, 5.73 g, 1 equiv.) in toluene (50 mL) was added triphenylphosphine (25 mmol, 6.56 g, 1 equiv.). The resulting mixture was stirred at room temperature for 72 h. The precipitated solid was collected by filtration, washed with toluene (25 mL), and redissolved in CH_2Cl_2 (50 mL). This solution was then treated with a 1.5 M aqueous Na_2CO_3 solution (25 mL). The mixture was stirred vigorously at room temperature for 2 hours. The organic layer was collected, and the aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (50 mL). The combined organic layers were washed with saturated aqueous NaCl (100 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4, and concentrated under reduced pressure to afford the product as a light yellow solid (1.5 g, 73%).

General Procedure for the Synthesis of Chalcones 14, 20-21, 23-24.

To a solution of (**42**) (1.8 mmol, 739 mg, 1.2 equiv.) and the corresponding benzaldehyde (**43**) (1.5 mmol, 1 equiv.) in acetonitrile (6 mL) was magnetically stirred at room temperature for 12 h. The solvent was removed under reduced pressure. The resulting residue was purified by column chromatography on silica gel (eluting with ethyl acetate/hexanes) to afford the desired product.

***In Vitro* Methods**

5.1.4.3. Mycobacterial Culture

The reference laboratory *M. tuberculosis* strain H37Rv (ATCC) and highly virulent *M. tuberculosis* clinical isolate strain of Beijing genotype (strain M299), previously characterized for their virulence properties [81], were kindly provided by Dr. Philip Suffys (Fiocruz/RJ, Brazil). A broad glycerol stock of each strain was obtained and stored at -80 °C. Before experiments, the aliquots were thawed and suspended in Middlebrook 7H9 broth, supplemented with 0.05% Tween 80, 0.2% glycerol, and ADC (albumin, dextrose, catalase). Bacterial culture was expanded to mid-log phase at 37 ºC for 7 days. For experimentation, bacterial suspensions were sonicated and vortexed to disaggregate clumps, then left undisturbed for 10 min to obtain single-cell suspensions. The optical density (OD) of the suspension at 600 nm was adjusted to 0.1 based on the previously determined concentrations (CFU/mL) [28].

5.1.4.4. Evaluation of Antimycobacterial Activity Against Mtb Growth in Broth

Fifty microliters of the bacterial suspension adjusted to an OD of 0.1 was plated (1×10^6 CFU/well) in 96-well microplates. Fifty microliters of the chalcones (0.8, 4, 20, and 100 µM) or rifampicin (0.004 to 2 µM) were added to the plate, which was incubated at 37 °C for 5 days. To measure bacterial growth after this period, 10 µL of MTT solution (5 mg/mL) were added to each well, and then treated overnight with lysis buffer (20% w/v sodium dodecyl sulfate (SDS)/50% dimethylformamide (DMF) in distilled water - pH 4.7) [90]. Optical densities were measured at 570 nm. To control the spontaneous growth of Mtb strains, untreated bacterial suspensions were used. Vehicle control (DMSO) at a final concentration of 0.5% was added as an internal control to ensure no interference in the assay. MIC_{50} was defined as the lowest concentration of the compound required to inhibit 50% of Mtb growth compared to the mean growth of untreated bacterial cultures.

5.1.4.5. MIC_{90} and Minimal Bactericidal Concentration (MBC) Determination

To determine whether chalcone derivatives under the conditions tested exhibited bactericidal or bacteriostatic effects, the Charcoal Agar Resazurin Assay (CARA) was employed as previously described [86,87]. The resazurin microtiter assay was carried out in parallel with the CARA assay. On day 7, the contents of the MIC_{90} *M. tuberculosis* H37Rv assay plate were gently resuspended, and 10 µL were transferred to the CARA microplates. The plates were sealed and incubated at 37°C for 7 days. To prevent charcoal from absorbing resazurin, each well containing bacterial microcolonies was pre-wetted with sterile PBS, then 50 µL of 0.01% resazurin in 5% Tween 80 was added. The wells were incubated for 45-60 min. Fluorescence was measured (excitation at 530 nm, emission at 590 nm) after a brief equilibration at room temperature. Rifampicin, a standard anti-TB drug, served as a positive control of the bactericidal effect. MBC was defined as the lowest compound concentration at which 99% of the bacteria in the starting inoculum were killed.

5.1.4.6. Infection of Macrophage Cultures and Evaluation of Intracellular Activity of Derivatives against Mycobacterial Growth

RAW 264.7 macrophages were seeded in a 96-well plate (5×10^5 cells/mL) in DMEM-F12 medium supplemented with 2% FBS and incubated for 24 h at 37 °C in 5% CO_2. Cells were infected with Mtb H37Rv at a multiplicity of infection (MOI) of 1:1 for 3 h to allow bacterial uptake. To remove extracellular bacilli, the cell monolayer was washed three times with PBS. The most active chalcones (0.8, 4, 20, and 100 µM) or rifampicin (0.004 to 2 µM) diluted in DMEM-F12 medium supplemented with 2% FBS were added, and the plates were incubated for 4 days at 37 ºC in 5% CO_2. On days 0 and 4 post-infection (p.i.), macrophage viability was assessed using an LDH assay according to the manufacturer's instructions (LDH Liquiform Kit, Labtest Diagnóstica). To quantify intracellular Mtb, cells were lysed with 1% saponin, and lysates were serially diluted in PBS. Fifty microliters of each dilution were plated on 7H10 agar, and CFU was quantified after 15-21 days of incubation at 37 ºC [91].

In order to expand the investigations from this perspective, THP-1 cells (ATCC, TIB-202, RRID: CVCL_0006) were seeded in 96-well plates (0.5×10^5 cells/mL) in complete RPMI medium and differentiated into macrophages using 50 ng/mL of PMA. After 24 h, PMA was removed, and cells were infected with Mtb H37Rv strain at a MOI of 1:10 for 3 h. Extracellular bacilli were removed by washing with PBS. Fresh medium complete with different treatments was added: isoniazid at 1x MIC_{90} (0.063 µg/mL) and compounds **24** and **27** at 4x MIC_{90}. Macrophages were lysed at 0 h and 3, 5, 7, and 10 days p.i., and aliquots were seeded on 7H10 agar and incubated at 37 °C for 10 days to quantify total CFU [92].

5.1.4.7. Cell Culture and Anti-inflammatory Assays

Two commercially available murine macrophage cell lines were used: RAW 264.7 (Cell Bank of Rio de Janeiro-BCRJ code 0212, RRID: CVCL_0493, RJ, Brazil) and J774A.1 (ATCC, TIB-67, RRID: CVCL_0358). Both cell lines were cultured in DMEM-F12 supplemented with 10% FBS, gentamicin (50 µg/mL), and amphotericin B (2.5 µg/mL) at 37 °C in 5% CO_2. Cells were plated (5×10^5 cells/mL), and after 24 h, the culture was treated with either chalcones (0.8, 4, 20, and 100 µM) and/or LPS (1 µg/mL). Following

an additional 24 h, the levels of NO, TNF-α (RAW 264.7), and IL-1β (J774A.1) were quantified in the culture supernatant [28,91].

5.1.4.8. Quantification of Inflammatory Mediators (NO, TNF-α, and IL-1β)

Nitric oxide production by LPS-stimulated macrophages was quantified indirectly using the Griess method, which measures nitrite [28,91]. TNF-α and IL-1β concentrations were determined using an ELISA kit (R&D Systems, MN, USA) following the manufacturer's instructions. Untreated and unstimulated macrophages served as the negative control, while LPS-stimulated cultures served as the positive control for pro-inflammatory mediator production. L-NMMA (20 µg/mL) was added as a positive control for NO inhibition. Ibuprofen (0.8 to 100 µM), a nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID), was used as a positive control for inhibition of TNF-α and IL-1β production.

5.1.4.9. Viability Assay

The effect of derivatives on the viability of RAW 264.7 macrophages was evaluated by the MTT method [93]. Cells stimulated with LPS served as the positive control of viability, while LPS-stimulated cells treated with 1% Triton X-100 were used as a negative control. Vehicle control (DMSO) was added at the same final concentration as the compound serial dilutions to serve as an internal control.

5.1.4.10. Antioxidant Activity

Antioxidant activity of the derivatives was evaluated using the DPPH radical-scavenging assay [94]. DPPH reagent was dissolved in methanol at a final concentration of 0.25 mg/mL. Fifty microliters of each chalcone derivative and BHT (0.8, 4, 20, and 100 µM), diluted in methanol, were combined with an equal volume of DPPH solution in a 96-well plate. The plate was incubated protected from light on an orbital shaker at room temperature for 1 h. Absorbance was measured at 520 nm, and radical scavenging activity was determined by the formula: % scavenging = [(absorbance control – absorbance of sample)/ absorbance of control] x 100. Methanol and DPPH solution were used as positive and negative controls, respectively.

5.1.4.11. Detection of iNOS by Western Blot

To measure iNOS protein levels, western blotting was performed [28]. RAW 264.7 macrophages were seeded (1×10^6 cells/mL) in 6-well plates and, after 24 h, were treated with the most active chalcones (4 and 20 µM) and/or LPS (1 µg/mL) for an additional 24 h. The cell monolayer was washed twice with PBS, then harvested and lysed in 100 µL of lysis buffer (1 M Tris-HCl, pH 6.8, 10% SDS, 20% glycerol, 2% bromophenol blue, containing protease inhibitors). Lysate aliquots were subjected to electrophoretic separation in a 10% SDS-polyacrylamide gel. Protein bands were blotted to a nitrocellulose membrane. After overnight blocking in TBS-T (0.5% Tween 20) containing 1% BSA at 4 °C, the membrane was incubated separately with mouse monoclonal anti-iNOS antibody (1:1000) and α-tubulin antibody (1:500) for 2 h at room temperature. The bands were visualized with HRP-linked secondary antibody (1:8000, Santa Cruz Biotechnology Inc., sc-2357) and diaminobenzidine/H_2O_2 as HRP substrate. To estimate protein molecular size, a protein standard ladder (Amersham™ ECL™ Rainbow™ marker Full Range, GERPN800E) was used. Membranes were scanned, and densitometry band

quantification was performed using ImageJ software for Windows (NIH, Bethesda, MD, USA). The positive control condition was defined as 1.0.

In Silico Methods

5.1.4.12. Structure-Activity Relationship (SAR) and ADMET Studies

The three-dimensional (3D) structures of the chalcones and chalcone-like derivatives were constructed and optimized using Spartan'10 software (Wavefunction Inc., Irvine, CA, USA). Initially, a conformational analysis of the compounds was performed using molecular mechanics with the MMFF force field to obtain the minimum-energy conformations. Afterward, the lowest-energy conformations of the compounds were optimized using the PM3 semi-empirical method. Some calculated descriptors included molecular surface area (MSA; $Å^2$), highest occupied molecular orbital (HOMO) and lowest unoccupied molecular orbital (LUMO) energy (E_{HOMO} and E_{LUMO}; eV), Energy gap between LUMO and HOMO (E_{GAP}, eV), molecular dipole moment (μ; Debye), molecular weight (MW; Da), and molecular volume (MV; $Å^3$). Other descriptors, such as the logarithm of the octanol/water partition coefficient (LogP), topologic polar surface area (TPSA), number of hydrogen bond acceptors (HBA), number of hydrogen bond donors (HBD), and the number of rotatable bonds (nRots), were calculated using Molinspiration (Molinspiration cheminformatics).

The two-dimensional (2D) structures of the most active compounds (chalcone derivatives **2**, **18**, **24**, **27**, and **28**) were submitted to ADMET analysis using Deep-PK [88]. The following parameters were predicted: Human Intestinal Absorption (HIA), permeability in Caco-2 cells, cardiotoxicity (hERG inhibitor), hepatotoxicity, and mutagenicity (based on the Ames test). Also, Lipinski's 'Rule of 5' was analyzed to evaluate the theoretical solubility and permeability of orally administered compounds. Rifampicin was used as a reference anti-TB drug.

Finally, a Pearson correlation analysis of the calculated descriptors and selected biological activities was performed using RStudio (RStudio: Integrated Development Environment for R, Posit Software, PBC, Boston, MA).

5.1.4.13. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8 software (GraphPad, USA). One-way ANOVA with Tukey's posttest was used to evaluate statistical significance among replicates and groups, with $p < 0.05$ considered significant. The IC_{50}, MIC_{50}, and CC_{50} values were calculated by non-linear regression analysis based on concentration-response curves for each activity and concentrations expressed in Log_{10}. Selectivity index (SI) was calculated as the ratio of the CC_{50} to the MIC against *M. tuberculosis* (CC_{50}/MIC_{50}).

Supporting Information

Analytical and characterization data (^1H and ^{13}C NMR, HPLC), copies of all spectra, and additional computational study details (**Figures S1** and **S2**) are available in the Supporting Information. References [95-113] are cited only in the Supporting Information.

Acknowledgements

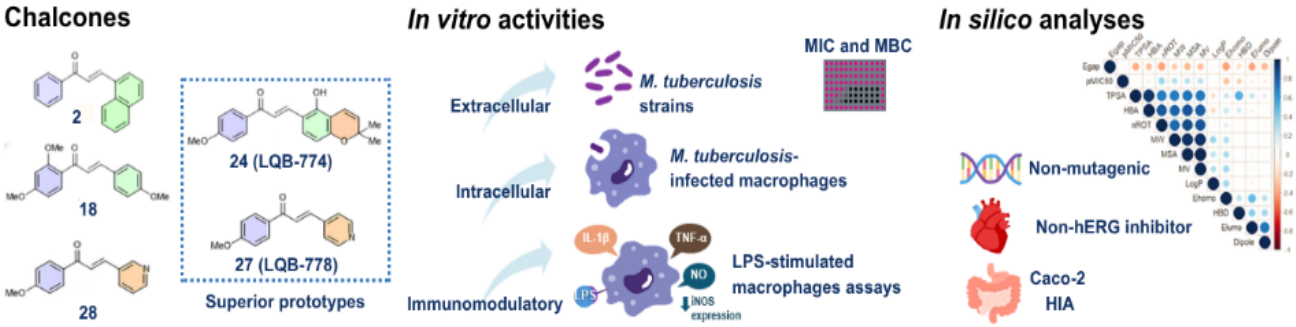
This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro

(FAPERJ, grant nº 210.726/2024, 204.386/2025), Brazil. The authors would like to thank the staff of the LBR (UENF), LPBio (UFRJ), LQB (UFRJ), LICC (UFRJ), and DMM (University of Padova/Italy). Costa, P.R.R. acknowledges funding from FAPERJ through the “Cientista do Nosso Estado” grant (grant nº. E-26/204.296/2024) and CNPq for a Research Productivity Fellowship (Senior Level). Martins, Y.V. and Falcão, J.S. are grateful to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil, for providing their doctoral fellowships (Finance Code 001). We thank the Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) and the Central Analítica of the Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais Walter Mors (IPPN-UFRJ) for providing access to the multiuser instrumentation facilities (LAMAR, LabCrom, LabMAS, and LabEsp) and for the technical support during the analyses. The authors used Gemini (Google) exclusively for language editing and proofreading to improve the clarity of the manuscript.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Table of Contents



From 34 chalcone derivatives, we identified dual-action compounds **24** (**LQB-774**) and **27** (**LQB-778**) as potent prototypes with bactericidal activity against Mtb, including the hypervirulent Mtb strain, and sustained efficacy in infected human macrophages. By suppressing iNOS, TNF-α, and IL-1β, these compounds have robust potential to mitigate exacerbated inflammation, an HDT strategy that can improve clinical outcomes in severe pulmonary TB.

5.1.5. References

[1] World Health Organization. “Global Tuberculosis Report 2025”, *World Health Organization*, Geneva: Organization (2025).

[2] M. Coleman, T.-A. Nguyen, B. K. Luu, et al., “Finding and Treating Both Tuberculosis Disease and Latent Infection During Population-Wide Active Case Finding for Tuberculosis Elimination”, *Frontiers in Medicine* **10**, (2023): 1275140, 1-8. https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1275140

[3] A. L. Garcia-Basteiro, H. E. Jenkins, M. Rangaka, “The Burden of Latent Multidrug-Resistant Tuberculosis”, *The Lancet Infectious Diseases* **19**, (2019): 802-803. https://doi.org/ 10.1016/S1473-3099(19)30271-3

[4] X. Wei, L. Yue, B. Zhao, N. Jiang, H. Lei, X. Zhai, “Recent Advances and Challenges of Revolutionizing Drug-Resistant Tuberculosis Treatment”, *European Journal of Medicinal Chemistry* **277**, (2024): 116785, 1-24. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.116785

[5] O. S. Pedersen, F. B. Holmgaard, M. K. D. Mikkelsen, et al., “Global Treatment Outcomes of Extensively Drug-Resistant Tuberculosis in Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis”, *Journal of Infection* **87**, (2023): 177-189. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2023.06.014

[6] T. T. B. Tram, H. N. Nhung, S. Vijay, et al., “Virulence of *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates Is Associated with Sputum Pre-Treatment Bacterial Load, Lineage, Survival in Macrophages, and Cytokine Response”, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **8**, (2018): 1-11. https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00417

[7] A. Rachow, O. Ivanova, R. Wallis, et al., “TB Sequel: Incidence, Pathogenesis and Risk Factors of Long-Term Medical and Social Sequelae of Pulmonary TB – A Study Protocol”, *BMC Pulmonary Medicine* **19**, (2019): 1-9. https://doi.org/10.1186/s12890-018-0777-3

[8] P. Chandra, S. J. Grigsby, J. A. Philips, “Immune Evasion and Provocation by *Mycobacterium tuberculosis*”, *Nature Reviews Microbiology* **20**, (2022): 750-766. https://doi.org/10.1038/s41579-022-00763-4

[9] R. F. Maphasa, M. Meyer, A. Dube, “The Macrophage Response to *Mycobacterium tuberculosis* and Opportunities for Autophagy Inducing Nanomedicines for Tuberculosis Therapy”, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **10**, (2021): 618414 1-22. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.618414

[10] S. Ashenafi, S. Brighenti, “Reinventing the Human Tuberculosis (TB) Granuloma: Learning from the Cancer Field”, *Frontiers in Immunology* **13**, (2022): 1059725, 1-19. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1059725

[11] F. M. Almeida, T. L. B. Ventura, E. P. Amaral, et al., “Hypervirulent *Mycobacterium tuberculosis* Strain Triggers Necrotic Lung Pathology Associated with Enhanced Recruitment of Neutrophils in Resistant C57BL/6 Mice”, *PLoS ONE* **12**, (2017): e0172510, 1-19. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173715

[12] M. G. M. De Melo, E. D. D. Mesquita, M. M. Oliveira, et al., “Imbalance of NET and Alpha-1-Antitrypsin in Tuberculosis Patients Is Related with Hyper Inflammation and Severe Lung Tissue Damage”, *Frontiers in Immunology* **9**, (2019): 3147, 1-17. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03147

[13] E. Doz-Deblauwe, B. Bounab, F. Carreras, et al., “Dual Neutrophil Subsets Exacerbate or Suppress Inflammation in Tuberculosis via IL-1β or PD-L1”, *Life Science Alliance* **7**, (2024): e202402623, 1-16. https://doi.org/10.26508/lsa.202402623

[14] M. Assefa, G. Girmay. “*Mycobacterium tuberculosis* Biofilms: Immune Responses, Role in TB Pathology, and Potential Treatment”, *ImmunoTargets and Therapy* **13**, (2024): 335-342. https://doi.org/10.2147/ITT.S455744

[15] C. Young, G. Walzl, N. Du Plessis, “Therapeutic Host-Directed Strategies to Improve Outcome in Tuberculosis”, *Mucosal Immunology* **13**, (2020): 190-204. https://doi.org/10.1038/s41385-019-0226-5

[16] Y. Dara, D. Volcani, K. Shah, K. Shin, V. Venketaraman, “Potentials of Host-Directed Therapies in Tuberculosis”, *Journal of Clinical Medicine* **8**, (2019): 1166, 1-12. https://doi.org/10.3390/jcm8081166

[17] S. Kaufmann, A. Dorhoi, R. S. Hotchkiss, R. Bartenschlager, “Host-Directed Therapies for Bacterial and Viral Infections”, *Nature Reviews Drug Discovery* **17**, (2018): 35-56. https://doi.org/10.1038/nrd.2017.162

[18] S. Krug, S. Parveen, W. R. Bishai, “Host-Directed Therapies: Modulating Inflammation to Treat Tuberculosis”, *Frontiers in Immunology* **12**, (2021): 660916, 1-10. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.660916

[19] J. M. Cubillos-Angulo, B. M. F. Nogueira, M. B. Arriaga, et al., “Host-Directed Therapies in Pulmonary Tuberculosis: Updates on Anti-Inflammatory Drugs”, *Frontiers in Medicine* **9**, (2022): 970408, 1-15. https://doi.org/10.3389/fmed.2022.970408

[20] World Health Organization, “WHO Consolidated Guidelines on Tuberculosis. Module 4: treatment – Drug-susceptible tuberculosis treatment, 2022 update. Module 5: Management of Tuberculosis in Children and Adolescents”, *World Health Organization*, Geneva (2022).

[21] M. R. Lee, M. C. Lee, C. H. Chang, et al., “Use of Antiplatelet Agents and Survival of Tuberculosis Patients: A Population-Based Cohort Study”, *Journal of Clinical Medicine* **8**, (2019): 923, 1-13. https://doi.org/10.3390/jcm8070923

[22] D. P. Eisen, E. S. McBryde, A. Walduck, “Low-Dose Aspirin and Ibuprofen’s Sterilizing Effects on Mycobacterium tuberculosis Suggest Safe New Adjuvant Therapies for Tuberculosis”, *Journal of Infectious Diseases* **208**, (2013): 1925-1927. https://doi.org/10.1093/infdis/jit476

[23] C. Vilaplana, E. Marzo, G. Tapia, J. Diaz, V. Garcia, P. J. Cardona, “Ibuprofen Therapy Resulted in Significantly Decreased Tissue Bacillary Loads and Increased Survival in a New Murine Experimental

Model of Active Tuberculosis", *Journal of Infectious Diseases* **208**, (2013): 199–202. https://doi.org/10.1093/infdis/jit152

[24] K. L. Fonseca, J. Farrés, K. Barbakadze, et al., "NSAIDS-XDR-TB Clinical Trial: A Randomized Pilot Study to Estimate the Potential Efficacy and Safety of Using Adjunctive Ibuprofen for the Treatment of pre-XDR and XDR Tuberculosis", *medRvix preprint* (2025). https://doi.org/10.1101/2025.05.29.25328553

[25] B. Salehi, C. Quispe, I. Chamkhi, et al., "Pharmacological Properties of Chalcones: A Review of Preclinical Including Molecular Mechanisms and Clinical Evidence", *Frontiers in Pharmacology* **11**, (2021): 592654, 1-21. https://doi.org/10.3389/fphar.2020.592654

[26] T. Nawaz, A. Tajammal, A. W. Qurashi, et al., "Chalcones As Broad-Spectrum Antimicrobial Agents: A Comprehensive Review And Analysis Of Their Antimicrobial Activities", *ChemistrySelect* **8**, (2023): e202302798, 1-13. https://doi.org/10.1002/slct.202302798

[27] S. Mishra, P. Janab, "Chalcones as Anti-Infective Agents for Effective Management of Tuberculosis", *Polycyclic Aromatic Compounds* **44**, (2023): 5640–5662. https://doi.org/10.1080/10406638.2023.2261593

[28] T. L. B. Ventura, S. D. Calixto, B. A. Abrahim-Vieira, et al., "Antimycobacterial and Anti-Inflammatory Activities of Substituted Chalcones Focusing on an Anti-Tuberculosis Dual Treatment Approach", *Molecules* **20**, (2015): 8072-8093. https://doi.org/10.3390/molecules20058072

[29] M. A. Shalaby, S. A. Rizk, A. M. Fahim, "Synthesis, Reactions and Application of Chalcones: A Systematic Review", *Organic & Biomolecular Chemistry* **21**, (2023): 5317-5346. https://doi.org/10.1039/D3OB00792H

[30] K. Xu, X. Ren, J. Wang, Q. Zhang, X. Fu, P. C. Zhang, "Clinical Development and Informatics Analysis of Natural and Semi-Synthetic Flavonoid Drugs: A Critical Review", *Journal of Advanced Research* **63**, (2023): 269-284 https://doi.org/10.1016/j.jare.2023.11.007

[31] S. Adhikari, P. Nath, V. K. Deb, et al., "Pharmacological Potential of Natural Chalcones: Recent Studies and Future Perspective", *Frontiers in Pharmacology* **16**, (2025): 1570385, 1-51. https://doi.org/10.3389/fphar.2025.1570385

[32] F. C. Demidoff, G. S. Caleffi, M. Figueiredo, P. R. R. Costa, "Ru(II)-Catalyzed Asymmetric Transfer Hydrogenation of Chalcones in Water: Application to the Enantioselective Synthesis of Flavans BW683C and Tephrowatsin E", *The Journal of Organic Chemistry* **87**, (2022): 14208-14222. https://doi.org/10.1021/acs.joc.2c01733

[33] H. Wei, Y. Li, K. Xiao, et al., "Synthesis of Polysubstituted Pyridines via a One-Pot Metal-Free Strategy", *Organic Letters* **17**, (2015): 5974-5977. https://doi.org/10.1021/acs.orglett.5b02903

[34] Z.-Y. Wang, S.-Z. Liu, C. Guo, et al., "Nickel-Catalyzed γ-Alkylation of Cyclopropyl Ketones with Unactivated Primary Alkyl Chlorides: Balancing Reactivity and Selectivity via Halide Exchange", *RSC Advances* **14**, (2024): 12883-12887. https://doi.org/10.1039/D4RA02616K

[35] K. Rikimaru, T. Wakabayashi, H. Abe, et al., "Structure–Activity Relationships and Key Structural Feature of Pyridyloxybenzene-Acylsulfonamides as New, Potent, and Selective Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) γ Agonists", *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **20**, (2012): 3332-3358. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.03.036

[36] M. L. N. Rao, V. N. Murty, S. Nand, "Functional Group Manoeuvring for Tuning Stability and Reactivity: Synthesis of Cicerfuran, Moracins (D, E, M) and Chromene-Fused Benzofuran-Based Natural Products", *Organic & Biomolecular Chemistry* **15**, (2017): 9415-9423. https://doi.org/10.1039/C7OB02459B

[37] G. Bojack, R. W. Brown, J. Dittgen, et al., "Synthesis and SAR of 2,3-Dihydro-1-benzofuran-4-carboxylates: Potent Salicylic Acid-Based Lead Structures against Plant Stress", *European Journal of Organic Chemistry* **2022**, (2022): e202200087, 1-11. https://doi.org/10.1002/ejoc.202200087

[38] T. Nemoto, S. Harada, M. Ikeda, et al., "Synthetic Studies on Didymeline Using Spirocyclization of Phenols with Diazo Functionality", *Heterocycles* **103**, (2021): 687-693. https://doi.org/10.3987/COM-20-S(K)65

[39] M. Nayak, I. Kim, "Alkyne Carbonyl Metathesis as a Means to Make 4-Acyl Chromenes: Syntheses of (±)-Deguelin and (±)-Munduserone", *The Journal of Organic Chemistry* **80**, (2015): 11460-11467. https://doi.org/10.1021/acs.joc.5b02160

[40] K. Katsuno, J. N. Burrows, K. Duncan, et al., “Hit and Lead Criteria in Drug Discovery for Infectious Diseases of the Developing World”, *Nature Reviews Drug Discovery* **14**, (2015): 751-758. https://doi.org/10.1038/nrd4683

[41] D. B. Abdjul, F. Budiyanto, J. T. Wibowo, “Unlocking Potent Anti-Tuberculosis Natural Products through Structure–Activity Relationship Analysis”, *Natural Products and Bioprospecting* **15**, (2025): 1-27. https://doi.org/10.1007/s13659-025-00529-4

[42] X. Li, Y. Li, G. Xu, et al., “Effects of Anti-Tuberculosis Drugs on the Proliferation and Differentiation of Alveolar Stem Cells”, *Toxicology and Applied Pharmacology* **505**, (2025): 117546, 1-9. https://doi.org/10.1016/j.taap.2025.117546

[43] Y. Liu, W. Chen, Y. Cen, et al., “Hepatocyte Ferroptosis Contributes to Anti-Tuberculosis Drug-Induced Liver Injury: Involvement of the HIF-1α/SLC7A11/GPx4 Axis”, *Chemico-Biological Interactions* **376**, (2023): 110439, 1-12. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2023.110439

[44] L. H. Chi, A. D. Burrows, R. L. Anderson, “Can Preclinical Drug Development Help to Predict Adverse Events in Clinical Trials?”, *Drug Discovery Today* **27**, (2022): 257-268. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.08.010

[45] C. N. Rodríguez-Silva, I. M. Prokopczyk, J. L. Dos Santos, “The Medicinal Chemistry of Chalcones as Anti-*Mycobacterium tuberculosis* Agents”, *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* **22**, (2022): 2068-2080. https://doi.org/10.2174/1389557522666220214093606

[46] L. D. Chiaradia, A. Mascarello, M. Purificação, et al., “Synthetic Chalcones as Efficient Inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* Protein Tyrosine Phosphatase PtpA”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **18**, (2008): 6227-6230. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.09.105

[47] K. Rodríguez-Villar, F. Cortés-Benítez, J. F. Palacios-Espinosa, J. Pérez-Villanueva, “Similarity Searching for Anticandidal Agents Employing a Repurposing Approach”, *Molecular Informatics* **43**, (2023): e202300206, 1-12. https://doi.org/10.1002/minf.202300206

[48] J. A. Geyer, S. M. Keenan, C. L. Woodard, et al., “Selective Inhibition of Pfmrk, a *Plasmodium falciparum* CDK, by Antimalarial 1,3-Diaryl-2-Propenones”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **19**, (2009): 1982-1985. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.02.042

[49] A. S. Bhambra, K. C. Ruparelia, H. L. Tan, et al., “Synthesis and Antitrypanosomal Activities of Novel Pyridylchalcones”, *European Journal of Medicinal Chemistry* **128**, (2017): 213-218. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.01.027

[50] C.-H. Lai, Y. K. Rao, S.-H. Fang, Y-T. Sing, Y-M. Tzeng, “Identification of 3′,4′,5′-Trimethoxychalcone Analogues as Potent Inhibitors of *Helicobacter pylori*-Induced Inflammation in Human Gastric Epithelial Cells”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **20**, (2010): 5462-5465. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.07.094

[51] M. M. Ravesloot-Chávez, E. V. Dis, S. A. Stanley, “The Innate Immune Response to *Mycobacterium tuberculosis* Infection”, *Annual Review of Immunology* **39**, (2021): 611-637. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-093019-010426

[52] C. H. Wang, C. Y. Liu, H. C. Lin, C. T. Yu, K. F. Chung, H. P. Kuo, “Increased Exhaled Nitric Oxide in Active Pulmonary Tuberculosis Due to Inducible NO Synthase Upregulation in Alveolar Macrophages”, *European Respiratory Journal* **11**, (1998): 809-815. https://doi.org/10.1183/09031936.98.11040809

[53] H.-S. Choi, P. R. Rai, H. W. Chu, C. Cool, E. D. Chan, “Analysis of Nitric Oxide Synthase and Nitrotyrosine Expression in Human Pulmonary Tuberculosis”, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **166**, (2002): 178-186. https://doi.org/10.1164/rccm.2201023

[54] C. H. Wang, H. C. Lin, C. Y. Liu, et al., “Upregulation of Inducible Nitric Oxide Synthase and Cytokine Secretion in Peripheral Blood Monocytes from Pulmonary Tuberculosis Patients”, *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* **5**, (2001): 283-291.

[55] D. Tiwari, A. R. Martineau, “Inflammation-Mediated Tissue Damage in Pulmonary Tuberculosis and Host-Directed Therapeutic Strategies”, *Seminars in Immunology* **65**, (2023): 101672, 1-16. https://doi.org/10.1016/j.smim.2022.101672

[56] H. U. Rashid, Y. Xu, N. Ahmad, Y. Muhammad, L. Wang, “Promising Anti-Inflammatory Effects of Chalcones via Inhibition of Cyclooxygenase, Prostaglandin E_2, Inducible NO Synthase and Nuclear Factor κB Activities”, *Bioorganic Chemistry* **87**, (2019): 335-365. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.03.003

[57] M. V. B. Reddy, H.-Y. Hung, P.-C. Kuo, et al., “Synthesis and Biological Evaluation of Chalcone, Dihydrochalcone, and 1,3-Diarylpropane Analogs as Anti-Inflammatory Agents”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **27**, (2017): 1547-1550. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.02.038

[58] Y. K. Rao, S.-H. Fang, Y.-M. Tzeng, “Synthesis and Biological Evaluation of 3′,4′,5′-Trimethoxychalcone Analogues as Inhibitors of Nitric Oxide Production and Tumor Cell Proliferation”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **17**, (2009): 7909-7914. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.10.022

[59] F. Herencia, M. L. Ferrándiz, A. Ubeda, “Synthesis and Anti-Inflammatory Activity of Chalcone Derivatives”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **8**, (1998): 1169-1174. https://doi.org/10.1016/s0960-894x(98)00179-6

[60] U. Kozhamkulov, S. Iglikova, A. Rakisheva, J. Almazan, “Multidrug-Resistant Tuberculosis in Central Asia and Predominant Beijing Lineage, Challenges in Diagnosis, Treatment Barriers, and Infection Control Strategies: An Integrative Review”, *Antibiotics* **14**, (2025): 1-24. https://doi.org/10.3390/antibiotics14070673

[61] S. C. M. Ribeiro, L. L. Gomes, E. P. Amaral, et al., “*Mycobacterium tuberculosis* Strains of the Modern Sublineage of the Beijing Family Are More Likely to Display Increased Virulence Than Strains of the Ancient Sublineage”, *Journal of Clinical Microbiology* **52**, (2014): 2615-2624. https://doi.org/10.1128/JCM.00498-14

[62] V. A. Dartois, E. J. Rubin, “Anti-Tuberculosis Treatment Strategies and Drug Development: Challenges and Priorities”, *Nature Reviews Microbiology* **20**, (2022): 685-701. https://doi.org/10.1038/s41579-022-00731-y

[63] T. C. Muradás, B. L. Abbadi, A. D. Villela, et al., “Pre-Clinical Evaluation of Quinoxaline-Derived Chalcones in Tuberculosis”, *PLoS One* **13**, (2018): e0202568, 1-13. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202568

[64] S. K. Sahoo, B. Rani, N. B. Gaikwad, et al., “Synthesis and Structure-Activity Relationship of New Chalcone Linked 5-Phenyl-3-Isoxazolecarboxylic Acid Methyl Esters Potentially Active Against Drug Resistant *Mycobacterium tuberculosis*”, *European Journal of Medicinal Chemistry* **222**, (2021): 113580, 1-17. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113580

[65] B. Gold, J. Roberts, Y. Ling, et al., “Rapid, Semiquantitative Assay to Discriminate among Compounds with Activity against Replicating or Nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **59**, (2015): 6521-6538. https://doi.org/10.1128/AAC.00803-15

[66] B. Gold, J. Roberts, Y. Ling, et al., “Visualization of the Charcoal Agar Resazurin Assay for Semi-Quantitative, Medium-Throughput Enumeration of Mycobacteria”, *Journal of Visualized Experiments* **118**, (2016): e54690, 1-10. https://doi.org/10.3791/54690

[67] P. Santucci, D. J. Greenwood, A. Fearns, K. Chen, H. Jiang, M. G. Gutierrez, “Intracellular Localisation of *Mycobacterium tuberculosis* Affects Efficacy of the Antibiotic Pyrazinamide”, *Nature Communications* **12**, (2021): 3816, 1-15. https://doi.org/10.1038/s41467-021-24127-3

[68] C. Bussi, M. G. Gutierrez, “*Mycobacterium tuberculosis* Infection of Host Cells in Space and Time”, *FEMS Microbiology Reviews* **43**, (2019): 341-361. https://doi.org/10.1093/femsre/fuz006

[69] N. Tian, H. Chu, Q. Li, et al., “Host-Directed Therapy for Tuberculosis”, *European Journal of Medical Research* **30**, (2025): 267: 1-18. https://doi.org/10.1186/s40001-025-02443-4

[70] I. Kostopoulou, A. Tzani, N.-I. Polyzos, et al., “Exploring the 2′-Hydroxy-Chalcone Framework for the Development of Dual Antioxidant and Soybean Lipoxygenase Inhibitory Agents”, *Molecules* **26**, (2021): 2777, 1-24. https://doi.org/10.3390/molecules26092777

[71] G. P. Rosa, A. M. L. Seca, M. C. Barreto, A. M. S. Silva, D. C. G. A. Pinto, “Chalcones and Flavanones Bearing Hydroxyl and/or Methoxyl Groups: Synthesis and Biological Assessments”, *Applied Sciences* **9**, (2019): 2846, 1-17. https://doi.org/10.3390/app9142846

[72] M. L. Birsa, L. G. Sarbu, “Hydroxy Chalcones and Analogs with Chemopreventive Properties”, *International Journal of Molecular Sciences* **24**, (2023): 10667, 1-18. https://doi.org/10.3390/ijms241310667

[73] K. Thanigaimani, S. Arshad, N. C. Khalib, et al., “A New Chalcone Structure of (E)-1-(4-Bromophenyl)-3-(Napthalen-2-yl)Prop-2-en-1-one: Synthesis, Structural Characterizations, Quantum Chemical Investigations and Biological Evaluations”, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **149**, (2015): 90-102. https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.04.028

[74] R. Minhas, Y. Bansal, G. Bansal, “Inducible Nitric Oxide Synthase Inhibitors: A Comprehensive Update”, *Medical Research Reviews* **40**, (2020): 823–855. https://doi.org/10.1002/med.21636

[75] D. Zhang, H. Wang, H. Ou, et al., “Identification of Chalcone Analogues as Anti-Inflammatory Agents Through the Regulation of NF-κB and JNK Activation”, *RSC Medicinal Chemistry* **15**, (2024): 2002–2017. https://doi.org/10.1039/d4md00011k

[76] H. Jamaati, E. Mortaz, Z. Pajouhi, et al., “Nitric Oxide in the Pathogenesis and Treatment of Tuberculosis”, *Frontiers in Microbiology* **8**, (2017): 2008, 1-11. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02008

[77] X. Yao, Y. Liu, Y. Wang, et al., “Multiplex Analysis of Plasma Cytokines/Chemokines Showing Different Immune Responses in Active TB Patients, Latent TB Infection Individuals and Healthy Participants”, *Tuberculosis* **107** (2017): 88-94. https://doi.org/10.1016/j.tube.2017.07.013

[78] Y. Wang, Q. Sun, Y. Zhang, et al., “Systemic Immune Dysregulation in Severe Tuberculosis Patients Revealed by a Single-Cell Transcriptome Atlas”, *Journal of Infection* **86**, (2023): 421-438. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2023.03.020

[79] M. A. Gardam, E. C. Keystone, R. Menzies, et al., “Anti-tumour Necrosis Factor Agents and Tuberculosis Risk: Mechanisms of Action and Clinical Management”, *The Lancet Infectious Diseases* **3**, (2003): 148-155. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00545-0

[80] J.-M. Yuk, J. K. Kim, I. S. Kim, E. K. Jo, “TNF in Human Tuberculosis: A Double-Edged Sword”, *Immune Network* **24**, (2024): e4, 1-19. https://doi.org/10.4110/in.2024.24.e4

[81] S.-Y. Eum, J.-H. Kong, M.-S. Hong, et al., “Neutrophils Are the Predominant Infected Phagocytic Cells in the Airways of Patients with Active Pulmonary Tuberculosis”, *Chest* **137**, (2010): 122-128. https://doi.org/10.1378/chest.09-0903

[82] P. H. Wang, Y. Wang, Y. Y. Guo, Z. H. Ma, C. Wu, L. Xing, “Ibuprofen Modulates Macrophage Polarization by Downregulating Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1”, *International Immunopharmacology* **143**, (2024): 113502, 1-12. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2024.113502

[83] A.-F. Villamizar-Mogotocoro, L. Y. Vargas-Méndez, V. V. Kouznetsov, “Pyridine and Quinoline Molecules as Crucial Protagonists in the Never-Stopping Discovery of New Agents Against Tuberculosis”, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **151** (2020): 105374, 1-13. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105374

[84] Y. Ling, Z.-Y. Hao, D. Liang, C.-L. Zhang, Y.-F. Liu, Y. Wang, “The Expanding Role of Pyridine and Dihydropyridine Scaffolds in Drug Design”, *Drug Design, Development and Therapy* **15**, (2021): 4289-4338. https://doi.org/10.2147/DDDT.S329547

[85] B. G. Singh, A. Kunwar, “Redox Reactions of Organoselenium Compounds: Implication in Their Biological Activity”, *Free Radical Research* **55**, (2021): 641-654. https://doi.org/10.1080/10715762.2021.1882678

[86] P. Kimber, F. Plasser, “Energy Component Analysis for Electronically Excited States of Molecules: Why the Lowest Excited State Is Not Always the HOMO/LUMO Transition”, *Journal of Chemical Theory and Computation* **19**, (2023): 2340–2352. https://doi.org/10.1021/acs.jctc.3c00125

[87] J. S. Dhaliwal, S. Moshawih, K. W. Goh, et al., “Pharmacotherapeutics Applications and Chemistry of Chalcone Derivatives”, *Molecules* **27**, (2022): 7062, 1-24. https://doi.org/10.3390/molecules27207062

[88] Y. Myung, A. G. C. de Sá, D. B. Ascher, “Deep-PK: Deep Learning for Small Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Prediction”, *Nucleic Acids Research* **52**, (2024): W469–W475. https://doi.org/10.1093/nar/gkae254

[89] C.-Y. Jia, J.-Y. Li, G.-F. Hao, G.-F. Yang, “A Drug-Likeness Toolbox Facilitates ADMET Study in Drug Discovery”, *Drug Discovery Today* **25**, (2020): 248–258. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.10.014

[90] S. Moodley, N. A. Koorbanally, T. Moodley, D. Ramjugernath, M. Pillay, “The 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromide (MTT) Assay Is a Rapid, Cheap Screening Test for the In Vitro Anti-Tuberculous Activity of Chalcones”, *Journal of Microbiological Methods* **104**, (2014): 72-78. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.06.014

[91] S. D. Calixto, T. L. B. V. Simão, M. V. Palmeira-Mello, et al., “Antimycobacterial and Anti-Inflammatory Activities of Thiourea Derivatives Focusing on Treatment Approaches for Severe Pulmonary Tuberculosis”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **53**, (2022): 116506, 1-13. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2021.116506

[92] F. Boldrin, I. Anso, S. Alebouyeh, et al., “The Phosphatidyl-myo-Inositol Dimannoside Acyltransferase PatA Is Essential for *Mycobacterium tuberculosis* Growth In Vitro and In Vivo”, *Journal of Bacteriology* **203**, (2021): e00439-20, 1-12. https://doi.org/10.1128/JB.00439-20

[93] T. Mosmann, “Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays”, *Journal of Immunological Methods* **65**, (1983): 55–63. https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4

[94] R. B. Mansour, W. M. Ksouri, S. Cluzet, S. Krisa, T. Richard, R. Ksouri, “Assessment of Antioxidant Activity and Neuroprotective Capacity on PC12 Cell Line of *Frankenia thymifolia* and Related Phenolic LC-MS/MS Identification”, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2016**, (2016): 2843463, 1-8. https://doi.org/10.1155/2016/2843463

[95] C.-K. Chan, Y.-L. Tsai, M.-Y. Chang, “$Bi(OTf)_3$ Catalyzed Disproportionation Reaction Of Cinnamyl Alcohols”, *Tetrahedron* **73**, (2017): 3368-3376. https://doi.org/10.1016/j.tet.2017.05.006

[96] M. A. Rahim, M. M. H. Bhuiayan, M. M. Matin, “Microwave Assisted Efficient Synthesis Of Some Flavones For Antimicrobial and ADMET Studies”, *Journal of Scientific Research* **12**, (2020): 673-685. https://doi.org/10.3329/jsr.v12i4.45523

[97] Y.-L. Zhang, Y.-Q. Wang, “Enantioselective Biomimetic Cyclization Of 2′-Hydroxychalcones To Flavanones”, *Tetrahedron Letters* **55**, (2014): 3255-3258. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2014.04.032

[98] G. S. Caleffi, A. S. Rosa, L. G. de Souza, et al., “Aurones: A Promising Scaffold To Inhibit SARS-CoV-2 Replication”, *Journal of Natural Products* **86**, (2023): 1536-1549. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.3c00249

[99] V. Pathak, I. Ahmad, A. K. Kahlon, et al., “Syntheses Of 2-Methoxyestradiol And Eugenol Template-Based Diarylpropenes As Non-Steroidal Anticancer Agents”, *RSC Advances* **4**, (2014): 35171-35185. https://doi.org/10.1039/C4RA03823A

[100] C. Letulle, F.-X. Troublet, A. Pinon, et al., “Synthesis And Antiproliferative Effect Of 3,4,5-Trimethoxylated Chalcones On Colorectal And Prostatic Cancer Cells”, *Pharmaceuticals* **17**, (2024): 1207, 1-24. https://doi.org/10.3390/ph17091207

[101] L. B. Salum, W. F. Altei, L. D. Chiaradia, et al., “Cytotoxic 3,4,5-Trimethoxychalcones As Mitotic Arresters And Cell Migration Inhibitors”, *European Journal of Medicinal Chemistry* **63**, (2013): 501–510. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.02.037

[102] B. H. Lee, Y. L. Choi, S. Shin, J.-N. Heo, “Stereoselective Palladium-Catalyzed A-Arylation Of 3-Aryl-1-Indanones: An Asymmetric Synthesis Of (+)-Pauciflorol F”, *The Journal of Organic Chemistry* **76**, (2011): 6611-6618. https://doi.org/10.1021/jo2009164

[103] M. Abdel-Halim, S. Sigler, N. A. S. Racheed, et al., “From Celecoxib To A Novel Class Of Phosphodiesterase 5 Inhibitors: Trisubstituted Pyrazolines As Novel PDE5 Inhibitors With Extremely High Potency And Isozymic Selectivity”, *Journal of Medicinal Chemistry* **64**, (2021): 4462-4477. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01120

[104] F. Peng, C.-W. Meng, Q.-M. Zhou, et al., “Cytotoxic Evaluation Against Breast Cancer Cells Of Isoliquiritigenin Analogues From *Spatholobus Suberectus* And Their Synthetic Derivatives”, *Journal of Natural Products* **79**, (2016): 248-251. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00774

[105] Y.-R. Lee, X. Wang, “First Concise Total Synthesis Of Biologically Interesting Natural Licoagrochalcone B And Its Unnatural Derivatives”, *Bulletin of the Korean Chemical Society* **28**, (2007): 2523-2526. https://doi.org/10.5012/bkcs.2007.28.12.2523

[106] C. Li, Q. Chen, Y. He, et al., “Discovery Of A Chalcone Derivative As Potent Necroptosis Inhibitor For The Treatment Of Acute Kidney Injury”, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **49**, (2022): 824-835. https://doi.org/10.1111/1440-1681.13670

[107] F. E. Mulyana, S. S. W. Waskitha, D. Pranowo, M. Khairuddean, T. D. Wahyuningsih, “Synthesis Of Chalcone Derivatives With Methoxybenzene And Pyridine Moieties As Potential Antimalarial Agents*”, Pharmacia* **70**, (2023): 1305-1313. https://doi.org/10.3897/pharmacia.70.e107406

[108] A. Stafford, S. R. Allen, L. Estergreen, K. Kafle, S. T. Roberts, Z. A. Page, “Efficient Near-Infrared Photopolymerizations Using Azabodipys With Electron-Donating Groups And Intramolecular Charge Transfer”, *Macromolecules* **56**, (2023): 9804-9810. https://doi.org/10.1021/acs.macromol.3c02004

[109] S. Żubrowski, D. Krzysztofik, S. Buda, “Formation Of 2H- And 4H-Chromene Rings In Intramolecular Rauhut–Currier Reaction, Catalyzed By Lithium Selenolates”, *ACS Omega* **10**, (2025): 3652-3664. https://doi.org/10.1021/acsomega.4c08613

[110] P. Ahmad, H. Woo, K.-Y. Jun, et al., “Design, Synthesis, Topoisomerase I & II Inhibitory Activity, Antiproliferative Activity, And Structure–Activity Relationship Study Of Pyrazoline Derivatives: An ATP-Competitive Human Topoisomerase IIα Catalytic Inhibitor”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **24**, (2016): 1898-1908. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.03.017

[111] A. Armstrong, R. D. C. Pullin, C. R. Jenner, J. N. Scutt, “Amine-Promoted Synthesis Of Vinyl Aziridines”, *The Journal of Organic Chemistry* **75**, (2010): 3499-3502. https://doi.org/10.1021/jo100407s

[113] A. Sharma, N. Sharma, A. Shard, et al., “Tandem Allylic Oxidation–Condensation/Esterification Catalyzed By Silica Gel: An Expeditious Approach Towards Antimalarial Diaryldienones And Enones From Natural Methoxylated Phenylpropenes”, *Organic & Biomolecular Chemistry* **9**, (2011): 5211-5219. https://doi.org/10.1039/c1ob05293d

5.2. CAPÍTULO II – Avaliação do potencial terapêutico da chalcona 27 em modelo animal de tuberculose pulmonar grave.

5.2.1. Avaliação do efeito da chalcona 27 no crescimento bacteriano nos pulmões de camundongos C57Bl/6 infectados pela cepa hipervirulenta M299

A partir dos resultados satisfatórios obtidos nos ensaios *in vitro* e *in silico* para a série de chalconas, observado no capítulo I a chalcona **27** foi selecionada para a continuidade dos estudos a fim de obter protótipos promissores com ação *dual* para o tratamento da TB pulmonar grave. A chalcona **27** exibiu elevada atividade antimicobacteriana em conjunto com ampla ação anti-inflamatória, além de propriedades farmacocinéticas *in silico* favoráveis em comparação às demais substâncias avaliadas.

Para avaliar o potencial terapêutico da chalcona **27** *in vivo* utilizamos um modelo bem estabelecido de camundongos C57BL/6 infectados com uma cepa Mtb hipervirulenta. O modelo reproduz importantes aspectos da TB pulmonar grave em humanos, incluindo progressão contínua da infecção, aumento da carga bacilar pulmonar, desenvolvimento de pneumonia tuberculosa associada à necrose tecidual e disseminação para órgãos como o baço e o fígado, podendo ser observado área de granulomas organizados, de infiltrado inflamatório intenso e áreas de necrose pulmonar, características particularmente útil para a investigação de novos candidatos terapêuticos e estratégias de modulação da resposta imune do hospedeiro (ALMEIDA et al., 2017). Nosso grupo de pesquisa descreveu, em trabalhos anteriores, a utilização do modelo experimental *in vivo* como uma plataforma bem-sucedida para a avaliação do potencial terapêutico de diferentes substâncias, tais como chalconas e tioureias, no contexto da

TB pulmonar grave (SIMÃO, 2015; CALIXTO, 2022). Desta forma, o modelo experimental permite investigar os efeitos terapêuticos da chalcona **27** sobre o controle da multiplicação bacilar como também, avaliar a capacidade de prevenção ou redução de lesões necróticas, da modulação da resposta inflamatória e de preservação da arquitetura tecidual.

O potencial terapêutico *dual* da chalcona **27** foi comparado ao da rifampicina, fármaco padrão no tratamento da TB pulmonar, e ao do ibuprofeno, fármaco anti-inflamatório. Inicialmente, a eficácia antimicobacteriana da chalcona **27** foi determinada pela quantificação da carga bacilar pulmonar, considerada um dos principais indicadores da progressão da infecção.

Conforme mostrado na **Figura 16**, após 15 e 30 dias de tratamento, os grupos de animais tratados com a chalcona **27** e com rifampicina, apresentaram redução significativa da carga bacilar pulmonar em comparação ao grupo infectado não tratado (Mtb) ($p < 0,01$ e $p < 0,05$).

Após 15 dias de tratamento, o derivado **27** reduziu 1,4 de Log_{10} na carga bacilar pulmonar em relação ao grupo infectado não tratado. O efeito inibitório foi mantido após 30 dias de tratamento, com a diminuição de 1,3 Log_{10} de UFC nos pulmões dos animais comparado ao grupo infectado e não tratado (**Figura 16**). É fundamental destacar que a capacidade da chalcona **27** em reduzir a carga bacilar pulmonar foi comparável à ao tratamento com o fármaco anti-TB padrão, a rifampicina, não sendo detectadas diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p > 0,05$), embora a dose de tratamento da rifampicina tenha sido metade da dose utilizada para a chalcona **27**, os animais tradados com o antibiótico apresentaram diarreia de forma expressiva, o que poderia ser exacerbado em dose maior e culminar no agravamento da condição experimental devido a perda de peso e impacto a microbiota.

Em comparação com os resultados descritos por Ventura, T.L.B. (2015) em sua tese, a chalcona **5C** selecionada para avaliação *in vivo* sob similares condições de tratamento (dose e via de administração) e de modelo murino experimental, a chalcona **27** apresentou potencial comparável a chalcona **5C**, que reduziu 1,8 Log_{10} da carga bacilar pulmonar após 15 dias de tratamento, embora inferior ao observado para o tratamento com a rifampicina no mesmo período. Contudo, após 30 dias de tratamento, o potencial da chalcona **5C** foi superior reduzindo 3 Log_{10} do UFC pulmonar e de forma comparável ao tratamento com rifampicina.

No presente estudo, embora a chalcona **27** tenha promovido uma redução mais modesta da carga bacilar o potencial inibitório não diferiu do observado para a rifampicina nos períodos avaliados, especialmente nos estágios iniciais do tratamento. Além disso, é importante ressaltar o perfil bacteriostático *in vitro* da chalcona **5C** enquanto a chalcona **27** apresentou um perfil bactericida (**Tabela 4**, **cap. I**), que pode contribuir para o observado no tratamento durante o estágio agudo, embora seja necessário considerar as limitações de extrapolação relativas à complexidade do modelo *in vivo* e a verificação do mecanismo de ação anti-TB frente a Mtb H37Rv. Marrapu et al. (2011) descreveram o potencial moderado do tratamento oral diário (100mg/kg) por 28 dias com uma chalcona imidazolilada com um grupo 2,4-difluorobenziloxi, reduzindo em 40% a carga bacilar pulmonar em camundongos Swiss infectados por via intravenosa com 10^7 UFC de Mtb H37Rv. Contudo, a diferença no modelo experimental e a expressão dos resultados em percentual impossibilitam uma comparação em termos de potencial.

Embora o tratamento com o fármaco anti-inflamatório ibuprofeno tenha promovido uma redução de aproximadamente 0,95 e 0,7 Log_{10} na carga bacilar pulmonar após 15 e 30 dias de tratamento, essa diminuição não foi estatisticamente significativa quando comparada ao grupo infectado não tratado ($p > 0,05$) e foi inferior ao potencial da chalcona 27 em 1,2 Log_{10} (**Figura 16**). Estudos anteriores na literatura, utilizando diferentes modelos animais e vias de administração, divergem quanto ao potencial terapêutico do ibuprofeno, na infecção por Mtb. Byrnes et al. (2007) descreveram o potencial reduzido do tratamento oral diário por 30 dias, iniciando 1 dia p.i., com ibuprofeno (10-40mg/kg) para reduzir a carga bacilar pulmonar em modelo de camundongos BALB/c infectados via aerossol por Mtb H37Rv (suscetíveis à Mtb com predisposição genética à resposta do tipo Th2), embora, quando combinado ao tratamento com pirazinamida sob as mesmas condições experimentais, tenha aumentado o efeito anti-TB da pirazinamida. Vilaplana et al. (2013) mostraram que o tratamento oral isolado com ibuprofeno diariamente (80 mg/kg) por 1 semana, iniciado 3 semanas p.i., reduziu a carga bacteriana pulmonar em animais C3HeB/FeJ, altamente suscetíveis à TB, infectados pela via intravenosa com 2×10^4 UFC de Mtb H37Rv Pasteur. Em 2019, Mortesen et al. mostraram que a via de infecção é um fator preponderante para a avaliação do potencial terapêutico do ibuprofeno no contexto da TB pulmonar, a alteração da via de infecção de intravenosa (5×10^4 UFC/animal) para aerossol (25-50 UFC/animal) em camundongos CB6F1 (linhagem mais resistente à Mtb) com Mtb Erdman, pode aumentar a carga bacteriana por redução da capacidade

protetora de células TCD4^{+}. Desta forma, a discrepância entre os resultados obtidos aos modelos anteriores pode ser causada por diversas diferenças na abordagem experimental de infecção e tratamento.

A dificuldade em promover uma redução expressiva da carga bacilar foi observada em todos os tratamentos avaliados. Isto pode estar relacionado às características de cepas hipervirulentas de Mtb, que apresentam elevada capacidade de multiplicação intracelular e rápida expansão bacteriana durante as fases iniciais da infecção (RIBEIRO et al., 2014). Estudos experimentais demonstraram que cepas hipervirulentas exibem taxas de crescimento significativamente superiores às observadas em cepas de menor virulência, especialmente durante os primeiros 28 dias de infecção *in vivo*, favorecendo maior persistência tecidual e agravamento das lesões patológicas (KIM et al., 2015; ALMEIDA et al., 2017).

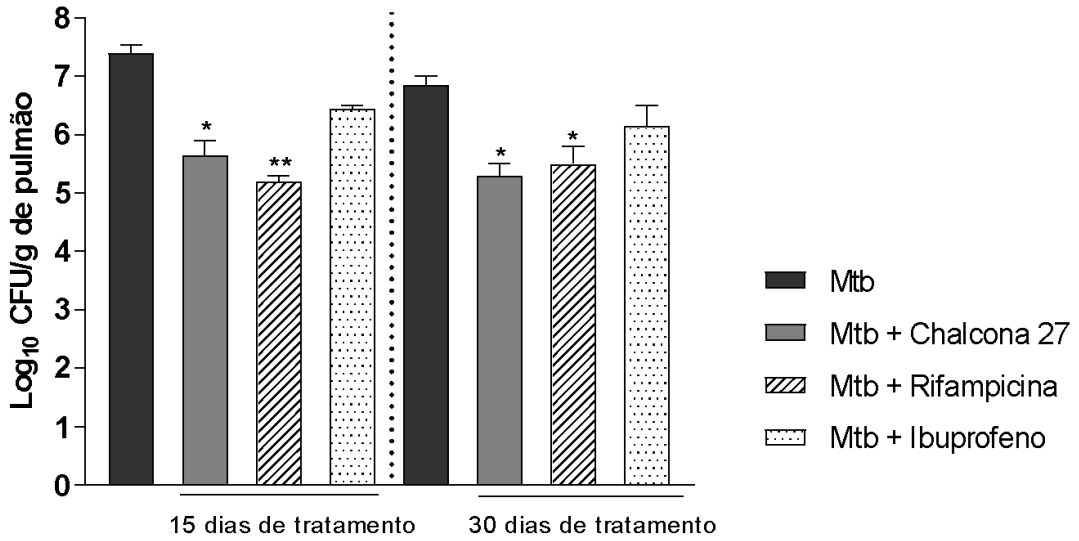


Figura 16. Efeito da chalcona 27, ibuprofeno ou rifampicina no crescimento intracelular de *M. tuberculosis* nos pulmões dos camundongos C57Bl/6 infectados. Os animais foram infectados com 100 bacilos da cepa hipervirulenta Mtb M299 por via intratraqueal. Após 15 dias de infecção, o tratamento diário de cada grupo de animais (n=5) foi realizado por via intraperitoneal durante 15 e 30 dias. A dose de tratamento nos animais infectados foi: chalcona 27 (20 mg/kg), rifampicina (10 mg/kg) ou ibuprofeno (40 mg/kg). O crescimento micobacteriano nos pulmões foi avaliado através da contagem de CFU. Os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão e p< 0,01 (**) e p< 0,05 (*) foi obtido comparando cada grupo tratado com o grupo de animais apenas infectado.

5.2.2. Avaliação do efeito da chalcona 27 na patologia dos pulmões de camundongos C57Bl/56 infectados com a cepa hipervirulenta M299

A avaliação do impacto do tratamento com a chalcona **27** na macropatologia pulmonar iniciou-se pela determinação da massa pulmonar relativa (**Figura 17A**) e do

peso pulmonar total expressos em gramas (**Figura 17B**), comparado ao observado para os grupos tratados com a rifampicina, ibruprofeno e em relação ao grupo de animais infectados sem tratamento (Mtb).

Como observado na **Figura 17**, os animais infectados sem tratamento apresentaram aumento da massa relativa e do peso pulmonar em comparação aos animais controle (não infectados), compatível com o excessivo influxo de células inflamatórias para o pulmão e o desenvolvimento de pneumonia tuberculosa associada à necrose tecidual (ALMEIDA et al., 2017). Em 30 dias após a infecção, fase aguda da doença, os animais somente infectados exibiram massa relativa pulmonar 2,8 vezes superior à dos animais controle, um acréscimo de 0,33 g de peso. Após 45 dias, início da transição para a fase crônica, a massa relativa dos animais somente infectados foi de 2,5 vezes a do grupo controle e o peso pulmonar exibiu ligeira redução, o que correlaciona com a capacidade natural do modelo C57Bl/6 estabelecido, de controlar a infecção e a inflamação, possibilitando a progressão da patologia pulmonar (ALMEIDA et al., 2017).

Em comparação com os animais somente infectados (grupo Mtb), o grupo tratado com a chalcona **27** por 15 dias reduziu a massa pulmonar relativa em 2 vezes, o que corresponde a uma diminuição de 50% em relação ao grupo Mtb (**Figura 17A**). O peso pulmonar médio dos animais deste grupo foi de 0,22 g, aproximadamente 56% menor em relação ao grupo somente infectado ($p< 0,01$) (**Figura 17B**). Após 30 dias de tratamento, a massa relativa pulmonar dos animais tratados com chalcona **27** manteve-se em 1,3 (**Figura 17A**), o que coincide com a permanência do peso pulmonar em aproximadamente 0,23 g, representando uma diminuição de 51% em comparação ao grupo infectado (Mtb) (**Figura 17B**).

Da mesma forma, os animais tratados com a chalcona **27** exibiram massa relativa e peso pulmonar comparáveis ao tratamento com o ibuprofeno em 15 e 30 dias, o que corrobora o potencial anti-inflamatório do derivado observado nos estudos *in vitro* realizados.

Diferente do observado no tratamento com a chalcona **27** e com o ibuprofeno, os animais tratados apenas com o antibiótico rifampicina durante 15 dias, exibiram redução na massa relativa de apenas 1,4 vezes comparado ao grupo de animais somente infectado (**Figura 17A**) enquanto o peso pulmonar foi de aproximadamente 0,39 g, umaredução de 22% (**Figura 17B**). Mesmo após 30 dias de tratamento, a redução na massa relativa e no peso pulmonar dos animais tratados com rifampicina manteve-se

inferior à observada nos animais tratados com a chalcona **27** e com ibuprofeno, sendo o único grupo sob tratamento que não diferiu significativamente do grupo de animais apenas infectados ($p > 0,05$). É importante destacar que os animais tratados com a chalcona **27** diferiram significativamente dos tratados com rifampicina em relação ao peso pulmonar. Isto evidencia que, embora a rifampicina exiba capacidade de eliminação dos bacilos Mtb comparável à chalcona **27**, a presença de propriedades anti-inflamatórias conjunta nesta última é fundamental para controle do microambiente inflamatório culminando na menor massa relativa e peso pulmonar dos animais tratados.

Ao comparar os resultados obtidos por Ventura (2015) para a chalcona **5C**; a chalcona **27** apresentou efeito comparável sobre os parâmetros de massa relativa e peso pulmonar. Ventura et al. (2015) descreveram a redução no peso pulmonar dos animais tratados com a chalcona **5C**, em condição experimental similar, em 45% após 15 dias de tratamento, alcançando 52% após 30 dias, comparado ao grupo somente infectado. Ambas as chalconas apresentaram potencial superior ao da rifampicina neste parâmetro.

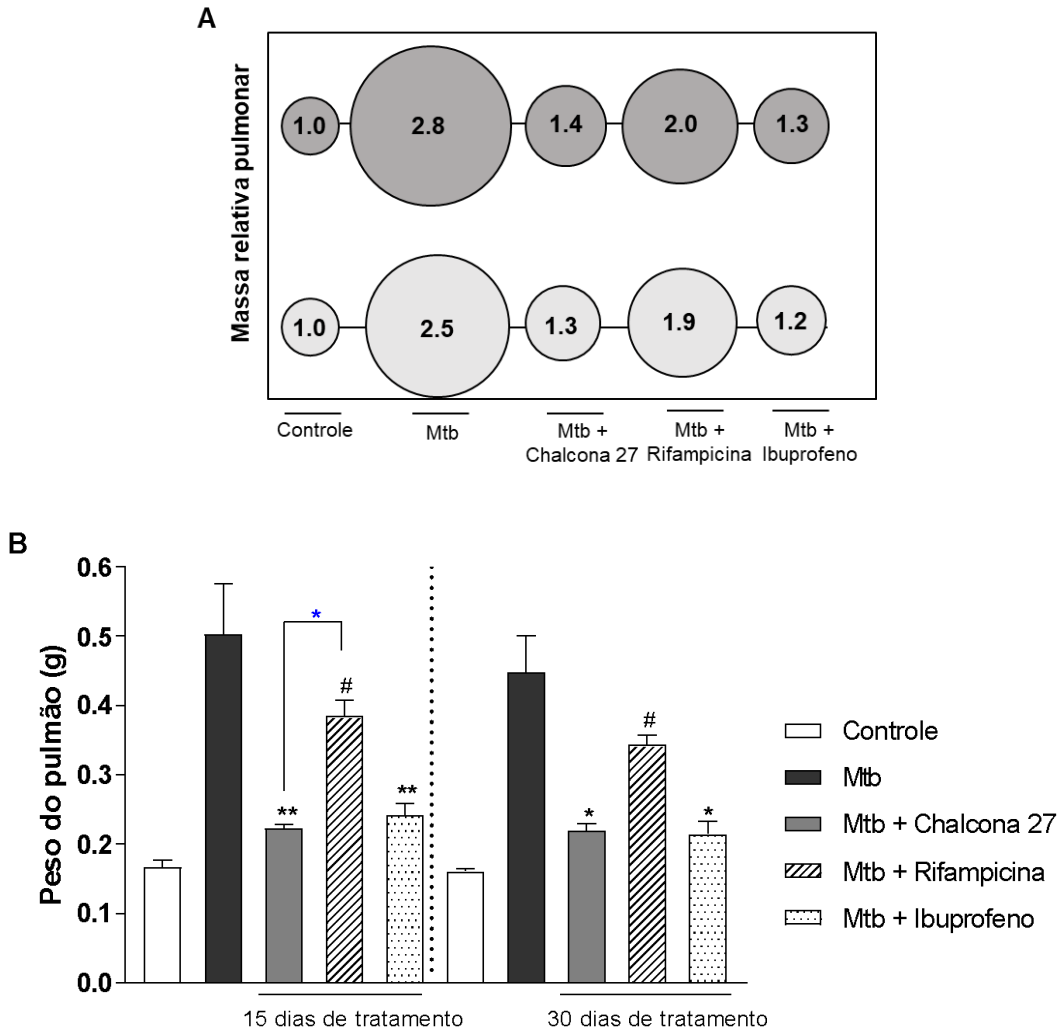


Figura 17. Efeito do tratamento com a chalcona 27, ibuprofeno ou rifampicina na macropatologia pulmonar induzida pela cepa *M. tuberculosis* hipervirulenta nos pulmões dos camundongos C57Bl/6 infectados. Os animais foram infectados com 100 bacilos da cepa hipervirulenta Mtb M299 por via intratraqueal. Após 15 dias de infecção, o tratamento diário de cada grupo de animais (n=5) foi realizado por via intraperitoneal durante 15 e 30 dias. A dose de tratamento nos animais infectados foi: chalcona 27 (20 mg/kg), rifampicina (10 mg/kg) ou ibuprofeno (40 mg/Kg). A macropatologia pulmonar foi avaliada através da obtenção da massa relativa pulmonar determinada pela razão entre a média do peso pulmonar dos animais de cada grupo e a média do peso pulmonar dos animais controles (**A**) e pelo peso pulmonar aferido em balança de precisão expresso em gramas (**B**). Os resultados apresentados foram apresentados como média ± desvio padrão. A diferença estatística foi analisada através da comparação de cada grupo tratado com o grupo de animais apenas infectado ($p< 0,01$ (**) e $p< 0,05$ (*)), com o grupo controle ($p< 0,05$ (#)) e grupos tratados diferentes do grupo tratado com a chalcona 27 ($p< 0,05$ (*)).

De forma prévia, o impacto do tratamento com a chalcona **27** em animais sadios, foi avaliado por análise comportamental (atividade locomotora, autolimpeza, peso corporal, consumo de água e ração) e possíveis efeitos tóxicos hepáticos através da análise histológica de secções do fígado. É fundamental a avaliação pré-clínica de novos candidatos a fármacos em contexto animal saudável previamente à análise em condições experimentais associadas a doenças, uma vez que a lesão hepática induzida

por medicamentos é a mais comum encontrada em estudos de toxicologia regulatórios e um obstáculo ao desenvolvimento de fármacos (BALLET, 2015; EZHILARASAN et al., 2025).

Camundongos C57BL/6 sadios foram tratados por via intraperitoneal com a chalcona **27** na dose de 20 mg/kg durante 15 e 30 dias. A análise comportamental diária por 30 a 60 minutos de ambos os grupos animais não evidenciou perda ou dificuldade motora, ou interferências no hábito de autolimpeza, assim como não foi observada perda de peso corporal ou alterações no consumo de água e ração para estes animais através de monitoramento 1x/semana ao longo do período experimental comparado aos animais sadios não tratados. Adicionalmente, a avaliação histopatológica de secções do fígado dos animais em colaboração com o patologista Prof. Dr. Eulógio Queiróz/LSA/UENF não indicou alterações morfológicas, inflamatórias ou degenerativas atribuíveis ao tratamento, sugerindo um perfil de segurança favorável para a chalcona **27** nas condições avaliadas (**Figura 18**). Os cortes histológicos dos pulmões destes grupos de animais (controle e animais sadios tratados com chalcona) foram incluídos na análise para comparação com os grupos de animais infectados, sob tratamento ou não.

Em conjunto à avaliação de parâmetros macropatológicos, foi realizada a análise histopatológica do tecido pulmonar por meio de cortes corados com hematoxilina-eosina (H&E) e Ziehl-Neelsen (ZN). Essa abordagem permitiu caracterizar tanto as alterações morfológicas associadas à infecção quanto a presença de BAAR no parênquima pulmonar.

A análise das secções histológicas dos animais somente infectados com a cepa Mtb hipervirulenta indicou o satisfatório estabelecimento do quadro de TB pulmonar grave, conforme descrito por estudos anteriores do grupo de pesquisa, os pulmões dos animais infectados apresentavam intenso infiltrado inflamatório, comprometimento da arquitetura pulmonar e áreas de pneumonia tuberculosa, mostrarando a capacidade da cepa hipervirulenta de induzir uma infecção progressiva associada a extensas alterações histopatológicas pulmonares (RIBEIRO et al., 2014; SIMÃO, 2015; ALMEIDA et al., 2017, CALIXTO, 2022).

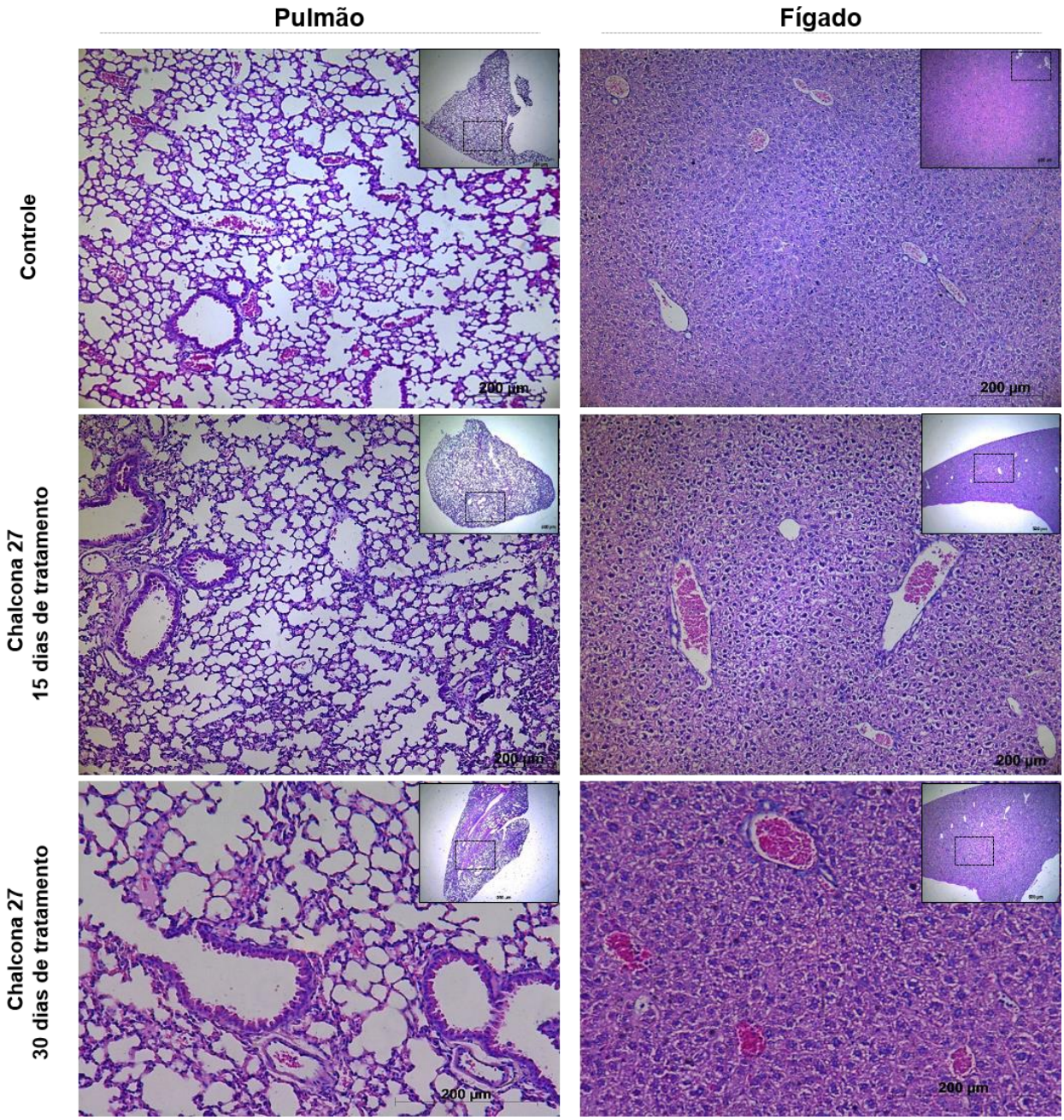


Figura 18. Análise histopatológica de camundongos C57BL/6 controle e animais não infectados e tratados com chalcona 27. Camundongos C57Bl/6 sadios foram separados em grupos controle (sem tratamento) e grupos tratados por via intraperitoneal por 15 e 30 dias com a chalcona **27**. O lóbulo pulmonar esquerdo foi fixado em formol e processado para a obtenção de lâminas coradas com hematoxilina-eosina (HE). As lâminas foram observadas em microscópio óptico com aumento de 25X.

Após 30 dias de infecção, os pulmões dos animais infectados sem tratamento apresentaram extensa área de pneumonia tuberculosa, correspondendo a aproximadamente 81,4% da área total analisada (**Figuras 19-20**). A região central da lesão apresentou grandes nódulos granulomatosos coalescentes resultantes de lesões

primárias e extensas áreas de necrose caseosa (estrela preta), associadas à presença de grande quantidade de BAAR distribuídos predominantemente no ambiente necrótico extracelular (**Figura 19 A** e **C**). Circundando as áreas necróticas, observou-se regiões periféricas de alveolite (seta preta), caracterizada pelo espessamento dos septos alveolares e pelo intenso infiltrado inflamatório, de neutrófilos, macrófagos e linfócitos nos alvéolos e bronquíolos.

Nas regiões de alveolite, verificou-se a presença de debris celulares associado a elevada carga de BAAR nas vias aéreas (setas laranjas). As áreas adjacentes aos nódulos granulomatosos e a região de alveolite apresentavam acentuado acúmulo de exsudato seroso (estrela verde), compatível com aumento da permeabilidade vascular e edema inflamatório associados ao processo infeccioso. Trabalhos na literatura descreveram o granuloma tuberculoso como um microambiente dinâmico no qual a resposta inflamatória, especialmente a neutrofílica, participa do controle parcial da infecção e da amplificação do dano tecidual e da manutenção de nichos permissivos à persistência bacilar (DE MELLO et al., 2019). Além disso, a presença de bacilos no centro necrótico do granuloma reforça a ideia de que áreas de necrose caseosa constituem locais favoráveis à persistência extracelular de Mtb, contribuindo para a progressão da lesão pulmonar (SANTOS et al., 2025).

Embora a área de lesão ainda permaneça extensa em 45 dias pós-infecção, os pulmões dos animais somente infectados apresentaram ligeira redução das áreas de alveolite e a área de pneumonia tuberculosa correspondeu a 73% da área pulmonar analisada (**Figuras 19-20**). Os resultados estão em acordância com a contenção parcial do processo inflamatório pulmonar durante a transição da fase aguda para a fase crônica da doença, compatível com o estabelecimento natural de mecanismos imunológicos capazes de promover o controle da infecção (ALMEIDA et al., 2017), o que correlaciona com a ligeira diminuição da massa relativa e do peso pulmonar neste período (**Figura 17**).

Os pulmões dos animais infectados e tratados por 15 dias com a chalcona **27** exibiram significativa diminuição na extensão das áreas de alveolite, bem como diminutas regiões de necrose intragranulomatosa e de acúmulo de exsudato seroso nas áreas adjacentes às lesões granulomatosas (**Figura 19 D**). A redução expressiva da área acometida por pneumonia tuberculosa, foi de aproximadamente 52,1% comparado ao observado no grupo de animais infectados não tratados (**Figura 20**). A maior preservação da arquitetura pulmonar também foi observada nos animais tratados com a

chalcona **27** reforçando sua capacidade de limitar a progressão do dano tecidual associado à infecção. (**Figura 19 D**), o que correlaciona com o reduzido peso e massa pulmonar relativa observada para os animais deste grupo (**Figura 17**).

A coloração de secções pulmonares por Ziehl-Neelsen evidenciou menor quantidade de BAAR nos pulmões dos animais tratados com a chalcona **27** quando comparados ao grupo infectado não tratado (**Figura 19 C e F**), o que é corroborado pela quantificação reduzida de UFC no homogenato pulmonar destes animais (**Figura 16**).

Com maior tempo de tratamento (30 dias), a área de patologia pulmonar manteve-se reduzida, em 54% em comparação ao observado para os animais infectados e não tratados (**Figuras 19 e 20**), além de menor quantidade de BAAR (**Figura 19**).

Esses dados demonstraram que o tratamento com a chalcona **27** exerce um efeito benéfico duplo, antimicobacteriano e anti-inflamatório, para o tratamento da TB pulmonar grave, em consonância com a literatura que mostram que as chalconas podem ser agentes promissores para abordagens HDT devido a combinação da elevada ação anti-TB através de mecanismos múltiplos e pela atividade anti-inflamatória intrínseca para a maioria das estruturas obtidas (MISHRA e JANA, 2024). Estudos *in vivo* envolvendo chalconas e análogos no contexto da TB, especialmente associados à patologia grave, representam uma lacuna de informações sobre o potencial desses flavonoides. Marrapu et al. (2011) investigaram o potencial das chalconas apenas sob o aspecto da carga bacilar pulmonar. Simão (2015) demonstrou o efeito terapêutico significativo na redução da patologia pulmonar induzida pela infecção por Mtb para o tratamento com a chalcona **5C**, sob condições similares de modelo animal e dose. Durante os 15 primeiros dias de tratamento, ambas as chalconas apresentaram potencial comparável em reduzir o desenvolvimento de áreas de patologia pulmonar, contudo, em 30 dias de tratamento, o tratamento com a chalcona **27** reduziu 10% a mais destas áreas comparado à chalcona **5C**. A substituição no anel B do derivado **27** por um anel heterocíclico piridínico na posição 4 mostrou-se uma otimização farmacológica benéfica em relação à presença da substituição 3,4-metilenodioxi, presente na chalcona 5C.

A comparação entre os tratamentos com chalcona **27** e o ibuprofeno mostrou que, após 15 e 30 dias, os tratamentos não diferiram significativamente entre eles ($p > 0,05$), tendo ambos promovido redução da área de pneumonia tuberculosa (**Figura 20**). Histopatologicamente, os pulmões dos animais tratados com ibuprofeno apresentaram menor extensão das áreas de alveolite e redução do infiltrado inflamatório celular em comparação aos animais infectados não tratados (**Figura 19**). Adicionalmente, observou-

se diminuição da quantidade de BAAR (**Figura 19**). É importante destacar que após 30 dias de tratamento com a chalcona **27**, os pulmões dos animais diferiam mais significativamente em relação à extensão da área de pneumonia do grupo somente infectado, quando comparados aos pulmões dos animais tratados com o ibuprofeno, o que pode ser observado nos cortes corados por H&E com uma tendência de áreas de alveolite e de infiltrados inflamatórios mais estendidas como também a presença de pequena área de necrose (**Figuras 19 e 20**), e nos cortes corados por ZN, uma maior presença de BAAR. Isto sugere que a elevada ação anti-Mtb da chalcona **27**, observada em nosso modelo de forma reduzida para o tratamento com o ibuprofeno, favoreceu melhor desfecho no período de progressão da doença para a fase crônica, onde a evolução da doença resulta tanto da multiplicação de Mtb quanto da resposta inflamatória exacerbada do hospedeiro. Contudo, a monoterapia oral diária com o dobro da dose de ibuprofeno, utilizada em nosso estudo, em modelo murino C3HeB/FeJ infectados i.v. com 2 x 10^4 UFC de Mtb H37Rv Pasteur, mostrou que em virtude da via de administração causar disseminação bacilar imediata para órgãos imunocompetentes, como o baço, remontando uma rápida inflamação sistêmica, o tratamento com ibuprofeno teve efeito sobre a carga bacilar pulmonar e na redução significativa do número e tamanho das lesões pulmonares (VILAPLANA et al., 2013).

Em comparação aos animais tratados com a chalcona **27** aqueles tratados com rifampicina, exibiram extensas áreas de comprometimento pulmonar, regiões de alveolite circundadas por exsudato seroso acumulado e a presença de grandes áreas necróticas no parênquima pulmonar (**Figura 19**), o que correspondeu a aproximadamente 61,2% do tecido pulmonar após 15 dias de tratamento (**Figura 20**). Mesmo o tratamento de 30 dias com a rifampicina, não reduziu eficientemente a progressão da patologia pulmonar necrótica, onde os pulmões dos animais tratados exibiram 51,8% de área de pneumonia. A presença de BAAR extracelulares em áreas de necrose foi observada neste grupo (**Figura 19**). Interessantemente foi demonstrado que fármacos menos lipofílicos e/ou muito grandes se acumulam gradualmente no caseum através de um equilíbrio entre o transporte ativo, ligação a proteínas e propriedades físico-químicas, onde a rifampicina tem baixa captação por macrófagos e se acumula lentamente no caseum se ligando a macromoléculas em núcleos necróticos o que dificulta a difusão passiva do fármaco através do caseum avascular, contudo somente ter penetração favorável e atividade por si só não é suficiente, a distribuição heterogênea e cinética diferencial entre compartimentos pode criar janelas temporais e espaciais em nichos específicos

permitindo a multiplicação bacilar (PRIDEAUX et al., 2015; SARATHY et al., 2016). Quanto à capacidade de penetração e de acúmulo em áreas necróticas, são necessários estudos mais aprofundados para a chalcona **27**.

Isto demonstra que embora a rifampicina tenha apresentado maior capacidade na redução da carga bacilar, o efeito não acompanhado por um controle ou diminuição proporcional da inflamação pulmonar excessiva culminam na persistência da resposta inflamatória e da destruição do parênquima pulmonar, o que favorece o perfil terapêutico adjuvante da chalcona **27**. Os dados estão em consonância com revisões recentes sobre HDTs no contexto da TB, evidenciando que o controle da inflamação deletéria é necessário para complementar o efeito antimicrobiano clássico e reduzir sequelas pulmonares (CUBILLOS-ANGULO et al., 2022; UDINIA et al., 2023; OEHLERS et al., 2026).

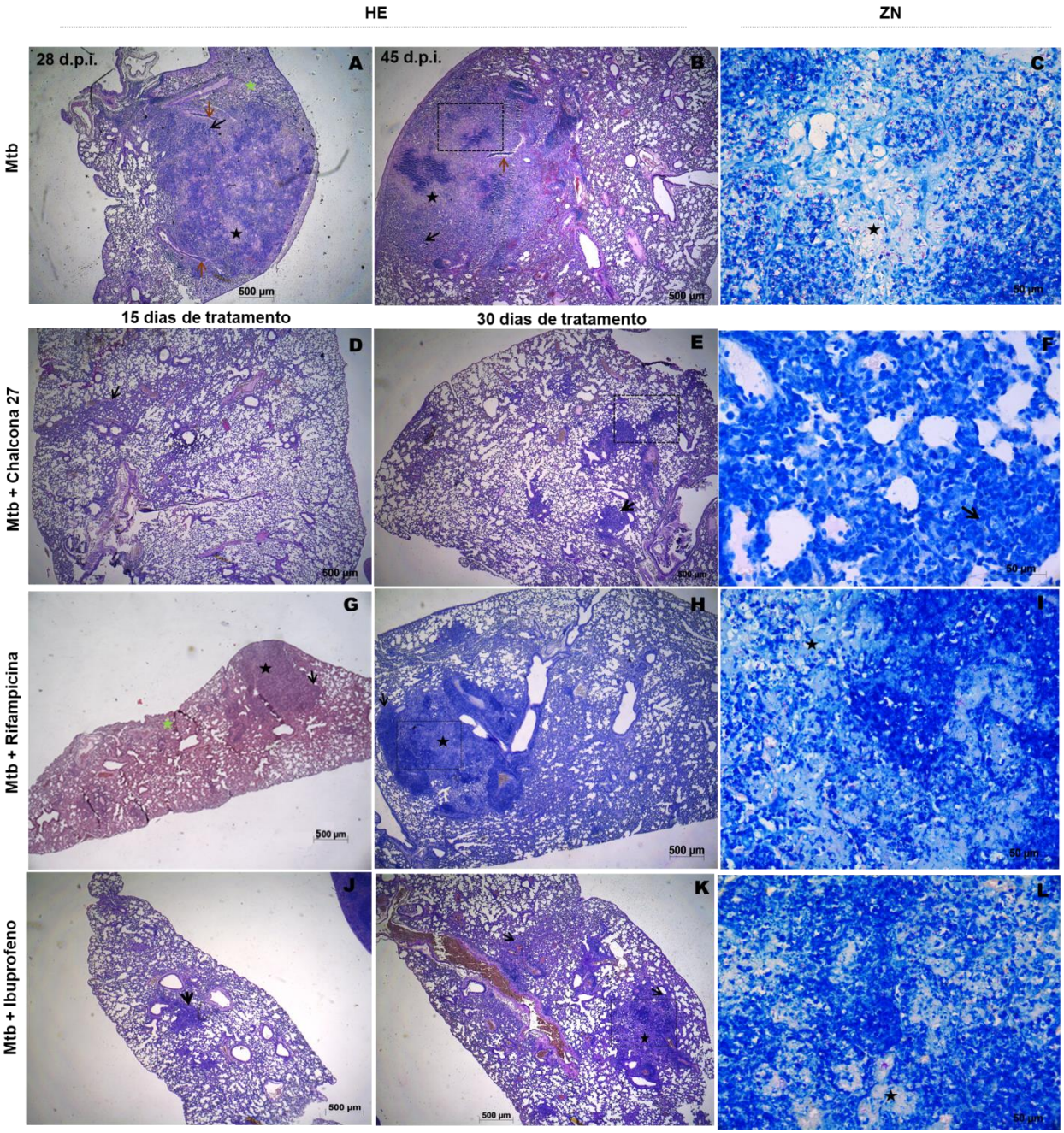


Figura 19. Análise histopatológica dos pulmões dos camundongos C57BL/6 infectados sem ou sob tratamento por 15 e 30 dias com a chalcona 27, ibuprofeno ou rifampicina. O lóbulo pulmonar esquerdo foi fixado em formol e processado para a obtenção de lâminas coradas com hematoxilina-eosina (HE) e através do método de Ziehl Neelsen (ZN). As lâminas coradas com HE foram fotografadas em microscópio óptico no aumento de 25X enquanto para a lâmina corada pela técnica de ZN, o aumento foi de 400X (área fotografada delimitada pelo quadrado preto). Setas pretas indicam áreas de alveolite. Setas laranjas indicam presença de debris celulares nas vias aéreas. A estrela preta indica área necrótica enquanto a estrela verde indica área de exsudato. Os BAAR estão corados em vermelho (ZN).

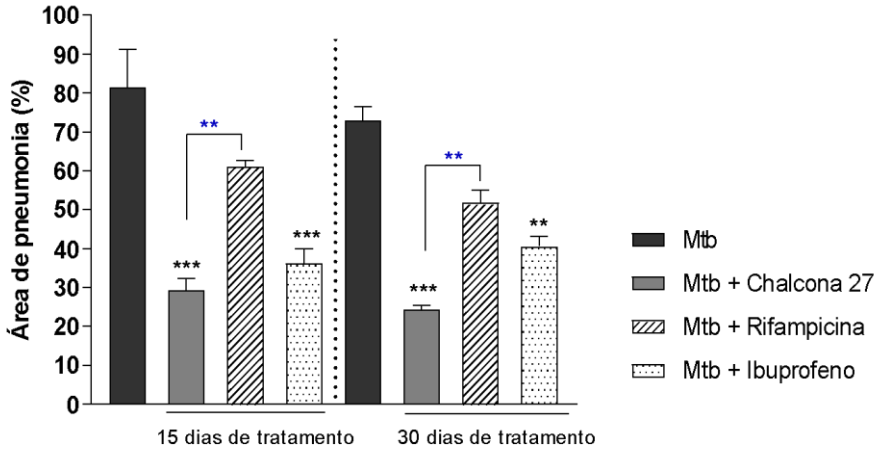


Figura 20. Efeito do tratamento com a chalcona 27, rifampicina e ibuprofeno sob a área de pneumonia nos pulmões dos animais infectados. Imagens de 5-10 seções dos pulmões de cada grupo de animais foram obtidas utilizando o sistema de câmera Axiocam MCR-5 Zeiss, no aumento de 10X. A análise de cada imagem para determinação morfométrica da área de inflamação (pneumonia) foi realizada a partir do programa Image J. A quantificação desta área foi obtida através da subtração do percentual de área pulmonar não aerada em relação a área pulmonar total (100%) de cada grupo infectado da média percentual da área não aerada nos pulmões dos animais controle (não infectados). Os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão. As análises estaísticas p< 0,001 (***) e p< 0,01 (**) são referentes a comparações de cada grupo tratado com o grupo apenas infectado, enquanto p< 0,01 (**), refere-se à comparação dos demais grupos tratados ao grupo de animais tratado com a chalcona **27**.

5.2.4. Análise do perfil de citocinas produzidas *ex vivo* pelas células dos pulmões dos camundongos C57Bl/6 infectados pela cepa hipervirulenta M299 sob efeito do tratamento com a chalcona 27

Para melhor caracterizar o perfil de mediadores inflamatórios produzidos pelas células imunesna resposta contra Mtb nos animais infectados e tratados com a chalcona **27**, avaliamos, nos sobrenadantes da cultura *ex vivo* das células pulmonares, a produção das citocinas TNF-α, IL-1β e IL-10 e a produção de óxido nítrico (NO) **figura 21**.

A quantificação desses mediadores permite inferir o balanço entre vias pró-inflamatórias e regulatórias no microambiente pulmonar, uma vez que TNF-α e IL-1β estão associados à amplificação da resposta inflamatória, enquanto IL-10 exerce função moduladora, limitando a ativação excessiva de células efetoras e contribuindo para a homeostase tecidual (O'GARRA et al., 2013; RAHMAN, 2024). De forma complementar, a mensuração dos níveis de NO produzido é amplamente empregada como indicador da ativação funcional de células da imunidade inata e da atividade microbicida em modelos de infecção, por refletir a produção de nitrito estável nos sobrenadantes celulares após reação de Griess (MIRANDA et al., 2001; BRAVERMAN e STANLEY, 2017).

Nesse contexto, a análise integrada desses mediadores permite melhor compreensão da resposta imune local no pulmão e sua relação aos mecanismos responsáveis por induzir ou limitar a imunopatologia. Essa abordagem é particularmente relevante em modelos experimentais de TB pulmonar grave, nos quais a eficácia terapêutica depende não apenas da redução da carga bacilar, mas também da modulação adequada da resposta inflamatória e da preservação da arquitetura pulmonar, refletindo a atuação integrada de mediadores pró-inflamatórios regulatórios na fisiopatologia da doença (DIRICKS et al., 2025; SARAIVA et al., 2026).

As células pulmonares provenientes dos animais infectados e não tratados apresentaram um perfil inflamatório acentuado, caracterizado pela secreção de elevados níveis de NO, TNF-α e IL-1β nos sobrenadantes das culturas *ex vivo* (**Figura 21 A-C**), concomitante à produção da citocina imunorregulatória IL-10 em menor concentração (**Figura 21 D**). O perfil de mediadores inflamatórios observado é compatível com a intensa resposta inflamatória observada na análise histopatológica, marcada por extensa área de pneumonia e expressiva presença de infiltrado de células inflamatórias no parênquima pulmonar. Embora não haja diferença significativa entre os níveis de concentração destes mediadores após 45 dias de infecção, verificou-se uma tendência à redução da produção dos mediadores pró-inflamatórios, visto a capacidade de animais C57Bl/6 regularem negativamente a inflamação. Este comportamento foi descrito por Almeida et al. (2017) para o modelo utilizado durante o período de transição da fase aguda para a fase crônica, mantendo-se baixos níveis destes mediadores até o 150º dia pós-infecção, sendo sugerido pelos autores a partir deste momento a reativação da inflamação.

Os níveis dos mediadores pró-inflamatórios NO, TNF-α e IL-1β secretados pelas células pulmonares dos animais infectados e tratados com a chalcona **27** foram significativamente reduzidos após 15 dias de tratamento, quando comparadas às células provenientes dos animais infectados e não tratados (**Figura 21 A-C**). Níveis reduzidos dos mediadores pró-inflamatórios foram mantidos após 30 dias de tratamento. A redução dos níveis destes foi de aproximadamente 3 a 4 vezes, evidenciando a capacidade da chalcona **27** em atenuar a resposta inflamatória pulmonar desencadeada pela infecção por Mtb.

Em contrapartida, verificou-se um aumento significativo na secreção da citocina anti-inflamatória IL-10 pelas células pulmonares dos animais infectados e tratados com a chalcona **27**, especialmente após 15 dias de tratamento, permanecendo superior ao

grupo somente infectado em 30 dias após o tratamento (**Figura 21 D**). O papel da IL-10 na limitação da imunopatologia pulmonar durante a TB, regulando a ativação excessiva de macrófagos e outras células da imunidade inata, favorece a preservação da arquitetura pulmonar e níveis adequadamente regulados dessa citocina contribuem para o equilíbrio entre mecanismos efetores e regulatórios da resposta imune sem necessariamente comprometer o controle da infecção, especialmente quando associados à manutenção de uma resposta antimicobacteriana eficiente (O'GARRA et al., 2013; SANKAR e MISHRA, 2023).

Estes achados estão em concordância com a menor observação de infiltrado inflamatório no pulmão deste grupo de animais e área de patologia reduzida, sugerindo que a chalcona **27** pode utilizar como um mecanismo de atenuação da resposta inflamatória excessiva, a capacidade de regulação da produção de mediadores pró- e anti-inflamatórios pelas células pulmonares contribuindo para aprevenção do danotecidual sem comprometer a capacidade do hospedeiro de responder à infecção, tendo em vista que não houve a supressão completa da secreção de mediadores pró-inflamatórios. A capacidade de inibição da produção de NO, TNF-α e IL-1β observada no modelo de macrófagos ativados por LPS (capítulo II) tratados com a chalcona **27** sustentou-se no modelo animal de TB pulmonar grave.

Os níveis dos mediadores pró-inflamatórios NO, TNF-α secretados pelas células pulmonares dos animais infectados e tratados com a chalcona **27** não diferiram dos observados no tratamento com o ibuprofeno em 15 e 30 dias. Entretanto, os níveis de IL-1β secretados pelas células pulmonares de animais tratados com a chalcona **27** foram substancialmente menores após 15 dias e comparáveis após 30 dias de tratamento. Além disso, as diferenças significativas nos níveis de secreção da citocina anti-inflamatória IL-10 em ambos os períodos de tratamento foram verificadas apenas no tratamento com a chalcona **27**. Trabalhos iniciais acerca do potencial adjuvante do ibuprofeno em modelos *in vivo* não avaliaram o contexto de mediadores inflamatórios no pulmão ou no plasma dos animais tratados (BYRNE et al., 2006, VILAPLANA et al., 2013). Mortesen e colaboradores (2019) reproduziram o modelo murino de TB a partir de infecção intravenosa estabelecido por Vilaplana et al. (2013) e descreveram diminuição dos níveis de IL-6 no homogenato pulmonar, embora sem redução significativa nos níveis de IL-1β, TNF-α e IL-12; os níveis de IL-10 não foram mensurados. Nosso estudo avança neste contexto mostrando que a ação do ibuprofeno na atenuação da resposta inflamatória excessiva no contexto da TB pulmonar grave,

diferentemente do observado para a chalcona **27,** não perpassa pela modulação dos níveis de IL-10. É conhecido que o ibuprofeno exerce ação anti-inflamatória principalmente pela inibição da produção de prostanoides pela via da COX, embora outros efeitos biológicos possam ser secundários à ação principal, como a inibição da translocação de NF-κB por meio da estabilização de IκBα (MAZALEUSKAYA et al., 2015). A limitação do ibuprofeno em exercer efeito rapidamente sobre a liberação de IL-1β foi descrita por estudos que demonstraram a integração de múltiplos eventos de sinalização moleculares e celulares que sustentam a ativação do complexo inflamassoma em doenças inflamatórias (HE et al., 2016; BLEVINS et al., 2022).

Em contraste, os níveis de mediadores pró-inflamatórios secretados pelas células pulmonares de animais tratados com rifampicina foram significativamente maiores (**Figura 21 A-C**), quando comparados aos observados nos tratamentos com a chalcona **27** e ibuprofeno ($p < 0,001$ e $p < 0,05$), embora os níveis de NO e TNF-α tenham sido significativamente menores quando comparados aos mensurados no sobrenadante das células pulmonares dos animais somente infectados. Adicionalmente, os níveis de IL-10 foram significativamente inferiores aos observados para o tratamento com a chalcona **27** (**Figura 21 D**) e comparáveis ao observado no tratamento com o ibuprofeno e para o grupo apenas infectado e não tratado. A rifampicina exerce sua atividade terapêutica por meio da eliminação de Mtb, ação bactericida, e em contextos de TB pulmonar não agravada, a redução rápida da carga bacilar reflete diminuição do estímulo antigênico e na ativação celular e levando a diminuição gradual da produção de citocinas inflamatórias (KATHAMUTHU et al., 2022).

Em conjunto estes dados reforçam a satisfatória capacidade da chalcona **27** em modular a resposta inflamatória em concomitância a ação anti-Mtb e a relevância da abordagem HDT ao complementar a terapia convencional a fim de reduzir a imunopatologia pulmonar, minimizando sequelas, favorecendo a recuperação clínica e potencializando a eficácia do tratamento antimicrobiano, sem substituir a ação bactericida dos esquemas terapêuticos (TIAN et al., 2025; WHO, 2025).

Trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa demonstrou que o tratamento dos animais infectados com a chalcona **5C** (SIMÃO, 2015) reduziu a secreção de mediadores inflamatórios em aproximadamente 2 a 3 vezes, com tendência ao aumento dos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10, pelas células pulmonares, associado a redução do influxo inflamatório e diminuição da área de pneumonia, corroborando o papel promissor de chalconas como protótipos líderes para o desenvolvimento de abordagens de

tratamento adjuvante. O tratamento com a chalcona **27** agregou ao potencial desta classe de flavonoides, um efeito imunomodulador significativamente superior na secreção de IL-10, o que pode sugerir melhor capacidade desta de atuar através mecanismos regulatórios da resposta inflamatória.

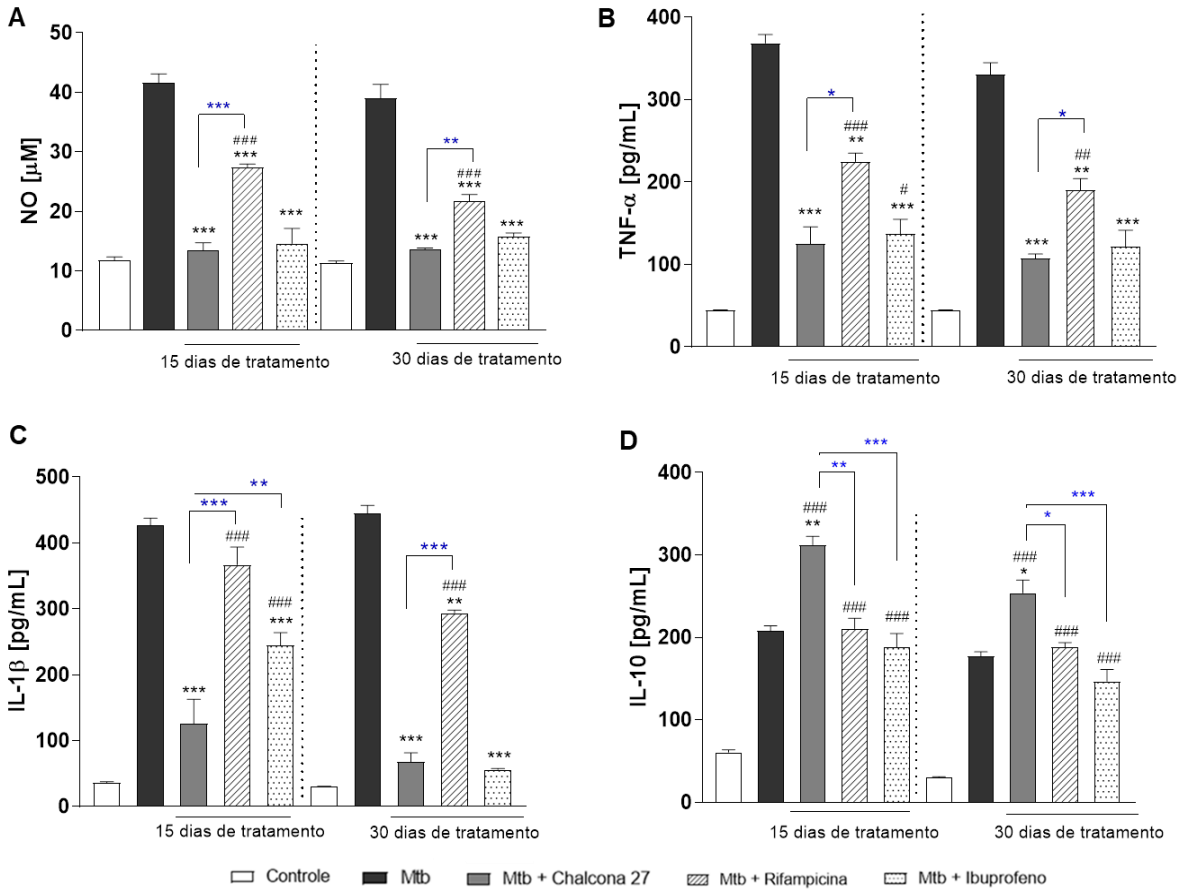


Figura 21. Análise da produção de citocinas e óxido nítrico (NO) pelas células pulmonares dos animais infectados sobre efeito do tratamento com chalcona 27, rifampicina ou ibuprofeno. As células foram extraídas do pulmão e a concentração celular foi ajustada em 2 x 10^5 células/mL para cada animal avaliado. As células foram plaquedas *ex vivo* e mantidas sob cultivo por 48 h. A partir dos sobrenadantes da cultura foram quantificados a concentração de NO (**A**), TNF-α (**B**), IL-1β (**C**) e IL-10 (**D**). Os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão. A diferença estatística foi analisada através da comparação de cada grupo tratado com o grupo de animais apenas infectado (p< 0,001 (***), p< 0,01 (**) e p< 0,05 (*)), com o grupo controle (p< 0,001 (###), p< 0,01 (##), p< 0,05 (#)) e grupos tratados diferentes do grupo tratado com a chalcona 27 (p< 0,001 (*******), p< 0,01 (******), p< 0,05 (*****)).

5.3. CAPÍTULO III - Efeito das auronas no crescimento de *M. tuberculosis* H37Rv em cultura bacteriana, na produção de NO por macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS e na viabilidade celular

Quatro derivados de auronas apresentando diferentes padrões de substituição nos anéis aromáticos foram sintetizados, exibindo substituições com grupos

metilenodioxi, hidroxila, metoxila e halogênios, a fim de investigarmos a influência dessas modificações estruturais sobre a atividade biológica. É importante ressaltar que a adição no anel B dos substituintes 3,4-metilenodioxi e 4-Cl está presente, respectivamente, nas chalconas 5C e 3C, descritas previamente como os melhores protótipos com atividade *dual* por Ventura et al. (2015), o que também motivou o design dos derivados de auronas.

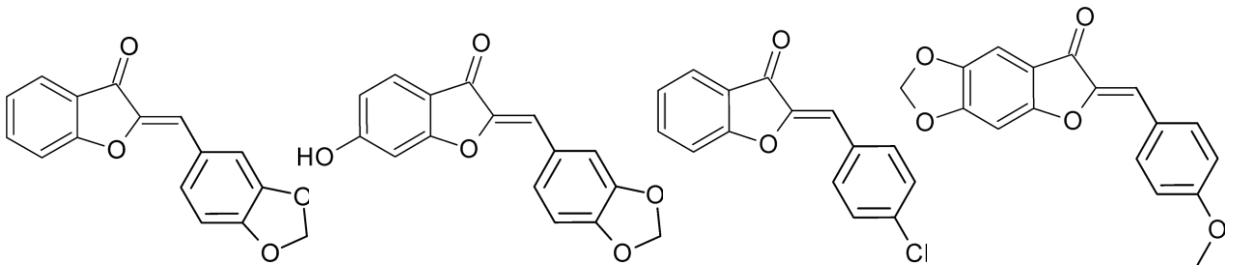


Figura 22. Estruturas químicas das auronas sintetizadas

Os derivados 36–39 foram submetidos à triagem inicial quanto ao potencial antimicobacteriano contra a cepa Mtb H37Rv, uma linhagem padrão que mantém a virulência conservada e sensibilidade aos fármacos de primeira linha, constituindo um modelo robusto para avaliação preliminar de substâncias (CLSI, 2023; BRENNAN et al., 2024).

Dois derivados, **36** e **37**, demonstraram atividade inibitória relevante frente à cepa H37Rv, apresentando valores de MIC_{50} inferiores a 10 µM, de 9,4 e 7,8 µM, respectivamente, MIC considerada promissora para substâncias protótipos na prospecção de novos agentes anti-TB (ABDJUL et al., 2025). Em contraste, os derivados **38** e **39** não apresentaram ação anti-Mtb, exibindo ambos MIC_{50} superior a 100 µM (**Tabela 7**). Contudo, os derivados ativos não mantiveram seu potencial inibitório frente à cepa Mtb hipervirulenta, com MIC_{50} > 100 µM (**Tabela 7**).

Tabela 7. Efeito dos derivados de auronas contra *Mycobacterium tuberculosis*, produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS e na viabilidade celular.

Auronas	Mtb H37Rv	Mtb M299	MTT	IS	NO
	MIC_{50} (µM)	MIC_{50} (µM)	CC_{50} (µM)	CC_{50}/MIC_{50}	IC_{50} (µM)
36	9,4 ± 1,2[a]	> 100	> 100	10,6	> 100
37	7,8 ± 1,3[a]	> 100	> 100	12,8	> 100
38	> 100	59,0 ± 1,1	> 100	1	> 100
39	> 100	> 100	> 100	1	> 100
Rifampicina[a]	0,1 ± 0.2	1,5 ± 0,1	x	x	X
***L*-NMMA[b]**	x	x	x	x	46,7 ± 2.1

[a] Fármaco anti-TB padrão; [b] Inibidor não seletivo de NOS. Valores expressos como média ± desvio padrão (DP); n = 3; X – não determinado. Índice de seletividade calculado em relação aos valores de MIC obtids para Mtb H37Rv. Valores seguidos por letras sobrescritas iguais (a) na mesma coluna não diferem significativamente entre si (p >0,05).

A presença do grupo 3-4 metilenodioxo no anel B contribuiu significativamente para a atividade anti-Mtb observada para **36** e **37**. Este sistema estrutural foi associado ao aumento da atividade biológica em flavonoides e considerados importantes farmacóforos devido à sua capacidade de modular propriedades eletrônicas e lipofílicas da molécula (MAZZIOTTI et al., 2022), além de contribuir para a manutenção da planaridade molecular, características que podem facilitar a interação com alvos biológicos e a permeação através da parede celular micobacteriana (HAUDECOEUR e BOUMENDJEL, 2012; JANKUTE et al., 2015).

Além disso, não foi observada diferença no potencial anti-TB com a adição do substituinte 6-OH no anel A do derivado **37**,embora a introdução de grupos hidroxila em flavonoides, a depender da posição e número de hidroxilas adicionadas, tenha sido amplamente associada ao aumento da potência farmacológica, em razão da maior capacidade de formação de ligações de hidrogênio e da modulação da densidade eletrônica do sistema aromático conjugado (MAZZIOTTI et al., 2022; LATHWAL e KUMAR, 2023), de forma a favorecer o reconhecimento molecular e aumentar a afinidade por determinados alvos biológicos (SUI et al., 2021).

Em contraste, a substituição do sistema 1,3 benzodioxol por 4’-Clna aurona **38** resultou na perda da atividade antimicobacteriana comparada às auronas mais ativas. Embora substituintes halogenados sejam empregados durante a síntese de compostos fenólicos para obtenção de aumento de lipofilicidade e estabilidade metabólica, o impacto sobre a atividade biológica depende fortemente da posição de substituição e do contexto estrutural da molécula (MEANWELL, 2018). Dessa forma, os resultados

sugerem que, nesta série, a presença isolada do átomo de cloro não foi capaz de reproduzir os efeitos eletrônicos e conformacionais associados ao grupo benzodioxol.

A substituição do anel A da aurona **39** com um grupo 3,4-metilenodioxi e um grupo metoxi no anel B sugere que não apenas a natureza dos substituintes, mas sua posição na estrutura aurônica desempenham papel fundamental na atividade antimicobacteriana, contudo, a presença da substituição no anel B não possibilita uma correlação direta sobre a influência da mudança do grupo 3,4-metilenodioxi entre os anéis e a capacidade inibitória.

As auronas **36** e **37** foram menos ativas do que a rifampicina, embora tenham exibido potencial inibitório comparável ao da chalcona 5C (VENTURA et al., 2015) contra Mtb H37Rv, na qual o grupo 3,4-metilenodioxi está presente no anel B. Assim, a presença do anel benzofurônico nas auronas correlacionou positivamente com a capacidade anti-Mtb H37Rv quando o grupo substituinte 3,4-metilenodioxi estava presente no anel B. Em contrapartida, a perda da atividade inibitória do derivado **38** pode estar relacionada à presença do anel benzofurônico, característico de auronas, uma vez que a ausência deste no arcabouço estrutural, como observado na chalcona 3C, conduziu a potente atividade frente à mesma cepa de Mtb.

A atividade antimicobacteriana dos derivados incorporados ao nosso estudo é descrita pela primeira vez. Na literatura, o derivado **36** exibiu moderada atividade antialimentar contra a lagarta-rosca (*Spodoptera litura*) (MORIMOTO et al., 2008). O derivado **38** foi descrito por moderada inibição não competitiva da neuraminidase do H1N1 e por baixa atividade anti-influenza (EC_{50} de 51,39 nM) (CHINTAKRINDI et al., 2020). Adicionalmente, a aurona **39** foi identificada como um potente inibidor da replicação do SARS-CoV-2, exibindo $EC_{50} < 3$ μM, na ausência de efeito citotóxico evidente em células derivadas do epitélio pulmonar Calu-3 (CALEFFI et al., 2023). Para o derivado **37** não foi encontrado descrição de atividade biológica na literatura embora sua síntese e propriedades químicas já tenham sido reportadas por Popova et al. (2016)

Yang e colaboradores (2020) descreveram a dificuldade de selecionar auronas clássicas ativas contra Mtb, incorporando ao estudo azaauronas, onde ocorre a substituição do átomo de oxigênio no benzofurano por um átomo de nitrogênio, tendo obtido significante aumento de potencial inibitório contra Mtb CDC1551 e cepas Mtb resistentes. As azaauronas também foram descritas por Campaniço et al. (2019) como protótipos mais promissores. Interessantemente, Campaniço e colaboradores (2019) descreveram como inativa contra Mtb, uma aurona que difere apenas na ausência do

grupo 3',4'-metilenodioxi do derivado **37**, corroborando nossas análises acerca da potencialidade deste grupo substituinte para as auronas. Da mesma forma, a substituição do 4'-Cl presente no derivado **38** por 4'Br, não resultou em atividade anti-Mtb para a aurona sintetizada por estes autores. O derivado também não apresentou ação inibitória contra *B. subtilis*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *E. coli* e *S. aboni* (SOMEPALLI et al., 2007).

Em conjunto as análises anti-TB, avaliamos a viabilidade celular de cultura de macrófagos RAW 264.7 frente aos derivados de auronas, células que desempenham papel central na patogênese da TB por constituírem o principal nicho intracelular de Mtb (TIAN et al., 2025). As quatro auronas (**36-39**) apresentaram valores de CC_{50} superiores a 100 μM, indicando nenhuma ou baixa interferência na viabilidade celular nas condições experimentais empregadas, o que indica que as modificações estruturais introduzidas no núcleo aurônico não comprometeram a viabilidade dos macrófagos.

A partir da determinação do índice de seletividade (IS) observamos que as auronas **36** e **37** apresentaram valores de IS > 10, considerado promissor para protótipos de fármacos anti-TB (ABDJUL et al., 2025), e também evidencia que a capacidade inibitória destes derivados não é consequência de efeitos tóxicos inespecíficos associados a um impacto deletério sobre as células hospedeiras.

No que se refere à capacidade imunomodulatória, os resultados demonstraram que os derivados não exibiram significativa capacidade de inibição da produção de NO em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS nas concentrações empregadas, apresentando valores de IC_{50} superiores a 100 μM. A triagem inicial, frente à produção de NO, considerou a ação deste como um dos principais mediadores efetores da resposta imune contra Mtb e a associação da produção excessiva e prolongada de NO ao dano tecidual e à exacerbação do processo inflamatório, especialmente em infecções crônicas (KONG et al., 2025; MOHAMMADNABI et al., 2024).

Diferentes derivados aurônicos apresentando grupos hidroxila, metoxila, amino e outros substituintes foram descritos pela capacidade de modular a interação com alvos relacionados ao processo inflamatório, incluindo NF-κB, COX-2, iNOS e citocinas pró-inflamatórias. Auronas polihidroxiladas frequentemente apresentam capacidade de modular mediadores inflamatórios, como NO, TNF-α e IL-6 (HAUDECOEUR & BOUMENDJEL, 2012).

No entanto, a presença desses grupos funcionais, isoladamente, não garante atividade biológica significativa. A eficácia farmacológica resulta da combinação entre

propriedades estruturais, conformacionais e físico-químicas que determinam o reconhecimento molecular e a capacidade do composto de estabelecer interações favoráveis com seus respectivos alvos biológicos (HAUDECOEUR; BOUMENDJEL, 2012; WANG et al., 2017; MAZZIOTTI et al., 2022). Estudos de SAR demonstraram que o potencial anti-inflamatório das auronas é fortemente dependente da natureza, posição e combinação dos substituintes presentes nos anéis aromáticos (MAZZIOTTI et al., 2022). MAZZIOTTI et al., 2022 demonstraram que a capacidade antioxidante das auronas está intimamente relacionada ao número e à posição dos grupos hidroxila presentes na estrutura molecular. Auronas contendo padrões de substituição 4′-hidroxi, 3′,4′-di-hidroxi ou 3′,4′,5′-tri-hidroxi geralmente exibem maior eficiência na eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROs), devido à maior estabilização eletrônica dos radicais intermediários gerados durante o processo antioxidante (KIM et al., 2021).

Considerando a baixa citotoxidade (CC_{50} > 100 μM), a ausência de atividade observada sugere que os requisitos estruturais necessários à ação imunomodulatória da produção de NO não estão presentes ou culminou em reduzida interação com os alvos moleculares envolvidos na regulação da produção de NO. É importante observar que as chalconas 5C e 3C (Ventura et al. 2015) que diferem respectivamente dos derivados **36** e **38** quanto à presença do anel benzofurônico, característico de auronas, exibiram elevada capacidade de inibição de mediadores inflamatórios, incluindo NO.

No contexto da inflamação, somente o derivado **38** possui descrição na literatura, exibindo atividade antioxidante frente ao radical livre estável DPPH, ao ânion superóxido e H_2O_2, ao radical hidroxil e inibindo a peroxidação lipídica do ácido linoleico, embora não tenha exibido atividade inibitória de LOX (DETSI et al., 2009; MAKHMOOR, 2013). Somepalli e colaboradores (2007) descreveram a ausência de atividade antioxidante para o derivado **38**, no método de fotorredução utilizando NBT. É importante ressaltar que a atividade observada em sistemas celulares não depende exclusivamente do potencial antioxidante intrínseco da molécula, mas também de fatores como a absorção celular, permeabilidade através das membranas biológicas e a biodisponibilidade intracelular (KIM et al., 2021). Atividade inibitória do derivado **38** e outras 7 auronas foi descrita para o modelo *in vitro* de doença inflamatória intestinal frente à adesão de monócitos às células do cólon epitelial induzida por TNF-α (KADAYAT et al., 2017). A ação hepatoprotetora através do pré-tratamento oral com a aurona **38** também foi descrita em modelo de toxidade em rato Winstar induzida por CCl_4, mantendo os níveis

de marcadores bioquímicos hepáticos séricos principalmente devido a ação antioxidante (MAKHMOOR et al., 2013).

Embora os derivados **36** e **37** tenham demonstrado seletiva e relevante atividade antimicobacteriana frente à cepa Mtb H37Rv, a ausência de potencial de inibição da produção de NO em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS culminou na não seleção destes para estudos posteriores voltados ao desenvolvimento de candidatos promissores com dupla ação anti-TB e imunomoduladora, para o tratamento da TB pulmonar grave.

6. CONCLUSÕES

- Foram avaliados 27 derivados de chalcona, 7 análagos de chalconas e 4 derivados de auronas, selecionando substâncias com potente ação dual, antimicobacteriana e anti-inflamatória;
- Em relação às auronas, os derivados **36** e **37** exibiram atividade relevante e seletiva contra MtbH37Rv, sendo a primeira descrição deste potencial para estes derivados embora não inéditos quimicamente. A presença do anel benzofurônico e do grupo substituinte 3,4-metilenodioxi no anel B correlacionou-se positivamente com a atividade observada.
- Não foi observado efeito inibitório sobre a produção de NO para os derivados de auronas avaliados, embora possam ser protótipos promissores para o desenvolvimento de novas substâncias anti-TB;
- Com relação aos derivados de chalconas, nove derivados (**3, 12, 14, 19–23** e **25**) apresentam estruturas químicas inéditas.
- Esta é a primeira descrição de ação dual, antimicobacteriana e anti-inflamatória, para os derivados e análagos de chalconas **2**, **18**, **24**, **27** e **28**, com a identificação *in vitro* dos derivados contendo o grupo benzopirano ciclado (**24**) e do bioisóstero contendo piridina (**27**) como protótipos superiores, superando neste âmbito, as chalconas 3C e 5C.
- As chalconas **2**, **18**, **24**, **27** e **28** mostraram notável eficácia contra a cepa Mtb H37Rv e em especial, contra a cepa Mtb hipervirulenta, para a qual houve perda significativa de potência da rifampicina, exercendo efeito bactericida direto

mantido no ambiente intracelular em modelo de macrófagos murinos (RAW 264.7) infectados;

- A chalcona **27** exibiu eficácia antimicobacteriana sustentada em modelo de macrófagos humanos (THP-1) infectados por 10 dias.
- A ação anti-inflamatória dos derivados **2**, **18**, **24**, **27** e **28** na produção de NO foi mediada pela supressão da expressão de iNOS, e não pela eliminação inespecífica de radicais livres. Além de mostrarem potencial comparável à do ibuprofeno para inibir a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1β e TNF-α;
- A análise de SAR dos derivados de chalconas confirmou que a rigidez estrutural e a substituição bioisostérica por anéis heterocíclicos são os principais fatores químicos responsáveis pelo perfil farmacológico otimizado. Os parâmetros ADMET *in silico* foram favoráveis para os derivados de chalconas mais ativos, e destacaram as chalconas 24 e 27 como protótipos superiores;
- No modelo *in vivo* de TB pulmonar grave, o tratamento com a chalcona **27** reduziu significativamente a carga bacilar pulmonar e o número de BAAR extracelulares em áreas de necrose, o que foi acompanhado pela capacidade de reduzir o influxo de células inflamatórias e de prevenir ou reduzir a extensão da área de pneumonia.
- A diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias secretadas pelas células pulmonares dos animais tratados com a chalcona **27** e o aumento da produção de IL-10 por estas, corroboram o potencial da chalcona **27** controlar a resposta hiperinflamatória limitando os danos teciduais decorrentes da inflamação exacerbada.
- Em comparação ao tratamento com o ibuprofeno, a chalcona **27** apresentou efeito terapêutico superior relacionado a redução da carga bacilar e da área de pneumonia ao final do tratamento. Embora a rifampicina tenha promovido redução mais acentuada da carga bacilar, a monoterapia isolada não foi suficiente para controlar a resposta inflamatória pulmonar, reforçando a importância da utilização de terapias adjuvantes capazes de modular a inflamação sem comprometer o controle da infecção.
- Dentre todas as substâncias investigadas, a chalcona **27** apresentou o perfil farmacológico mais completo, configurando-se como a substância mais

promissora para o desenvolvimento de novos candidatos para terapia adjuvante da TB pulmonar grave.

- Por fim, este trabalho amplia o conhecimento acerca do potencial farmacológico de chalconas e auronas sintéticas e fornece evidências experimentais consistentes para estabelecimento de bases sólidas para estudos futuros de otimização estrutural, elucidação dos mecanismos moleculares de ação, avaliação toxicológica e farmacocinética em estudos pré-clínicos.

7. REFERÊNCIAS

Obs: As referências relativas ao capítulo I encontram-se compiladas neste.

ABDJUL, D. B.; BUDIYANTO, F.; WIBOWO, J. T.; et al. Unlocking potent anti-tuberculosis natural products through structure-activity relationship analysis. *Natural Products and Bioprospecting*, v. 15, n. 1, art. 44, 2025. https://doi.org/10.1007/s13659-025-00529-4.

CHIN, K. L.; ANIBARRO, L.; SARMIENTO, M. E.; et al. Challenges and the way forward in diagnosis and treatment of tuberculosis infection. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, v. 8, n. 2, art. 89, 2023. https://doi.org/10.3390/tropicalmed8020089**.**

ABRAHAMS, K. A.; BESRA, G. S. Mycobacterial cell wall biosynthesis: a multifaceted antibiotic target. *Parasitology*, v. 145, n. 2, p. 116–133, 2018. https://doi.org/10.1017/S0031182017002617.

ADHIKARI, S.; PANDEY, A.; SHARMA, P.; et al. Pharmacological Potential of Natural Chalcones: A Recent Studies and Future Perspective. *Frontiers in Pharmacology*, Lausanne, v. 16, art. 1570385, 2025. DOI: 10.3389/fphar.2025.1570385.

AFRIYIE-ASANTE, A.; DABLA, A.; DAGENAIS, A.; et al. *Mycobacterium tuberculosis* exploits focal adhesion kinase to induce necrotic cell death and inhibit reactive oxygen species production. *Frontiers in Immunology*, v. 12, art. 742370, 2021. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.742370.

AGUILERA, J.; KARKI, C. B.; LI, L.; et al. Nα-Acetylation of the virulence factor EsxA is required for mycobacterial cytosolic translocation and virulence: Nα-Acetylation of EsxA facilitates heterodimer separation. *Journal of Biological Chemistry*, v. 295, n. 17, p. 5785–5794, 2020. https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.012092.

ALEMU, A.; GETACHEW, T.; MENGISTU, Y.; et al. Incidence and predictors of extrapulmonary tuberculosis among people living with human immunodeficiency virus in Addis Ababa, Ethiopia: a retrospective cohort study. *PLoS ONE*, v. 15, n. 5, e0232426, 2020. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232426.

ALLWOOD, B. W.; BYRNE, A.; MEGHJI, J.; et al. Doença pulmonar pós-tuberculose: revisão clínica de um desafio global pouco reconhecido. *Respiration*, v. 100, n. 8, p. 751–763, 2021.

ALMEIDA, F. M.; VENTURA, T. L. B.; AMARAL, E. P.; et al. Hypervirulent *Mycobacterium tuberculosis* strain triggers necrotic lung pathology associated with enhanced recruitment of neutrophils in resistant C57BL/6 mice. *PLoS ONE*, v. 12, n. 3, e0173715, 2017. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173715.

ALMEIDA-SANTOS, G.; SILVA-MIRANDA, M.; AMARAL, E. P.; et al. CD39 regulates P2RX7-mediated necrotic pulmonary lesions in severe experimental tuberculosis. *bioRxiv*, 2025. https://doi.org/10.1101/2025.05.28.656614.

AMADO, P. S. M.; COSTA, A. M.; SOUSA, J. A.; et al. Recent advances of DprE1 inhibitors against *Mycobacterium tuberculosis*: computational analysis of physicochemical and ADMET properties. *ACS Omega*, v. 7, n. 45, p. 40659–40681, 2022. https://doi.org/10.1021/acsomega.2c04632.

AMARAL, E. P.; LASUNSKAIA, E. B.; D'IMPÉRIO-LIMA, M. R. Innate immunity in tuberculosis: How the sensing of mycobacteria and tissue damage modulates macrophage death. *Microbes and Infection*, v. 18, n. 1, p. 11–20, 2016. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2015.09.005.

AMARAL, E. P.; RIBEIRO, S. C. M.; LESSA, M. A.; *et al.* Pulmonary infection with hypervirulent *Mycobacterium tuberculosis* reveals a crucial role for the P2X7 receptor in aggressive forms of tuberculosis. *PLoS Pathogens*, v. 10, n. 7, e1004188, 2014. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004188.

AMERICAN THORACIC SOCIETY (ATS); Centers for disease control and prevention (cdc); european respiratory society (ers); infectious diseases society of america (IDSA). *Updates on the treatment of drug-resistant tuberculosis*. 2024.

AMINGAD, S. P.; HAKKIMANE, S. S. Plant-based natural compounds as novel therapeutic avenues against tuberculosis: emphasis on curcumin. *Microbial Pathogenesis*, v. 199, art. 107787, 2025. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2025.107787.

AN, Y.; NI, R.; ZHUANG, L.; et al. Tuberculosis vaccines and therapeutic drug: challenges and future directions. *Molecular Biomedicine*, v. 6, art. 4, 2025. https://doi.org/10.1186/s43556-024-00243-6.

ANAGANI, B.; SINGH, J.; BASSIN, J. P.; et al. Identification and validation of the mode of action of the chalcone anti-mycobacterial compounds. *The Cell Surface*, v. 6, art. 100041, 2020. https://doi.org/10.1016/j.tcsw.2020.100041.

APOLLONI, V. B.; PEREIRA, M. C.; ALMEIDA, F. M.; et al. A limitação de macrófagos intersticiais deletérios que expressam iNOS depende da ação protetora das interleucinas IL-1α e lL-17 na tuberculose e na obesidade preexistente. *Immunology*, 2025. https://doi.org/10.1111/imm.13947.

ARAÚJO, A.; TORTOLI, E.; KIM, B. J.; et al. A brief update on mycobacterial taxonomy, 2020 to 2022. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 61, n. 5, art. e00034-23, 2023. https://doi.org/10.1128/JCM.00034-23.

ASHENAFI, S.; BRIGHENTI, S. Reinventing the human tuberculosis (TB) granuloma: learning from the cancer field. *Frontiers in Immunology*, v. 13, art. 1059725, 2022. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1059725.

ATANASOV, ATANAS G.; ZOTCHEV, SERGEY B.; DIRSCH, VERENA M.; *et al.* Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, London, v. 20, n. 3, p. 200–216, 2021. DOI: https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z.

ATAVLIYEVA, S.; AUGANOVA, D.; TARLYKOV, P. Genetic diversity, evolution and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* lineage 2. *Frontiers in Microbiology*, v. 15, art. 1384791, 2024. https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1384791.

AYAZ, M.; ALI SHAH, S. W.; SHOAIB, M.; et al. Synthesis, characterization and biological evaluation of aurones as potential neuroprotective agents. *Future Medicinal Chemistry*, v. 16, n. 16, p. 1649–1663, 2024. https://doi.org/10.1080/17568919.2024.2363713.

BALLET, F. Preventing drug-induced liver injury: how useful are animal models? *Digestive Diseases*, v. 33, n. 4, p. 477–485, 2015. https://doi.org/10.1159/000374107.

BASTOS, H. N.; OSÓRIO, N. S.; GAGNEUX, S.; et al. The troika host–pathogen–extrinsic factors in tuberculosis: modulating inflammation and clinical outcomes. *Frontiers in Immunology*, v. 8, art. 1948, 2018. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01948.

BHARATE, S. B.; LINDSLEY, C. W. Natural products driven medicinal chemistry. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 67, n. 23, p. 20723–20730, 2024. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.4c02107.

BLEVINS, H. M.; XU, Y.; BIBY, S.; ZHANG, S. The NLRP3 Inflammasome Pathway: A Review of Mechanisms and Inhibitors for the Treatment of Inflammatory Diseases. *Frontiers in Aging Neuroscience*, v. 14, art. 879021, 2022. https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.879021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sus (CONITEC). Relatório de recomendação: incorporação da pretomanida e dos esquemas BPaL/BPaLM no Sistema Único de Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. *Boletim Epidemiológico de Tuberculose: Número Especial*. Brasília: Ministério da Saúde, mar. 2026.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis**.** *Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil*. Brasília: Ministério da Saúde, 2019.

BRATTON, A. C.; MARSHALL JR., E. K. A New Coupling Component for Sulfanilamide Determination. *Journal of Biological Chemistry*, v. 128, n. 2, p. 537–550, 1939.

BRAVERMAN, J.; STANLEY, S. A. Nitric oxide modulates macrophage responses to *Mycobacterium tuberculosis* infection through activation of HIF-1α and repression of NF-κB. *The Journal of Immunology*, v. 199, n. 5, p. 1805–1816, 2017. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700515.

BRENNAN, M. J.; RIBEIRO, S. C. M.; AMARAL, E. P.; et al. The chosen few: Mycobacterium tuberculosis isolates for IMPAc-TB. *Frontiers in Immunology*, v. 15, art. 1427510, 2024. https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1427510.

BROWN, R. E.; HUNTER, R. L. Early lesion of post-primary tuberculosis: subclinical driver of disease and target for vaccines and host-directed therapies. *Pathogens*, v. 10, n. 12, art. 1572, 2021. https://doi.org/10.3390/pathogens10121572.

BUTLER, M. S.; ROBERTSON, A. A. B.; COOPER, M. A.; *et al.* Natural product-derived compounds in clinical trials and drug approvals. *Natural Product Reports*, 2026. https://doi.org/10.1039/D6NP00036A.

BUTOV, D. O.; ZAITSEVA, S. I.; PITENKO, M. M.; *et al.* Morphological changes in experimental tuberculosis resulting from treatment with quercetin and polyvinylpyrrolidone. *International Journal of Mycobacteriology*, v. 4, n. 4, p. 296–301, 2015. https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2015.08.003.

BYRNE, S. T.; DENKIN, S. M.; ZHANG, Y. Aspirin and ibuprofen enhance pyrazinamide treatment of murine tuberculosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 59, n. 2, p. 313–316, 2007. https://doi.org/10.1093/jac/dkl486.

CALEFFI, G. S.; ROSA, A. S.; SOUZA, L. G.; et al. Aurones: A Promising Scaffold To Inhibit SARS-CoV-2 Replication. *Journal of Natural Products*, v. 86, n. 6, p. 1536–1549, 2023. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.3c00249.

CALIXTO, S. D. Derivados de tioureias com atividade antimicobacteriana e anti-inflamatória como estratégia de tratamento adjuvante da tuberculose pulmonar severa. 2022. 167 f. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) – Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, 2022.

CAMPANIÇO, A.; CARRASCO, M. P.; NJOROGE, M.; et al. Azaaurones as potent antimycobacterial agents active against MDR- and XDR-TB. *ChemMedChem*, v. 14, n. 23, p. 2057–2069, 2019. https://doi.org/10.1002/cmdc.201900289.

CAMPOS, K. R.; COLEMAN, P. J.; ALVAREZ, J. C.; *et al.* The importance of synthetic chemistry in the pharmaceutical industry. *Science*, v. 363, n. 6424, eaat0805, 2019. https://doi.org/10.1126/science.aat0805.

CANTWELL, M. F.; SHEHAB, Z. M.; COSTELLO, A. M.; *et al.* Brief report: congenital tuberculosis. *The New England Journal of Medicine*, v. 330, n. 15, p. 1051–1054, 1994. https://doi.org/10.1056/NEJM199404143301505.

CAVIEDES, L.; DELGADO, J.; GILMAN, R. H. Tetrazolium microplate assay as a rapid and inexpensive colorimetric method for determination of antibiotic susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, p. 1873–1874, 2002.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Signs and Symptoms of Tuberculosis. Atlanta: CDC, 2025. Disponível em: https://www.cdc.gov/tb/signs-symptoms/. Acesso em: 29 mar. 2026.

CHAI, Q.; LU, Z.; LIU, C. H. Host defense mechanisms against *Mycobacterium tuberculosis*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 77, n. 10, p. 1859–1878, 2020. https://doi.org/10.1007/s00018-019-03353-5.

CHANDRA, P.; GRIGSBY, S. J.; PHILIPS, J. A. Immune evasion and provocation by *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Reviews Microbiology*, v. 20, n. 12, p. 750–766, 2022. https://doi.org/10.1038/s41579-022-00763-4.

CHANDRASEKARAN, P.; SARAVANAN, N.; BETHUNAICKAN, R.; TRIPATHY, S. Malnutrition: modulator of immune responses in tuberculosis. *Frontiers in Immunology*, v. 8, art. 1316, 2017. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01316.

CHEN, L. W.; CHENG, M. J.; PENG, C. F.; CHEN, I. S. Secondary metabolites and antimycobacterial activities from the roots of *Ficus nervosa*. *Chemistry & Biodiversity*, v. 7, n. 7, p. 1814–1821, 2010. https://doi.org/10.1002/cbdv.200900227.

CHERAGHI, M.; SHAHRIARI, M.; KAZEMI, S.; *et al.* Bedaquiline and linezolid regimens for multidrug-resistant tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 51, n. 1, e20240391, 2025. https://doi.org/10.36416/1806-3756/e20240391.

CHINTAKRINDI, A. S.; GUPTA, S.; KUMAR, P.; et al. Design, synthesis and biological evaluation of substituted flavones and aurones as potential anti-influenza agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 28, n. 1, art. 115191, 2020. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.115191.

CHUNXIAO L, Junsheng F, Xuerong C, Xiaomin W, Shuihua L. From bench to bedside: advances in cell therapy for tuberculosis treatment. *Stem Cell Research & Therapy*, v. 17, n. 1, art. 164, 2026. https://doi.org/10.1186/s13287-026-04978-7.

CITARELLA, ALESSIA; VITTORIO, STEFANIA; DANK, CHRISTIAN; IELO, LUCIANO. Syntheses, reactivity, and biological applications of coumarins. *Frontiers in Chemistry*, Lausanne, v. 12, art. 1362992, 2024. DOI: https://doi.org/10.3389/fchem.2024.1362992.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). *Methods for antimicrobial susceptibility testing of mycobacteria*. 3. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2023. (CLSI Standard M24).

CLINICALTRIALS.GOV. A study to evaluate intensified tuberculosis treatment to reduce the mortality of patients with tuberculous meningitis (INTENSE-TBM). Bethesda (MD): U.S. National Library of Medicine, 2026. Identificador: NCT04145258. Disponível em: ClinicalTrials.gov – NCT04145258. Acesso em: 20 jan. 2026.

CRONAN, M. R. In the thick of it: formation of the tuberculous granuloma and its effects on host and therapeutic responses. *Frontiers in Immunology*, v. 13, art. 820134, 2022. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.820134.

CROSS, G. B. New drugs for the management of tuberculosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 38, n. 6, p. 512–521, 2025. https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000001156.

CUBILLOS-ANGULO, J. M.; GARCÍA-VELÁSQUEZ, M. S.; RODRÍGUEZ-CAICEDO, A.; *et al.* Host-directed therapies in pulmonary tuberculosis: updates on anti-inflammatory

drugs. *Frontiers in Medicine*, v. 9, art. 970408, 2022. https://doi.org/10.3389/fmed.2022.970408.

DARTOIS, V.; RUBIN, E. J. Anti-tuberculosis treatment strategies and drug development: challenges and priorities. *Nature Reviews Microbiology*, v. 20, n. 11, p. 685–701, 2022. https://doi.org/10.1038/s41579-022-00731-y.

DE MELO, M. G. M.; MESQUITA, E. D. D.; OLIVEIRA, M. M.; et al. Imbalance of NET and alpha-1-antitrypsin in tuberculosis patients is related with hyperinflammation and severe lung tissue damage. *Frontiers in Immunology*, v. 9, art. 3147, 2018. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03147.

DETSI, A.; MAJDALANI, M.; KONTOGIORGIS, C. A.; et al. Natural and synthetic 2'-hydroxy-chalcones and aurones: Synthesis, characterization and evaluation of the antioxidant and soybean lipoxygenase inhibitory activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 17, n. 23, p. 8073–8085, 2009. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.10.002.

DHALIWAL, JASPREET S.; MOSHAWIH, SAID; GOH, KHANG WEN; *et al.* Pharmacotherapeutics applications and chemistry of chalcone derivatives. *Molecules*, Basel, v. 27, n. 20, art. 7062, 2022. DOI: https://doi.org/10.3390/molecules27207062.

DHIVYA, L. S.; VELMURUGAN, D.; ARUNACHALAM, S.; et al. Halogenated chalcones against *Mycobacterium tuberculosis* targeting InhA: rational design, *in silico* and *in vitro* evaluation. *Microbial Pathogenesis*, v. 196, art. 106945, 2024. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2024.106945.

DIAB, M. K.; SOLIMAN, T. H. A.; MOHAMED, A. M.; et al. A novel in silico molecular tool for comprehensive identification of *Mycobacterium* species. *Scientific Reports*, v. 15, art. 4981, 2025. https://doi.org/10.1038/s41598-025-89148-0.

DIAS, M. V. B.; FRANCO, G. R.; NOGUEIRA, F. C. S.; et al. Using omics to study leprosy, tuberculosis, and other mycobacterial diseases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 12, art. 792617, 2022. https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.792617.

DIRICKS, M.; MÖLLER, M.; VAN INGEN, J.; et al. Genomic insights into the plasmidome of non-tuberculous mycobacteria. *Genome Medicine*, v. 17, n. 1, art. 19, 2025. https://doi.org/10.1186/s13073-024-01425-7.

DOMINGO-FERNÁNDEZ, D.; KHALIFA, Y.; MESTRES, J.; et al. Natural products have increased rates of clinical trial success throughout the drug development process. *Journal of Natural Products*, v. 87, n. 7, p. 1844–1851, 2024. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.4c00380.

DOZ-DEBLAUWE, E.; BOUNAB, B.; CARRERAS, F.; et al. Dual neutrophil subsets exacerbate or suppress inflammation in tuberculosis via IL-1β or PD-L1. *Life Science Alliance*, v. 7, n. 10, e202402623, 2024. https://doi.org/10.26508/lsa.202402623.

EHLERS, S.; SCHAIBLE, U. E. The granuloma in tuberculosis: Dynamics of a host-pathogen collusion. *Frontiers in Immunology*, v. 3, art. 411, p. 1–10, 2012. https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00411.

EISEN, D. P.; MCBRYDE, E. S.; WALDUCK, A. Low-dose aspirin and ibuprofen's sterilizing effects on *Mycobacterium tuberculosis* suggest safe new adjuvant therapies for tuberculosis. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 208, n. 12, p. 1925–1927, 2013. https://doi.org/10.1093/infdis/jit476.

ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA SERGIO AROUCA (ENSP/FIOCRUZ). Implementação prática do BPaL no Brasil e resultados iniciais. Rio de Janeiro: ENSP/Fiocruz, 2025. Disponível em: https://informe.ensp.fiocruz.br/noticias/56741. Acesso em: 27 jul. 2026.

EZHILARASAN, D.; ARULSELVAN, P.; TANGJITSOMKIT, N.; et al. Preclinical liver toxicity models: Advantages, limitations and recommendations. *Toxicology*, v. 511, art. 154020, 2025. https://doi.org/10.1016/j.tox.2025.154020.

FAN, X.; LI, Y.; ZHANG, H.; *et al.* Progress of single-cell sequencing technology in immunotherapy for tuberculosis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 15, art. 1666630, 2025. https://doi.org/10.3389/fcimb.2025.1666630.

FAYSAL, M. A.; HANAFY, M.; ZINNIEL, D. K.; et al. Cell death pathways in response to *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacterial infections. *Infection and Immunity*, v. 93, n. 10, e00401-25, 2025. https://doi.org/10.1128/iai.00401-25.

FELLAG, M.; LOUKIL, A.; DRANCOURT, M. The puzzle of the evolutionary natural history of tuberculosis. *New Microbes and New Infections*, v. 41, art. 100712, 2021. https://doi.org/10.1016/j.nmni.2020.100712.

FERNANDES, G. F. S.; THOMPSON, A. M.; CASTAGNOLO, D.; et al. Tuberculosis drug discovery: challenges and new horizons. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 65, n. 11, p. 7489–7531, 2022. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c00227.

FERREIRA, MARIA K. A.; SILVA, LUCAS R.; OLIVEIRA, AMANDA C.; et al. Potencial farmacológico de chalconas: uma breve revisão. *Revista Virtual de Química*, Niterói, v. 10, n. 5, p. 1408–1428, 2018. DOI: https://doi.org/10.21577/1984-6835.20180099.

FISHER, K. L.; RAJKUMAR-BHUGELOO, K.; MOODLEY, D.; et al. Investigating neutrophil death in tuberculosis pathogenesis. *Gates Open Research*, v. 5, art. 175, 2022. https://doi.org/10.12688/gatesopenres.13472.2.

FONSECA, K. L.; FARRÉS, J.; BARBAKADZE, K.; et al. NSAIDS-XDR-TB Clinical Trial: A Randomized Pilot Study to Estimate the Potential Efficacy and Safety of Using Adjunctive Ibuprofen for the Treatment of Pre-XDR and XDR Tuberculosis. *medRxiv*, 2025. https://doi.org/10.1101/2025.05.29.25328553.

FONSECA, K. L.; PEREIRA, R. M.; SILVA, A. C.; *et al.* NSAIDS-XDR-TB clinical trial: a randomized pilot study to estimate the potential efficacy and safety of using adjunctive ibuprofen for the treatment of pre-XDR and XDR tuberculosis. *medRxiv*, 2025. https://doi.org/10.1101/2025.05.29.25328553.

FORRELLAD, M. A.; KLEPP, L. I.; GIOFFRÉ, A.; et al. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*, v. 4, n. 1, p. 3–66, 2013. https://doi.org/10.4161/viru.22329.

GARGATE, N.; LAWS, M.; RAHMAN, K. M. Current economic and regulatory challenges in antibiotic development for Gram-negative bacteria. *npj Antimicrobial Resistance*, v. 3, art. 50, 2025. https://doi.org/10.1038/s44259-025-00123-1.

GETAHUN, H.; MATTEELLI, A.; ABUBAKAR, I.; et al. Management of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: WHO guidelines for low tuberculosis burden countries. *European Respiratory Journal*, Sheffield, v. 46, n. 6, p. 1563–1576, 2015. https://doi.org/10.1183/13993003.01245-2015.

GLOBAL DRUG FACILITY. *Global Drug Facility (GDF).* Geneva: Stop TB Partnership, 2025. Disponível em: https://www.stoptb.org/buyers/plan-order. Acesso em: 27 jul. 2026.

GOLD, B.; NATHAN, C. Targeting phenotypically tolerant *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology Spectrum*, v. 5, n. 1, 2017. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBTB2-0031-2016.

GOYAL, K.**;** KAUR, R.; GOYAL, A.; AWASTHI, R. Chalcones: A Review on Synthesis and Pharmacological Activities. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v. 11, supl. 1, p. 001–014, 2021. DOI: 10.7324/JAPS.2021.110101.

GOYAL, R.; SHARMA, P.; VERMA, A.; *et al.* Insights on natural products and their derivatives in tuberculosis management. *Scripta Medica*, v. 56, n. 2, p. 315–328, 2025. https://doi.org/10.5937/scriptamed56.

GRIESS, J. P. On a New Series of Bodies in Which Nitrogen is Substituted for Hydrogen. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, v. 154, p. 667–731, 1864.

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

HE, Y.; HARA, H.; NÚÑEZ, G. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 41, n. 12, p. 1012–1021, 2016. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.09.002.

HERMANN, C.; KARAMCHAND, L.; BLACKBURN, J. M.; *et al.* Cell envelope proteomics of mycobacteria. *Journal of Proteome Research*, v. 20, n. 1, p. 94–109, 2021. https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00650.

HUANG, X.; LI, Y.; ZHANG, H.; et al. Natural products in anti-tuberculosis host-directed therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 171, art. 116087, 2024.

HUANG, X.; ZHANG, Y.; LIU, Y.; et al. Natural products in anti-tuberculosis host-directed therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 171, art. 116087, 2024. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.116087.

HUNTER, L.; RUEDAS-TORRES, I.; AGULLÓ-ROS, I.; *et al.* Comparative pathology of experimental pulmonary tuberculosis in animal models. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 10, art. 1264833, 2023. https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1264833.

HUNTER, R. L. The pathogenesis of tuberculosis: the Koch phenomenon reinstated. *Pathogens*, v. 9, n. 10, art. 813, 2020. https://doi.org/10.3390/pathogens9100813.

HUSSAIN, T.; TAN, B.; YIN, Y.; et al. Flavonoids: An Overview of Their Sources, Biological Activities, and Health Benefits. *Molecules*, v. 27, n. 16, art. 5335, 2022. https://doi.org/10.3390/molecules27165335.

JACOBO-DELGADO, Y. M.; RODRÍGUEZ-CARLOS, A.; SERRANO, C. J.; RIVAS-SANTIAGO, B. *Mycobacterium tuberculosis* cell wall and antimicrobial peptides: a mission impossible? *Frontiers in Immunology*, v. 14, art. 1194923, 2023. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1194923.

JAGATAP, VISHAL R.; AHMAD, IRFAN; PATEL, HITESH M. Recent updates in natural terpenoids as potential anti-mycobacterial agents. *Indian Journal of Tuberculosis*, New Delhi, v. 69, n. 3, p. 282–304, 2022. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijtb.2021.07.006.

JANKUTE, M.**;** COX, J. A. G.; HARRISON, J.; et al. Assembly of the mycobacterial cell wall. *Annual Review of Microbiology*, v. 69, p. 405–423, 2015. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104121.

JOHN, D.; GEORGE, K.; RADHAKRISHNAN, E. K. A concise update on the synthetic transformation of aurones via asymmetric cycloaddition, annulation, and Michael/Mannich reactions. *RSC Advances*, v. 14, n. 9, p. 6339–6359, 2024. https://doi.org/10.1039/D3RA07967A.

KADAYAT, T. M.; BANSKOTA, S.; GURUNG, P.; et al. Discovery and structure-activity relationship studies of 2-benzylidene-2,3-dihydro-1H-inden-1-one and benzofuran-3(2H)-one derivatives as a novel class of potential therapeutics for inflammatory bowel disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 137, p. 575–597, 2017. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.06.014.

KALSCHEUER, R.; MALM, S.; MOTSCH, J.; et al. The *Mycobacterium tuberculosis* capsule: a cell structure with key implications in pathogenesis. *Biochemical Journal*, v. 476, n. 14, p. 1995–2016, 2019. https://doi.org/10.1042/BCJ20190001.

KATHAMUTHU, G. R.; BHAVANI, P. K.; SINGH, M.; et al. High-Dose Rifampicin Mediated Systemic Alterations of Cytokines, Chemokines, Growth Factors, Microbial Translocation Markers, and Acute-Phase Proteins in Pulmonary Tuberculosis. *Frontiers in Pharmacology*, v. 13, art. 896551, 2022. https://doi.org/10.3389/fphar.2022.896551.

KAUFMANN, S. H. E.; DORHOI, A.; HOTCHKISS, R. S.; et al. Host-directed therapies for bacterial and viral infections. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 17, n. 1, p. 35–56, 2018. https://doi.org/10.1038/nrd.2017.162.

KERNIEN, J. F.; YOUNGBLOM, M. A.; SMITH, T. M.; et al. Contingencies in biofilm adaptation of *Mycobacterium tuberculosis*. *bioRxiv* [preprint], 2024. https://doi.org/10.1101/2024.06.07.597933.

KHAN, H.; ULLAH, H.; CASTILLO, A.; et al. The Role of Flavonoids in Cancer Prevention and Treatment: A Review. *Seminars in Cancer Biology*, v. 69, p. 200–211, 2021. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.06.010.

KIM, H. G.; LEE, J. H.; KIM, Y. H.; et al. Aurones and flavonols from *Coreopsis lanceolata* L. and their antioxidant, anti-inflammatory and pancreatic islet recovery effects in zebrafish. *Molecules*, v. 26, n. 20, art. 6098, 2021. https://doi.org/10.3390/molecules26206098.

KIM, H.; SHIN, S. J. Pathological and protective roles of dendritic cells in *Mycobacterium tuberculosis* infection: interaction between host immune responses and pathogen evasion. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 12, art. 891878, 2022. https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.891878.

KIM, W. S.; CHOI, H. G.; KIM, H. J.; et al. Virulence-dependent alterations in the kinetics of immune cells during pulmonary infection by *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS ONE*, v. 10, n. 12, art. e0145234, 2015. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145234.

KNIGHT, G. M.; MCGRATH-LONE, L.; DARTON, T.; et al. The distribution of latent tuberculosis in the United States using electronic health record data. *PLoS ONE*, San Francisco, v. 14, n. 11, e0225323, 2019. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225323.

KONG, X.; LI, Y.; ZHANG, H.; et al. Advancing roles of nitric oxide in tuberculosis: promising targets for novel anti-TB therapeutics. *Microbiological Research*, v. 300, art. 128292, 2025. https://doi.org/10.1016/j.micres.2025.128292.

KROESEN, V. M.; VAN GRONINGEN, A.; HODGE, S.; *et al. Mycobacterium tuberculosis* modifies cell wall carbohydrates during biofilm growth with a concomitant reduction in complement activation. *The Cell Surface*, v. 7, art. 100065, 2021. https://doi.org/10.1016/j.tcsw.2021.100065.

KRUG, S.; PARVEEN, S.; BISHAI, W. R. Host-directed therapies: modulating inflammation to treat tuberculosis. *Frontiers in Immunology*, v. 12, art. 660916, 2021. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.660916.

KUDRYAVTSEV, D. E.**;** KUDRYAVTSEVA, A. V.; SHUBIN, A. V.; et al. The role of the immune response in developing latent and active tuberculosis. *Frontiers in Tuberculosis*, v. 3, art. 1464259, 2024. https://doi.org/10.3389/ftb.2024.1464259.

KUFA, M.; WANG, Y.; LI, X.; *et al.* Revolutionizing tuberculosis treatment: breakthroughs, challenges, and hope on the horizon. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, v. 15, n. 3, p. 1311–1332, 2025. https://doi.org/10.1016/j.apsb.2024.11.018.

LAGU, S. B.; YEJELLA, R. P.; NISSANKARARAO, S.; et al. Antitubercular activity assessment of fluorinated chalcones, 2-aminopyridine-3-carbonitrile and 2-amino-4H-pyran-3-carbonitrile derivatives: In vitro, molecular docking and in-silico drug likeliness

studies. *PLoS ONE*, v. 17, n. 6, art. e0265068, 2022. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0265068.

LATHWAL, E.; KUMAR, S. A review of the various synthetic approaches to access aurone derivatives and their biological activities. *Current Organic Chemistry*, v. 27, p. 308–351, 2023.

LEE, M. R.; LEE, M. C.; CHANG, C. H.; et al. Use of antiplatelet agents and survival of tuberculosis patients: a population-based cohort study. *Journal of Clinical Medicine*, v. 8, n. 7, art. 923, 2019. https://doi.org/10.3390/jcm8070923.

LERNER, T. R.; BOREL, S.; GREENWOOD, D. J.; *et al. Mycobacterium tuberculosis* replicates within necrotic human macrophages. *Journal of Cell Biology*, v. 216, n. 3, p. 583–594, 2017. https://doi.org/10.1083/jcb.201603040.

LI, C.; FU, J.; CHEN, X.; et al. From bench to bedside: advances in cell therapy for tuberculosis treatment. *Stem Cell Research & Therapy*, v. 17, n. 1, art. 164, 2026. https://doi.org/10.1186/s13287-026-04978-7.

LI, J.; LIU, Y.; RUAN, Y.; et al. Immune defense and immune evasion in *Mycobacterium tuberculosis* infection: inspirations and challenges for host-directed therapy. *Microbial Pathogenesis*, v. 198, art. 107914, 2025. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2024.107914.

LI, S.; JIN, F.; VIJI, M.; et al. A novel cyclization/oxidation strategy for a two-step synthesis of (Z)-aurone. *Tetrahedron Letters*, v. 58, n. 14, p. 1417–1420, 2017. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2017.02.074.

LIU, Q.; QUE, S.; QIU, Y.; *et al.* Host immune response to *Mycobacterium tuberculosis* infection: implications for vaccine development. *Journal of Inflammation Research*, v. 18, p. 8429–8445, 2025. https://doi.org/10.2147/JIR.S517034.

LIU, X.; HU, J.; WANG, W.; et al. Mycobacterial biofilm: mechanisms, clinical problems, and treatments. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 14, art. 7771, 2024. https://doi.org/10.3390/ijms25147771.

LIU, Y.; BROWN, C. M.; ERRAMILLI, S.; et al. Structural insights into terminal arabinosylation of mycobacterial cell wall arabinan. *Nature Communications*, v. 16, art. 3973, 2025. https://doi.org/10.1038/s41467-025-58196-5.

LIU, Y.; CHEN, W.; CEN, Y.; *et al.* Hepatocyte ferroptosis contributes to anti-tuberculosis drug-induced liver injury: involvement of the HIF-1α/SLC7A11/GPx4 axis. *Chemico-Biological Interactions*, v. 376, art. 110439, 2023. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2023.110439.

LÖNNROTH, K.; MIGLIORI, G. B.; ABUBAKAR, I.; et al. Tuberculosis. *The Lancet*, v. 406, n. 10413, p. 1925–1945, 2025. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(25)01465-5.

LOPES, S. R.; MARÇAL, M.; FERNANDES, N.; *et al.* Update in tuberculosis treatment: a scoping review of current practices. *Breathe*, v. 21, n. 1, art. 240232, 2025. https://doi.org/10.1183/20734735.0232-2024.

LY, A.; LIU, J. Mycobacterial virulence factors: surface-exposed lipids and secreted proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 11, art. 3985, 2020. https://doi.org/10.3390/ijms21113985.

LYU, J.; NARUM, D. E.; BALDWIN, S. L.; et al. Understanding the development of tuberculous granulomas: insights into host protection and pathogenesis, a review in humans and animals. *Frontiers in Immunology*, v. 15, art. 1427559, 2024. https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1427559.

MAKHMOOR, T.; NAHEED, S.; SHUJAAT, S.; et al. Hepatoprotection by chemical constituents of the marine brown alga *Spatoglossum variabile*: A relation to free radical scavenging potential. *Pharmaceutical Biology*, v. 51, n. 3, p. 383–390, 2013. https://doi.org/10.3109/13880209.2012.732582.

MARRAPU, V. K.; CHATURVEDI, V.; SINGH, S.; et al. Novel aryloxy azolyl chalcones with potent activity against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 46, n. 9, p. 4302–4310, 2011. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.06.037.

MARRAPU, V. K.; CHATURVEDI, V.; SINGH, S.; et al. Novel aryloxy azolyl chalcones with potent activity against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 46, n. 9, p. 4302–4310, 2011. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.06.037.

MATSUMOTO, Y.; FUKUSHIMA, K.; ZHANG, S.; *et al.* mlstverse-web: advancing real-time identification of mycobacteria from sputum using targeted sequencing NALC-Seq. *Functional & Integrative Genomics*, v. 25, n. 1, art. 105, 2025. https://doi.org/10.1007/s10142-025-01609-x.

MATSUMOTO, Y.; FUKUSHIMA, K.; ZHANG, S.; et al. mlstverse-web: advancing real-time identification of mycobacteria in sputum using NALC-Seq targeted sequencing. *Functional & Integrative Genomics*, v. 25, art. 105, 2025. https://doi.org/10.1007/s10142-025-01609-x.

MAYER-BARBER, K. D.; BARBER, D. L. Innate and adaptive cellular immune responses to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 5, n. 12, art. a018424, 2015. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018424.

MAYOSI, B. M.; NTSEKHE, M.; BOSCH, J.; *et al.* Prednisolone and *Mycobacterium indicus pranii* in tuberculous pericarditis. *The New England Journal of Medicine*, v. 371, n. 12, p. 1121–1130, 2014. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1407380.

MAZALEUSKAYA, L. L.; THEKEN, K. N.; GONG, L.; et al. PharmGKB summary: ibuprofen pathways. *Pharmacogenetics and Genomics*, v. 25, n. 2, p. 96–106, 2015. https://doi.org/10.1097/FPC.0000000000000113.

MAZZIOTTI, I.; PETRAROLO, G.; LA MOTTA, C. Aurones: a golden resource for active compounds. *Molecules*, v. 27, n. 1, art. 2, 2022. https://doi.org/10.3390/molecules27010002.

MEANWELL, N. A. Fluorine and fluorinated motifs in the design and application of bioisosteres for drug design. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 61, n. 14, p. 5822–5880, 2018. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01788.

MEZGEBE, K.**;** MELAKU, Y.; MULUGETA, E. Synthesis and Pharmacological Activities of Chalcone and Its Derivatives Bearing N-Heterocyclic Scaffolds: A Review. *ACS Omega*, Washington, v. 8, n. 22, p. 19194–19211, 2023. DOI: 10.1021/acsomega.3c01092.

MI, J.; WU, X.; LIANG, J. The advances in adjuvant therapy for tuberculosis with immunoregulatory compounds. *Frontiers in Microbiology*, v. 15, art. 1380848, 2024. https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1380848

MIGLIORI, G. B.; THÖRN, K.; GIRONI, L. C.; et al*.* Programmatic management of tuberculosis preventive treatment in the WHO European Region. *European Respiratory Journal*, Sheffield, v. 57, n. 1, 2021. https://doi.org/10.1183/13993003.04098-2020.

MIRANDA, K. M.; ESPEY, M. G.; WINK, D. A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*, v. 5, n. 1, p. 62–71, 2001. https://doi.org/10.1006/niox.2000.0319.

MISHRA, BRAJ B.; RATHINAM, VINAY K.; MARTENS, GREGORY W et al. Nitric oxide prevents a pathogen-permissive granulocytic inflammation during tuberculosis. *Nature Microbiology*, London, v. 2, art. 17072, 2017. DOI: https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.72.

MISHRA, RICHA; JANA, PARTHA. Chalcones as anti-infective agents for effective management of tuberculosis. *Polycyclic Aromatic Compounds*, Philadelphia, v. 44, n. 8, p. 5640–5662, 2024. DOI: https://doi.org/10.1080/10406638.2023.2210213.

MISHRA, S.; SAITO, K. Clinically encountered growth phenotypes of tuberculosis-causing bacilli and their *in vitro* study: a review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 12, art. 1029111, 2022. https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1029111.

MOHAMMADNABI, N.; HOSSEINI, S. M.; AHMADI, M.; et al. *Mycobacterium tuberculosis*: the mechanism of pathogenicity, immune responses, and diagnostic challenges. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, v. 38, n. 23, art. e25122, 2024. https://doi.org/10.1002/jcla.25122.

MONTGOMERY, R. M. *The multifactorial determinants of tuberculosis mortality: a global comprehensive epidemiological analysis and framework for disease elimination*. 2025.

MORIMOTO, M.; FUKUMOTO, H.; NOZOE, T.; et al. Synthesis and insect antifeedant activity of aurones against *Spodoptera litura* larvae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, n. 3, p. 700–705, 2007. https://doi.org/10.1021/jf062562t.

MORTENSEN, R.; CLEMMENSEN, H. S.; WOODWORTH, J. S.; et al. Cyclooxygenase inhibitors impair CD4 T cell immunity and exacerbate Mycobacterium tuberculosis infection in aerosol-challenged mice. *Communications Biology*, v. 2, art. 288, 2019. https://doi.org/10.1038/s42003-019-0530-3.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983. https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4.

MUÑOZ-EGEA, M.-C.; AKIR, A.; ESTEBAN, J. Mycobacterial biofilms. *Biofilm*, v. 5, art. 100107, 2023. https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2023.100107.

MVUBU, N. E. Innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis*: receptor engagement and inflammatory outcomes at the site of infection. *Cell Surface*, v. 14, art. 100150, 2025. https://doi.org/10.1016/j.tcsw.2025.100150.

NAKAYAMA, T. Biochemistry and regulation of aurone biosynthesis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 86, n. 5, p. 557–573, 2022. https://doi.org/10.1093/bbb/zbac034.

NAMDAUNG, U.; AROONRERK, N.; SUKSAMRARN, S.; *et al.* Bioactive constituents of the root bark of *Artocarpus rigidus* subsp. *rigidus*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 54, n. 10, p. 1433–1436, 2006. https://doi.org/10.1248/cpb.54.1433.

NATIONAL HEALTH SERVICE (NHS). Tuberculosis (TB). London: NHS, 2025. Disponível em: https://www.nhs.uk/conditions/tuberculosis-tb/. Acesso em: 29 jul. 2026.

NICULESCU, ALEXANDRU G.; MÜK, GÜLŞAH R.; AVRAM, SORIN; *et al.* Novel strategies based on natural products and synthetic derivatives to overcome resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, Amsterdam, v. 269, art. 116268, 2024. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.116268.

NIKITINA, I. Y.; PIROGOVA, L. V.; ANDREEVSKAYA, S. N.; et al. Th1, Th17, and Th1Th17 Lymphocytes during Tuberculosis: Th1 Lymphocytes Predominate and Appear as Low-Differentiated CXCR3+CCR6+ Cells in the Blood and Highly Differentiated CXCR3+/−CCR6− Cells in the Lungs. *The Journal of Immunology*, v. 200, n. 6, p. 2090–2103, 2018. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701124.

OEHLERS, S. H.; AGARWAL, S.; SINGHAL, A. Host-directed therapies for tuberculosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2026. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a041823.

O'GARRA, A.; REDFORD, P. S.; MCNAB, F. W.; et al. The immune response in tuberculosis. *Annual Review of Immunology*, v. 31, p. 475–527, 2013. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095939.

OREN, A.; TRÜPER, H. G.; GARRITY, G. M.; et al. International code of nomenclature of prokaryotes (prokaryotic code): 2025 revision. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 76, n. 3A, art. 006979, 2026. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.006979.

ORGEUR, M.; SOUS, C.; MADACKI, J.; et al. Evolution and emergence of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 48, n. 2, art. fuae006, 2024. https://doi.org/10.1093/femsre/fuae006.

PALO-NIETO, C.; MEDINA-FRANCO, J. L. Role of halogens in medicinal chemistry and drug design. *Molecules*, v. 28, art. 5894, 2023. https://doi.org/10.3390/molecules28155894.

PANTELEEV, A. V.; LYADOVA, I. V. Th1 and Th17 Cells in Tuberculosis: Protection, Pathology, and Biomarkers. *Mediators of Inflammation*, v. 2015, art. 854507, p. 1–13, 2015. https://doi.org/10.1155/2015/854507.

PARIHAR, S. P.; GULER, R.; BROMBACHER, F. Statins: a viable candidate for host-directed therapy against infectious diseases. *Nature Reviews Immunology*, v. 19, n. 2, p. 104–117, 2019. https://doi.org/10.1038/s41577-018-0094-3.

PARK, H. S.; NELSON, D. E.; TAYLOR, Z. E.; et al. Suppression of LPS-induced NF-κB activity in macrophages by the synthetic aurone, (Z)-2-((5-(hydroxymethyl)furan-2-yl)methylene)benzofuran-3(2H)-one. *International Immunopharmacology*, v. 43, p. 116–128, 2017. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.12.004.

PATRICK, G. L. *An introduction to medicinal chemistry*. 6. ed. Oxford: Oxford University Press, 2017.

PAULOS, B.; BISRAT, D.; YESHAK, M. Y.; *et al.* Natural products with potent antimycobacterial activity (2000–2024): a review. *Molecules*, v. 30, n. 18, art. 3708, 2025. https://doi.org/10.3390/molecules30183708.

PEDERSEN, O. S.; HOLMGAARD, F. B.; MIKKELSEN, M. K. D.; *et al.* Global treatment outcomes of extensively drug-resistant tuberculosis in adults: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Infection*, v. 87, p. 177–189, 2023. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2023.06.014.

POH, X. Y.; et al. Neutrophil-mediated immunopathology and matrix metalloproteinases in central nervous system–tuberculosis. *Frontiers in Immunology*, v. 12, art. 788976, 2022. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.788976.

PONNUSAMY, N.; PILLAI, G.; ARUMUGAM, M. Computational investigation of phytochemicals identified in medicinal plant extracts against tuberculosis. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, v. 42, n. 7, p. 3382–3395, 2024. https://doi.org/10.1080/07391102.2023.2213341.

POPOVA, A. V.; BONDARENKO, S. P.; FRASINYUK, M. S. Synthesis and properties of 2-benzylidene-8,9-dihydro-7H-furo[2,3-f][1,3]benzoxazin-3(2H)-one derivatives. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, v. 52, n. 8, p. 592–600, 2016. https://doi.org/10.1007/s10593-016-1937-0.

PRASAD, K.; SINGH, M. B.; RYAN, H. Corticosteroids for managing tuberculous meningitis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, n. 4, art. CD002244, 2016. https://doi.org/10.1002/14651858.CD002244.pub4.

PRASAD, P.; SHARMA, S.; MOHANASUNDARAM, S.; *et al.* Tuberculosis in kidney transplant candidates and recipients. *World Journal of Transplantation*, v. 14, n. 3, 2024. https://doi.org/10.5500/wjt.v14.i3.96225.

PRIDEAUX, B.; VIA, L. E.; ZIMMERMAN, M. D.; et al. The association between sterilizing activity and drug distribution into tuberculosis lesions. *Nature Medicine*, v. 21, n. 10, p. 1223–1227, 2015. https://doi.org/10.1038/nm.3937.

RABAAN, A. A.; ALHUMAID, S.; ALBAYAT, H.; et al. Promising Antimycobacterial Activities of Flavonoids against *Mycobacterium* sp. Drug Targets: A Comprehensive Review. *Molecules*, v. 27, n. 16, art. 5335, 2022. https://doi.org/10.3390/molecules27165335.

RABAAN, ABDULMONEM A.; ALHUMAID, SULTAN; ALBAYAT, HANAN; et al. Promising antimycobacterial activities of flavonoids against *Mycobacterium* sp. drug targets: a comprehensive review. *Molecules*, Basel, v. 27, n. 16, art. 5335, 2022. DOI: https://doi.org/10.3390/molecules27165335.

RACHOW, A.; IVANOVA, O.; WALLIS, R.; *et al.* TB sequel: incidence, pathogenesis and risk factors of long-term medical and social sequelae of pulmonary tuberculosis: a study protocol. *BMC Pulmonary Medicine*, v. 19, art. 4, 2019. https://doi.org/10.1186/s12890-018-0771-2.

RAHMAN, F. Characterizing the immune response to *Mycobacterium tuberculosis*: a comprehensive narrative review and implications in disease relapse. *Frontiers in Immunology*, v. 15, art. 1437901, 2024. https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1437901.

RAJENDRAN, G.**;** BHANU, D.; ARUCHAMY, B.; RAMANI, P.; PANDURANGAN, N.; BOBBA, K. N.; OH, E. J.; CHUNG, H. Y.; GANGADARAN, P.; AHN, B. C. Chalcone: A Promising Bioactive Scaffold in Medicinal Chemistry. *Pharmaceuticals*, Basel, v. 15, n. 10, art. 1250, 2022. DOI: 10.3390/ph15101250.

RATNAKUMAR, S.; MEGHJI, J.; EVANS, C. A.; et al. Post-pulmonary tuberculosis lung function: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Global Health*, v. 13, n. 6, p. e1020–e1029, 2025.

RAUTER, AMÉLIA P.; ENNIS, MARCUS; HELLWICH, KARL-HEINZ; *et al.* Nomenclature of flavonoids (IUPAC Recommendations 2017). *Pure and Applied Chemistry*, Berlin, v. 90, n. 9, p. 1429–1486, 2018. DOI: https://doi.org/10.1515/pac-2013-0919.

RAVESLOOT-CHÁVEZ, M. M.; VAN DIS, E.; STANLEY, S. A. The innate immune response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Annual Review of Immunology*, v. 39, p. 611–637, 2021. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-093019-010426.

RAVIKOTI, S.; BHATIA, V.; MOHANASUNDARI, S. K. Recent advancements in tuberculosis (TB) treatment regimens. *Journal of Family Medicine and Primary Care*, v. 14, n. 2, p. 521–525, 2025. https://doi.org/10.4103/jfmpc.jfmpc_1237_24.

REYNOLDS, R. C.; ANANTHAN, S.; FAALEOLEA, E.; et al. High throughput screening of a library based on kinase inhibitor scaffolds against *Mycobacterium tuberculosis*

H37Rv. *Tuberculosis*, v. 92, n. 1, p. 72–83, 2012. https://doi.org/10.1016/j.tube.2011.05.005.

RIAZ, S. M.; HANEVIK, K.; SVILAND, L.; MUSTAFA, T. Characterization of early lesions of human post-primary tuberculosis and its progression to necrosis using archival material of the pre-antibiotic era. *Pathogens*, v. 14, n. 3, art. 224, 2025. https://doi.org/10.3390/pathogens14030224.

RIBEIRO, S. C. M.; GOMES, L. L.; AMARAL, E. P.; et al. *Mycobacterium tuberculosis* strains of the modern sublineage of the Beijing family are more likely to display increased virulence than strains of the ancient sublineage. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 52, n. 7, p. 2617–2624, 2014. https://doi.org/10.1128/JCM.00498-14.

RODRÍGUEZ-SILVA, C. N.; PROKOPCZYK, I. M.; DOS SANTOS, J. L. The medicinal chemistry of chalcones as anti-*Mycobacterium tuberculosis* agents. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 22, n. 16, p. 2068–2080, 2022. https://doi.org/10.2174/1389557522666220214093606.

RUDRAPAL, MANISHA; KHAN, JAVED; DUKHYIL, ABDULLAH A. B.; *et al.* Chalcone scaffolds, bioprecursors of flavonoids: chemistry, bioactivities, and pharmacokinetics. *Molecules*, Basel, v. 26, n. 23, art. 7177, 2021. DOI: https://doi.org/10.3390/molecules26237177.

SABARATHINAM, S.; GANAMURALI, N.; SATHEESH, S.; et al. Pharmacokinetic correlation of structurally modified chalcone derivatives as promising leads to treat tuberculosis. *Future Medicinal Chemistry*, v. 15, n. 20, p. 1903–1913, 2023. https://doi.org/10.4155/fmc-2023-0161.

SABARATHINAM, SIVAKUMAR; GANAMURALI, NANDHINI; SATHEESH, SARAVANAN; DHANASEKARAN, DHARMALINGAM; RAJA, ANNAMALAI. Pharmacokinetic correlation of structurally modified chalcone derivatives as promising leads to treat tuberculosis. *Future Medicinal Chemistry*, London, v. 15, n. 20, p. 1903–1913, 2023. DOI: https://doi.org/10.4155/fmc-2023-0161.

SACHAN, R. S. K.; KUMAR, A.; SINGH, P.; et al. Overcoming *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance: novel drugs and repurposing strategies. *ACS Omega*, v. 8, n. 36, p. 32244–32257, 2023. https://doi.org/10.1021/acsomega.3c02563.

SAINI, S.; GANGWAR, A.; SHARMA, R. Harnessing host-pathogen interactions for innovative drug discovery and host-directed therapeutics to tackle tuberculosis. *Microbiological Research*, v. 275, art. 127466, 2023. https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127466.

SALEHI, B.; MISHRA, A. P.; NIGAM, M.; et al. Pharmacological Properties of Chalcones: A Review of Preclinical Including Molecular Mechanisms and Clinical Evidence. *Frontiers in Pharmacology*, Lausanne, v. 11, art. 592654, 2021. DOI: 10.3389/fphar.2020.592654.

SALUZZO, F.; YERLIKAYA, S.; DORMAN, S.; et al. Future-proofing tuberculosis therapy: framework for concurrent drug and resistance testing development. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 26, p. e248–e256, 2025. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(25)00332-7.

SANCHEZ-GONZALEZ, M.; ROSAZZA, J. P. N. Biocatalytic synthesis of butein and sulfuretin by *Aspergillus alliaceus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n. 13, p. 4646–4650, 2006. https://doi.org/10.1021/jf060900k.

SANKAR, P.; MISHRA, B. B**.** Early innate cell interactions with *Mycobacterium tuberculosis* in protection and pathology of tuberculosis. *Frontiers in Immunology*, v. 14, art. 1260859, 2023. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1260859.

SANTAMARIA, C.; XU, Y.; CHEN, J.; et al*.* Trehalose dimycolate inhibits phagosome maturation and promotes intracellular *Mycobacterium tuberculosis* growth via noncanonical SNARE interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 122, n. 20, 2025. https://doi.org/10.1073/pnas.2423292122.

SANTOS, A. P.; SILVA, D. R.; MIGLIORI, G. B.; et al. The role of neutrophil response in lung damage and post-tuberculosis lung disease: a translational narrative review. *Frontiers in Immunology*, v. 16, art. 1528074, 2025. https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1528074.

SARAIVA, M.; BRANCHETT, W. J.; RENGARAJAN, J.; et al. The host immune response to *Mycobacterium tuberculosis*: determining protection or disease progression. *Nature Immunology*, v. 27, p. 1104–1118, 2026. https://doi.org/10.1038/s41590-026-02529-z.

SARATHY, J. P.; VIA, L. E.; ZIMMERMAN, M. D.; et al. Prediction of drug penetration in tuberculosis lesions. *ACS Infectious Diseases*, v. 2, n. 8, p. 552–563, 2016. https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.6b00051.

SARDÀ CARBASSE, J.; MEIER-KOLTHOFF, J. P.; REIMER, L. C.; GÖKER, M. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 70, n. 11, p. 5607–5612, 2020. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004332.

SARKER, S. D.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. Microtitre Plate-Based Antibacterial Assay Incorporating Resazurin as an Indicator of Cell Growth, and Its Application in the *in vitro* Antibacterial Screening of Phytochemicals. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 20, n. 2, p. 757–759, 2010. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.11.118.

SAROHA, B.; KUMAR, G.; KUMAR, S. Aurones as versatile enzyme inhibitors: recent advances, structural insights, mechanisms and therapeutic potential. *European Journal of Medicinal Chemistry Reports*, art. 100280, 2025. https://doi.org/10.1016/j.ejmcr.2025.100280.

SASIKUMAR, K.; GHOSH, A. R.; DUSTHACKEER, A. Antimycobacterial potentials of quercetin and rutin against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *3 Biotech*, v. 8, n. 10, art. 427, 2018. https://doi.org/10.1007/s13205-018-1450-5.

SASINDRAN, S. J.; TORRELLES, J. B. Mycobacterium tuberculosis infection and inflammation: What is beneficial for the host and for the bacterium? *Frontiers in Microbiology*, v. 2, art. 2, p. 1–16, 2011. https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00002.

SAUKKONEN, J. J.; NAHID, P.; DALTON, T. L.; et al. Updates on the treatment of drug-susceptible and drug-resistant tuberculosis: an official ATS/CDC/ERS/IDSA clinical practice guideline. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 211, n. 1, p. 15–33, 2025. https://doi.org/10.1164/rccm.202410-1850ST.

SCHRAGER, L. K.; IZZO, A.; VELMURUGAN, K. Immunopathogenesis of tuberculosis and novel mechanisms of vaccine activity. *Tuberculosis*, v. 99, Suppl. 1, p. S3–S7, 2016. https://doi.org/10.1016/j.tube.2016.02.004.

SCRIBA, T. J.; SULIMAN, S.; FLETCHER, H. A.; et al. Immunopathology of human tuberculosis. *Science Immunology*, v. 9, n. 102, art. eado5951, 2024. https://doi.org/10.1126/sciimmunol.ado5951.

SHALABY, M. A.; RIZK, S. A.; FAHIM, A. M. Synthesis, Reactions and Application of Chalcones: A Systematic Review. *Organic & Biomolecular Chemistry*, Cambridge, v. 21, n. 28, p. 5317–5346, 2023. DOI: 10.1039/D3OB00792H.

SHIH, T.-L.; CHEN, C.-H.; CHANG, C.-S.; et al. Halo-Substituted Chalcones and Azachalcones Inhibited Lipopolysaccharide-Stimulated Pro-Inflammatory Responses through the TLR4-Mediated Pathway. *Molecules*, Basel, v. 23, n. 3, art. 597, 2018. DOI: 10.3390/molecules23030597.

SHIH, TZENGE-LIEN; CHAN, YEN-YI; CHEN, YU-HSUAN; *et al.* Halo-substituted chalcones and azachalcones inhibited lipopolysaccharide-stimulated pro-inflammatory responses through the TLR4-mediated pathway. *Molecules*, Basel, v. 23, n. 3, art. 597, 2018. DOI: https://doi.org/10.3390/molecules23030597.

SHUKLA, S.; BHARDWAJ, N.; SINGH, A. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: an evolutionary perspective and adaptation to the pulmonary microenvironment. *The Microbe*, v. 5, art. 100189, 2024. https://doi.org/10.1016/j.microb.2024.100189.

SILVA-PEREIRA, T. T.; SOLER-CAMARGO, N. C.; GUIMARÃES, A. M. S. Diversification of gene content in the *Mycobacterium tuberculosis* complex is determined by phylogenetic and ecological signatures. *Microbiology Spectrum*, v. 12, e02289-23, 2024. https://doi.org/10.1128/spectrum.02289-23.

SIMÃO, T. L. B. V. Estudo de chalconas substituídas com potencial ação anti-inflamatória e antimicobacteriana como nova estratégia para o tratamento da tuberculose. 2015. 177 f. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2015.

SOEDARSONO, S.; FAUZI, A.; WIDYONINGROEM, A.; *et al.* Comparison of the severity of lung damage on chest X-ray between new drug-resistant and drug-sensitive cases of pulmonary tuberculosis patients. *Archives of Clinical Infectious Diseases*, v. 18, n. 3, e137113, 2023. https://doi.org/10.5812/archcid-137113.

STAMM, C. E.; COLLINS, A. C.; SHILOH, M. U. Sensing of *Mycobacterium tuberculosis* and consequences to both host and bacillus. *Immunological Reviews*, v. 264, n. 1, p. 204–219, 2015. https://doi.org/10.1111/imr.12319.

SUI, G.; ZHANG, Y.; LI, X.; et al. Recent advances on synthesis and biological activities of aurones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 29, art. 115895, 2021. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115895.

SZACAWA, E.; RADULSKI, Ł.; WEINER, M.; *et al. Mycobacterium tuberculosis* complex infections in animals: a comprehensive review of species distribution and laboratory diagnostic methods. *Pathogens*, v. 14, n. 10, art. 1004, 2025. https://doi.org/10.3390/pathogens14101004.

TEIXEIRA, A. B.; FEITOSA, A. C. S.; RIBEIRO, D. B. C.; *et al.* General aspects of tuberculosis: an update on the etiologic agent and treatment. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 50, n. 3, p. 228–232, 2018.

TIAN, N.; CHU, H.; LI, Q.; et al. Host-directed therapy for tuberculosis. *European Journal of Medical Research*, v. 30, art. 267, 2025. https://doi.org/10.1186/s40001-025-02443-4.

TIWARI, D.; MARTINEAU, A. R. Inflammation-mediated tissue damage in pulmonary tuberculosis and host-directed therapeutic strategies. *Seminars in Immunology*, v. 68, art. 101672, 2023. https://doi.org/10.1016/j.smim.2023.101672.

TOHGE, T.; WATANABE, M.; HOEFGEN, R.; FERNIE, A. R. Shikimate and Phenylalanine Biosynthesis in the Green Lineage. *Frontiers in Plant Science*, Lausanne, v. 4, art. 62, 2013. DOI: 10.3389/fpls.2013.00062.

TOUSIF, S.; SINGH, D. K.; MUKHERJEE, S.; et al. Nanoparticle-formulated curcumin prevents posttherapeutic disease reactivation and reinfection with *Mycobacterium tuberculosis* following isoniazid therapy. *Frontiers in Immunology*, v. 8, art. 739, 2017. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00739.

TRAM, T. T.; NHUNG, H. N.; VIJAY, S.; et al. Virulence of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates is associated with sputum pretreatment bacterial load, lineage, survival in macrophages, and cytokine response. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 8, art. 417, 2018. https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00417.

TREATMENT ACTION GROUP. *Tuberculosis treatment pipeline report 2025*. New York: Treatment Action Group, 2025.

TZELEPIS, F.; BLAGIH, J.; KHAN, N.; et al. Mitochondrial cyclophilin D regulates T cell metabolic responses and disease tolerance to tuberculosis. *Science Immunology*, v. 3, n. 23, art. eaau4135, 2018. https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aau4135.

UDINIA, S.; SUAR, M.; KUMAR, D. Host-directed therapy against tuberculosis: concept and recent developments. *Journal of Biosciences*, v. 48, art. 54, 2023. https://doi.org/10.1007/s12038-023-00372-9.

VATS, D.; SHARMA, A.; SINGH, R.; *et al.* Tuberculosis and T cells: impact of T-cell diversity on tuberculosis infection. *Tuberculosis*, v. 149, art. 102567, 2024. https://doi.org/10.1016/j.tube.2024.102567.

VENKATESWARLU, S.; PANCHAGNULA, G. K.; GOTTUMUKKALA, A. L.; et al. Synthesis, structural revision, and biological activities of 4′-chloroaurone, a metabolite of marine brown alga *Spatoglossum variabile*. *Tetrahedron*, v. 63, n. 29, p. 6909–6914, 2007. https://doi.org/10.1016/j.tet.2007.04.048.

VENTURA, THATIANA L. B.; CALIXTO, Sanderson D.; ABRAHIM-VIEIRA, Bruna A.; et al. Antimycobacterial and anti-inflammatory activities of substituted chalcones focusing on an anti-tuberculosis dual treatment approach. *Molecules*, Basel, v. 20, n. 5, p. 8072–8093, 2015. DOI: https://doi.org/10.3390/molecules20058072.

VIDYARAJ, C. K.; SURESH, K.; SHENOY, V.; *et al.* Prevalence of extrapulmonary tuberculosis and factors influencing successful treatment outcomes among notified cases in South India. *Scientific Reports*, v. 15, n. 1, p. 8290, 2025. https://doi.org/10.1038/s41598-025-92573-z.

VILAPLANA, C.; MARZO, E.; TAPIA, G.; *et al.* Ibuprofen therapy resulted in significantly decreased tissue bacillary loads and increased survival in a new murine experimental model of active tuberculosis. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 208, n. 2, p. 199–202, 2013. https://doi.org/10.1093/infdis/jit152.

VILAPLANA, C.; MARZO, E.; TAPIA, G.; et al. Ibuprofen Therapy Resulted in Significantly Decreased Tissue Bacillary Loads and Increased Survival in a New Murine Experimental Model of Active Tuberculosis. *Journal of Infectious Diseases*, v. 208, n. 2, p. 199–202, 2013. https://doi.org/10.1093/infdis/jit152.

VILLA, S. M.; HECKMAN, J.; BANDYOPADHYAY, D. Medicinally privileged natural chalcones: abundance, mechanisms of action, and clinical trials. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 17, art. 9623, 2024. https://doi.org/10.3390/ijms25179623.

VISWANATHAN, G.; HUGHES, E. J.; GAN, M.; et al. Granuloma dual RNA-seq reveals composite transcriptional programs driven by neutrophils and necrosis within tuberculous granulomas. *bioRxiv*, preprint, art. 2025.04.26.650783, 2025. https://doi.org/10.1101/2025.04.26.650783.

WANG, Z.; BAE, E. J.; HAN, Y. T. Synthesis and anti-inflammatory activities of novel dihydropyranoaurone derivatives. *Archives of Pharmacal Research*, v. 40, p. 695–703, 2017. https://doi.org/10.1007/s12272-017-0910-5.

WARNER, D. F.; BARCZAK, A. K.; GUTIERREZ, M. G.; et al. *Mycobacterium tuberculosis* biology, pathogenicity and interaction with the host. *Nature Reviews Microbiology*, v. 23, n. 12, p. 788–804, 2025. https://doi.org/10.1038/s41579-025-01201-x.

WEI, X.; YUE, L.; ZHAO, B.; *et al.* Recent advances and challenges of revolutionizing drug-resistant tuberculosis treatment. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 277, art. 116785, p. 1–24, 2024. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.116785.

WOO, S.; MARQUEZ, L.; CRANDALL, W. J.; et al. Recent advances in the discovery of plant-derived antimicrobial natural products to combat antimicrobial-resistant pathogens:

insights from 2018–2022. *Natural Product Reports*, v. 40, n. 7, p. 1271–1290, 2023. https://doi.org/10.1039/D2NP00090C.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Global tuberculosis report 2024*. Geneva: World Health Organization, 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Tuberculosis: fact sheet. Geneva: World Health Organization, 2025. Disponível em: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis. Acesso em: 29 jul. 2026.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *WHO consolidated guidelines on tuberculosis: Module 3: Diagnosis*. Geneva: World Health Organization, 2025.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO consolidated guidelines on tuberculosis: module 4: treatment – drug-resistant tuberculosis treatment. 2025 update. Geneva: World Health Organization, 2025.

XU, K.; REN, X.; WANG, J.; ZHANG, Q.; FU, X.; ZHANG, P. C. Clinical Development and Informatics Analysis of Natural and Semi-Synthetic Flavonoid Drugs: A Critical Review. *Journal of Advanced Research*, Cairo, v. 63, p. 269–284, 2024. DOI: 10.1016/j.jare.2023.11.007.

XU, X.; DONG, B.; PENG, L.; *et al.* Anti-tuberculosis drug development by targeting the cell envelope of *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, art. 1056608, 2022. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1056608.

YADAV, G. D.; WAGH, D. P. Condensação de Claisen-Schmidt utilizando processos catalíticos verdes: uma revisão crítica. *ChemistrySelect*, v. 5, n. 29, p. 9059–9085, 2020. https://doi.org/10.1002/slct.202001737.

YADAV, V. R.; PRASAD, S.; SUNG, B.; AGGARWAL, B. B. The role of chalcones in suppression of NF-κB-mediated inflammation and cancer. *International Immunopharmacology*, v. 11, n. 3, p. 295–309, 2011. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2010.12.006.

YANG, D.; TAYLOR, Z. E.; HANDY, S.; et al. Identification of anti-tuberculosis compounds from aurone analogs. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, art. 1004, 2020. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01004.

YANG, D.; TAYLOR, Z. E.; HANDY, S.; et al. Identification of Anti-tuberculosis Compounds From Aurone Analogs. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, art. 1004, 2020. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01004.

YOUNG, C.; WALZL, G.; DU PLESSIS, N. Therapeutic host-directed strategies to improve outcome in tuberculosis. *Mucosal Immunology*, v. 13, n. 2, p. 190–204, 2020. https://doi.org/10.1038/s41385-019-0226-5.

YUK, J.-M.; KIM, J. K.; KIM, I. S.; et al. TNF in human tuberculosis: a double-edged sword. *Immune Network*, v. 24, art. e4, p. 1–19, 2024. https://doi.org/10.4110/in.2024.24.e4.

ZEIN-EDDINE, R.; LE MEUR, A.; SKOULOUBRIS, S.; *et al.* Comprehensive genomic analyses reveal the role of mutator phenotypes in the emergence of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *npj Antimicrobial Resistance*, v. 3, art. 35, 2025. https://doi.org/10.1038/s44259-025-00107-1.

ZHAI, Z.; SOLCO, A.; WU, L.; et al. Echinacea increases arginase activity and has anti-inflammatory properties in RAW 264.7 macrophage cells, indicative of alternative macrophage activation. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 122, n. 1, p. 76–85, 2009. https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.11.004.

ZHANG, D.; WANG, H.; OU, H.; et al. Identification of chalcone analogues as anti-inflammatory agents through the regulation of NF-κB and JNK activation. *RSC Medicinal Chemistry*, v. 15, p. 2002–2017, 2024. https://doi.org/10.1039/D4MD00011K.

ZHAO, C. Y.; SONG, C.; LU, Y. B.; et al. A new era in tuberculosis prevention and treatment: breakthroughs in drug development and future prospects. *Infectious Diseases and Therapy*, v. 14, n. 10, p. 2205–2219, 2025. https://doi.org/10.1007/s40121-025-01221-3.

ZHAO, L.; et al. Host-directed therapy against *Mycobacterium tuberculosis* infections with diabetes mellitus. *Frontiers in Immunology*, v. 14, art. 1305325, 2024. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1305325.

ZIHAD, S. M. N. K.; CHOWDHURY, M. A. A.; RAHMAN, M. S.; *et al.* Role of pattern recognition receptors in the detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *Heliyon*, v. 9, n. 10, e20636, 2023. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e20636.

ZLATAR, L.; KNOPF, J.; SINGH, J.; *et al.* Neutrophil extracellular traps characterize caseous granulomas. *Cell Death & Disease*, v. 15, art. 548, 2024. https://doi.org/10.1038/s41419-024-06892-3.

8. ANEXOS

8.1. Certificado de aprovação CEUA do projeto de pesquisa

GOVERNO DO ESTADO
RIO DE JANEIRO
Secretaria de Estado de Ciência, Tecnologia e Inovação
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

REITORIA
Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 653, intitulado "MECANISMOS PATOGÊNICOS ASSOCIADOS À NECROSE PULMONAR NA TUBERCULOSE E SUA CO-INFECÇÃO COM CORONAVÍRUS: VIRULÊNCIA DE BACTÉRIA E IMUNOPATOGENIA" sob a responsabilidade da Dra. Elena Lassounskaia, Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA) bem como a lei federal 11. 794 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA DE USO DE ANIMAIS (CEUA - UENF) em reunião ocorrida em 17/06/2025. Este programa está licenciado na presente formatação e tem validade até 17/06/2029.

Campos dos Goytacazes, 17 de junho de 2025.

Clóvis de Paula Santos
Presidente da Comissão de Ética de uso de Animais

UENF
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
Av. Alberto Lamego, 2000 - Parque California - Campos dos Goytacazes/ RJ - 28013-602
Tel.: (22) 2739-4178 - (22) – 2739-7180 correio eletrônico: adrianafaria@uenf.br

8.2. Material suplementar referente ao capítulo 2

Arquivo enviado separadamente

Antimycobacterial and anti-inflammatory activities of chalcone derivatives for adjuvant treatment of severe pulmonary tuberculosis: *In vitro* and *in silico* approaches

Yasmin Viana Martins [a], Juliane Falcão [b], Felipe Cerqueira Demidoff [b], Naiara Inacio da Silva [b],, Stella Schuenck Antunes [c,d],, Sanderson Dias Calixto [a], Vinícius de Oliveira Mussi [a], João Vitor Rocha Reis [e], Shaft Correa Pinto [c], Marlon Heggdorne de Araújo [c,e], Elena Lassounskaia [a], Paulo Roberto Ribeiro Costa [b], Nelilma Correia Romeiro [d], Francesca Boldrin [e], Riccardo Manganelli [e], Guilherme da Silva Caleffi [b], Michelle Frazão Muzitano [c,e]*, Thatiana Lopes Biá Ventura Simão[a]*.

[a] Ms Y. Martins, Dr S. Calixto, Dr V. Mussi, Dr E. Lassounskaia, Dr T. Simão*
Laboratório de Biologia do Reconhecer
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil
e-mail address: thativentura@uenf.br

[b] J. Falcão, Dr F. Demidoff*, N. Silva, Paulo Roberto Ribeiro Costa
Laboratório de Química Bioorgânica
Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais Walter Mors, Universidade Federal do Rio de Janeiro
Macaé, RJ, Brazil Supporting information for this article is given via a link at the end of the document
. e-mail address: guilherme.caleffi@ippn.ufrj.br.

[c] Dr M. Muzitano*, Dr S. Antunes, Dr S. Pint, Dr M. Araújo,
Laboratório de Produtos Bioativos
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Macaé Macaé, RJ.,
Macaé, RJ, Brazil
e-mail address: mfmuzitano@gmail.com

[d] Dr N. Falcão, Dr S. Antunes
Laboratório Integrado de Computacão Científica (LICC)
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Macaé
Macaé 27930-560, RJ, Brazil

[e] Dr J. Reis, Dr F. Boldrin, Dr R. Manganelli
Department of Molecular Medicine
University of Padova
35121 Padova, Italy

Table of Contents

Structure–Activity Relationship (SAR) and ADMET Studies	**3**
Characterization Data of the Syhthesized Compounds	**4**
References	**16**
NMR Spectra of the (E)-Chalcones: 1-35	**18**

Structure–Activity Relationship (SAR) and ADMET Studies

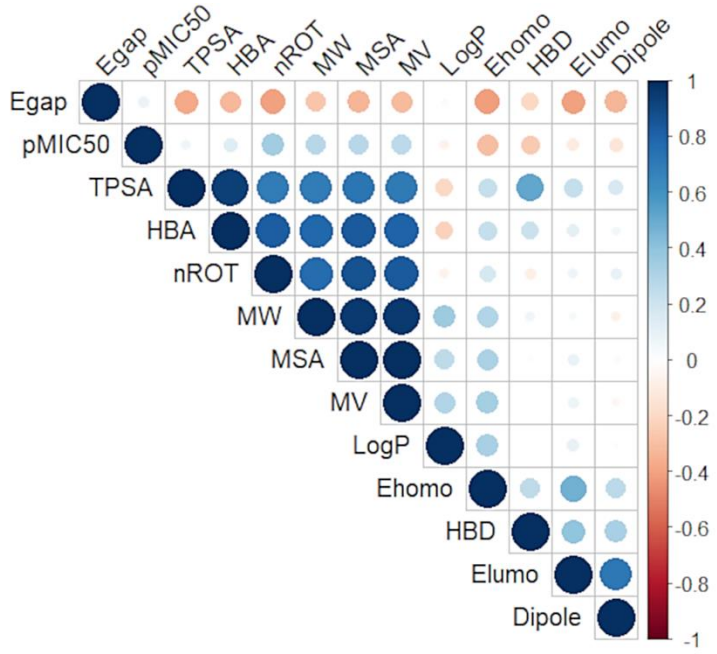


Figure S1. Correlation plot of calculated descriptors and $pMIC_{50}$[a].

[a] $pMIC_{50}$ was calculated in Excel v. 2408 using the formula: $pMIC_{50}$= -log10(IC_{50}*10^{-6}). Blue and red circles represent positive and negative correlations, respectively. Legends: molecular weight (MW; Da), molecular surface area (MSA; $Å^2$), molecular volume (MV; $Å^3$), topologic polar surface area (TPSA; $Å^2$), energy of the highest occupied molecular orbital and the lowest unoccupied molecular orbital (E_{HOMO} and E_{LUMO}; eV), dipole moment (Debye), E_{LUMO} - E_{HOMO} (E_{GAP}), logarithm of the octanol/water partition coefficient (LogP), number of hydrogen bond acceptors and donors (HBA and HBD) and number of rotatable bonds (nRot).

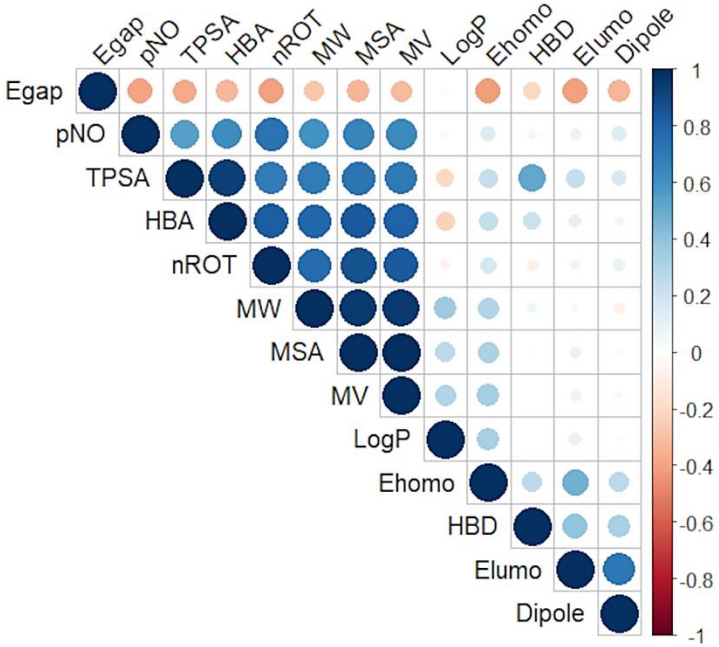
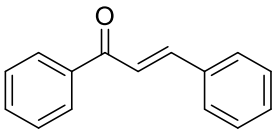


Figure S2. Correlation plot of calculated descriptors and pNO[a].

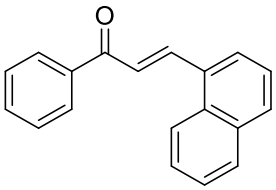
[a] pNO was calculated in Excel v. 2408 using the formula: pNO= -log10(IC_{50}*10^{-6}). Blue and red circles represent positive and negative correlations, respectively. Legends: molecular weight (MW; Da), molecular surface area (MSA; $Å^2$), molecular volume (MV; $Å^3$), topologic polar surface area (TPSA; $Å^2$), energy of the highest occupied molecular orbital and

the lowest unoccupied molecular orbital (E_{HOMO} and E_{LUMO}; eV), dipole moment (Debye), E_{LUMO} - E_{HOMO} (E_{GAP}), logarithm of the octanol/water partition coefficient (LogP), number of hydrogen bond acceptors and donors (HBA and HBD) and number of rotatable bonds (nRot).

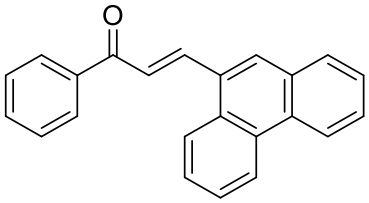
Characterization Data of the Syhthesized Compounds



(E)-chalcone (**1**): The compound was obtained as a white solid (1019 mg, 98% yield). The purity (99%) was determined by HPLC analysis using a Waters C18 column (150 x 4.6 mm, 5 µm), CH_3CN/H_2O 80:20, 1 mL/min, 28 ºC, t_R: 1.76 min, 254 nm. **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.05 – 7.99 (m, 2H), 7.81 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H), 7.67 – 7.62 (m, 2H), 7.61 – 7.54 (m, 1H), 7.53 – 7.47 (m, 3H), 7.46 – 7.37 (m, 3H). **^{13}C{H} NMR** (126 MHz, $CDCl_3$) δ 190.7, 145.0, 138.3, 135.0, 132.9, 130.7, 129.1, 128.7, 128.6, 128.6, 122.2. The spectroscopic data were consistent with those reported in the literature [1].

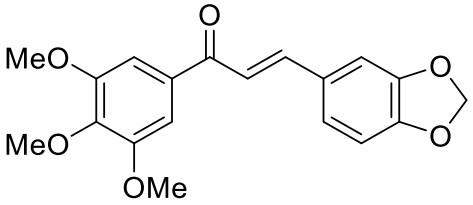


(E)-3-(naphthalen-1-yl)-1-phenylprop-2-en-1-one (**2**): The compound was obtained as a pale-yellow solid (1020 mg, 79% yield). The purity (98%) was determined by HPLC analysis using a Waters C18 (150 x 4.6 mm, 5 µm), CH_3CN/H_2O 80:20, 1 mL/min, 28 ºC, t_R: 2.38 min, 254 nm. **^{1}H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.68 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 8.27 (dd, *J* = 8.5, 1.2 Hz, 1H), 8.12 – 8.07 (m, 2H), 7.95 – 7.89 (m, 3H), 7.57 (m, 7H). **^{13}C{H} NMR** (126 MHz, $CDCl_3$) δ 190.4, 141.9, 138.3, 133.9, 133.0, 132.5, 131.9, 130.9, 128.9, 128.9, 128.8, 127.1, 126.5, 125.6, 125.2, 124.8, 123.6. The spectroscopic data were consistent with those reported in the literature [2].

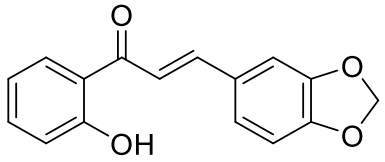


(E)-3-(phenanthren-9-yl)-1-phenylprop-2-en-1-one (**3**): The compound was obtained as a pale-yellow solid (1200 mg, 78% yield). The purity (98%) was determined by HPLC analysis using a Waters C18 column (250 x 4.6 mm, 5 µm), CH_3CN/H_2O 80:20, 1 mL/min, 28 ºC, t_R: 14.1 min, 254 nm. **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.72 (dd, *J* = 7.6, 1.2 Hz, 1H), 8.66 (s, 1H), 8.64 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 8.25 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.14 – 8.07 (m, 3H), 7.92 (dd, *J* = 7.8, 1.4 Hz, 1H), 7.72 – 7.64 (m, 4H), 7.64 – 7.58 (m, 2H), 7.53 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H). **^{13}C{H} NMR** (126 MHz, $CDCl_3$) δ 190.3, 142.5,

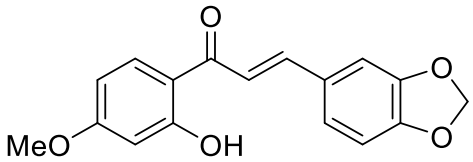
138.1, 132.9, 131.6, 131.3, 131.2, 130.5, 130.3, 129.2, 128.7, 128.6, 127.8, 127.2, 127.0, 126.6, 126.6, 125.2, 124.5, 123.2, 122.7.



(E)-3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-1-(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one (**4**): The compound was obtained as a yellow solid (1655 mg, 97% yield). The purity (98%) was determined by HPLC analysis using a Waters C18 column(150 x 4.6 mm, 5 µm), CH_3CN/H_2O 80:20, 1 mL/min, 28 ºC, t_R: 1.49 min, 254 nm. **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.74 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 7.32 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 7.27 (s, 1H), 7.18 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.13 (dd, *J* = 8.2, 1.7 Hz, 1H), 6.85 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.03 (s, 2H), 3.95 (s, 6H), 3.94 (s, 3H). **^{13}C{H} NMR** (126 MHz, $CDCl_3$) δ 189.2, 153.2, 150.0, 148.5, 144.7, 142.5, 133.8, 129.5, 125.4, 119.8, 108.8, 106.7, 106.1, 101.8, 61.1, 56.5. The spectroscopic data were consistent with those reported in the literature [2].

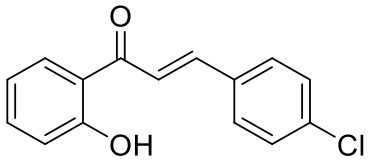


(E)-3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-1-(2-hydroxyphenyl)prop-2-en-1-one (**5**): The compound was obtained as a yellow solid (1285 mg, 96% yield). The purity (99%) was determined by HPLC analysis using a Rexchrom C18 column (250 x 4.6 mm, 5 µm), CH_3OH/H_2O 70:30, 1 mL/min, 28 ºC, t_R: 11.45 min, 254 nm. **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.91 (dd, *J* = 8.1, 1.6 Hz, 1H), 7.85 (d, *J* = 15.3 Hz, 1H), 7.53 – 7.46 (m, 2H), 7.19 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.16 (ddd, *J* = 8.0, 1.7, 0.5 Hz, 1H), 7.02 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H), 6.94 (ddd, *J* = 8.2, 7.2, 1.2 Hz, 1H), 6.87 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.05 (s, 2H). **^{13}C{H} NMR** (101 MHz, $CDCl_3$) δ 193.7, 163.7, 150.4, 148.6, 145.5, 136.4, 129.6, 129.2, 125.9, 120.2, 118.9, 118.7, 118.1, 108.9, 106.9, 101.9. The spectroscopic data were consistent with those reported in the literature [3].

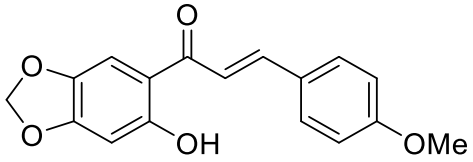


(E)-3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-1-(2,4-dihydroxyphenyl)prop-2-en-1-one (**6**): The compound was obtained as a yellow solid (1296 mg, 87% yield). **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ 13.86 (s, 1H), 7.82

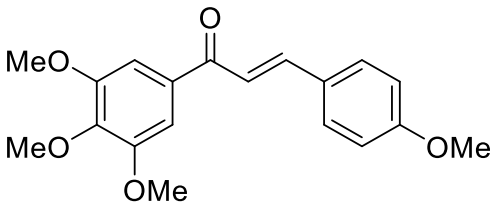
(d, *J* = 15.3 Hz, 1H), 7.57 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.33 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.91 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.44 (s, 1H), 5.96 (s, 2H), 3.82 (s, 3H). **^{13}C{H} NMR** (126 MHz, $CDCl_3$) δ 207.3, 191.4, 163.7, 161.9, 154.5, 144.6, 140.5, 130.5, 127.8, 127.5, 117.8, 114.5, 112.7, 106.2, 102.0, 98.9, 55.5. The spectroscopic data were consistent with those reported in the literature [4].



(E)-3-(4-chlorophenyl)-1-(2-hydroxyphenyl)prop-2-en-1-one (**7**): The compound was obtained as a pale-yellow solid (1262 mg, 98% yield). The purity (98%) was determined by HPLC analysis using a Rexchrom C18 column (250 x 4.6 mm, 5 µm), CH_3OH/H_2O 70:30, 1 mL/min, 28 ºC, t_R: 28.4 min, 254 nm. **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ δ 12.74 (s, 1H), 7.91 (dd, *J* = 8.1, 1.6 Hz, 1H), 7.87 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 7.63 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 7.60 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.51 (ddd, *J* = 8.6, 7.1, 1.6 Hz, 1H), 7.42 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.04 (dd, *J* = 8.4, 1.1 Hz, 1H), 6.95 (ddd, *J* = 8.2, 7.1, 1.2 Hz, 1H). **^{13}C{H} NMR** (101 MHz, $CDCl_3$) δ 193.6, 163.8, 144.1, 137.0, 136.7, 133.2, 129.9, 129.8, 129.5, 120.7, 120.1, 119.1, 118.9. The spectroscopic data were consistent with those reported in the literature [5].

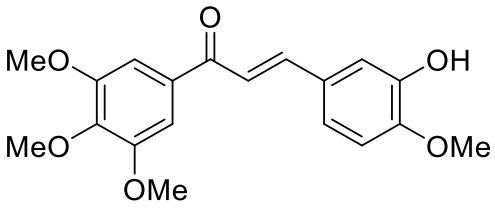


(E)-1-(6-hydroxybenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one (**8**): The compound was obtained as a yellow solid (566 mg, 38% yield). **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ 13.90 (s, 1H), 7.87 (d, *J* = 15.3 Hz, 1H), 7.61 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.35 (d, *J* = 15.3 Hz, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.95 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.50 (s, 1H), 6.00 (s, 2H), 3.87 (s, 3H). **^{13}C{H} NMR** (126 MHz, $CDCl_3$) δ 191.5, 163.8, 162.0, 154.5, 144.7, 140.6, 130.5, 127.6, 117.9, 114.6, 112.8, 106.3, 102.0, 99.1, 55.6. The spectroscopic data were consistent with those reported in the literature [6].

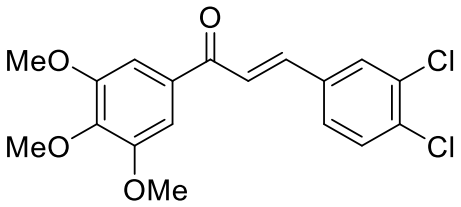


(E)-3-(4-methoxyphenyl)-1-(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one (**9**): The compound was obtained as a pale-yellow solid (1558 mg, 95% yield). **^{1}H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.78 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 7.60 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.35 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 7.25 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.94 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 3.94 (s, 6H), 3.93 (s, 3H), 3.85 (s, 3H). **^{13}C{H} NMR** (101 MHz, $CDCl_3$) δ 189.4,

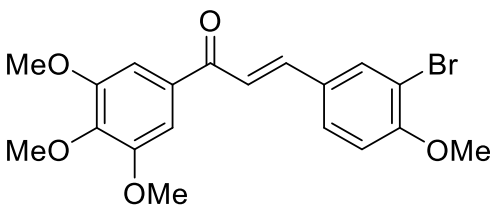
161.8, 153.3, 144.8, 142.4, 134.0, 130.4, 127.8, 119.6, 114.6, 106.1, 61.1, 56.5, 55.6. The spectroscopic data were consistent with those reported in the literature [7].



(E)-3-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-1-(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one (**10**): The compound was obtained as a yellow solid (1651 mg, 96% yield). The purity (99%) was determined by HPLC analysis using a Rexchrom C18 column (250 x 4.6 mm, 5 µm), CH_3OH/H_2O 70:30, 1 mL/min, 28 ºC, t_R: 4.89 min, 365 nm. **^{1}H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.73 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 7.34 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 7.29 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.24 (d, *J* = 12.4 Hz, 2H), 7.12 (dd, *J* = 8.3, 2.2 Hz, 1H), 6.86 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 5.79 (s, 1H), 3.94 (s, 6H), 3.92 (s, 6H). **^{13}C{H} NMR** (101 MHz, $CDCl_3$) δ 189.3, 153.2, 149.0, 146.0, 144.8, 142.4, 133.9, 128.6, 123.1, 119.9, 112.9, 110.7, 106.1, 61.1, 56.5, 56.2. The spectroscopic data were consistent with those reported in the literature [8].

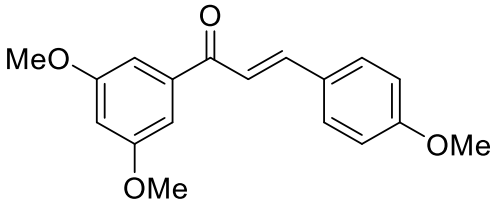


(E)-3-(3,4-dichlorophenyl)-1-(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one (**11**): The compound was obtained as a light-yellow solid (1119 mg, 61% yield). The purity (95%) was determined by HPLC analysis using a Waters C18 column (150 x 4.6 mm, 5 µm), CH_3CN/H_2O 80:20, 1 mL/min, 28 ºC, t_R: 2.19 min, 254 nm. **^{1}H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.73 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.70 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H), 7.53 – 7.42 (m, 3H), 7.27 (s, 1H), 3.96 (s, 6H), 3.95 (s, 3H). **^{13}C{H} NMR** (101 MHz, $CDCl_3$) δ 188.6, 153.3, 142.9, 141.9, 135.0, 134.5, 133.4, 133.1, 131.1, 129.8, 127.7, 123.2, 106.3, 61.1, 56.6, 56.5. The spectroscopic data were consistent with those reported in the literature [9].

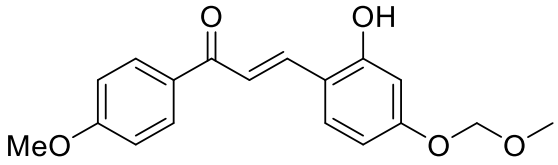


(E)-3-(3-bromo-4-methoxyphenyl)-1-(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one (**12**): The compound was obtained as a pale-yellow solid (1505 mg, 74% yield). The purity (96%) was determined by HPLC analysis using a Waters C18 column (150 x 4.6 mm, 5 µm), CH_3OH/H_2O

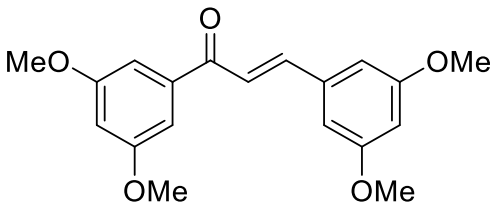
70:30, 1 mL/min, 28 ºC, t_R: 4.85 min, 254 nm. **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.71 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 7.33 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 7.14 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H), 6.85 (s, 2H), 6.67 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H), 3.92 (s, 6H), 3.90 (s, 3H), 3.86 (s, 6H). **^{13}C{H} NMR** (126 MHz, $CDCl_3$) δ 190.2, 161.0, 153.6, 145.3, 140.6, 140.4, 130.4, 121.5, 106.6, 105.8, 104.8, 61.1, 56.4, 55.8.



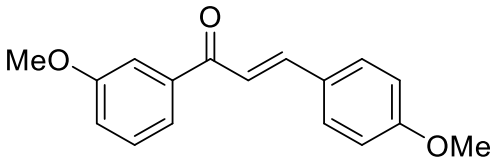
(E)-1-(3,5-dimethoxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one (**13**): The compound was obtained as a yellow solid (1170 mg, 78% yield). The purity (99%) was determined by HPLC analysis using a Rexchrom C18 column (250 x 4.6 mm, 5 µm), CH_3OH/H_2O 70:30, 1 mL/min, 28 ºC, t_R: 10.42 min, 254 nm**^{1}H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.78 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 7.60 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.35 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 7.14 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H), 6.94 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.66 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H), 3.86 (s, 5H), 3.86 (s, 3H). **^{13}C{H} NMR** (101 MHz, $CDCl_3$) δ 190.3, 161.9, 161.0, 145.0, 140.7, 130.4, 127.7, 119.9, 114.5, 106.5, 104.9, 55.9, 55.5. The spectroscopic data were consistent with those reported in the literature [10].



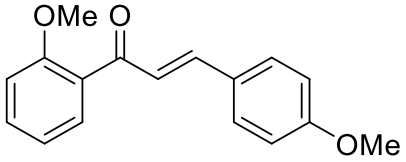
(E)-3-(2-hydroxy-4-(methoxymethoxy)phenyl)-1-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one (**14**): The compound was obtained as a pale-yellow solid (497 mg, 88% yield). The purity (99%) was determined by HPLC analysis using a Rexchrom C18 column (250 x 4.6 mm, 5 µm), CH_3OH/H_2O 70:30, 1 mL/min, 28 ºC, t_R: 6.84 min, 254 nm. **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.10 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H), 8.05 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.60 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H), 7.53 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.98 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 6.65 (dd, *J* = 8.5, 2.4 Hz, 1H), 6.62 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 5.18 (s, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.48 (s, 3H). **^{13}C{H} NMR** (101 MHz, $CDCl_3$) δ 189.2, 162.8, 159.8, 158.7, 140.1, 131.4, 130.6, 130.4, 119.6, 116.2, 113.4, 107.8, 103.5, 93.8, 55.8, 55.2.



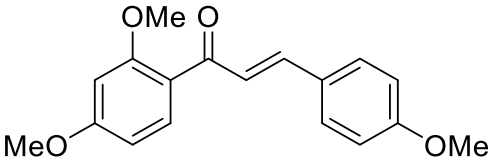
(E)-1,3-bis(3,5-dimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one (**15**): The compound was obtained as a yellow solid (1558 mg, 95% yield). The purity (99%) was determined by HPLC analysis using a Rexchrom C18 column (250 x 4.6 mm, 5 µm), CH_3OH/H_2O 70:30, 1 mL/min, 28 ºC, t_R: 12.7 min, 365 nm. **^{1}H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.71 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H), 7.40 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H), 7.13 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H), 6.77 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H), 6.67 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.52 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H), 3.86 (s, 6H), 3.83 (s, 6H). **^{13}C{H} NMR** (101 MHz, $CDCl_3$) δ 190.3, 161.2, 161.0, 145.1, 140.3, 136.9, 122.7, 106.5, 106.5, 105.1, 103.0, 55.8, 55.6. The spectroscopic data were consistent with those reported in the literature [11].



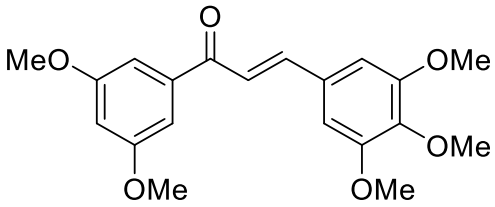
(E)-1-(3-methoxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one (**16**): The compound was obtained as a white solid (924 mg, 69% yield). The purity (95%) was determined by HPLC analysis using a Rexchrom C18 column (250 x 4.6 mm, 5 µm), CH_3OH/H_2O 70:30, 1 mL/min, 28 ºC, t_R: 8.96 min, 254 nm. **^{1}H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.78 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 7.62 – 7.56 (m, 3H), 7.54 (dd, *J* = 2.5, 1.5 Hz, 1H), 7.43 – 7.36 (m, 2H), 7.11 (ddd, *J* = 8.2, 2.7, 0.9 Hz, 1H), 6.93 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.84 (s, 3H). **^{13}C{H} NMR** (101 MHz, $CDCl_3$) δ 190.4, 161.8, 160.0, 144.8, 140.0, 130.4, 129.6, 127.7, 121.0, 119.9, 119.1, 114.5, 112.9, 55.6, 55.5. The spectroscopic data were consistent with those reported in the literature [12].



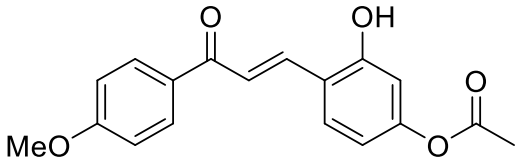
(E)-1-(2-methoxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one (**17**): The compound was obtained as a white solid (1270 mg, 95% yield). The purity (96%) was determined by HPLC analysis using a Rexchrom C18 column (250 x 4.6 mm, 5 µm), CH_3OH/H_2O 70:30, 1 mL/min, 28 ºC, t_R: 6.73 min, 254 nm. **^{1}H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.61 – 7.55 (m, 2H), 7.53 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.48 – 7.42 (m, 1H), 7.23 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H), 7.02 (td, *J* = 7.5, 0.9 Hz, 1H), 6.99 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.90 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.83 (s, 3H). **^{13}C{H} NMR** (101 MHz, $CDCl_3$) δ 193.3, 161.6, 158.0, 143.5, 132.7, 130.3, 130.2, 129.6, 127.9, 125.0, 120.8, 114.4, 111.7, 55.8, 55.5. The spectroscopic data were consistent with those reported in the literature [12].



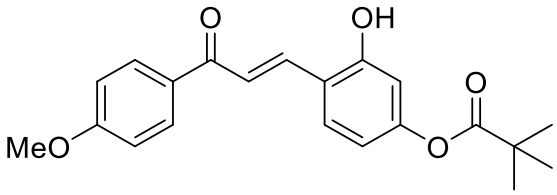
(E)-1-(2,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one (**18**): The compound was obtained as a white solid (687 mg, 46% yield). The purity (96%) was determined by HPLC analysis using a Rexchrom C18 column (250 x 4.6 mm, 5 µm), CH_3OH/H_2O 70:30, 1 mL/min, 28 ºC, t_R: 7.84 min, 254 nm. **^{1}H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.73 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.64 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H), 7.58 – 7.51 (m, 2H), 7.39 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H), 6.90 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.55 (dd, *J* = 8.6, 2.3 Hz, 1H), 6.49 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.83 (s, 3H). **^{13}C{H} NMR** (101 MHz, $CDCl_3$) δ 190.7, 164.1, 161.3, 160.3, 142.1, 132.8, 130.06, 128.2, 125.1, 122.53, 114.4, 105.2, 98.8, 55.8, 55.6, 55.5. The spectroscopic data were consistent with those reported in the literature [13].



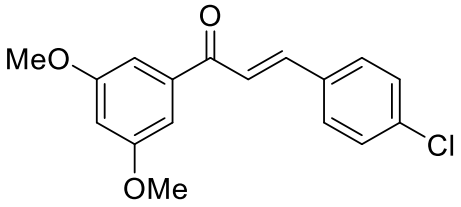
(E)-1-(3,5-dimethoxyphenyl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one (**19**): The compound was obtained as a pale-yellow solid (1288 mg, 72% yield). The purity (99%) was determined by HPLC analysis using a Rexchrom C18 column (250 x 4.6 mm, 5 µm), CH_3OH/H_2O 70:30, 1 mL/min, 28 ºC, t_R: 9.73 min, 254 nm. **^{1}H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.70 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 7.33 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 7.13 (d, *J* = 2.2 Hz, 2H), 6.85 (s, 2H), 6.66 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H), 3.91 (s, 6H), 3.89 (s, 3H), 3.85 (s, 6H). **^{13}C{H} NMR** (101 MHz, $CDCl_3$) δ 190.2, 161.0, 153.6, 145.2, 140.6, 140.4, 130.4, 121.5, 106.6, 105.8, 104.8, 61.1, 56.4, 55.8.



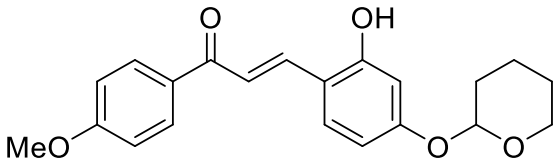
(E)-3-hydroxy-4-(3-(4-methoxyphenyl)-3-oxoprop-1-en-1-yl)phenyl acetate (**20**): The compound was obtained as a yellow solid (247 mg, 44% yield). **^{1}H NMR** (400 MHz, Acetone-d_6) δ 9.46 (s, 1H), 8.19 – 8.07 (m, 3H), 7.93 – 7.80 (m, 2H), 7.11 – 7.02 (m, 2H), 6.81 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.75 – 6.68 (m, 1H), 3.90 (s, 3H), 2.25 (s, 3H). **^{13}C{H} NMR** (101 MHz, Acetone-d_6) δ 188.5, 169.3, 164.2, 158.3, 154.2, 138.7, 132.1, 131.4, 130.3, 122.1, 120.8, 114.6, 114.5, 110.4, 55.9, 21.0.



(E)-3-hydroxy-4-(3-(4-methoxyphenyl)-3-oxoprop-1-en-1-yl)phenyl pivalate (**21**): The compound was obtained as a white solid (388 mg, 61% yield). The purity (96%) was determined by HPLC analysis using a Rexchrom C18 column (250 x 4.6 mm, 5 µm), CH_3OH/H_2O 70:30, 1 mL/min, 28 ºC, t_R: 10.14 min, 254 nm. **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.47 (s, 1H), 8.10 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H), 8.04 – 7.97 (m, 2H), 7.64 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H), 7.54 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.96 – 6.89 (m, 2H), 6.70 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.61 (dd, *J* = 8.5, 2.2 Hz, 1H), 3.85 (s, 3H), 1.33 (s, 9H). **^{13}C{H} NMR** (126 MHz, $CDCl_3$) δ 190.7, 177.5, 163.6, 157.6, 153.5, 140.3, 131.2, 131.1, 130.2, 121.8, 120.4, 113.9, 113.7, 110.2, 55.6, 39.3, 27.2.

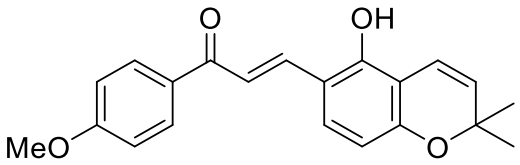


(E)-3-(4-chlorophenyl)-1-(3,5-dimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one (**22**): The compound was obtained as a pale-yellow solid (815 mg, 54% yield). The purity (95%) was determined by HPLC analysis using a Rexchrom C18 column (250 x 4.6 mm, 5 µm), CH_3OH/H_2O 70:30, 1 mL/min, 28 ºC, t_R: 25.78 min, 254 nm. **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.74 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H), 7.59 – 7.53 (m, 2H), 7.43 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H), 7.39 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.13 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H), 6.67 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H), 3.86 (s, 6H). **^{13}C{H} NMR** (126 MHz, $CDCl_3$) δ 189.9, 161.1, 143.5, 140.1, 136.6, 133.5, 129.7, 129.4, 122.6, 106.5, 105.2, 55.8, 55.8.

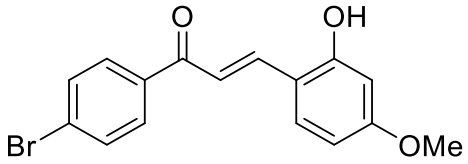


(E)-3-(2-hydroxy-4-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)phenyl)-1-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1one (**23**): The compound was obtained as a light-orange solid (490 mg, 77% yield). **^{1}H NMR** (500 MHz, DMSO-d_6) δ 10.34 (s, 1H), 8.08 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.97 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H), 7.78 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.73 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 7.06 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 6.62 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.55 (dd, *J* = 8.7, 2.4 Hz, 1H), 5.45 (t, *J* = 3.2 Hz, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.74 (ddd, *J* = 12.3, 9.0, 3.4 Hz, 1H), 3.56 (dt, *J* = 10.6, 4.6 Hz, 1H), 1.89 – 1.68 (m, 3H), 1.66 – 1.48 (m, 3H). **^{13}C{H} NMR** (126 MHz,

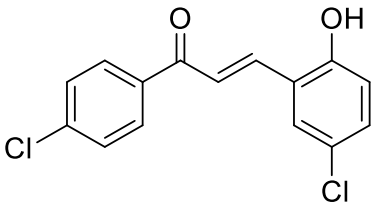
DMSO-d_6) δ 187.6, 162.9, 159.7, 158.6, 138.7, 131.0, 130.5, 129.9, 118.5, 115.5, 114.0, 108.3, 103.4, 95.6, 61.6, 55.6, 29.7, 24.6, 18.5.



(E)-3-(5-hydroxy-2,2-dimethyl-2H-chromen-6-yl)-1-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one (**24**): The compound was obtained as a green solid (332 mg, 55% yield). The purity (99%) was determined by HPLC analysis using a Waters C18 column (150 x 4.6 mm, 5 µm), CH_3OH/H_2O 70:30, 1 mL/min, 28 ºC, t_R: 5.23 min, 254 nm. **^{1}H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.54 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 8.05 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.49 (s, 1H), 7.46 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 6.97 (d, *J* = 9.0 Hz, 3H), 6.44 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 5.66 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H), 3.88 (s, 3H), 1.45 (s, 6H). **^{13}C{H} NMR** (126 MHz, $CDCl_3$) δ 190.0, 163.6, 156.9, 153.1, 141.0, 131.4, 131.1, 129.2, 127.9, 118.1, 116.6, 116.0, 113.9, 110.3, 109.9, 76.7, 55.6, 28.1. The spectroscopic data were consistent with those reported in the literature [14].

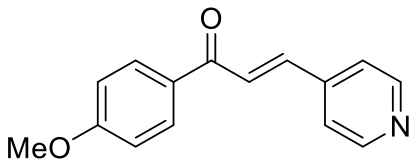


(E)-1-(4-bromophenyl)-3-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one (**25**): The compound was obtained as a brown solid (1082 mg, 65% yield). **^{1}H NMR** (400 MHz, Acetone-d_6) δ 9.30 (t, *J* = 0.7 Hz, 1H), 8.15 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 8.02 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.78 – 7.70 (m, 4H), 6.57 – 6.51 (m, 2H), 3.81 (s, 3H). **^{13}C{H} NMR** (101 MHz, Acetone-d_6) δ 189.2, 164.1, 159.7, 141.2, 138.8, 132.7, 131.4, 131.0, 127.5, 119.3, 116.1, 107.5, 102.2, 55.8.

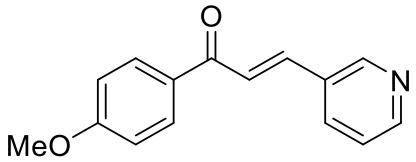


(E)-3-(5-chloro-2-hydroxyphenyl)-1-(4-chlorophenyl)prop-2-en-1-one (**26**): The compound was obtained as a pale-yellow solid (1318 mg, 90% yield). The purity (99%) was determined by HPLC analysis using a Rexchrom C18 column (250 x 4.6 mm, 5 µm), CH_3OH/H_2O 70:30, 1 mL/min, 28 ºC, t_R: 20.56 min, 254 nm. **^{1}H NMR** (500 MHz, DMSO) δ 8.18 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 8.04 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.97 (d, *J* = 14.0 Hz, 2H), 7.64 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.31 (dd, *J* = 8.7, 2.6 Hz, 1H), 6.95

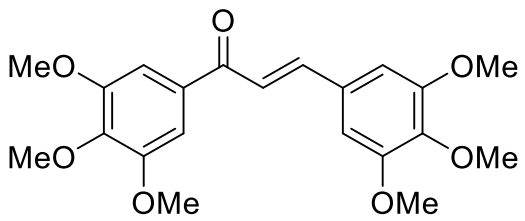
(d, *J* = 8.7 Hz, 1H). **^{13}C{H} NMR** (126 MHz, DMSO) δ 188.1, 156.0, 138.1, 138.0, 136.3, 131.6, 130.5, 128.9, 127.5, 123.3, 123.0, 121.6, 117.9. The spectroscopic data were consistent with those reported in the literature [15].



(E)-1-(4-methoxyphenyl)-3-(pyridin-4-yl)prop-2-en-1-one (**27**): The compound was obtained as a white solid (1147 mg, 96% yield). The purity (99%) was determined by HPLC analysis using a Waters C18 column (150 x 4.6 mm, 5 µm), CH_3OH/H_2O 70:30, 1 mL/min, 28 ºC, t_R: 3.25 min, 254 nm. **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.66 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 8.03 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.66 (s, 2H), 7.45 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 6.98 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 3.88 (s, 3H). **^{13}C{H} NMR** (126 MHz, $CDCl_3$) δ 188.0, 164.0, 150.6, 142.5, 140.8, 131.1, 130.6, 126.1, 122.1, 114.1, 55.6. The spectroscopic data were consistent with those reported in the literature [16].

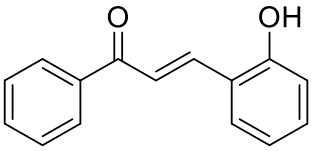


(E)-1-(4-methoxyphenyl)-3-(pyridin-3-yl)prop-2-en-1-one (**28**): The compound was obtained as a white solid (1015 mg, 85% yield). The purity (98%) was determined by HPLC analysis using a Rexchrom C18 column (250 x 4.6 mm, 5 µm), CH_3OH/H_2O 70:30, 1 mL/min, 28 ºC, t_R: 5.44 min, 254 nm. **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.86 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 8.62 (dd, *J* = 4.8, 1.7 Hz, 1H), 8.08 – 8.01 (m, 2H), 7.94 (dt, *J* = 7.9, 2.0 Hz, 1H), 7.77 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H), 7.61 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H), 7.35 (ddd, *J* = 8.0, 4.8, 0.9 Hz, 1H), 7.02 – 6.96 (m, 2H), 3.89 (s, 3H). **^{13}C{H} NMR** (126 MHz, $CDCl_3$) δ 188.0, 163.8, 150.9, 150.0, 149.9, 140.1, 134.6, 131.0, 130.7, 123.9, 123.7, 114.1, 55.5. The spectroscopic data were consistent with those reported in the literature [17].

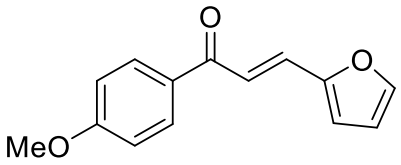


(E)-1,3-bis(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one (**29**): The compound was obtained as a pale-yellow solid (1881 mg, 97% yield). The purity (99%) was determined by HPLC analysis using a Waters C18 column (150 x 4.6 mm, 5 µm), CH_3OH/H_2O 60:40, 1 mL/min, 28 ºC, t_R: 5.26 min, 254 nm. **^{1}H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.70 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 7.32 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 7.24 (s, 2H), 6.85 (s, 2H), 3.93 (s, 6H), 3.92 (s, 3H), 3.91 (s, 6H), 3.89 (s, 3H). **^{13}C{H} NMR** (101 MHz,

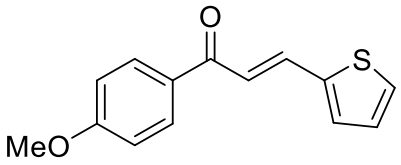
$CDCl_3$) δ 189.5, 153.6, 153.3, 145.1, 142.7, 140.6, 133.7, 130.5, 121.4, 106.4, 105.9, 61.1, 61.1, 56.6, 56.4. The spectroscopic data were consistent with those reported in the literature [18].



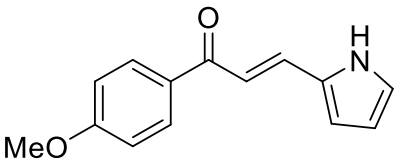
(E)-3-(2-hydroxyphenyl)-1-phenylprop-2-en-1-one (**30**): The compound was obtained as a yellow solid (996 mg, 89% yield). The purity (99%) was determined by HPLC analysis using a Rexchrom C18 column (250 x 4.6 mm, 5 µm), CH_3OH/H_2O 70:30, 1 mL/min, 28 ºC, t_R: 6.24 min, 365 nm. **^{1}H NMR** (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.34 (s, 1H), 8.16 – 8.06 (m, 3H), 7.92 – 7.83 (m, 2H), 7.67 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.59 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.34 – 7.27 (m, 1H), 6.99 (dd, *J* = 8.2, 0.7 Hz, 1H), 6.91 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H). **^{13}C{H} NMR** (101 MHz, DMSO-d_6) δ 189.6, 157.3, 139.6, 138.0, 132.9, 132.1, 128.8, 128.8, 128.4, 121.4, 121.0, 119.5, 116.3. The spectroscopic data were consistent with those reported in the literature [19].



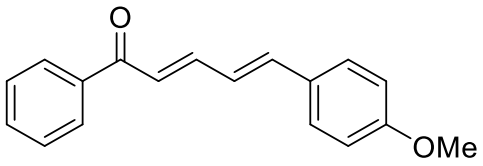
(E)-3-(furan-2-yl)-1-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one (**31**): The compound was obtained as a brown solid (971 mg, 85% yield). The purity (99%) was determined by HPLC analysis using a Rexchrom C18 column (250 x 4.6 mm, 5 µm), CH_3OH/H_2O 70:30, 1 mL/min, 28 ºC, t_R: 7.75 min, 254 nm. **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.04 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.58 (d, *J* = 15.3 Hz, 1H), 7.51 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.47 (d, *J* = 15.3 Hz, 1H), 6.97 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 6.69 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 6.50 (dd, *J* = 3.4, 1.8 Hz, 1H), 3.87 (s, 3H). **^{13}C{H} NMR** (126 MHz, $CDCl_3$) δ 188.0, 163.4, 151.8, 144.6, 131.1, 130.7, 129.9, 119.2, 115.8, 113.8, 112.5, 55.4. The spectroscopic data were consistent with those reported in the literature [20].



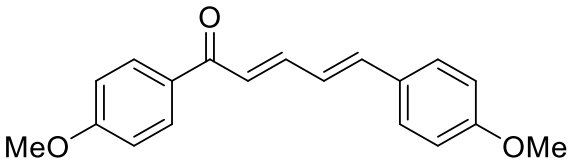
(E)-1-(4-methoxyphenyl)-3-(thiophen-2-yl)prop-2-en-1-oneone (**32**): The compound was obtained as a yellow solid (1050 mg, 86% yield). **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.02 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.93 (d, *J* = 15.3 Hz, 1H), 7.39 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H), 7.34 (dd, *J* = 9.4, 5.8 Hz, 2H), 7.08 (dd, *J* = 5.0, 3.6 Hz, 1H), 6.97 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 3.88 (s, 3H). **^{13}C{H} NMR** (126 MHz, $CDCl_3$) δ 188.1, 163.5, 140.7, 136.5, 131.8, 131.1, 130.8, 128.6, 128.4, 120.7, 113.9, 55.5. The spectroscopic data were consistent with those reported in the literature [21].



(E)-1-(4-methoxyphenyl)-3-(1H-pyrrol-2-yl)prop-2-en-1-one (**33**): The compound was obtained as a yellow solid (338 mg, 29% yield). The purity (97%) was determined by HPLC analysis using a Waters C18 column (250 x 4.6 mm, 5 µm), CH_3CN/H_2O 80:20, 1 mL/min, 28 ºC, t_R: 4.90 min, 254 nm. **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ 10.88 (s, 1H), 8.07 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.69 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 7.55 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 7.08 (dd, *J* = 3.9, 2.6 Hz, 1H), 7.05 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 6.70 (t, *J* = 3.6 Hz, 1H), 6.26 (dd, *J* = 6.0, 2.5 Hz, 1H), 3.89 (s, 3H). **^{13}C{H} NMR** (126 MHz, $CDCl_3$) δ 187.7, 164.1, 134.2, 133.9, 132.6, 131.1, 124.2, 116.3, 115.6, 114.7, 111.3, 56.0. The spectroscopic data were consistent with those reported in the literature [21].



(2E,4E)-5-(4-methoxyphenyl)-1-phenylpenta-2,4-dien-1-one (**34**): The compound was obtained as a yellow solid (1108 mg, 84% yield). The purity (96%) was determined by HPLC analysis using a Rexchrom C18 column (250 x 4.6 mm, 5 µm), CH_3OH/H_2O 70:30, 1 mL/min, 28 ºC, t_R: 11.64 min, 365 nm. **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.97 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.59 (dd, *J* = 14.9, 10.6 Hz, 1H), 7.55 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.50 – 7.41 (m, 4H), 7.04 (d, *J* = 14.9 Hz, 1H), 6.99 – 6.86 (m, 4H), 3.82 (s, 3H). **^{13}C{H} NMR** (126 MHz, $CDCl_3$) δ 190.6, 160.7, 145.5, 141.9, 138.5, 132.6, 129.0, 128.9, 128.6, 128.4, 124.9, 124.3, 114.4, 55.4. The spectroscopic data were consistent with those reported in the literature [22].



(2E,4E)-1,5-bis(4-methoxyphenyl)penta-2,4-dien-1-one (**35**): The compound was obtained as a yellow solid (1020 mg, 69% yield). The purity (97%) was determined by HPLC analysis using a Waters C18 column (250 x 4.6 mm, 5 µm), CH_3CN/H_2O 80:20, 1 mL/min, 28 ºC, t_R: 7.03 min, 254 nm. **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.99 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.59 (dd, *J* = 14.8, 10.4 Hz, 1H), 7.44 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.06 (d, *J* = 14.8 Hz, 1H), 6.99 – 6.93 (m, 3H), 6.93 – 6.86 (m, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.83 (s, 3H). **^{13}C{H} NMR** (126 MHz, $CDCl_3$) δ 188.8, 163.4, 160.6, 144.7, 141.4, 131.4, 130.8, 129.2, 128.8, 125.1, 124.2, 114.4, 113.9, 55.6, 55.4. The spectroscopic data were consistent with those reported in the literature [23].

References

[1] C.-K. Chan, Y.-L. Tsai, M.-Y. Chang, "$Bi(OTf)_3$ catalyzed disproportionation reaction of cinnamyl alcohols", *Tetrahedron* 73, nº 24 (2017): 3368–3376. https://doi.org/10.1016/j.tet.2017.05.006.

[2] L. D. Chiaradia, A. Mascarello, M. Purificação, et al., "Synthetic chalcones as efficient inhibitors of Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase PtpA", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 18, nº 23 (2008): 6227–6230. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.09.105.

[3] M. A. Rahim, M. M. H. Bhuiayan, M. M. Matin, "Microwave assisted efficient synthesis of some flavones for antimicrobial and ADMET studies", *Journal of Scientific Research* 12, nº 4 (2020): 673–685. https://doi.org/10.3329/jsr.v12i4.45523.

[4] M. V. B. Reddy, H.-Y. Hung, P.-C. Kuo, et al., "Synthesis and biological evaluation of chalcone, dihydrochalcone, and 1,3-diarylpropane analogs as anti-inflammatory agents", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 27, nº 7 (2017): 1547–1550. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.02.038.

[5] Y.-L. Zhang, Y.-Q. Wang, "Enantioselective biomimetic cyclization of 2′-hydroxychalcones to flavanones", *Tetrahedron Letters* 55, nº 21 (2014): 3255–3258. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2014.04.032.

[6] G. S. Caleffi, A. S. Rosa, L. G. De Souza, et al., "Aurones: a promising scaffold to inhibit SARS-CoV-2 replication", *Journal of Natural Products* 86, nº 6 (2023): 1536–1549. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.3c00249.

[7] V. Pathak, I. Ahmad, A. K. Kahlon, et al., "Syntheses of 2-methoxyestradiol and eugenol template-based diarylpropenes as non-steroidal anticancer agents", *RSC Advances* 4, nº 66 (2014): 35171. https://doi.org/10.1039/C4RA03823A.

[8] C. Letulle, F.-X. Troublet, A. Pinon, et al., "Synthesis and antiproliferative effect of 3,4,5-trimethoxylated chalcones on colorectal and prostatic cancer cells", *Pharmaceuticals* 17, nº 9 (2024): 1207. https://doi.org/10.3390/ph17091207.

[9] L. B. Salum, W. F. Altei, L. D. Chiaradia, et al., "Cytotoxic 3,4,5-trimethoxychalcones as mitotic arresters and cell migration inhibitors", *European Journal of Medicinal Chemistry* 63, (2013): 501–510. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.02.037.

[10] B. H. Lee, Y. L. Choi, S. Shin, J.-N. Heo, "Stereoselective palladium-catalyzed α-arylation of 3-aryl-1-indanones: an asymmetric synthesis of (+)-Pauciflorol F", *The Journal of Organic Chemistry* 76, nº 16 (2011): 6611–6618. https://doi.org/10.1021/jo2009164.

[11] M. Abdel-Halim, S. Sigler, N. A. S. Racheed, et al., "From celecoxib to a novel class of phosphodiesterase 5 inhibitors: trisubstituted pyrazolines as novel PDE5 inhibitors with extremely high potency and isozymic selectivity", *Journal of Medicinal Chemistry* 64, nº 8 (2021): 4462–4477. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01120.

[12] F. Peng, C.-W. Meng, Q.-M. Zhou, et al., "Cytotoxic evaluation against breast cancer cells of isoliquiritigenin analogues from Spatholobus suberectus and their synthetic derivatives", *Journal of Natural Products* 79, nº 1 (2016): 248–251. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00774.

[13] S. Kim, H. J. Park, J.-H. Kim, "First concise total synthesis of biologically interesting natural licoagrochalcone B and its unnatural derivatives", *Bulletin of the Korean Chemical Society* 28, nº 12 (2007): 2523–2526. https://doi.org/10.5012/bkcs.2007.28.12.2523.

[14] F. C. Demidoff, G. S. Caleffi, M. Figueiredo, P. R. R. Costa, "Ru(II)-catalyzed asymmetric transfer hydrogenation of chalcones in water: application to the enantioselective synthesis of flavans BW683C and Tephrowatsin E", *The Journal of Organic Chemistry* 87, nº 21 (2022): 14208–14222. https://doi.org/10.1021/acs.joc.2c01733.

[15] C. Li, Q. Chen, Y. He, et al., "Discovery of a chalcone derivative as potent necroptosis inhibitor for the treatment of acute kidney injury", *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 49, nº 8 (2022): 824–835. https://doi.org/10.1111/1440-1681.13670.

[16] F. E. Mulyana, S. S. W. Waskitha, D. Pranowo, et al., "Synthesis of chalcone derivatives with methoxybenzene and pyridine moieties as potential antimalarial agents*", Pharmacia* 70, nº 4 (2023): 1305–1313. https://doi.org/10.3897/pharmacia.70.e107406.

[17] A. Stafford, S. R. Allen, L. Estergreen, et al., "Efficient near-infrared photopolymerizations using AzaBODIPYs with electron-donating groups and intramolecular charge transfer", *Macromolecules* 56, nº 23 (2023): 9804–9810. https://doi.org/10.1021/acs.macromol.3c02004.

[18] S. Żubrowski, D. Krzysztofik, S. Buda, "Formation of 2H- and 4H-chromene rings in intramolecular Rauhut–Currier reaction, catalyzed by lithium selenolates", *ACS Omega* 10, nº 4 (2025): 3652–3664. https://doi.org/10.1021/acsomega.4c08613.

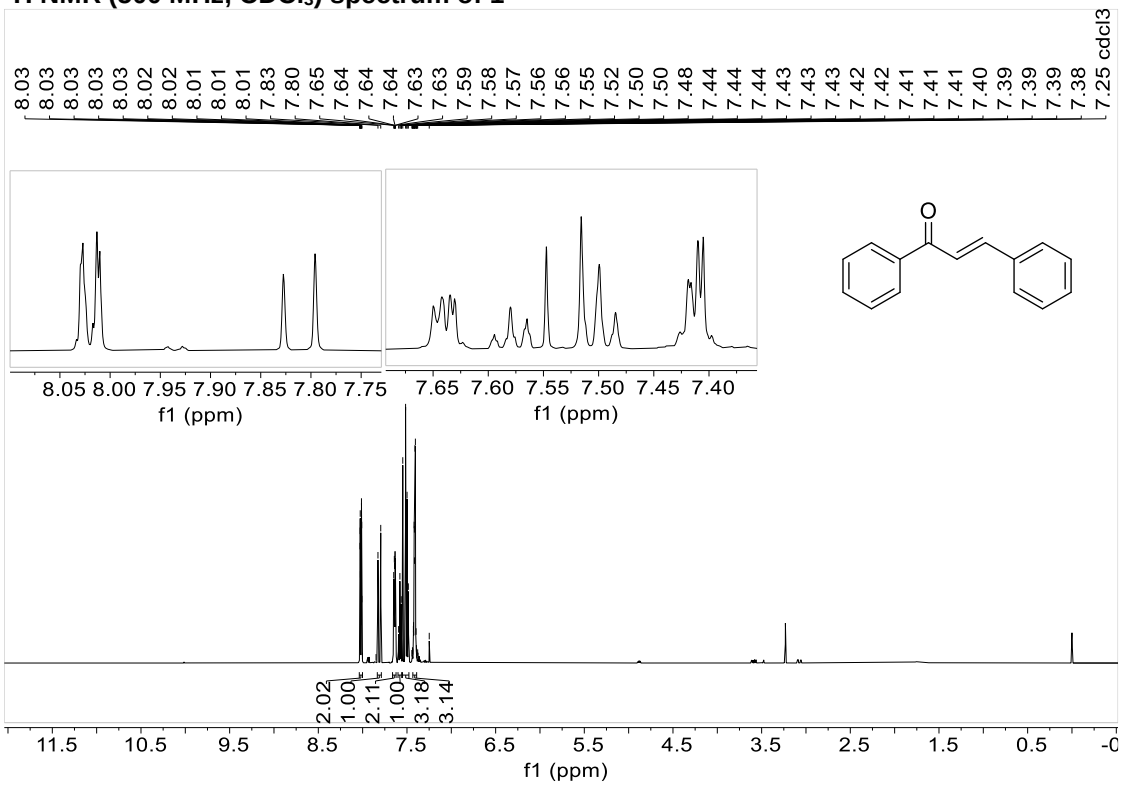
[19] P. Ahmad, H. Woo, K.-Y. Jun, et al., “Design, synthesis, topoisomerase I & II inhibitory activity, antiproliferative activity, and structure–activity relationship study of pyrazoline derivatives: an ATP-competitive human topoisomerase IIα catalytic inhibitor”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 24, nº 8 (2016): 1898–1908. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.03.017.

[20] A. Armstrong, R. D. C. Pullin, C. R. Jenner, J. N. Scutt, “Amine-promoted synthesis of vinyl aziridines”, *The Journal of Organic Chemistry* 75, nº 10 (2010): 3499–3502. https://doi.org/10.1021/jo100407s.

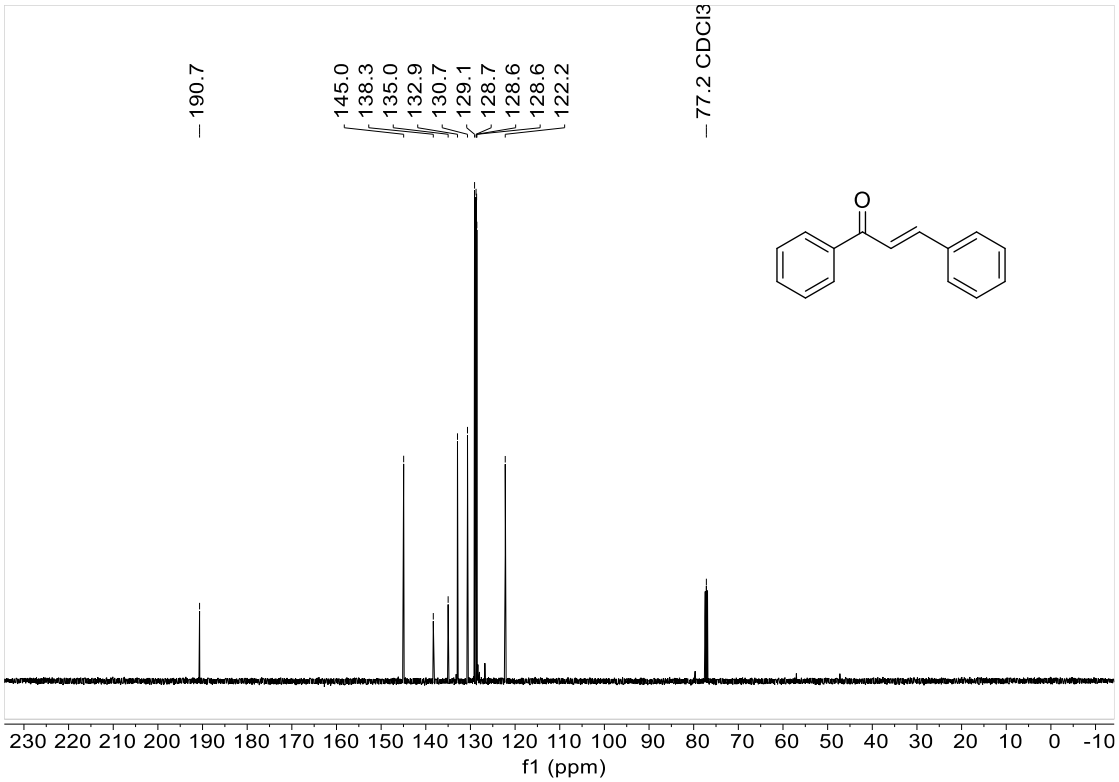
[21] A. Sharma, N. Sharma, A. Shard, et al., “Tandem allylic oxidation–condensation/esterification catalyzed by silica gel: an expeditious approach towards antimalarial diaryldienones and enones from natural methoxylated phenylpropenes”, *Organic & Biomolecular Chemistry* 9, nº 14 (2011): 5211. https://doi.org/10.1039/c1ob05293d.

NMR Spectra of the (E)-Chalcones: 1-35

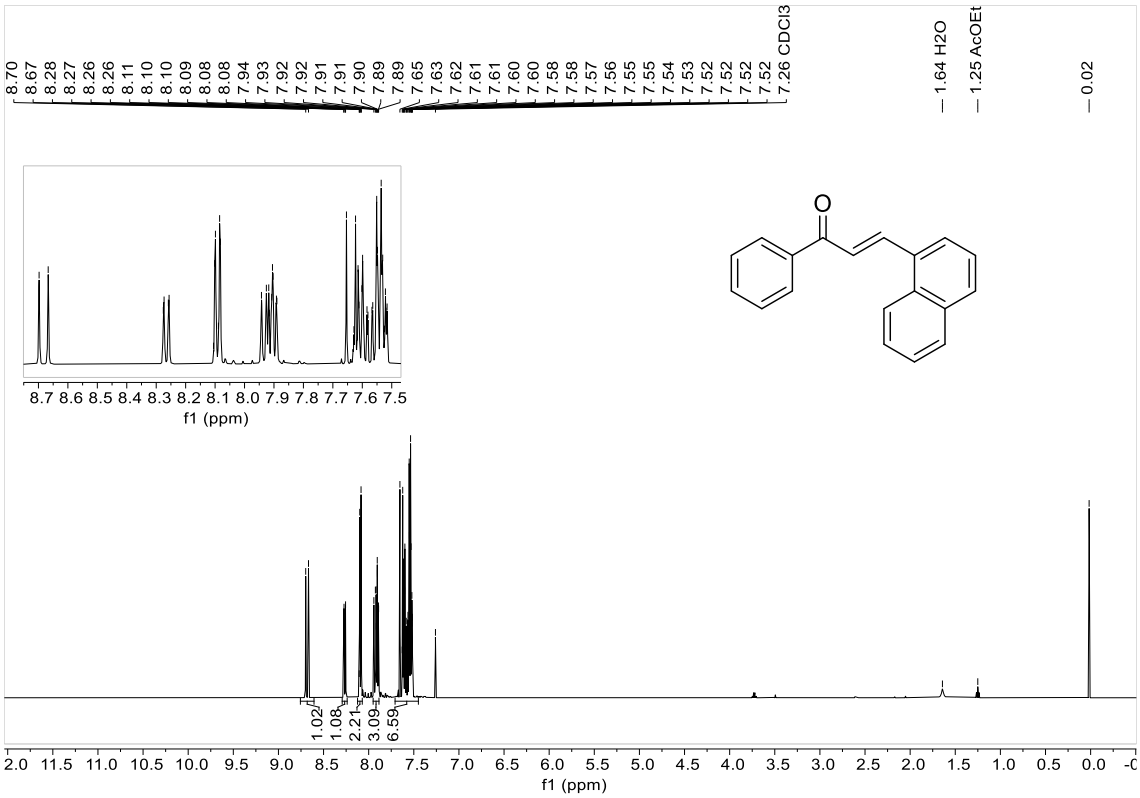
^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) spectrum of 1



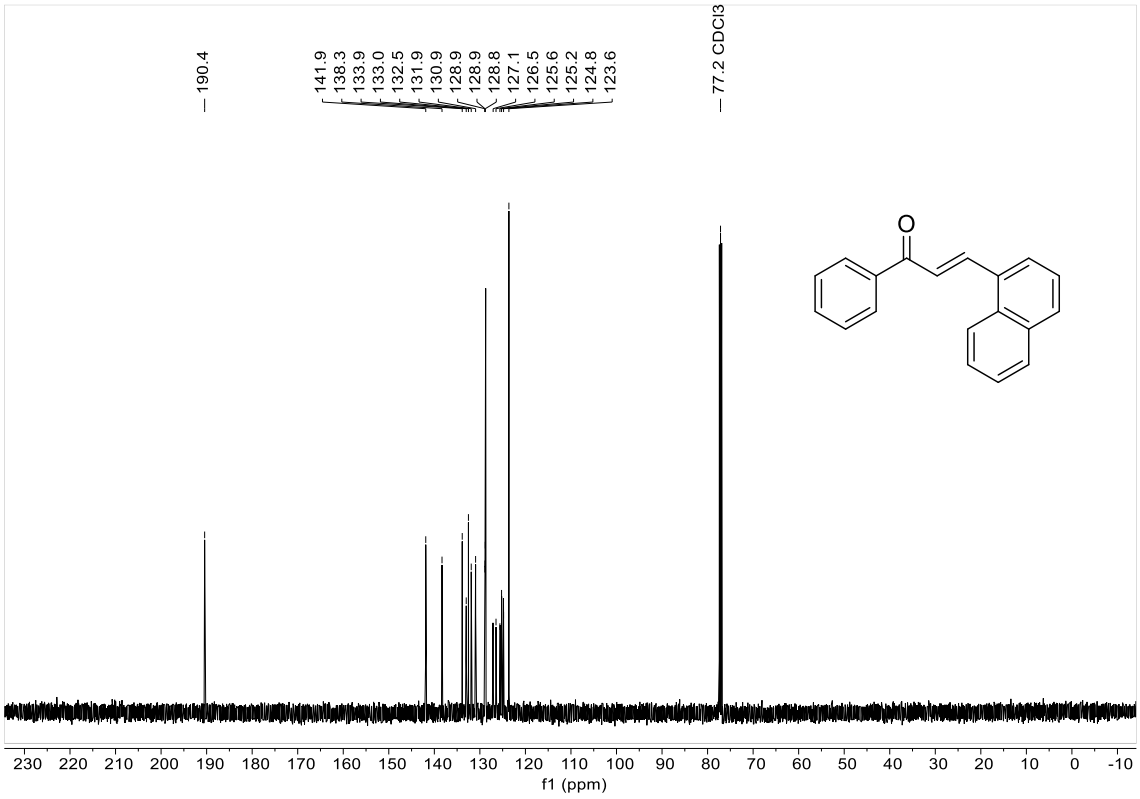
^{13}C NMR (126 MHz, CDCl3) of 1



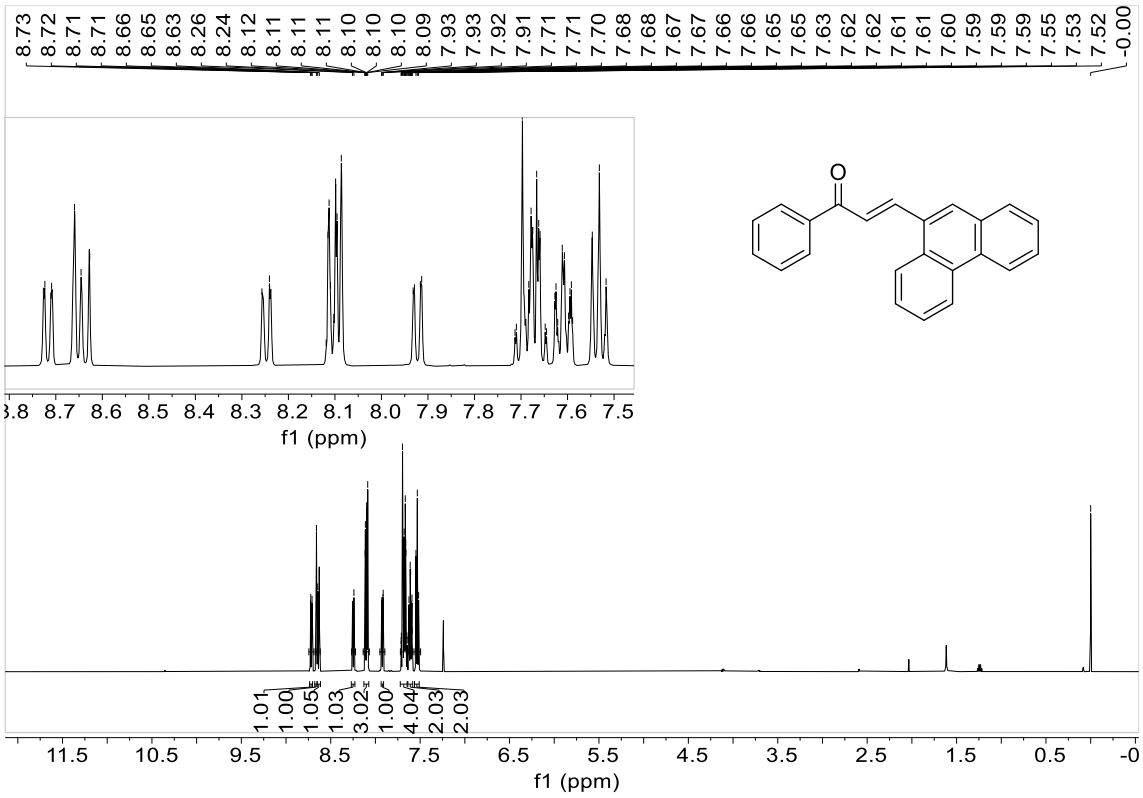
^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) spectrum of 2



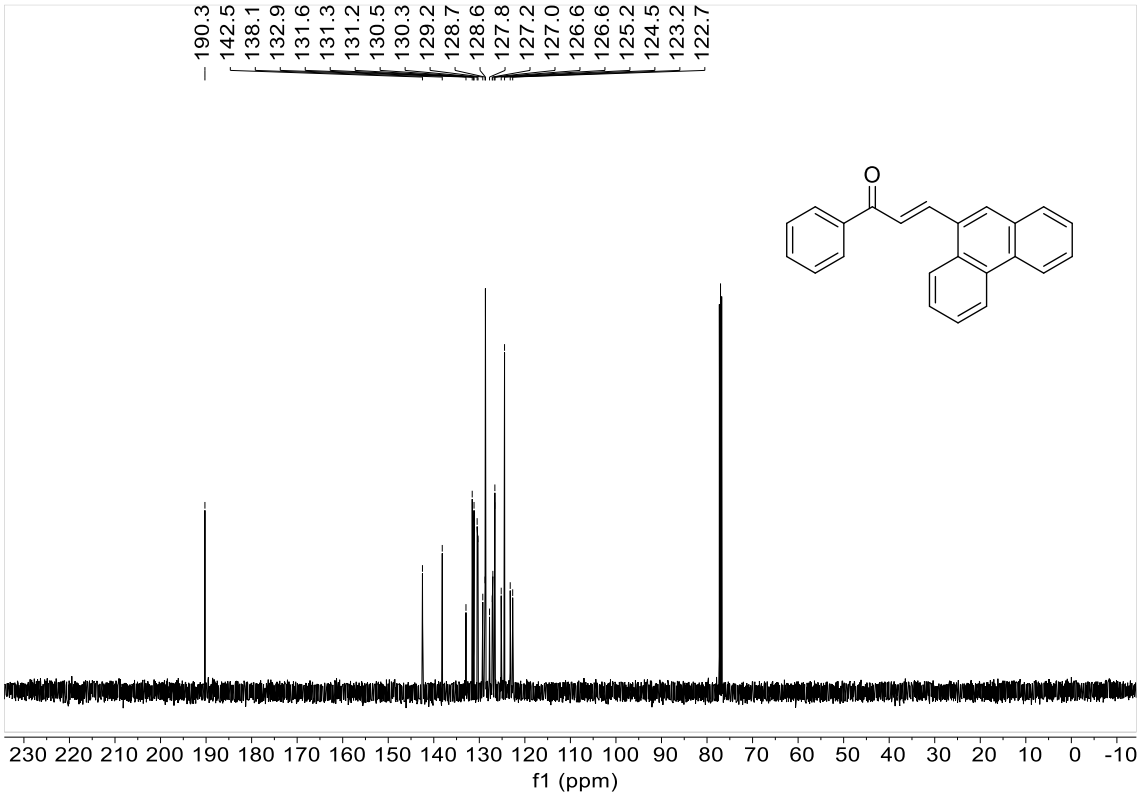
^{13}C NMR (126 MHz, CDCl3) of 2



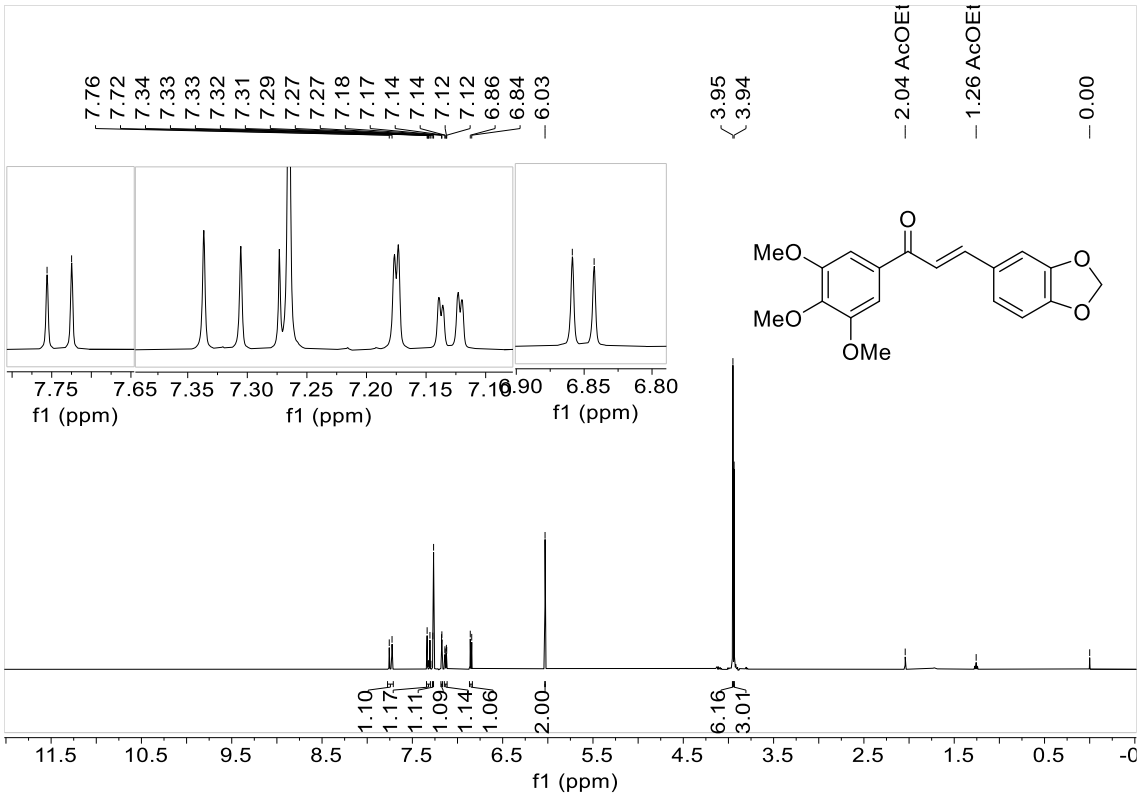
^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) spectrum of 3



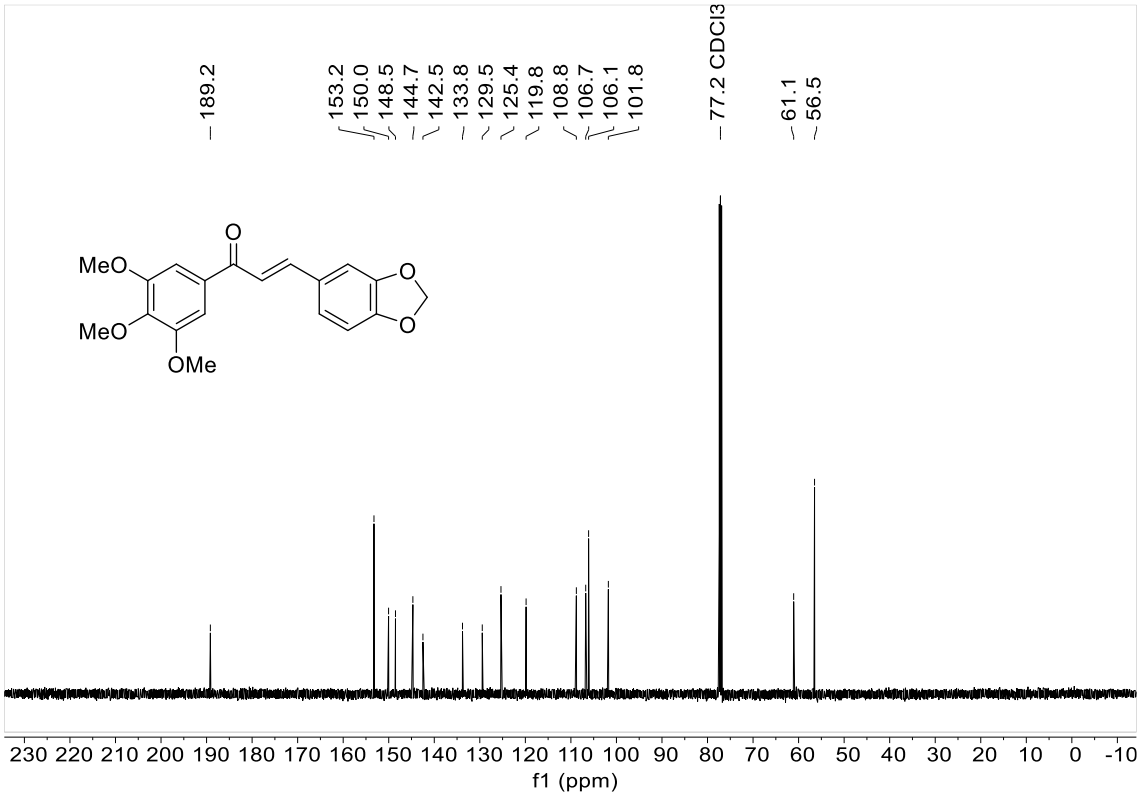
^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) of 3



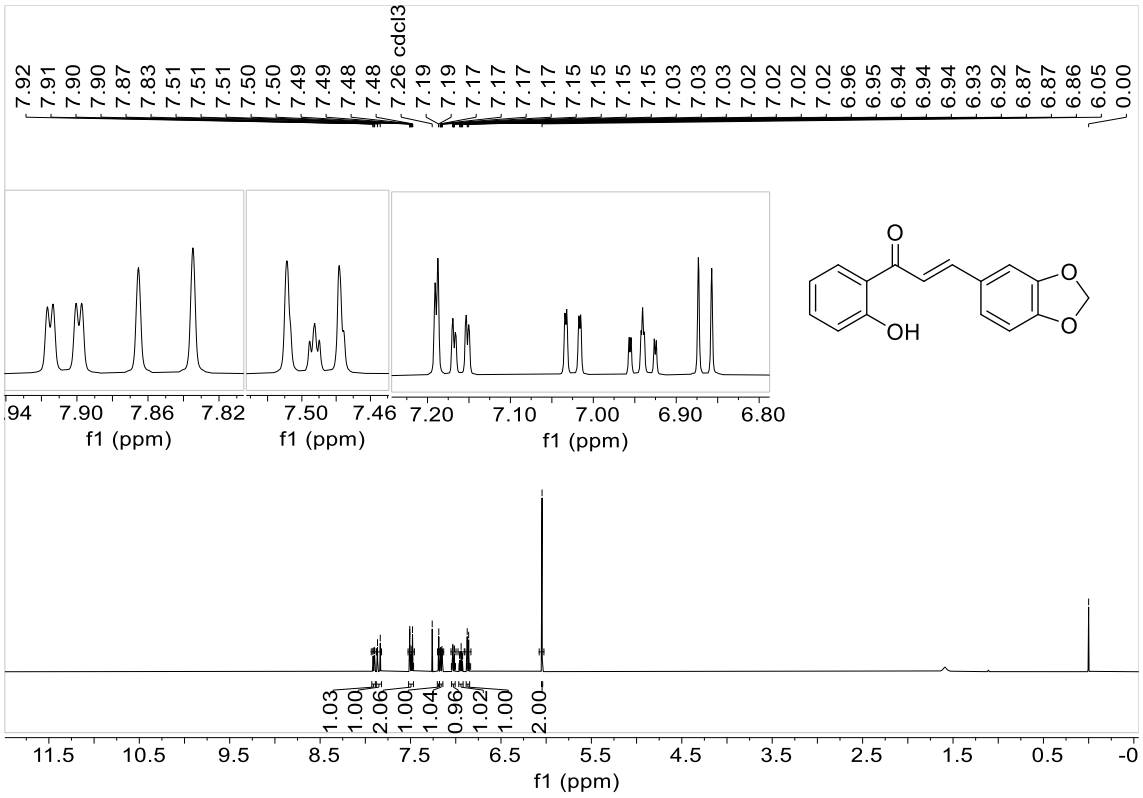
^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) spectrum of 4



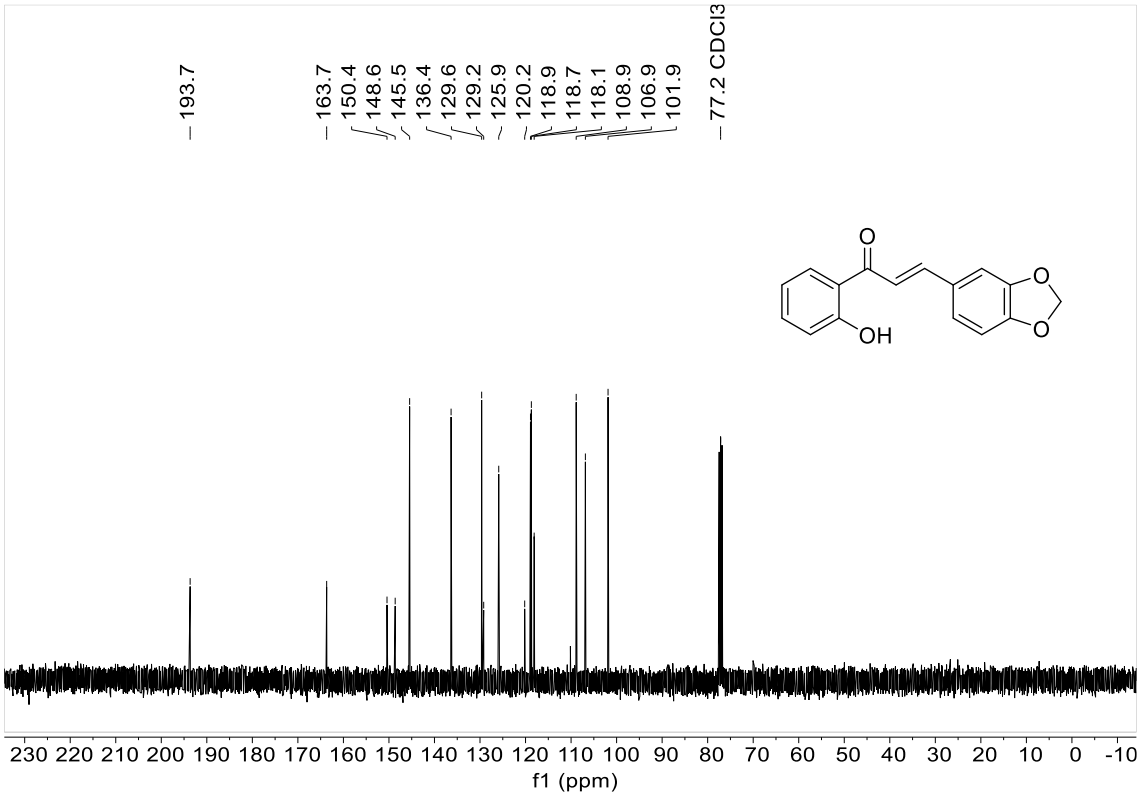
^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) of 4



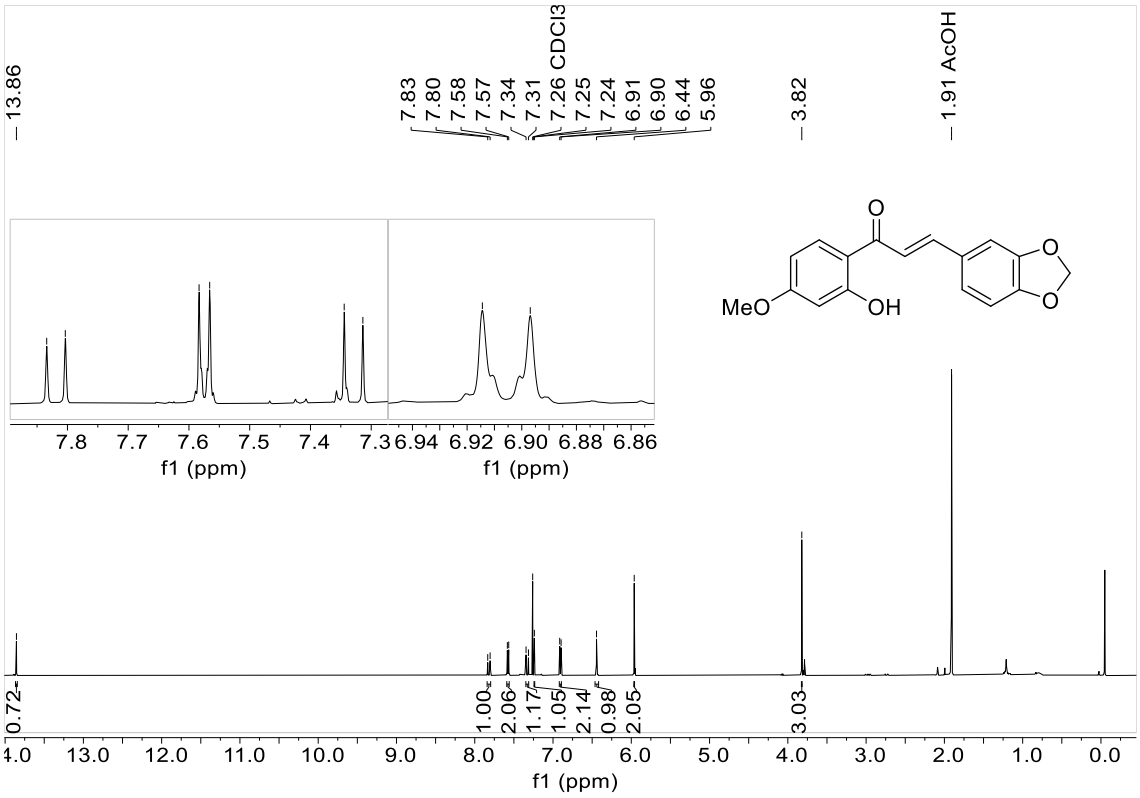
^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) spectrum of 5



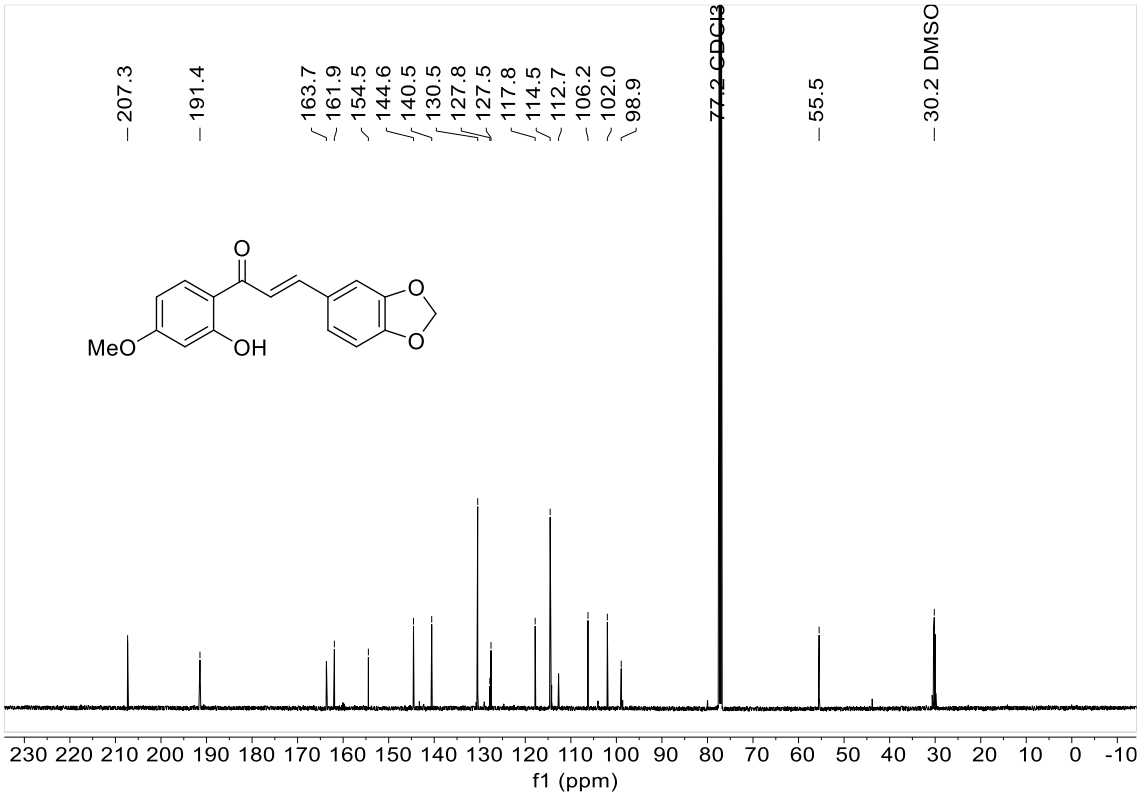
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) of 5



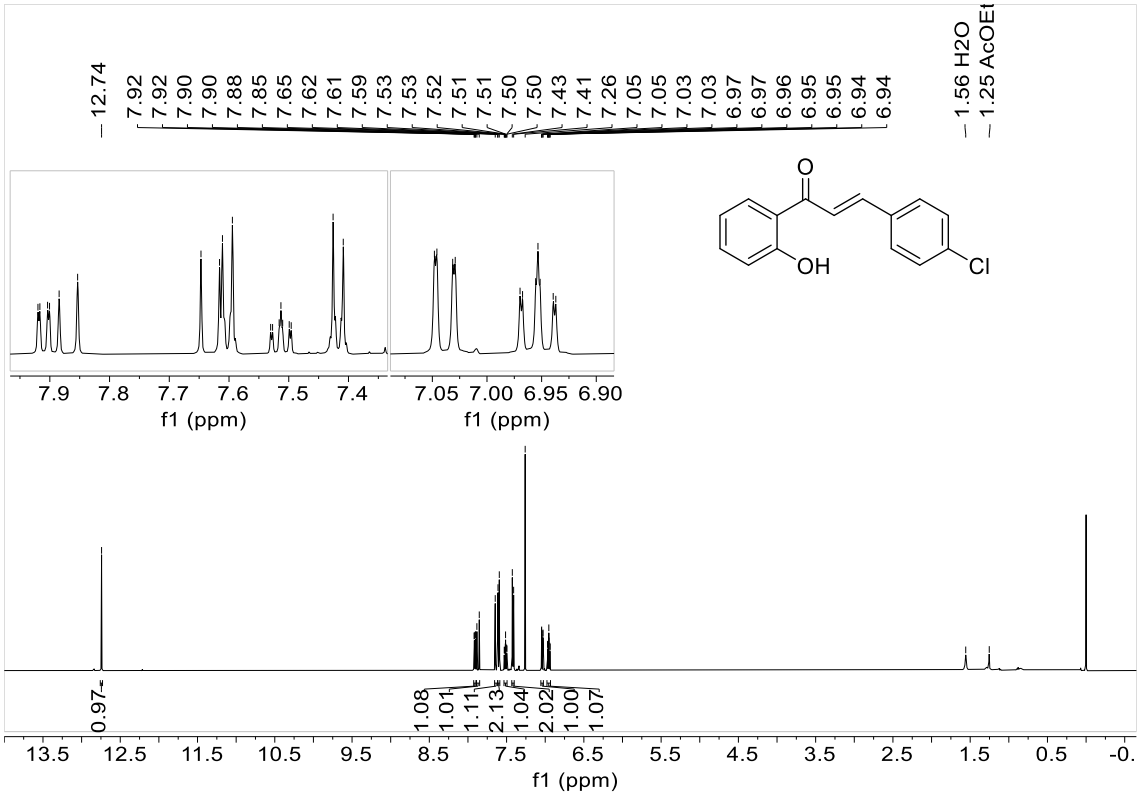
^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) spectrum of 6



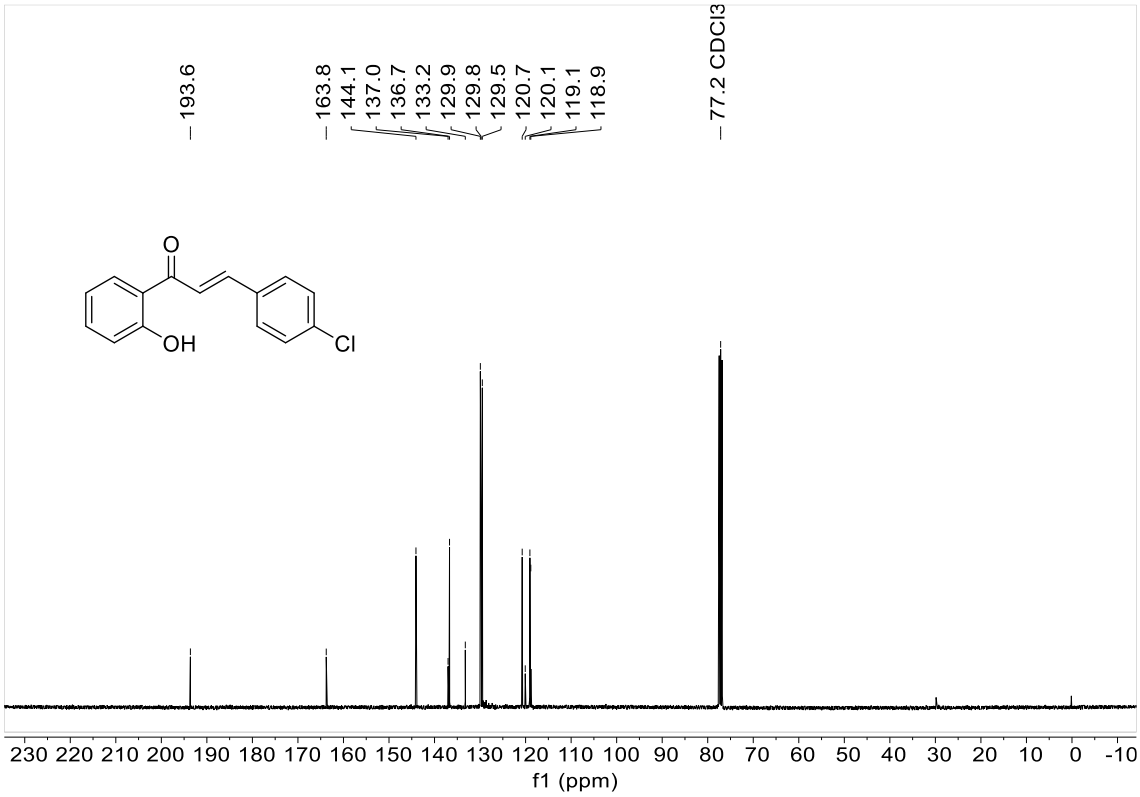
^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) of 6



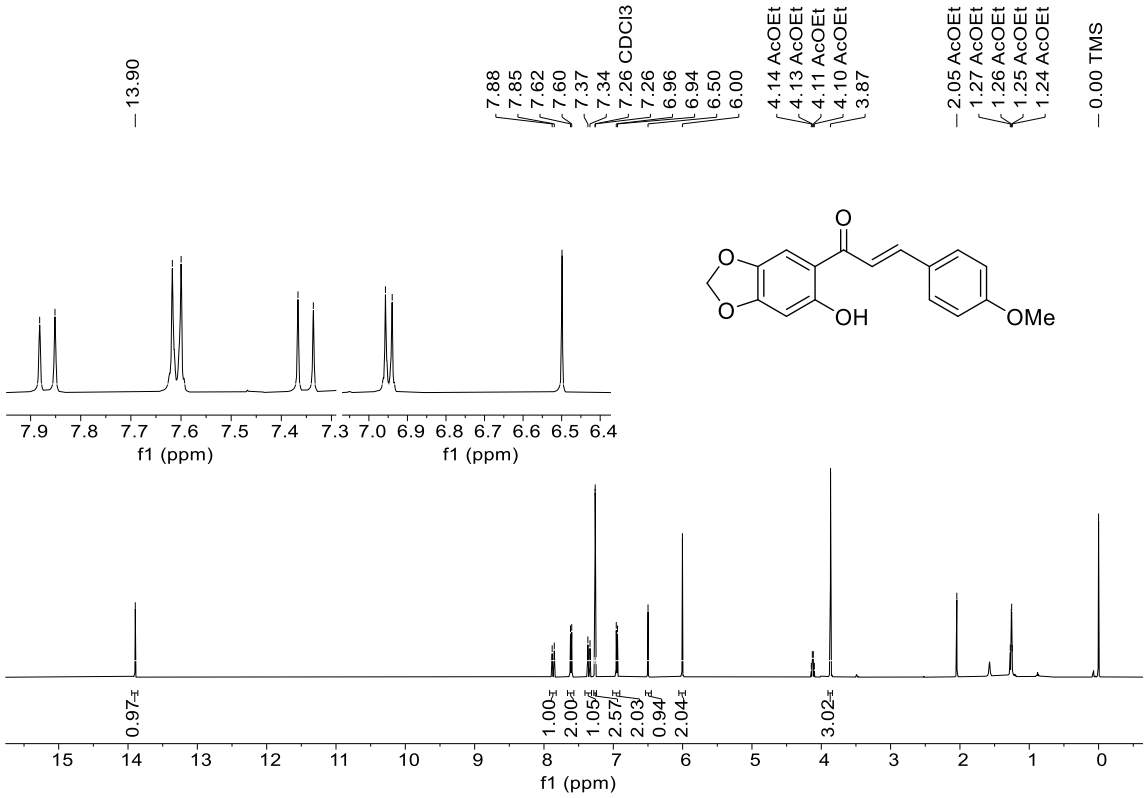
^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) spectrum of 7



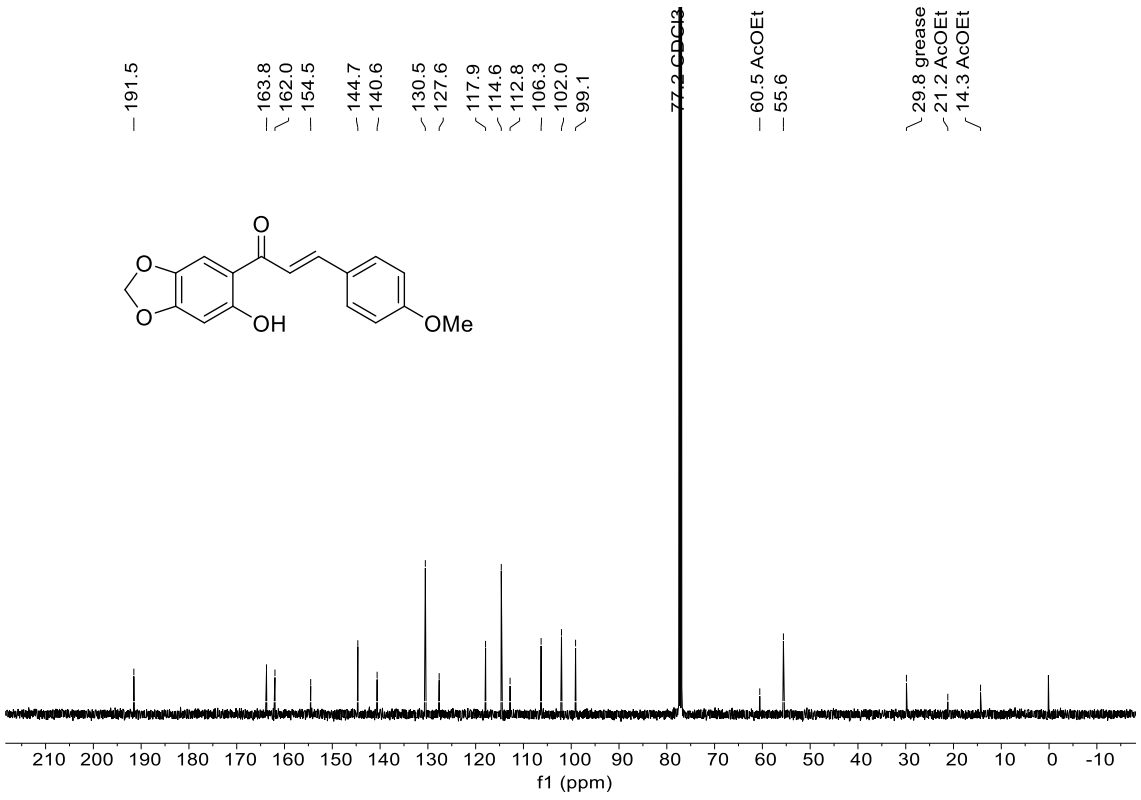
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) of 7



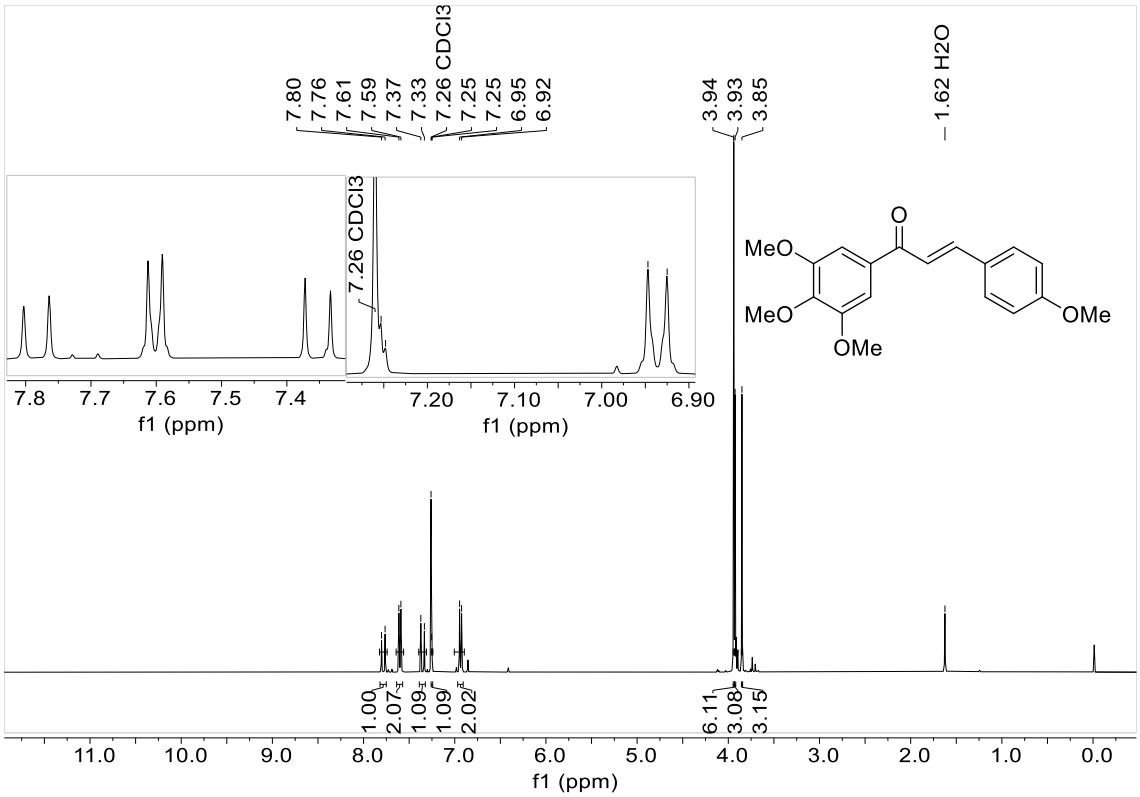
^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) spectrum of 8



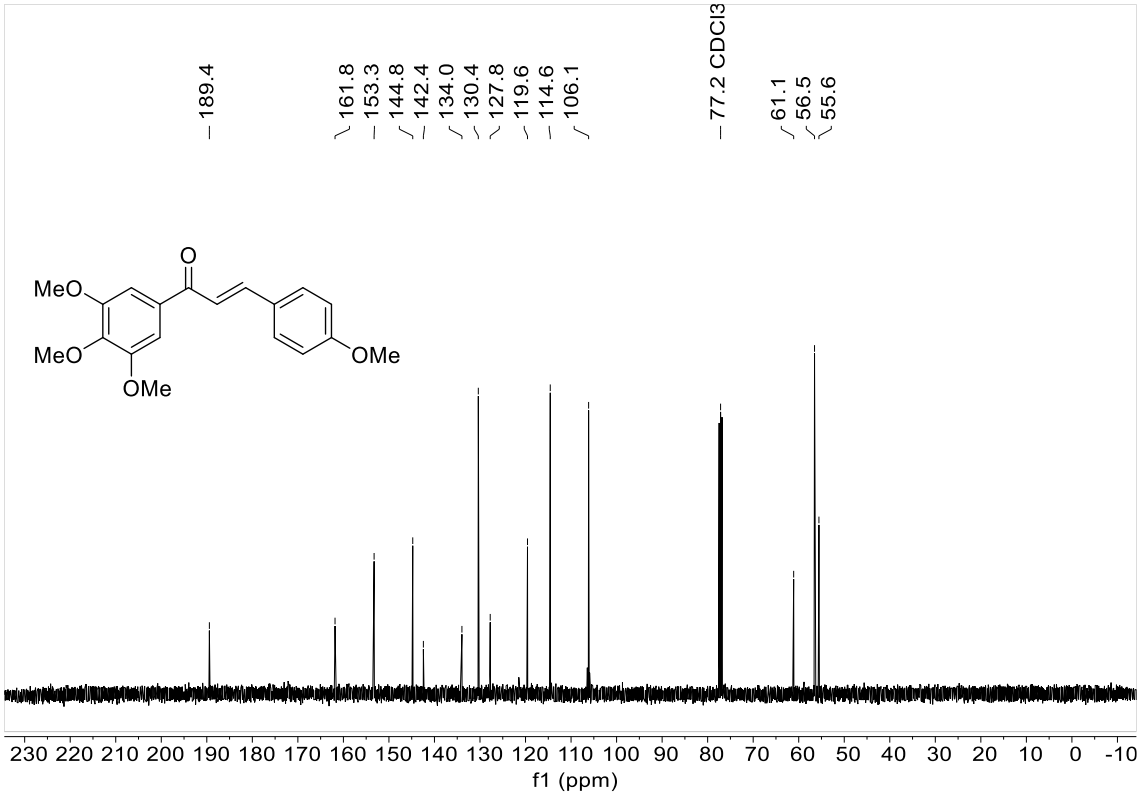
^{13}C{H} NMR (126 MHz, $CDCl_3$) spectrum of 8



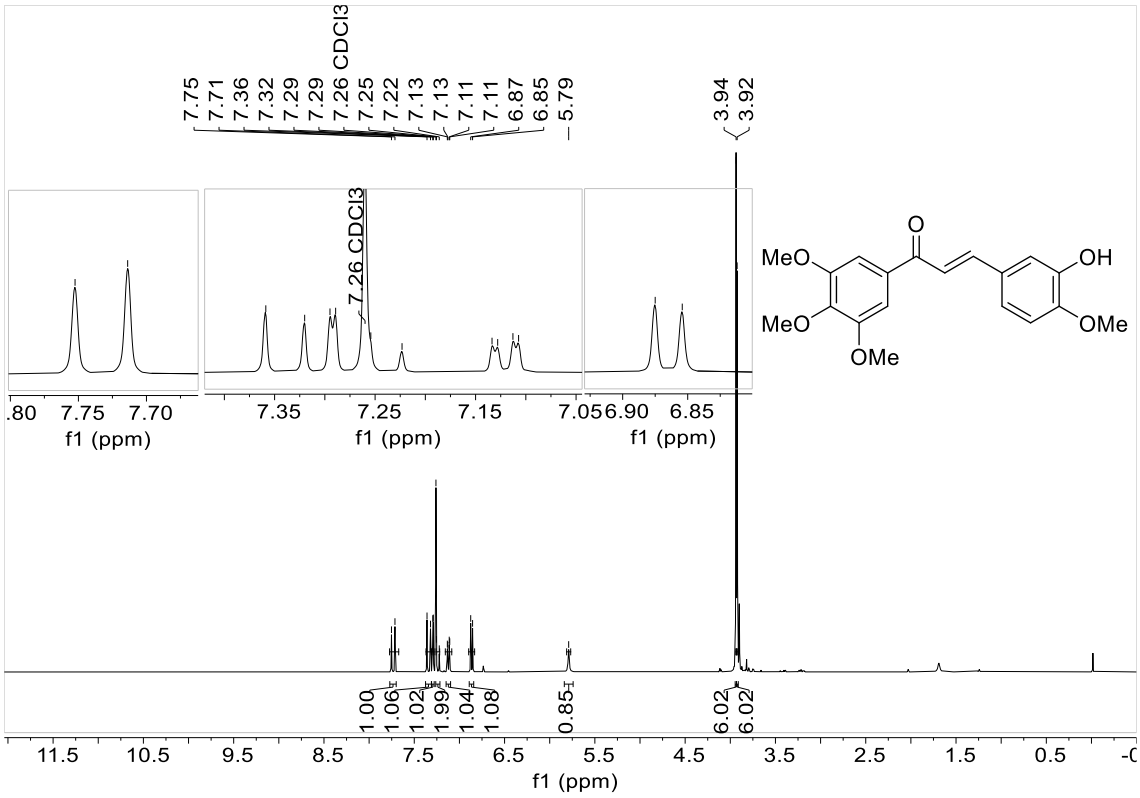
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) spectrum of 9



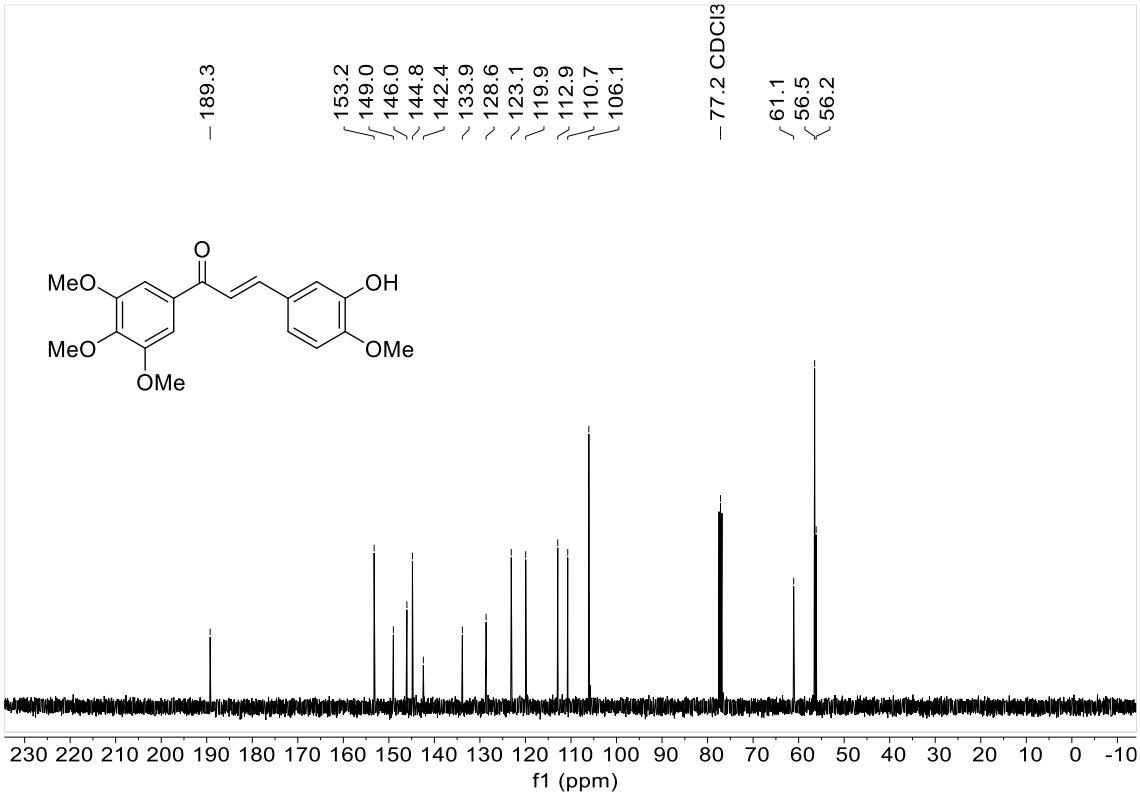
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) of 9



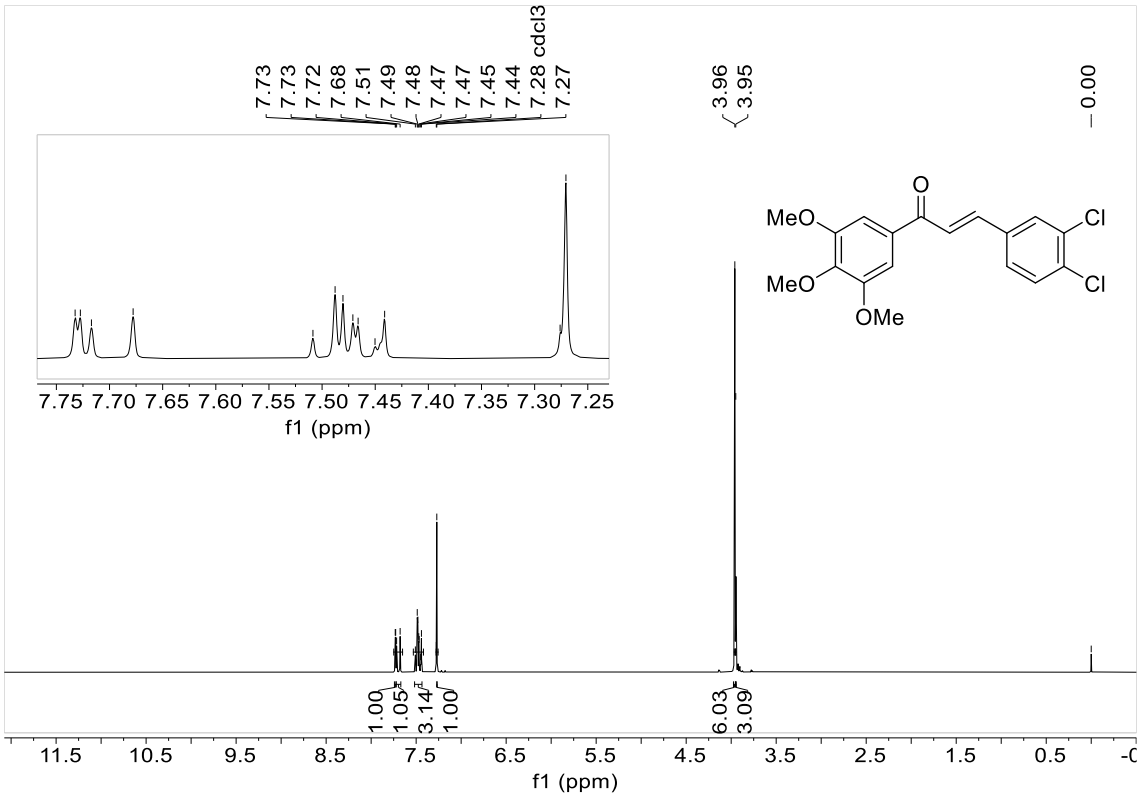
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) spectrum of 10



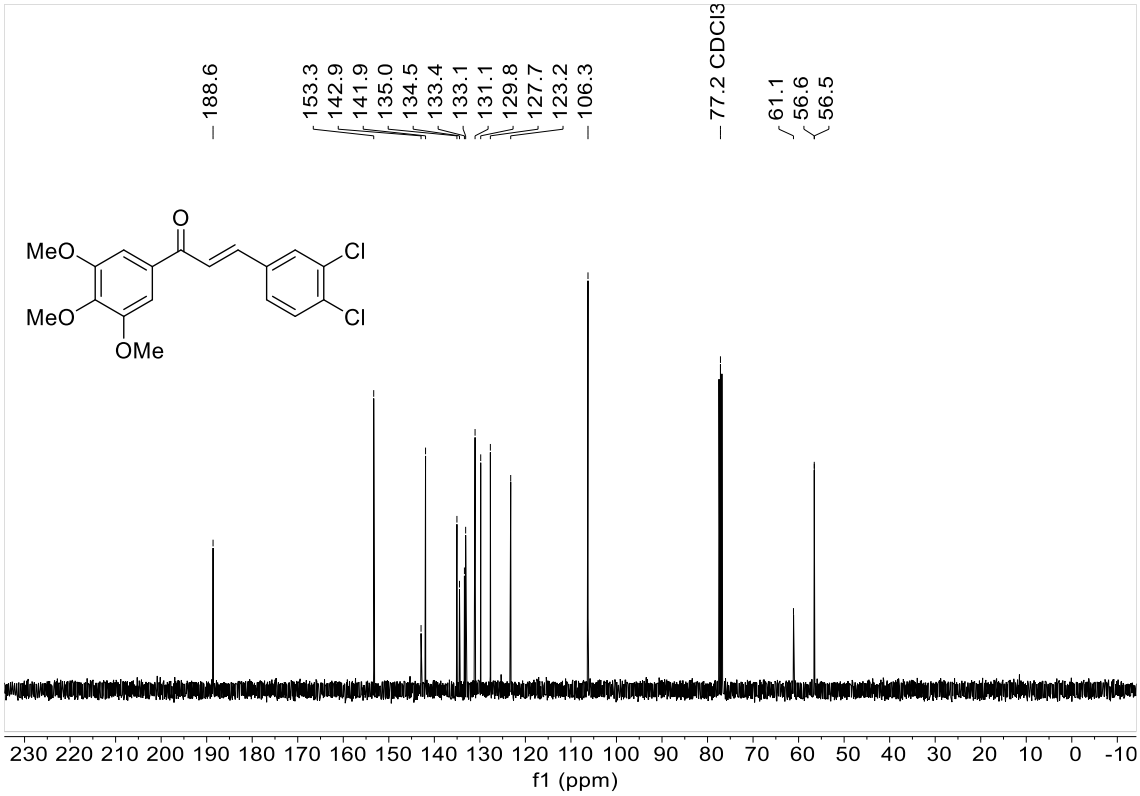
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) of 10



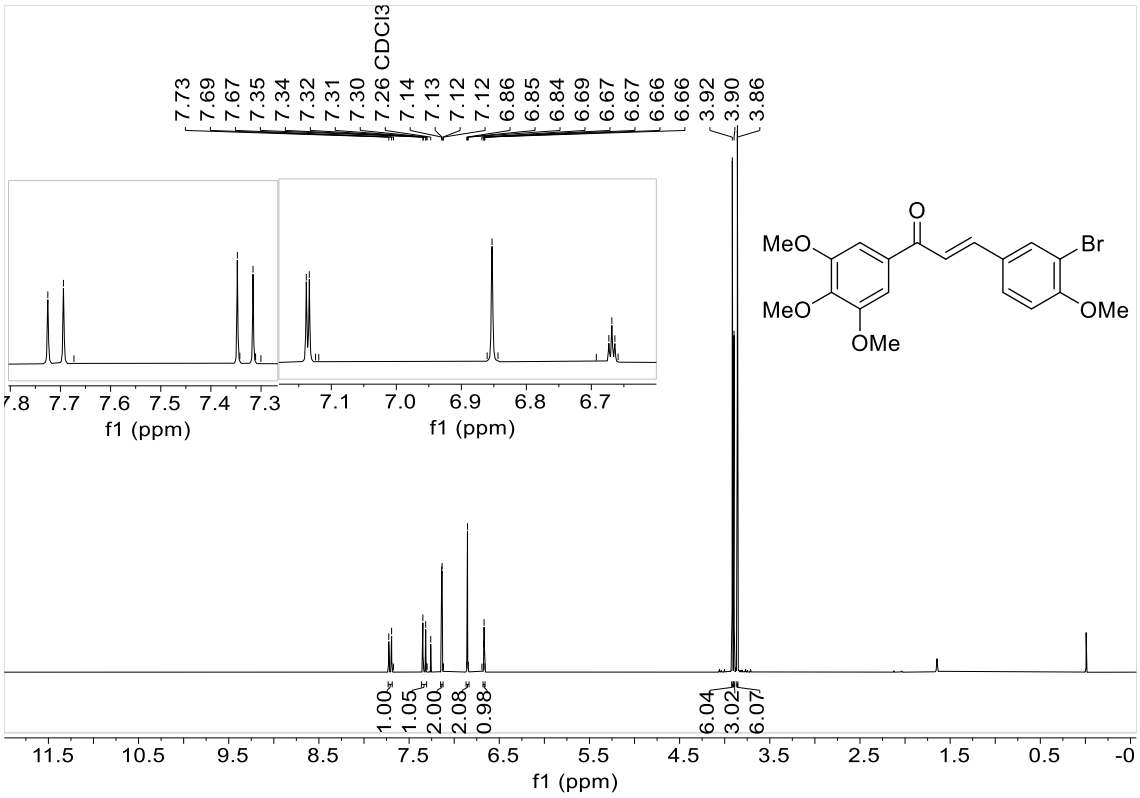
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) spectrum of 11



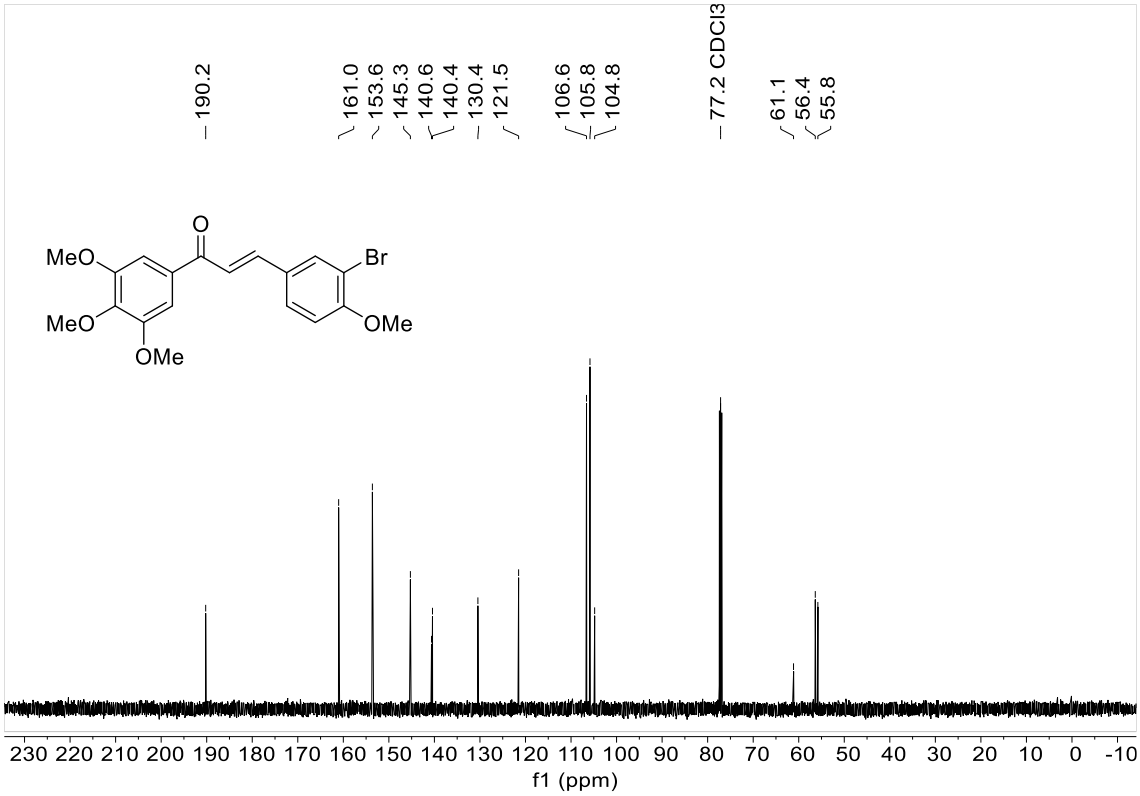
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) of 11



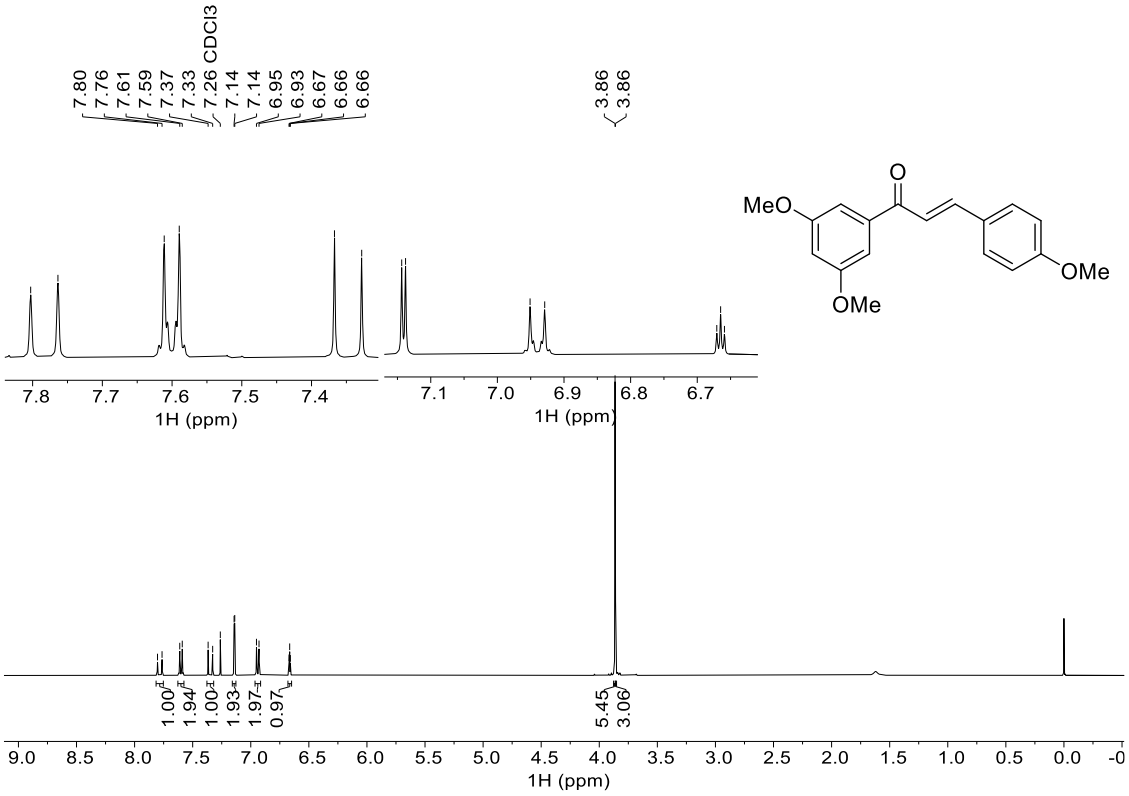
^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) spectrum of 12



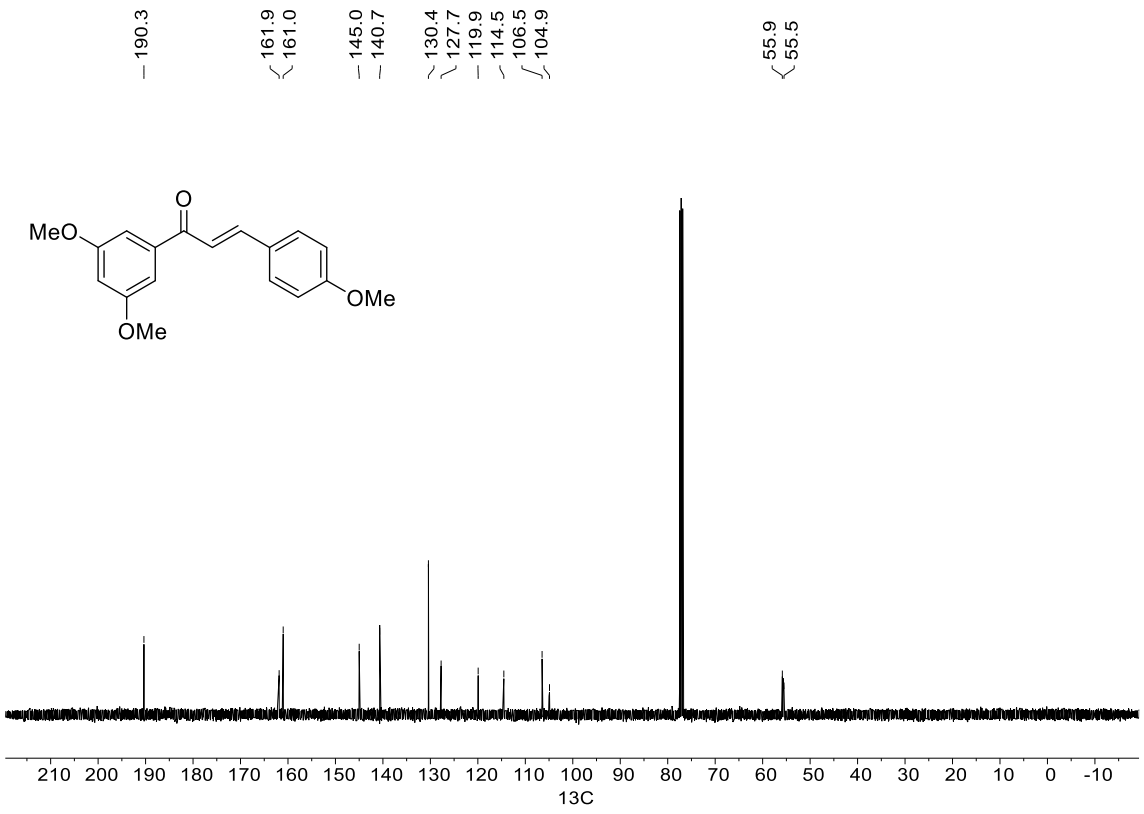
^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) of 12



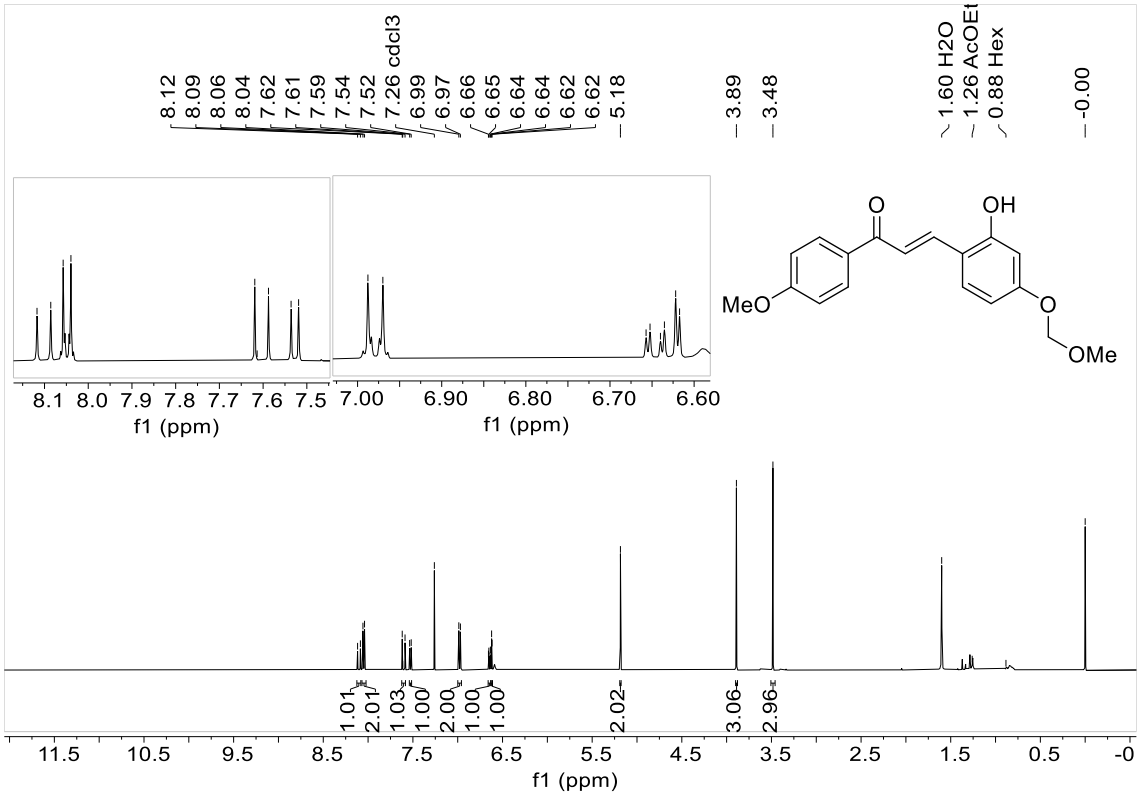
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) spectrum of 13



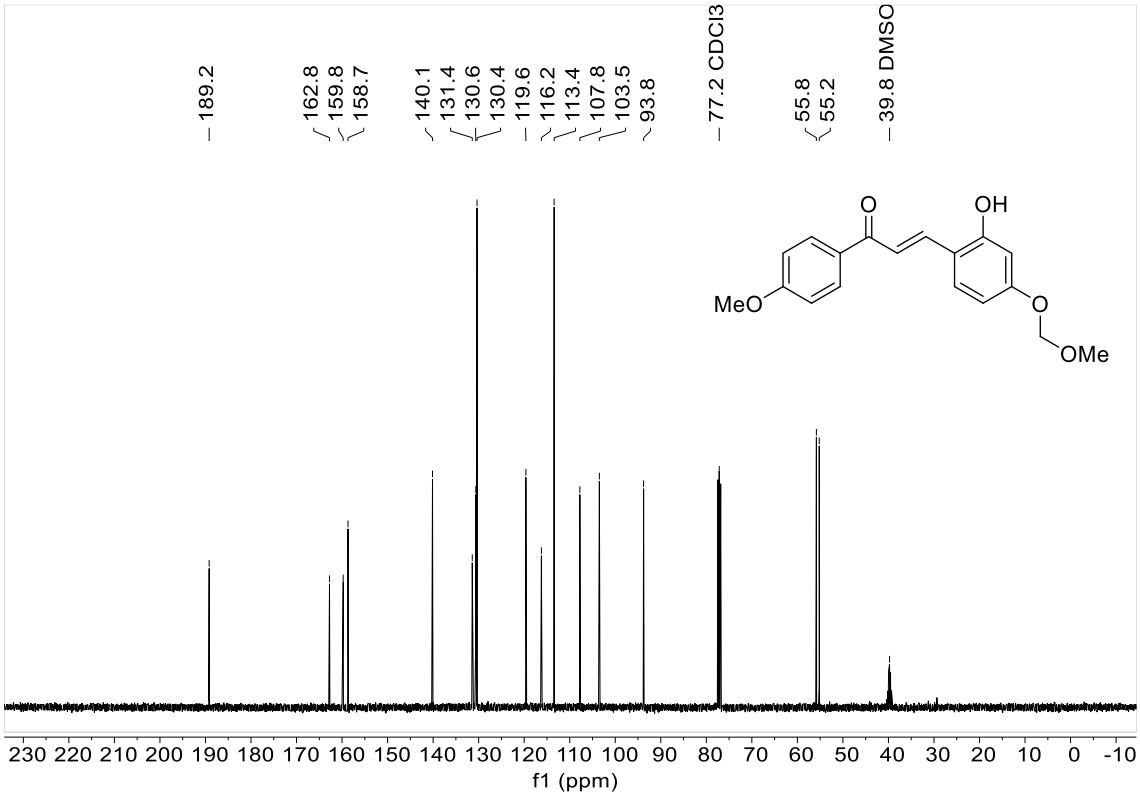
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) of 13



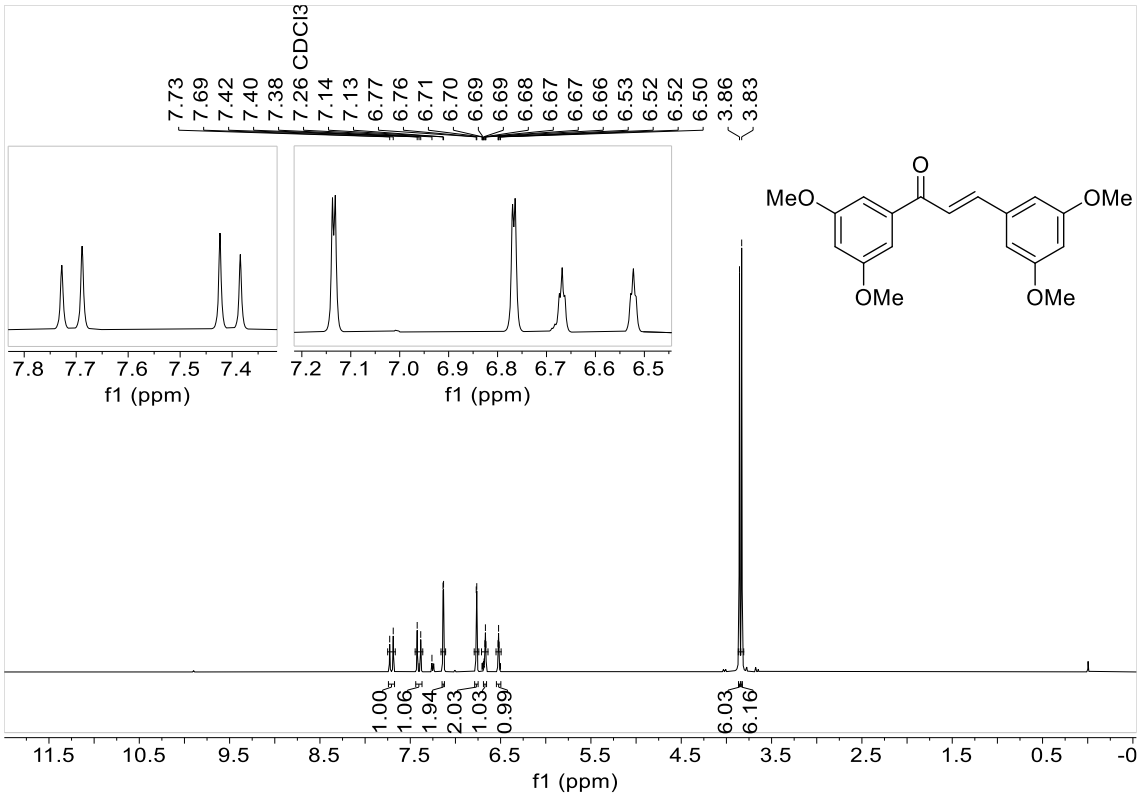
^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) spectrum of 14



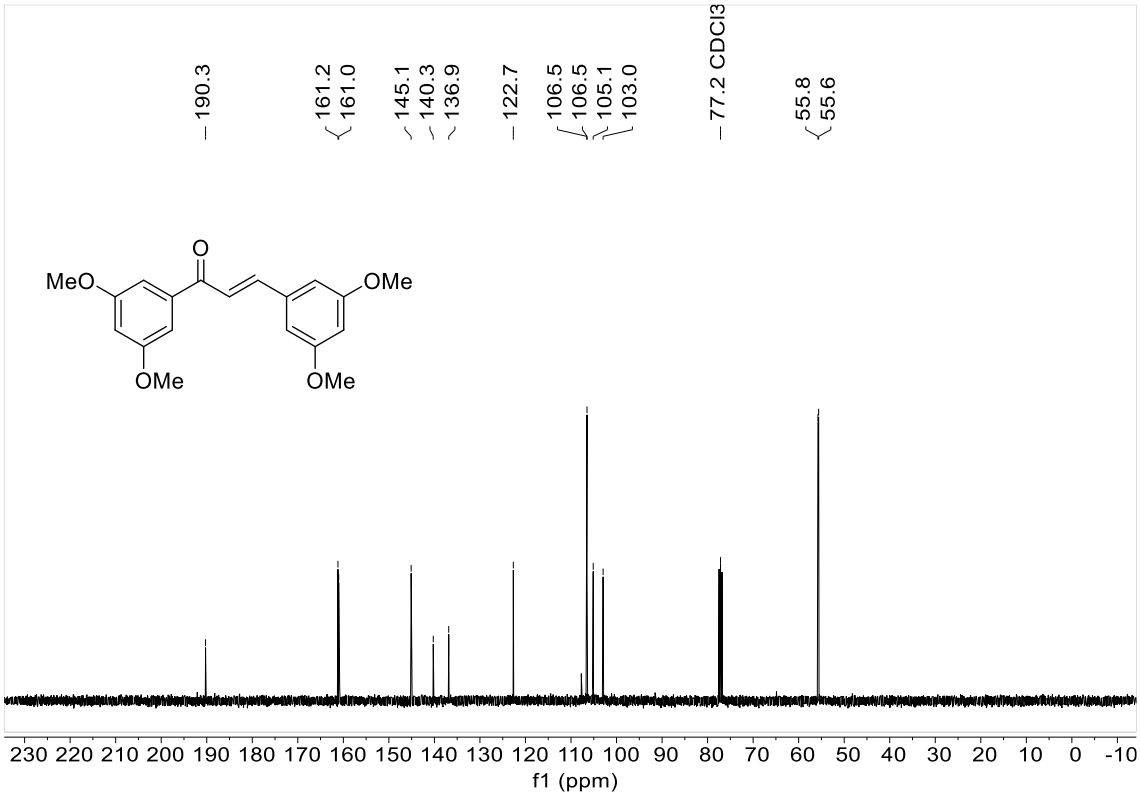
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) spectrum of 14



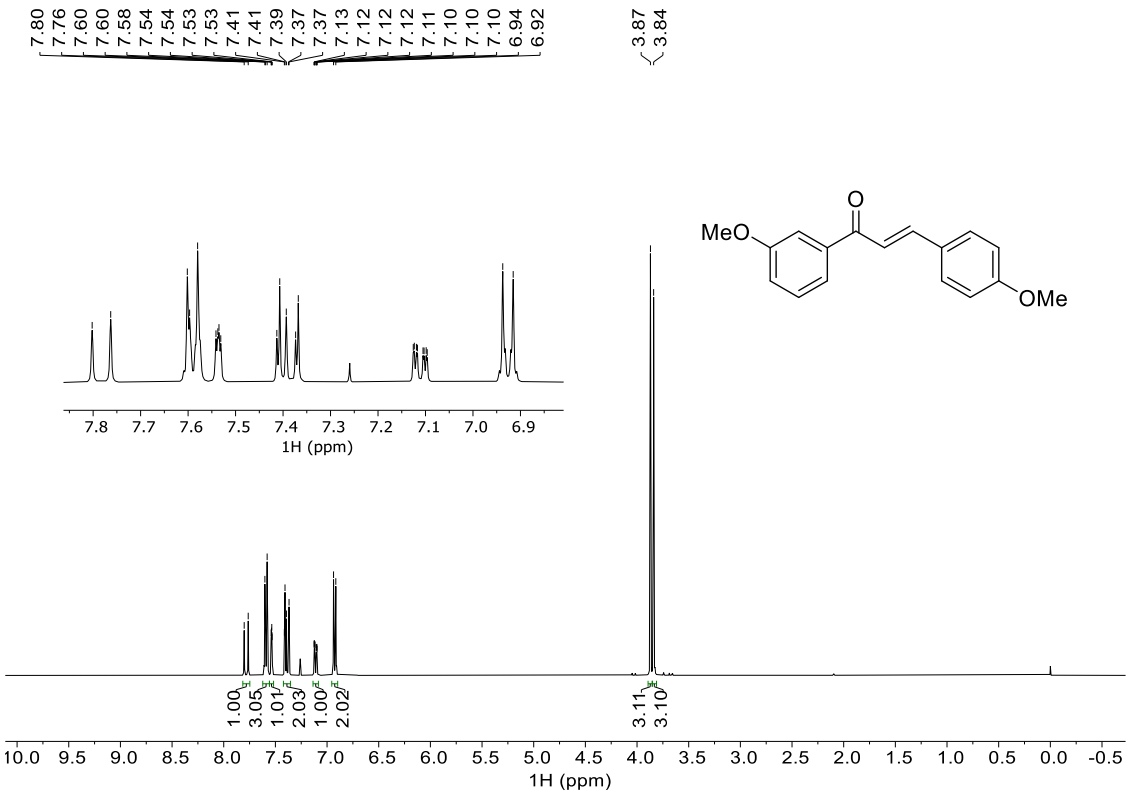
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) spectrum of 15



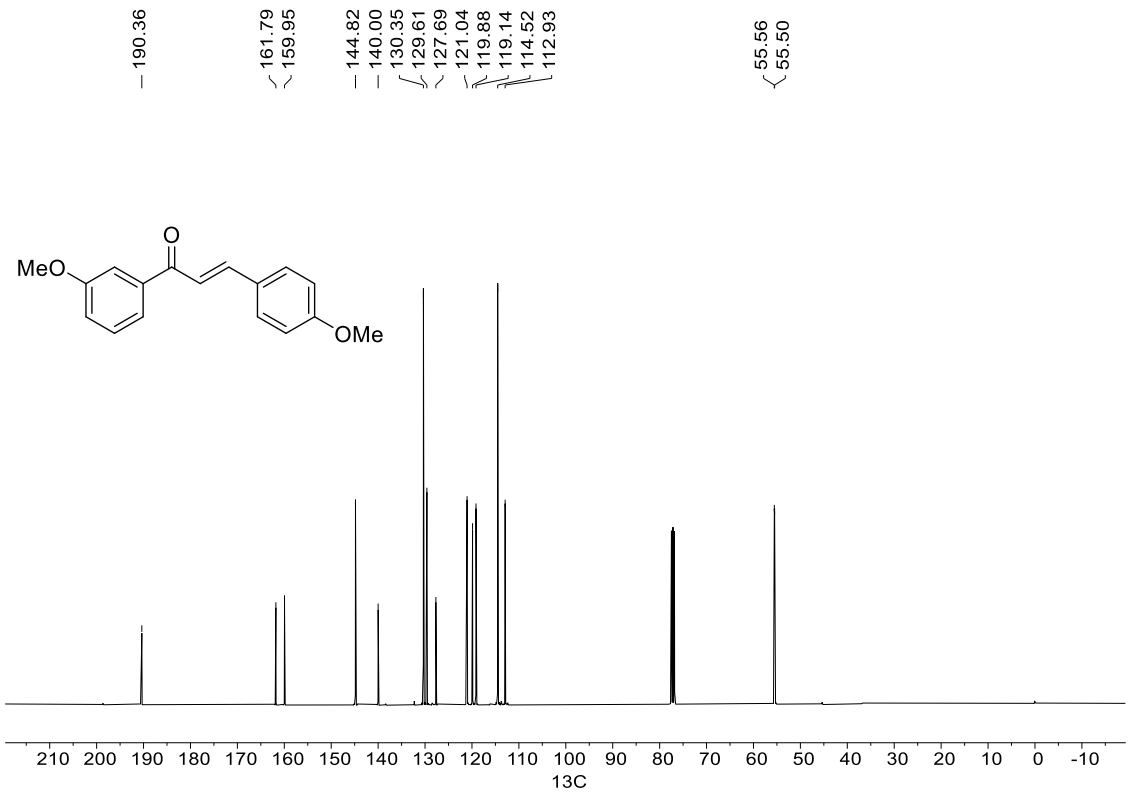
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) of 15



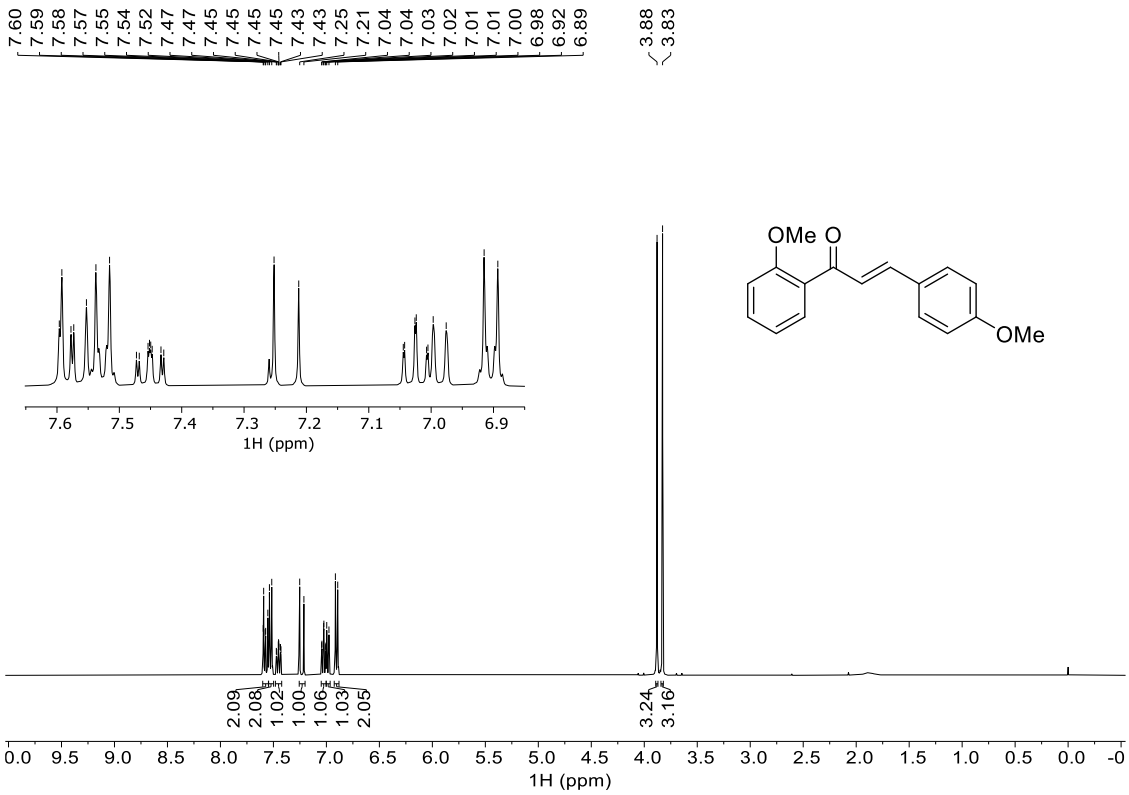
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) spectrum of 16



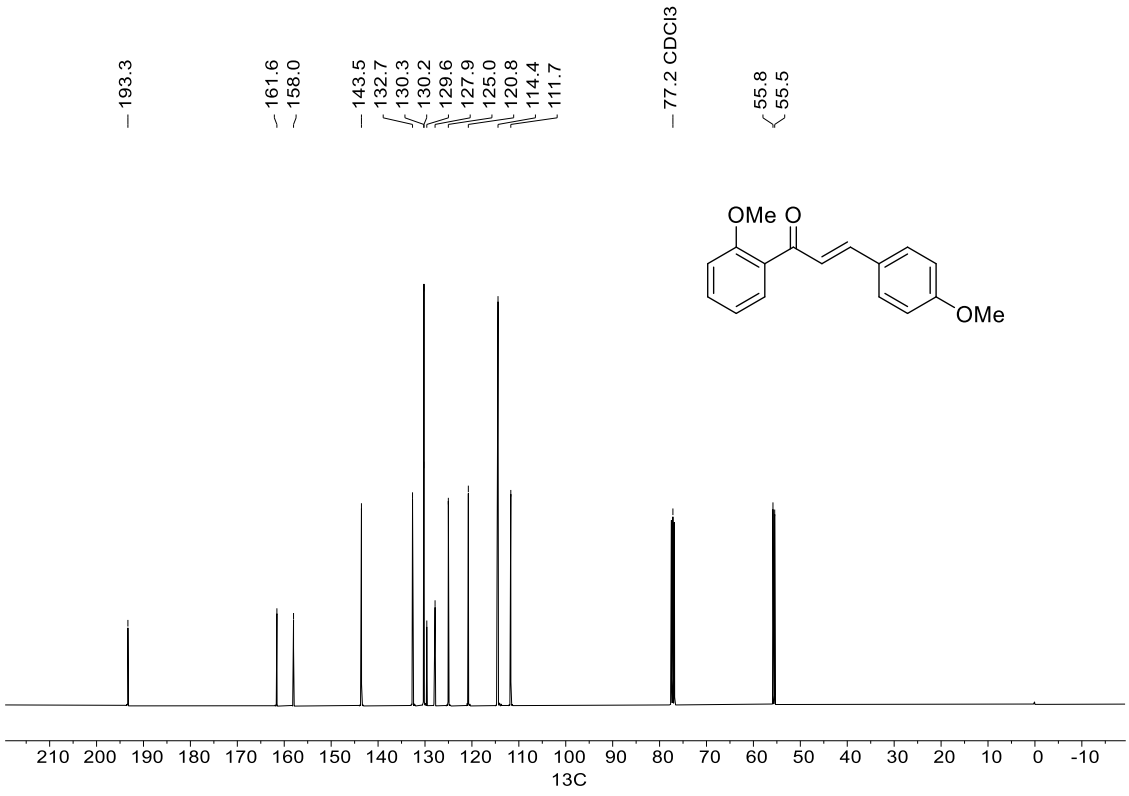
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) of 16



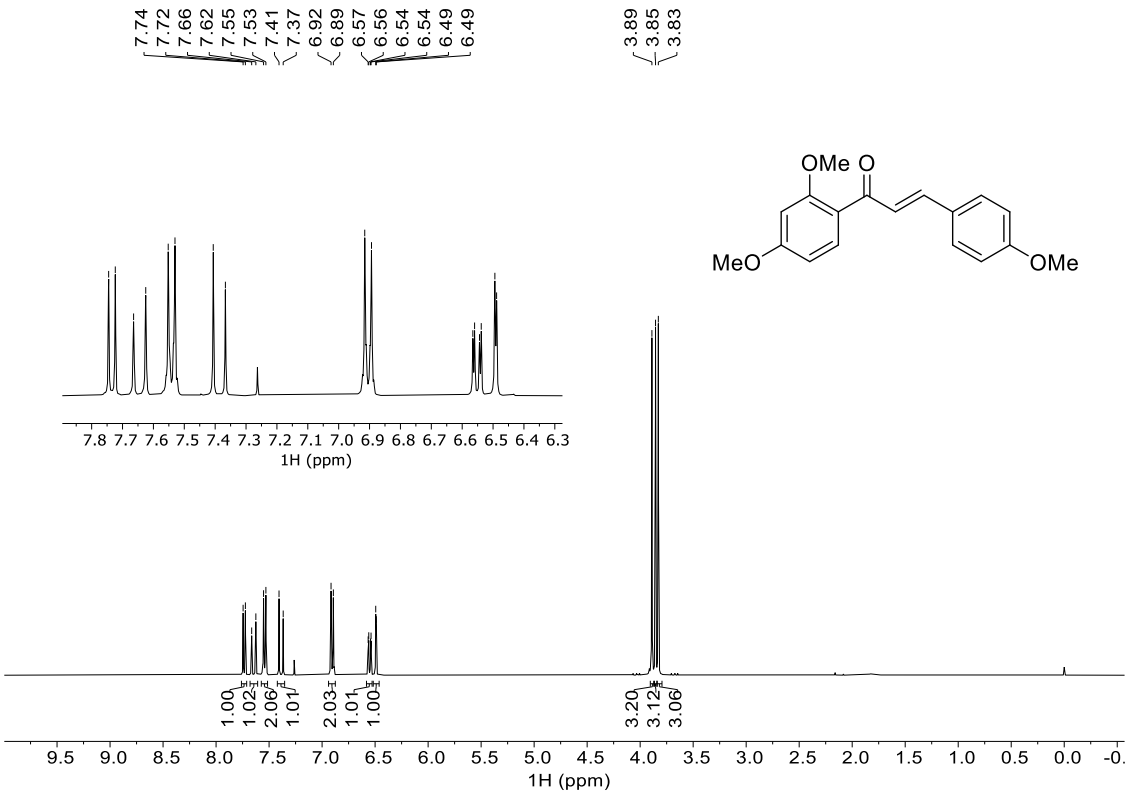
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) spectrum of 17



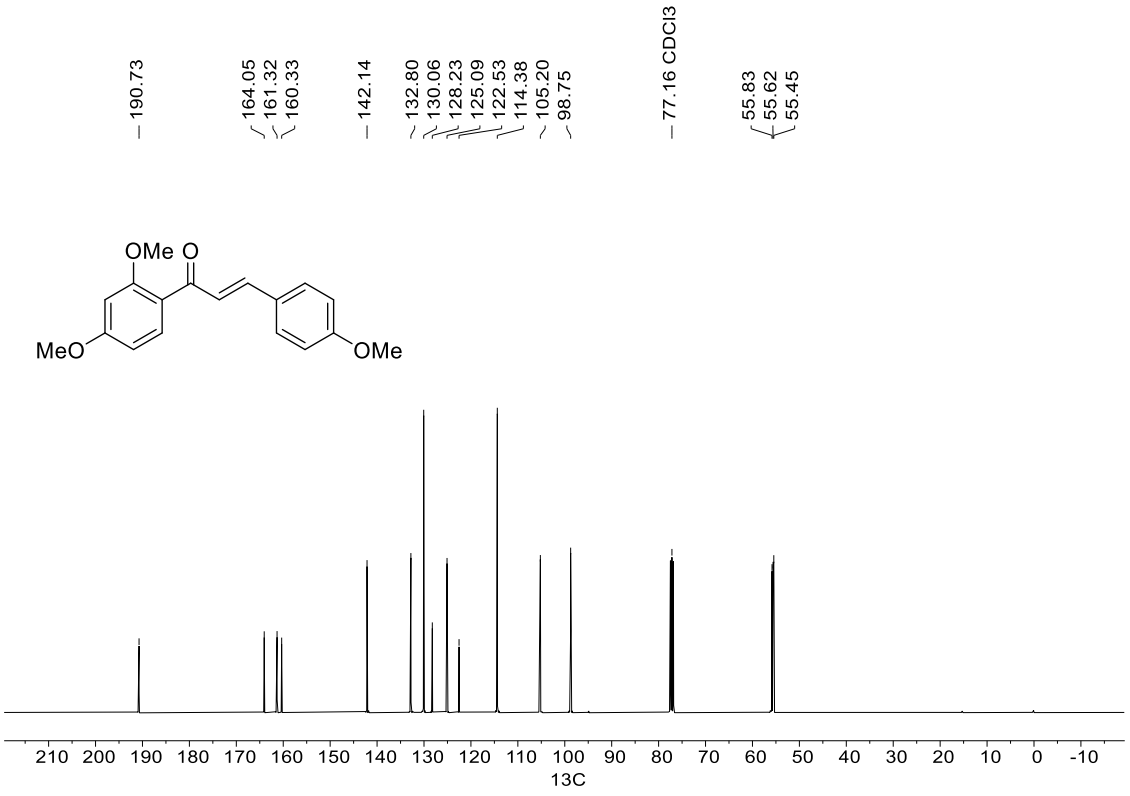
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) of 17



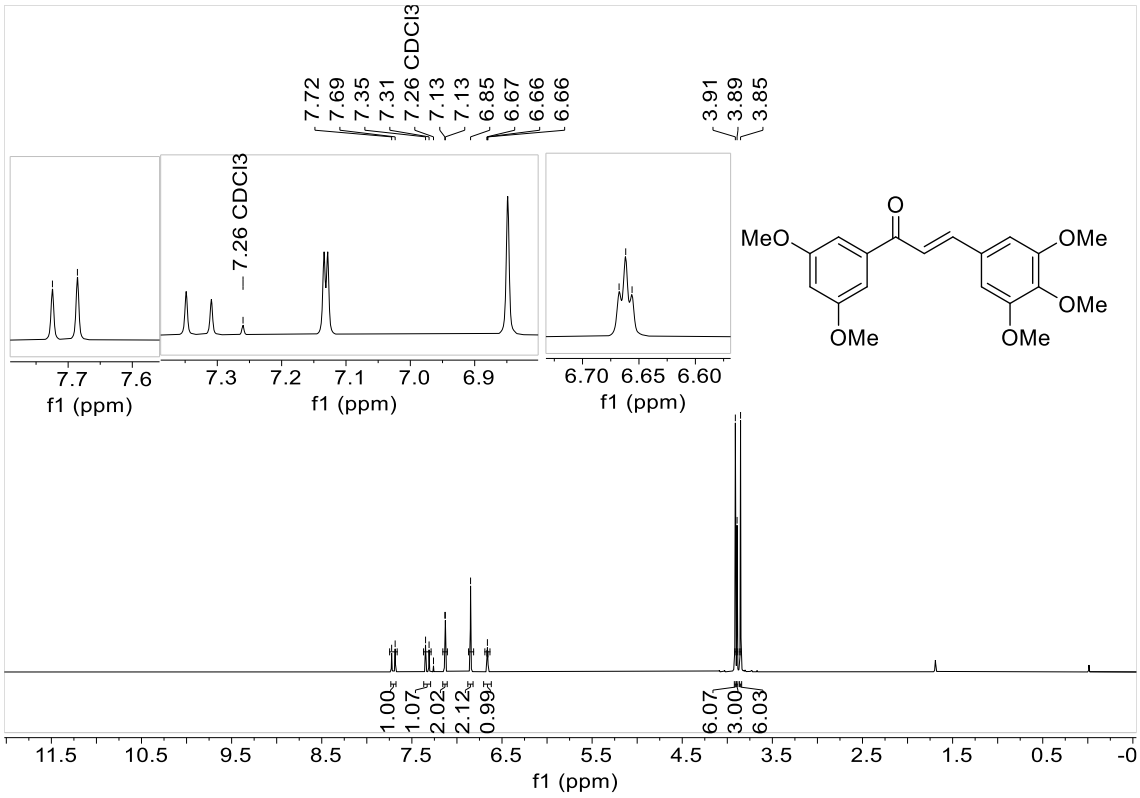
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) spectrum of 18



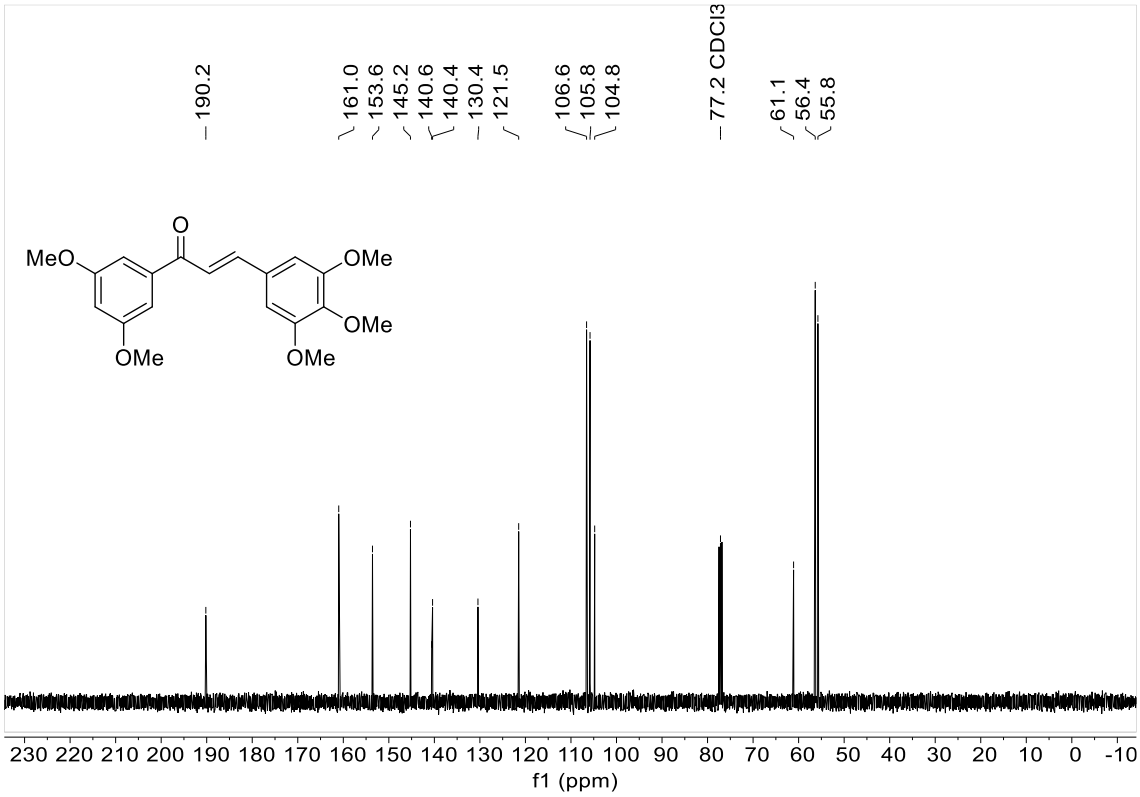
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) of 18



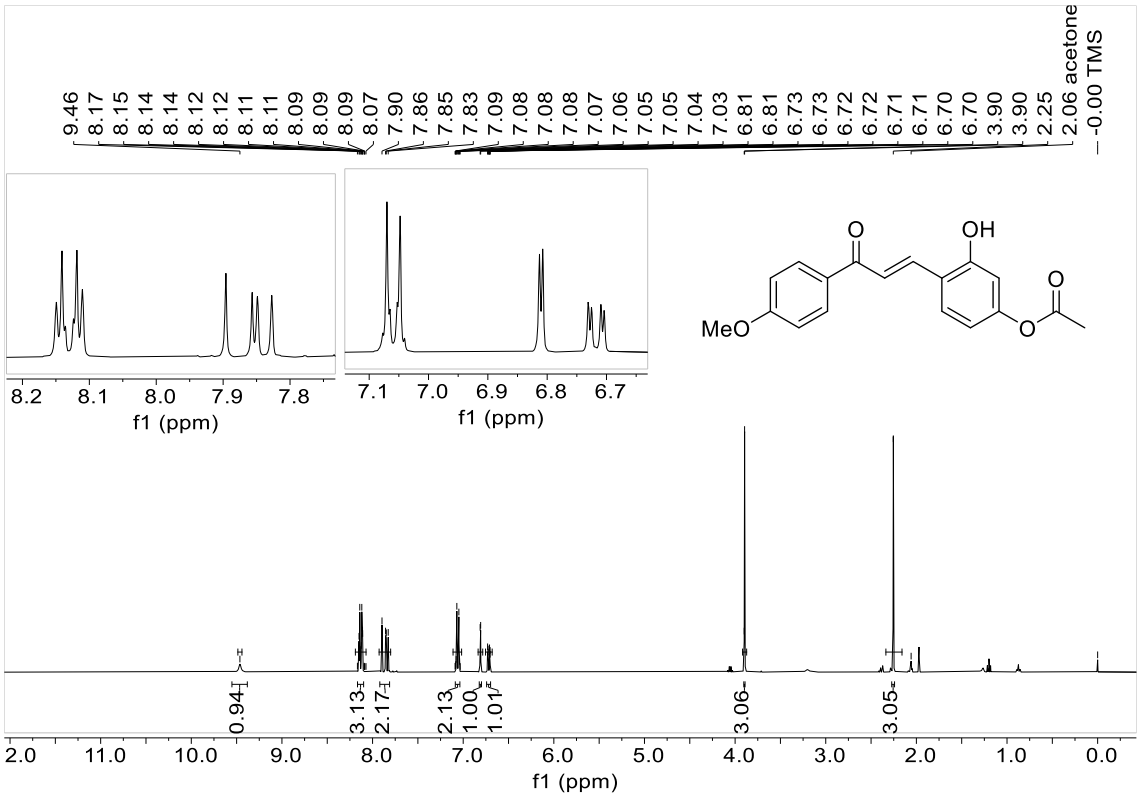
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) spectrum of 19



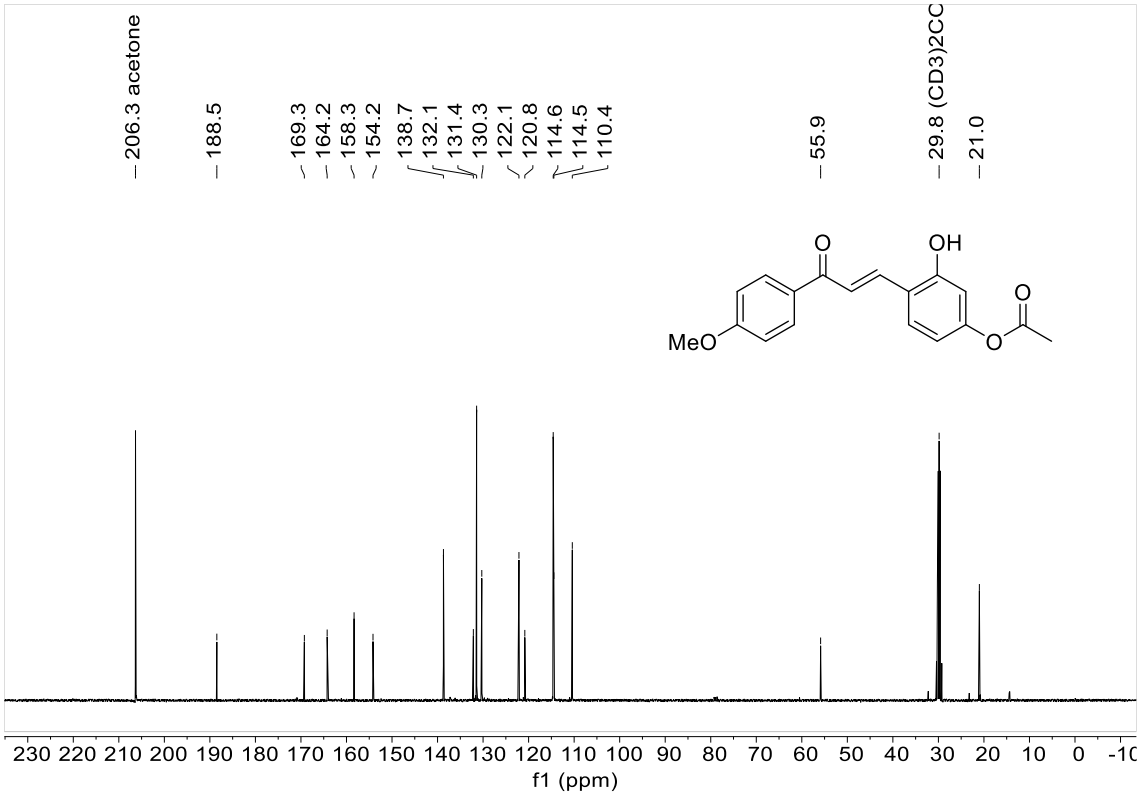
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) of 19



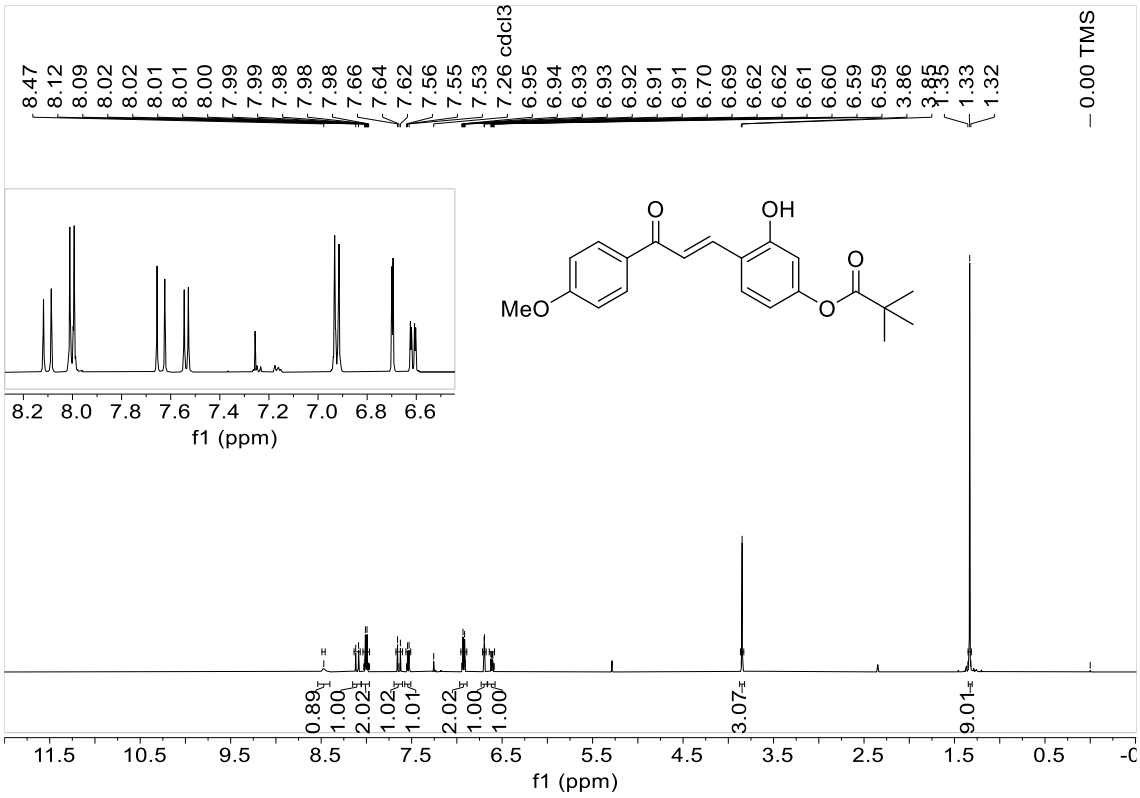
^{1}H NMR (400 MHz, Acetone-d_6) spectrum of 20



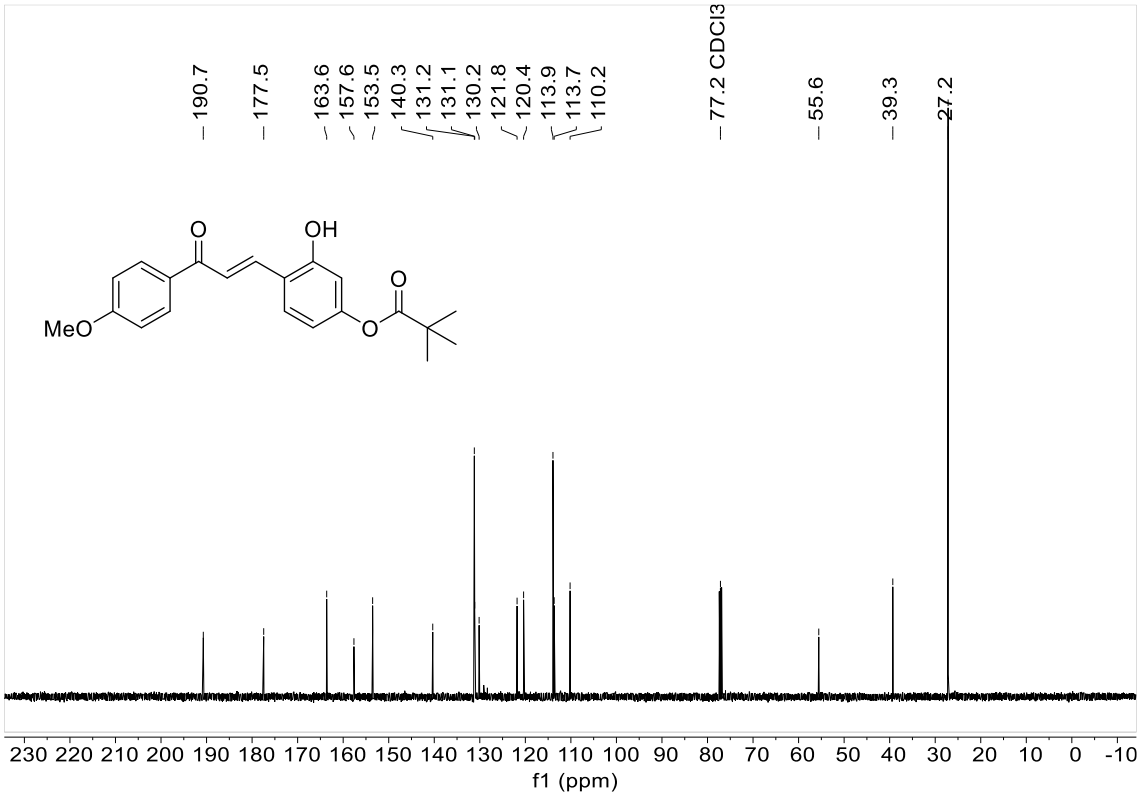
^{13}C NMR (101 MHz, Acetone-d_6) of 20



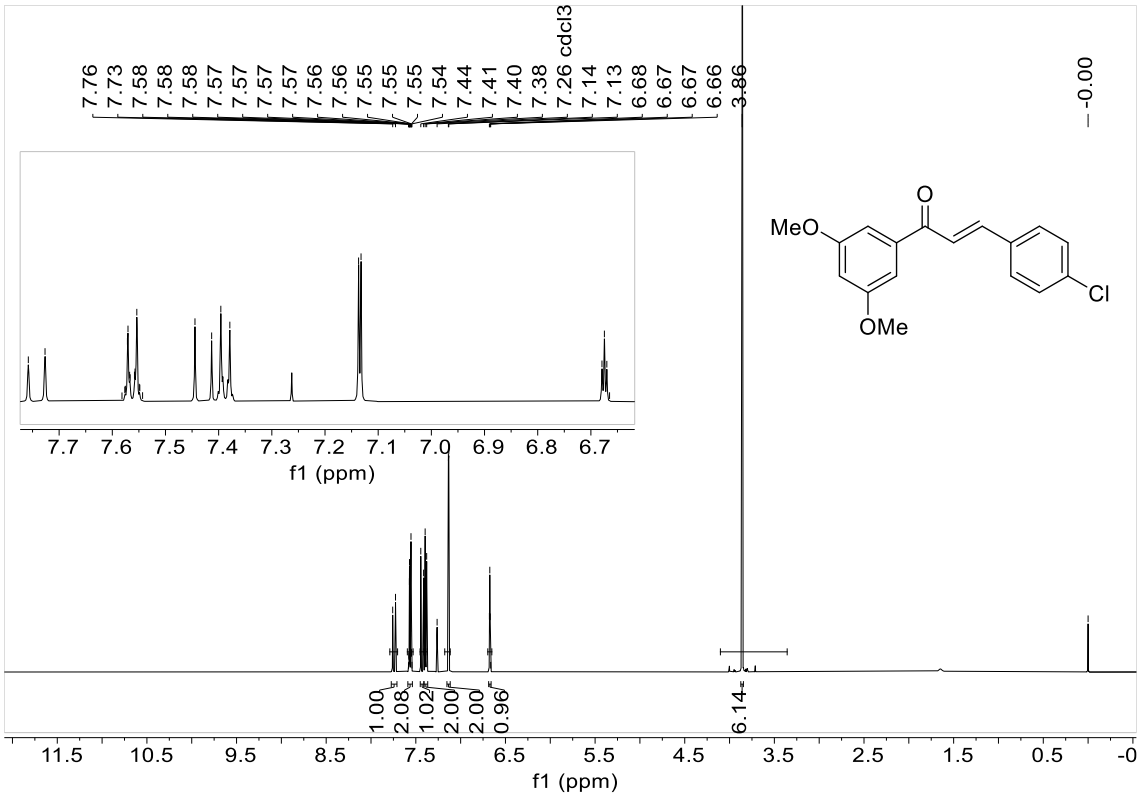
^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) spectrum of 21



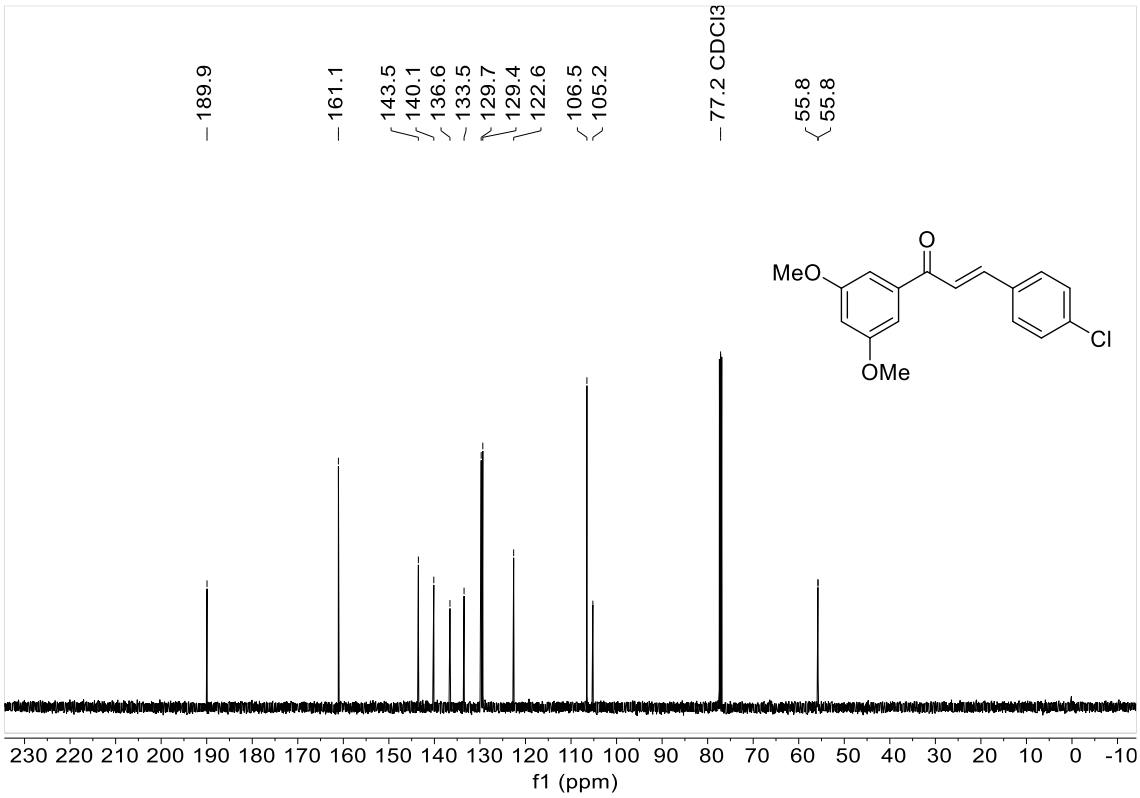
^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) of 21



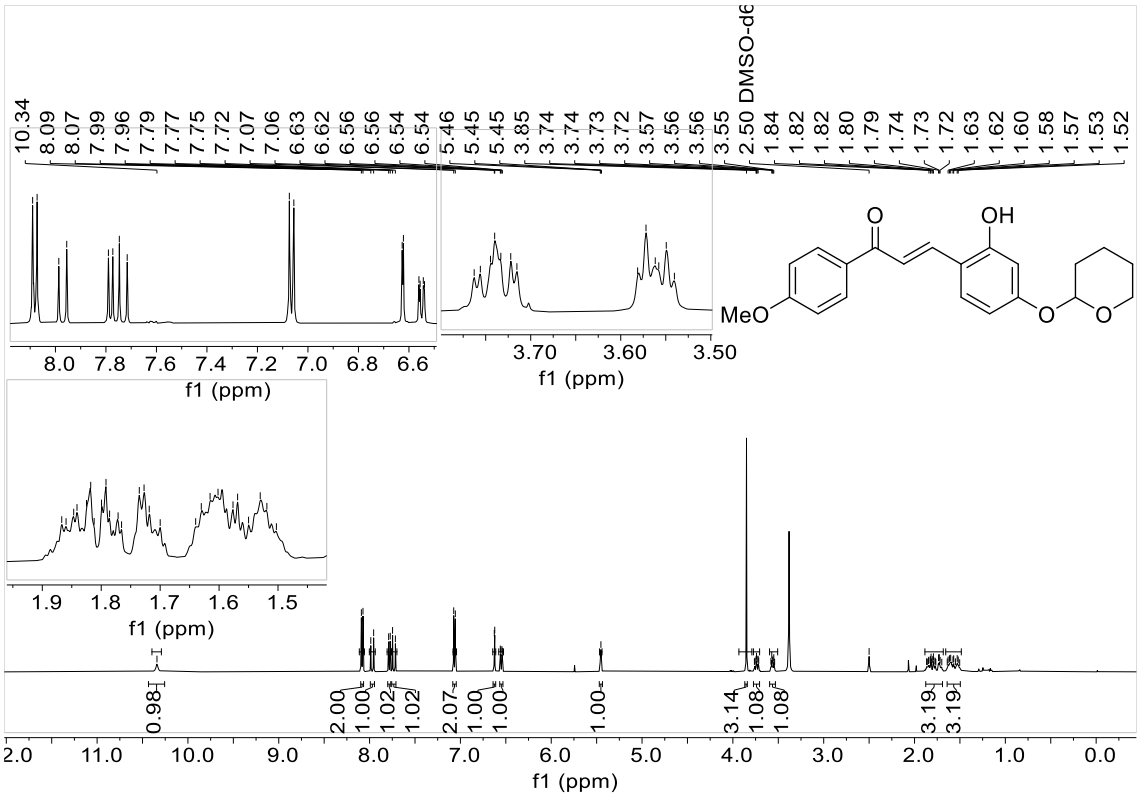
^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) spectrum of 22



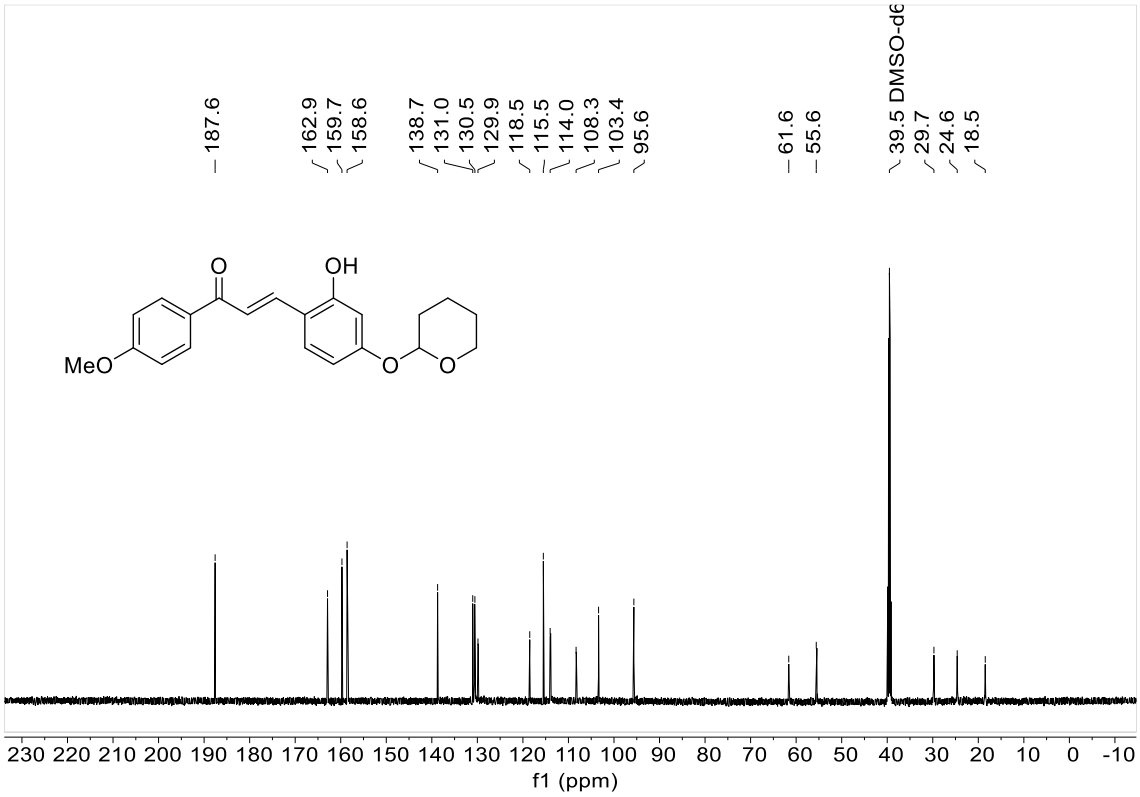
^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) of 22



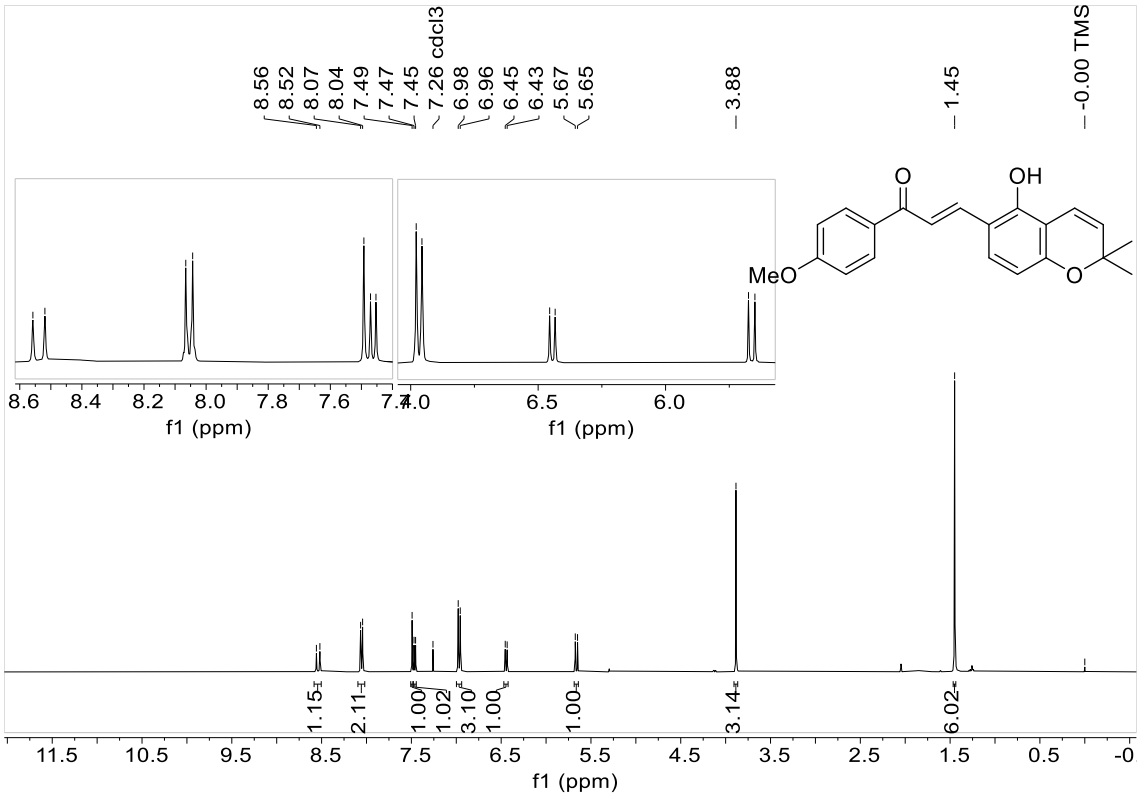
^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) spectrum of 23



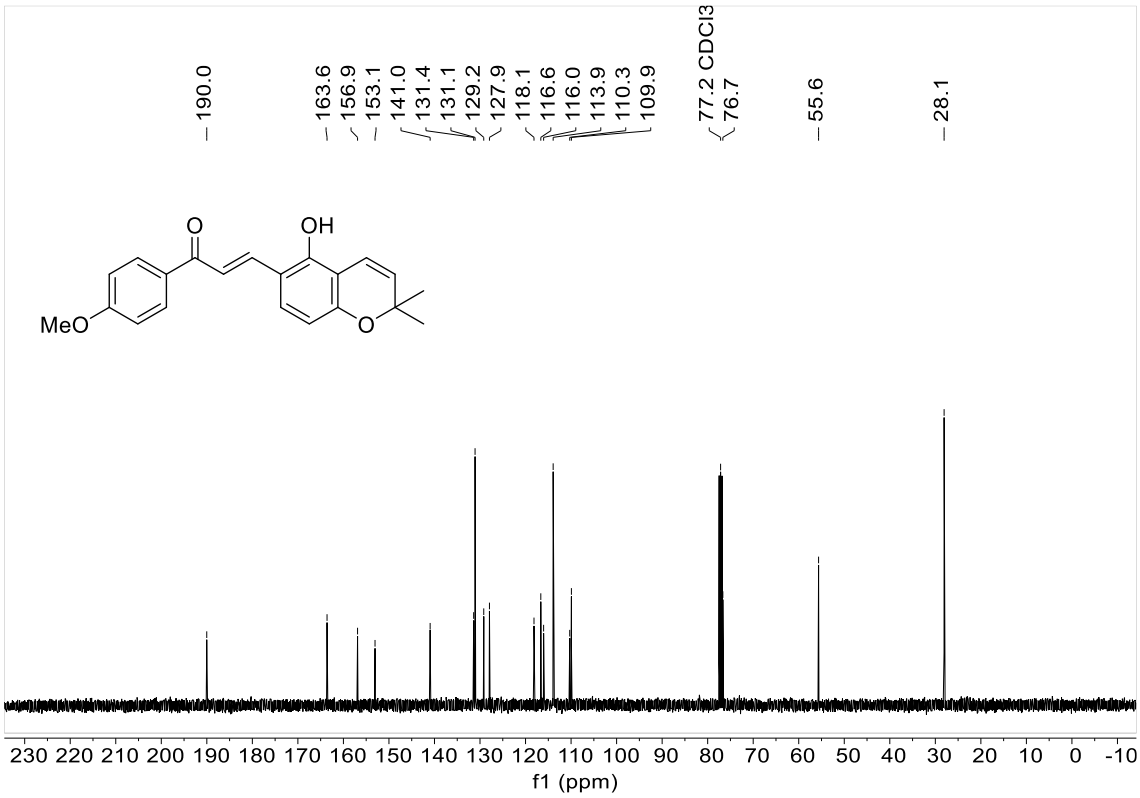
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) spectrum of 23



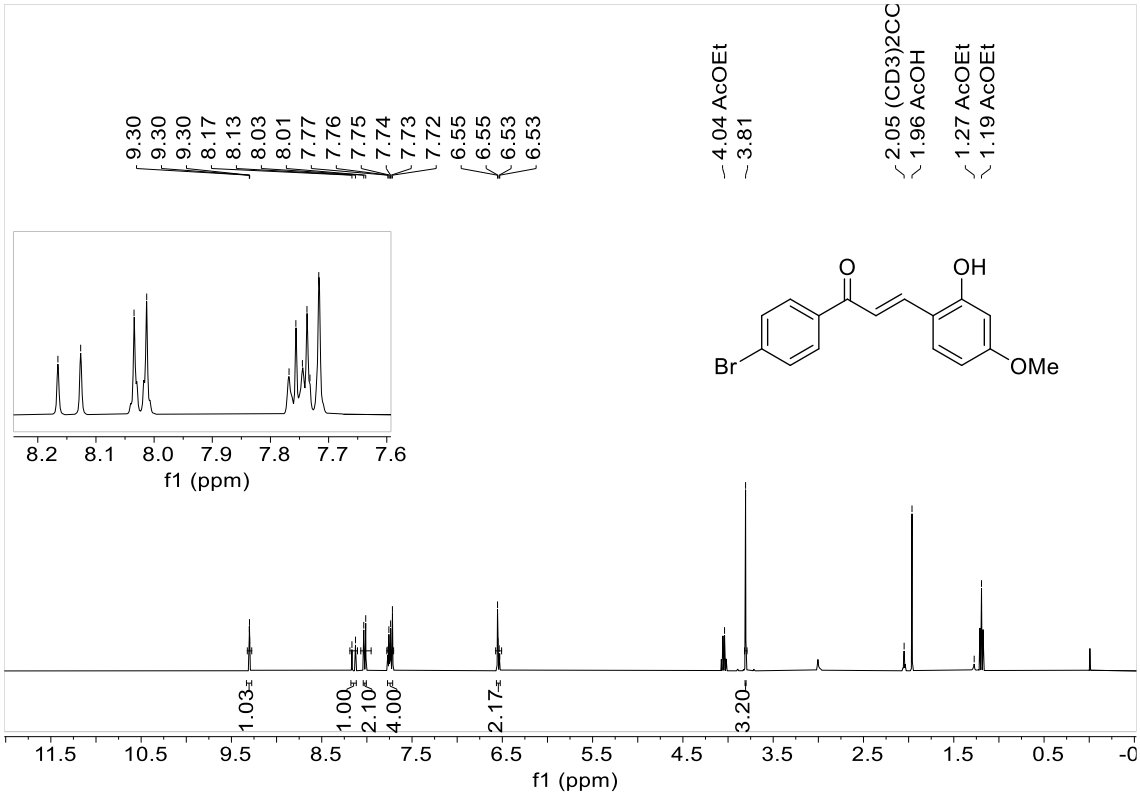
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) spectrum of 24



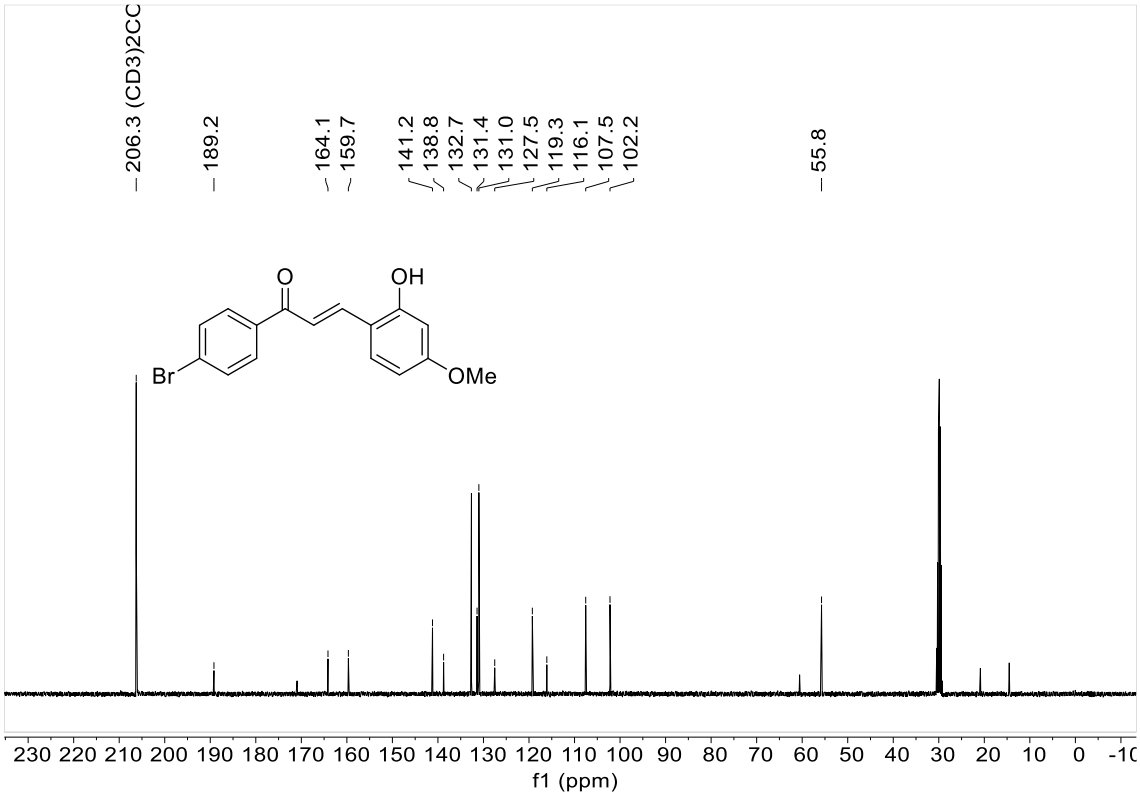
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) spectrum of 24



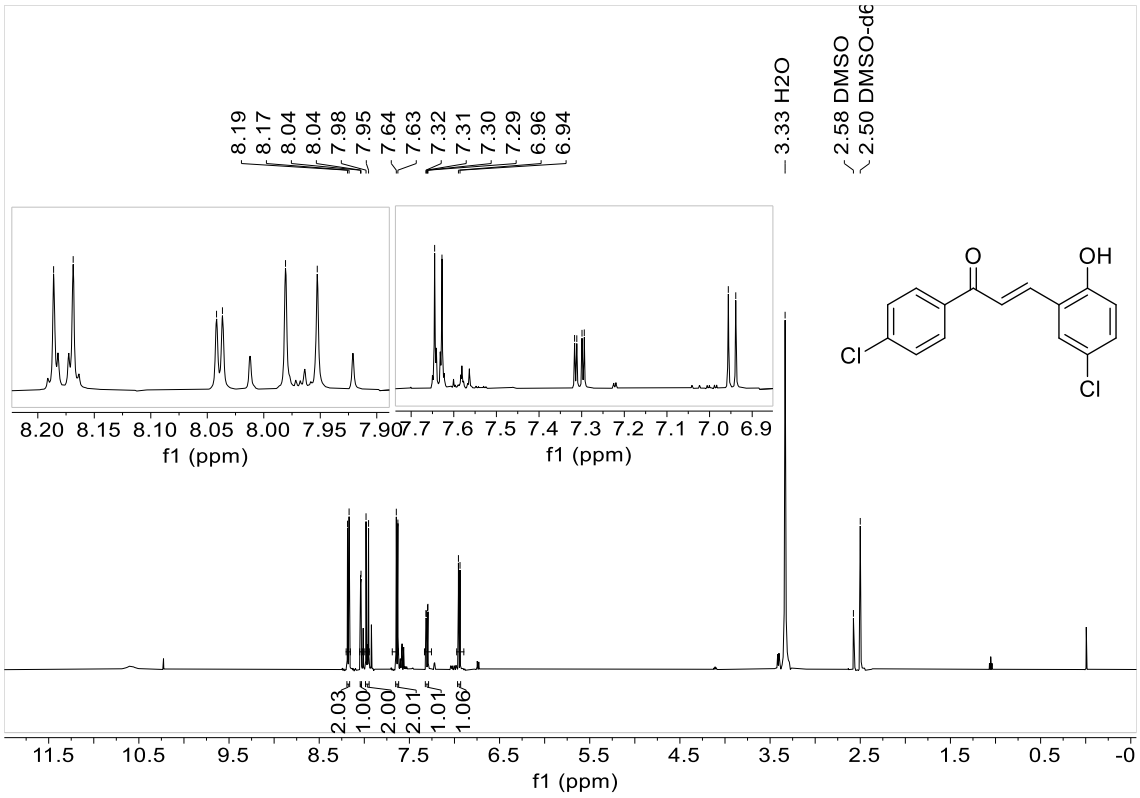
^{1}H NMR (400 MHz, Acetone-d_6) spectrum of 25



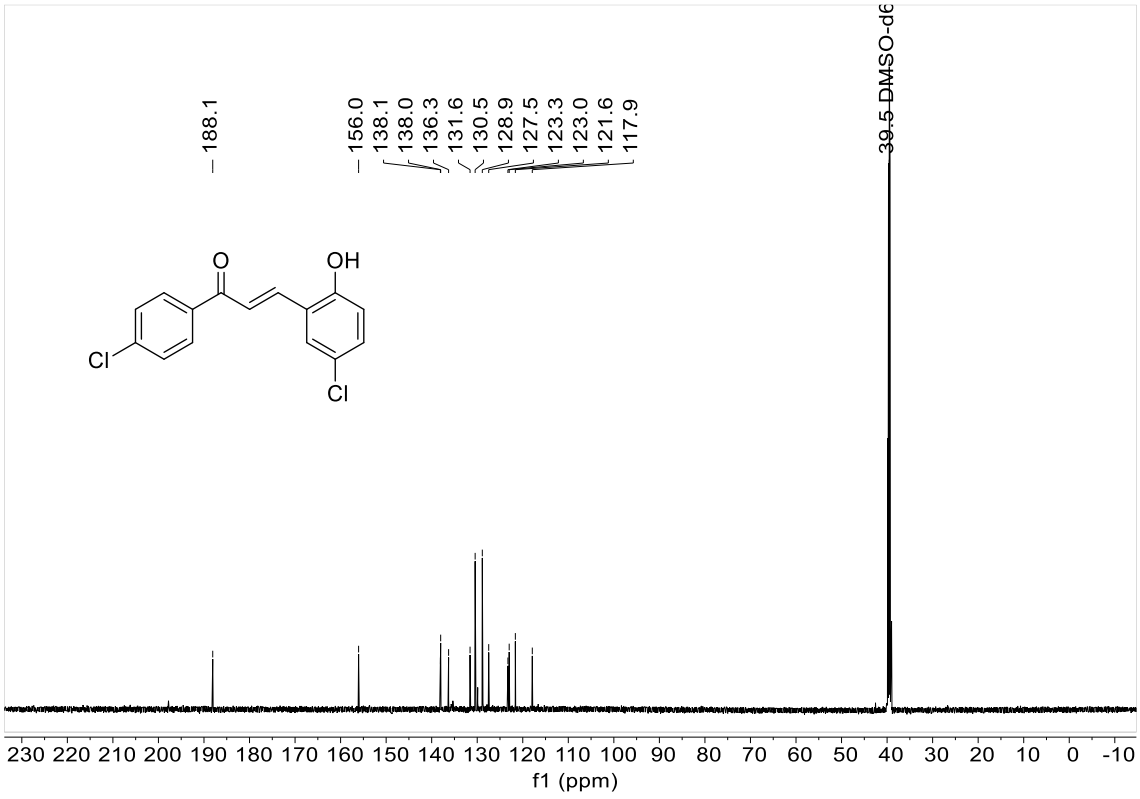
^{13}C NMR (101 MHz, Acetone-d_6) spectrum of 25



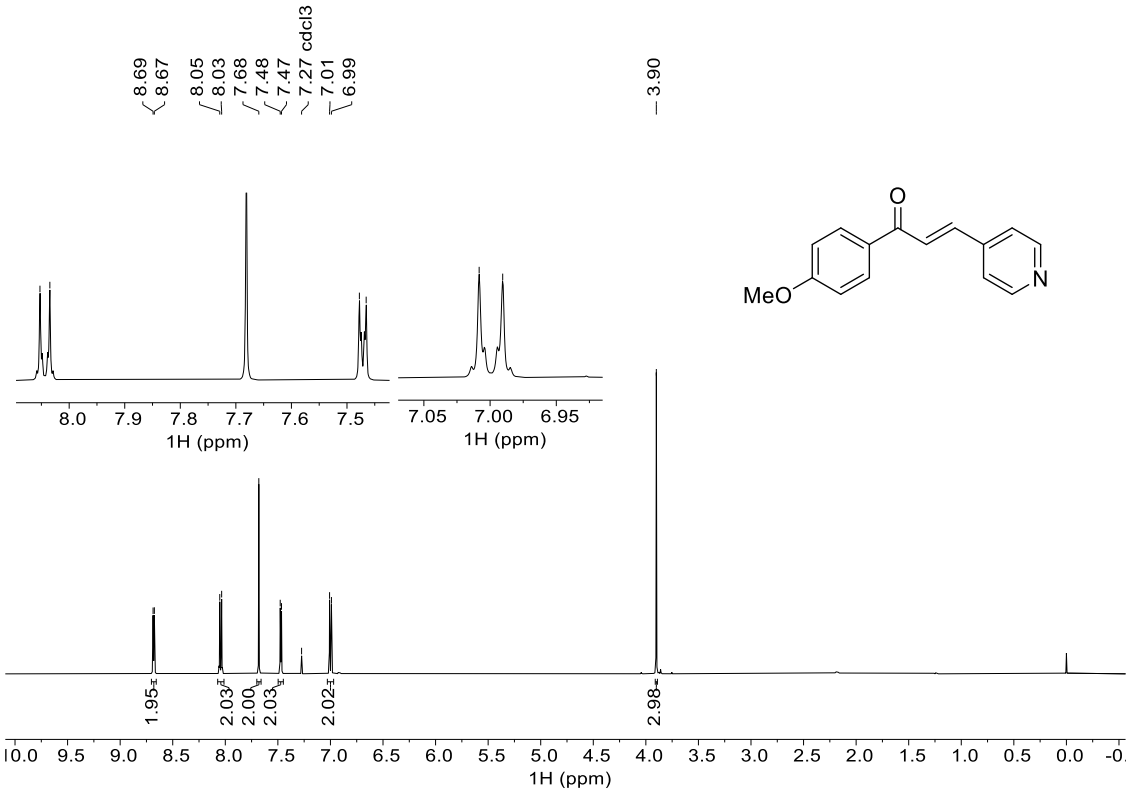
^{1}H NMR (500 MHz, DMSO) spectrum of 26



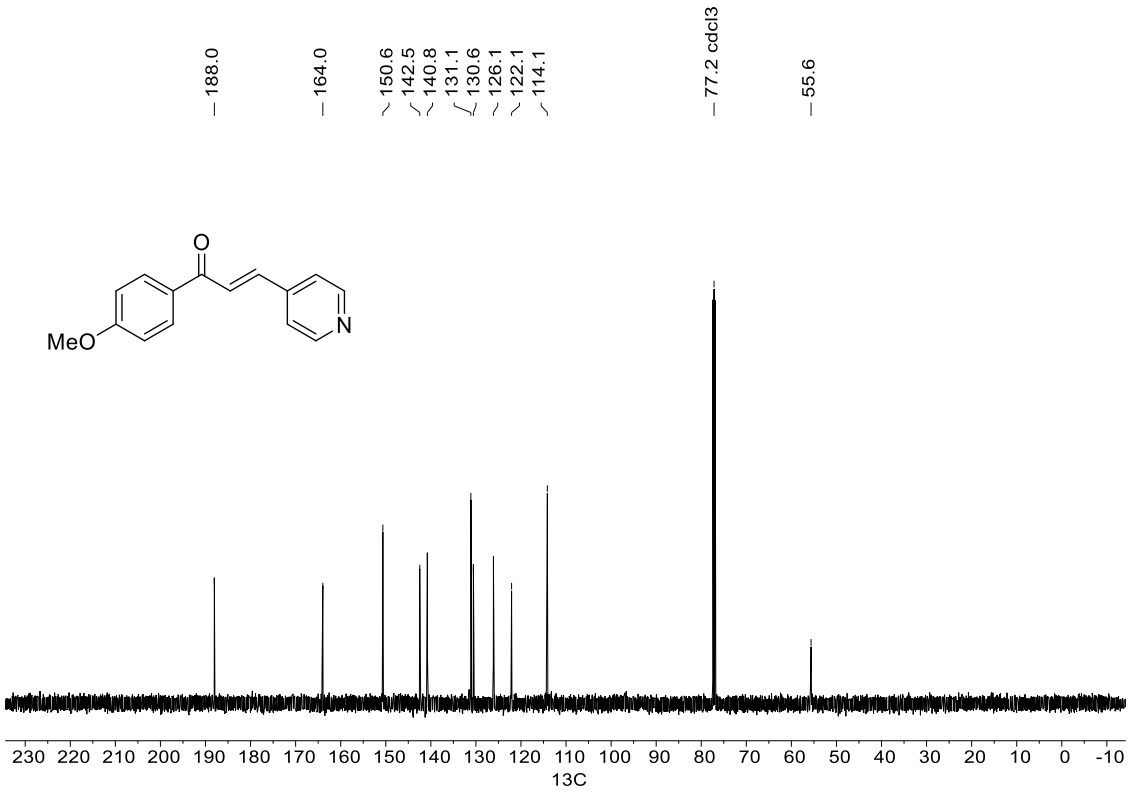
^{13}C NMR (126 MHz, DMSO) spectrum of 26



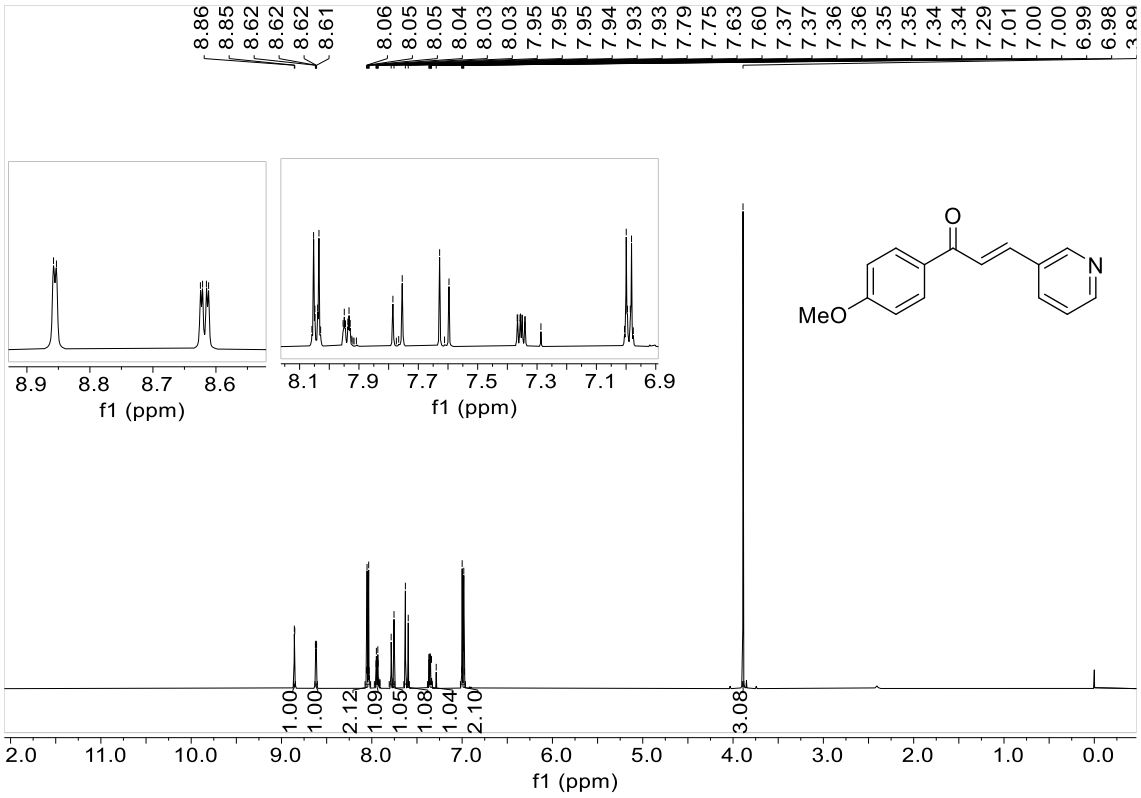
^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) spectrum of 27



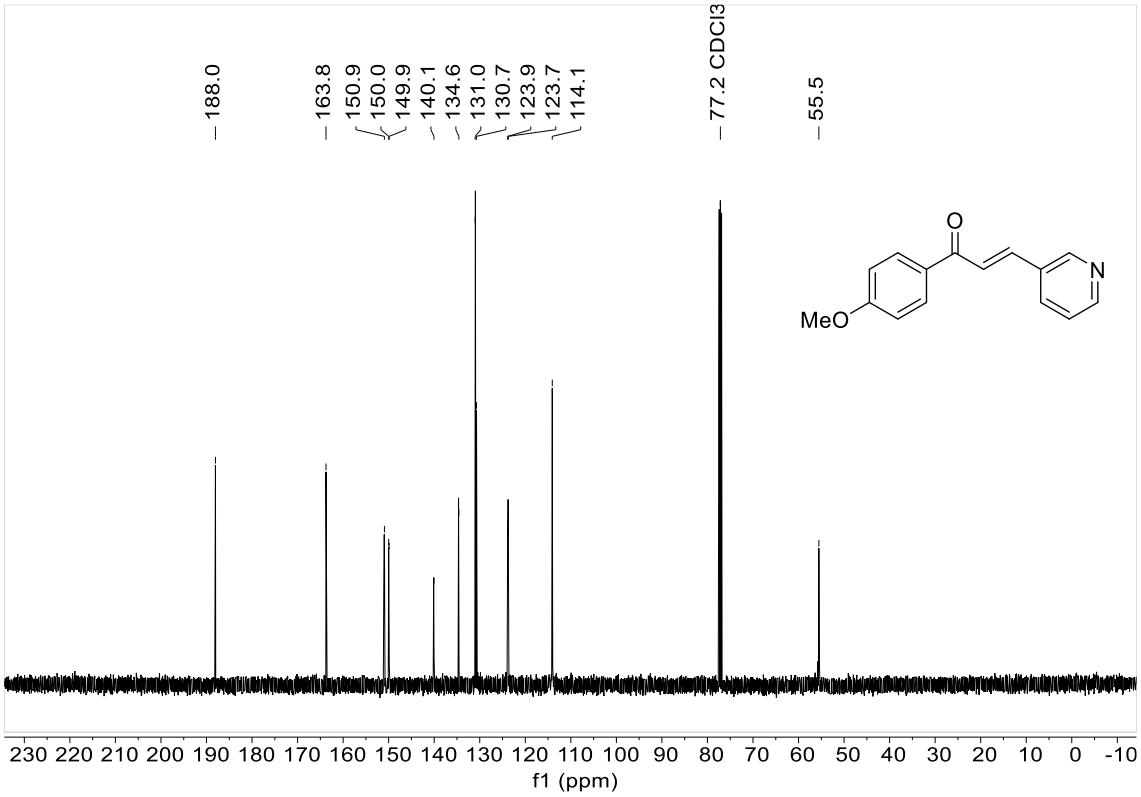
^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) of 27



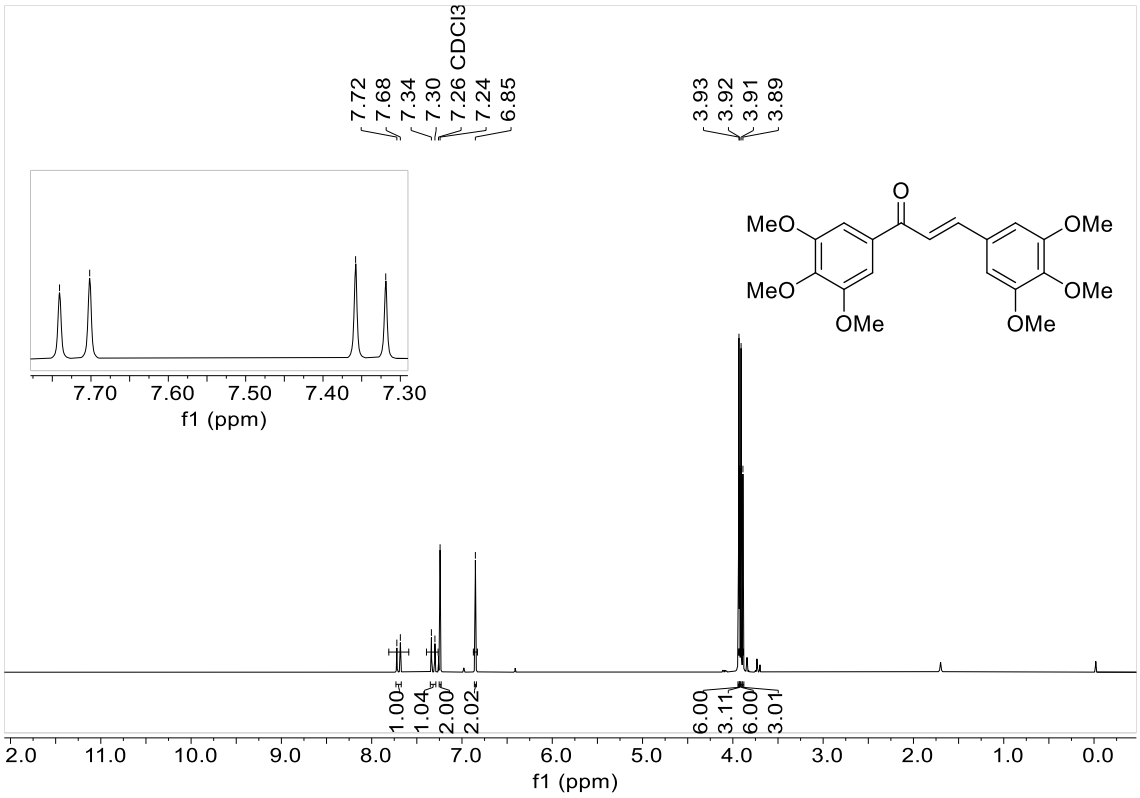
^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) spectrum of 28



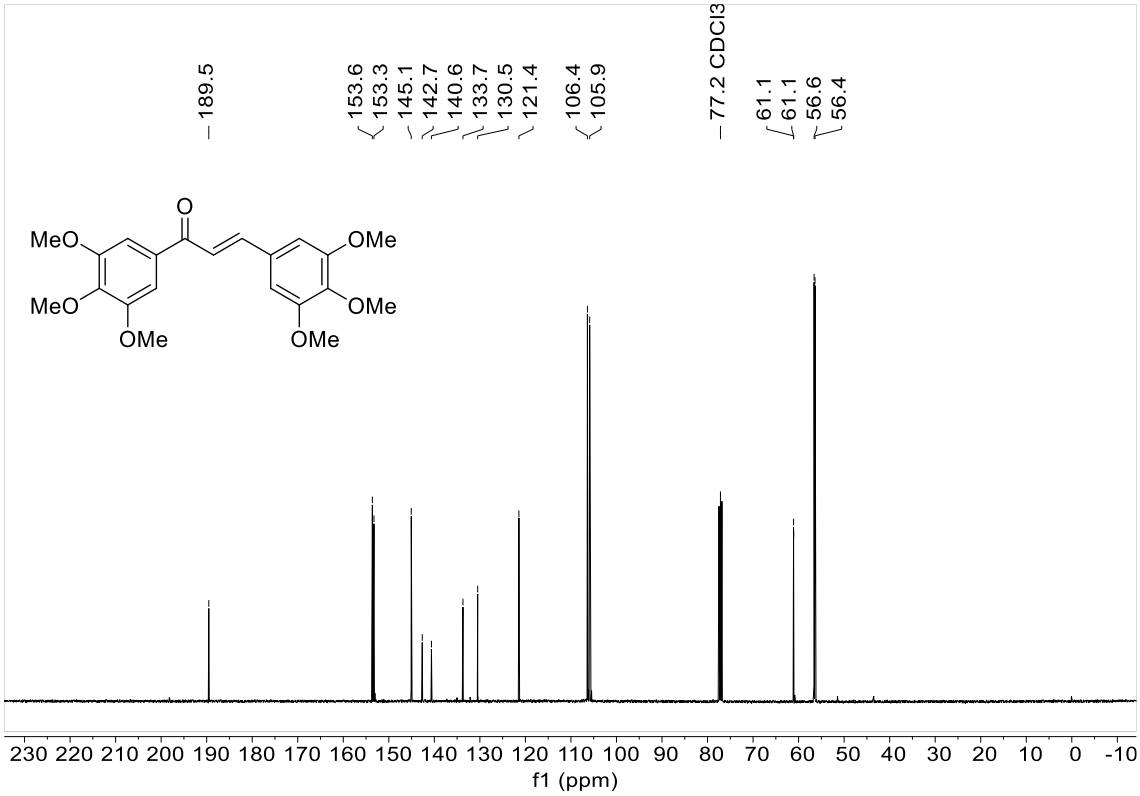
^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) of 28



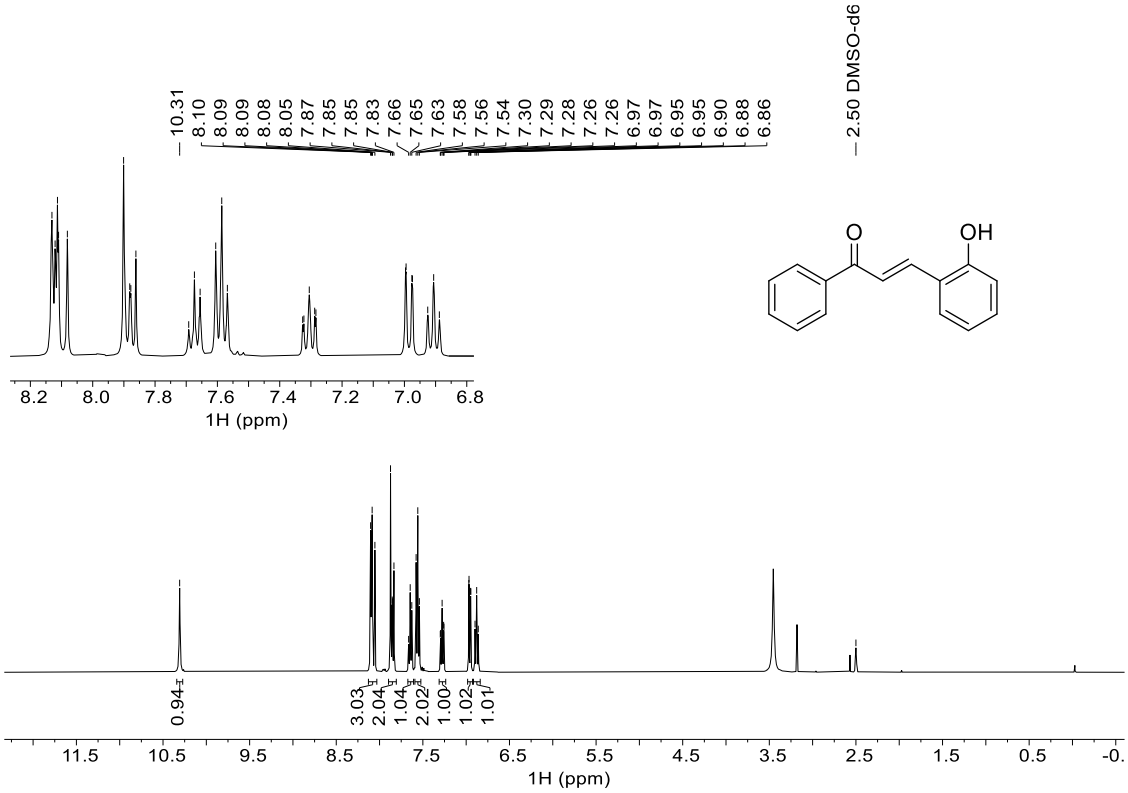
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) spectrum of 29



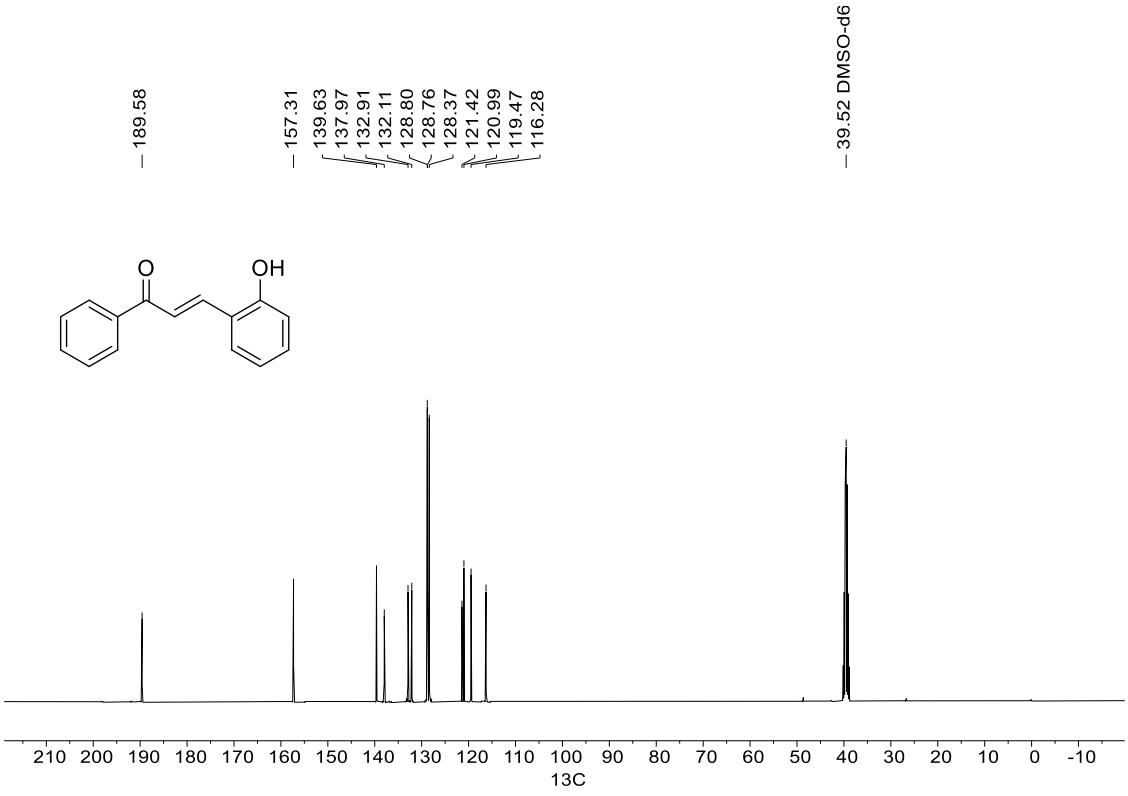
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) of 29



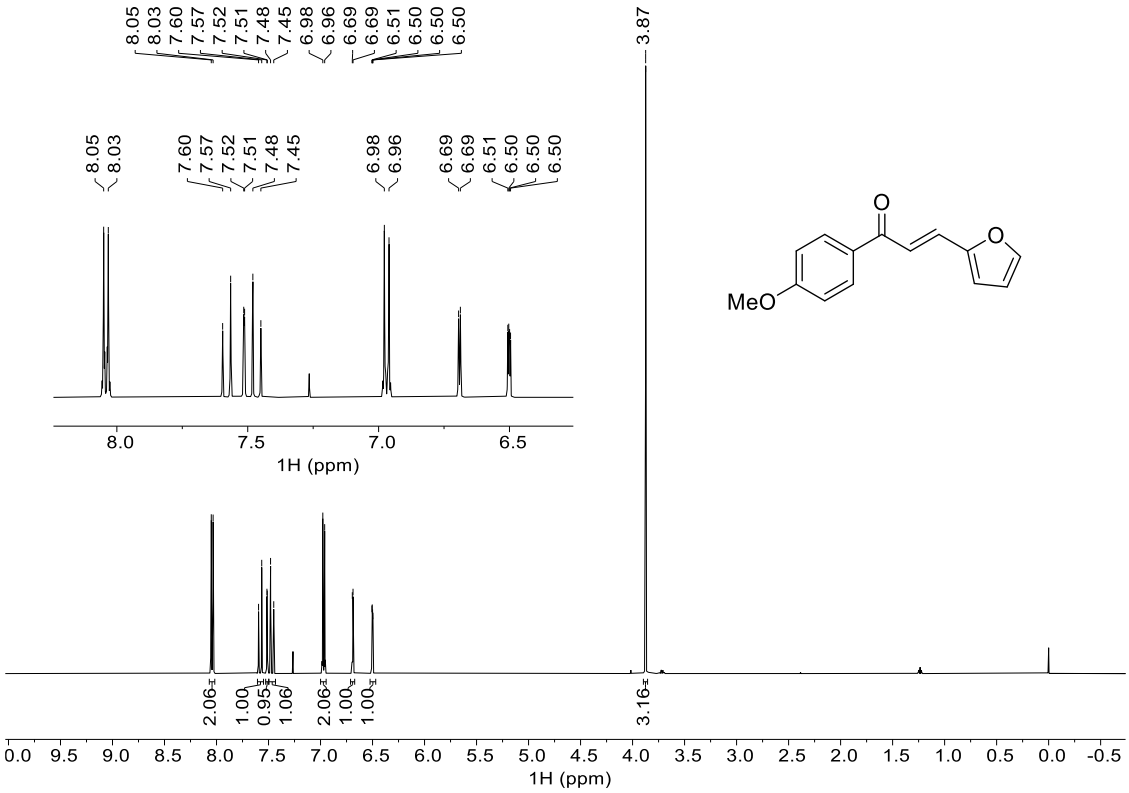
^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) spectrum of 30



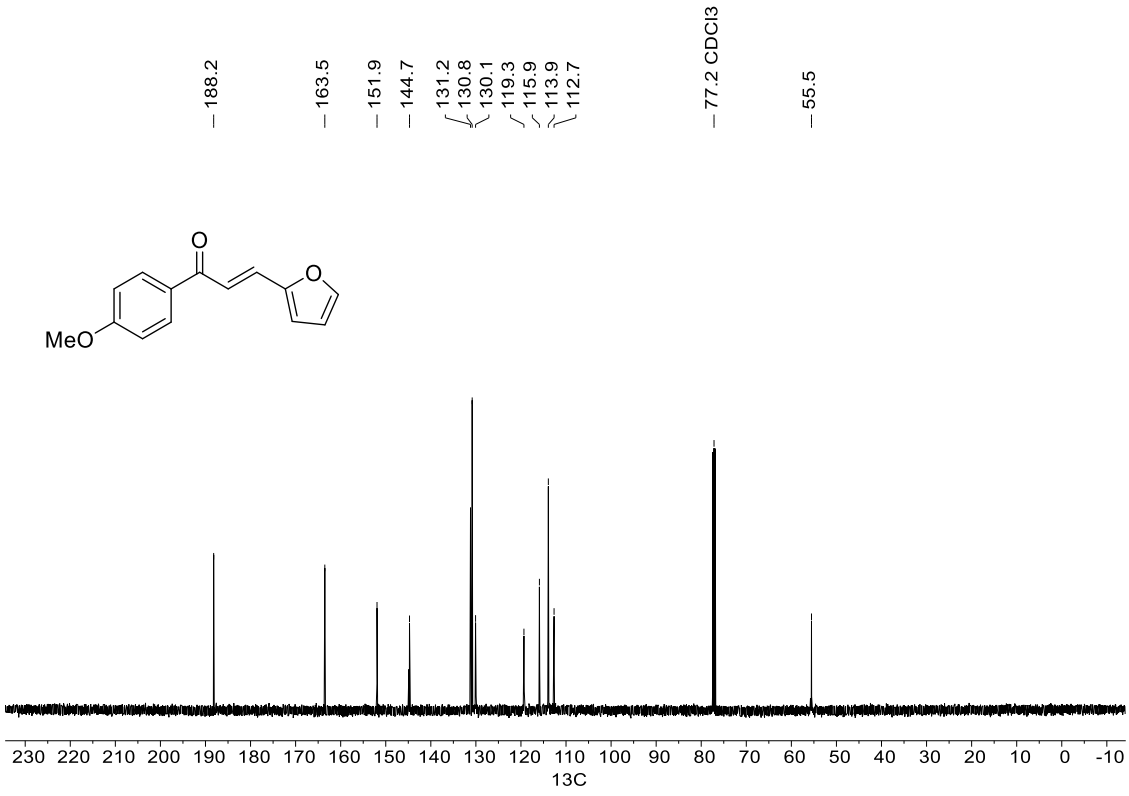
^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) spectrum of 30



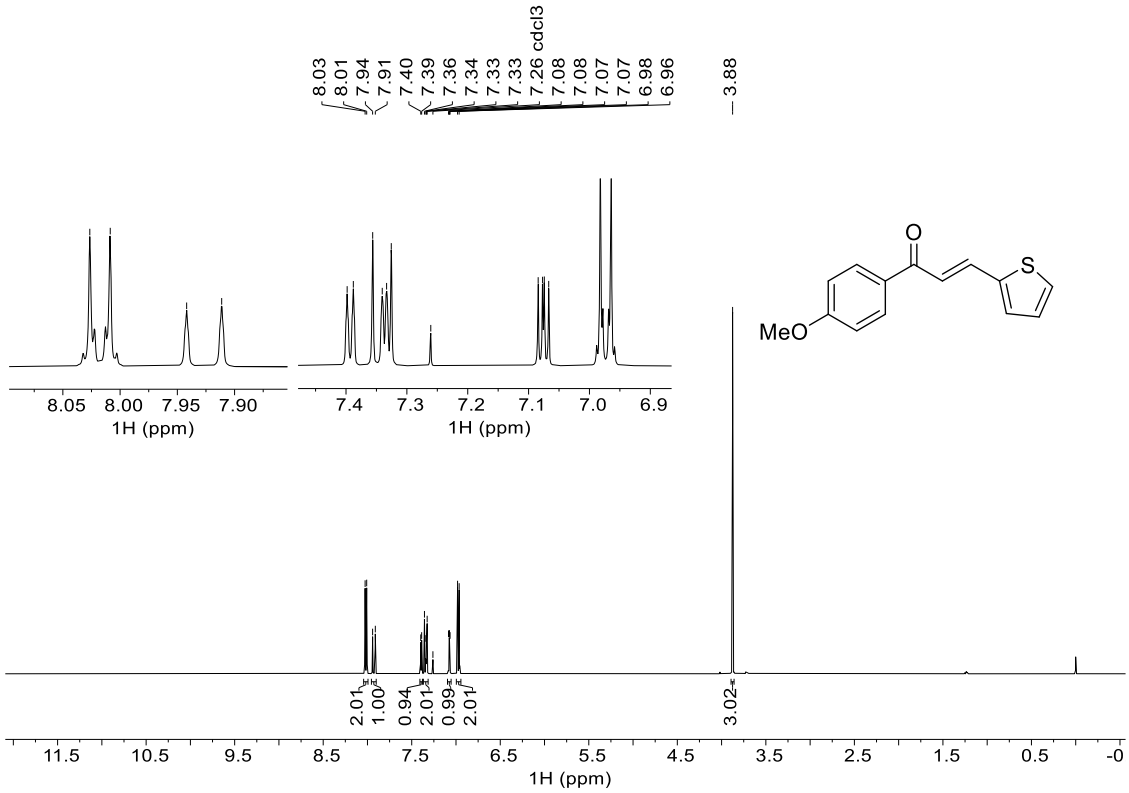
^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) spectrum of 31



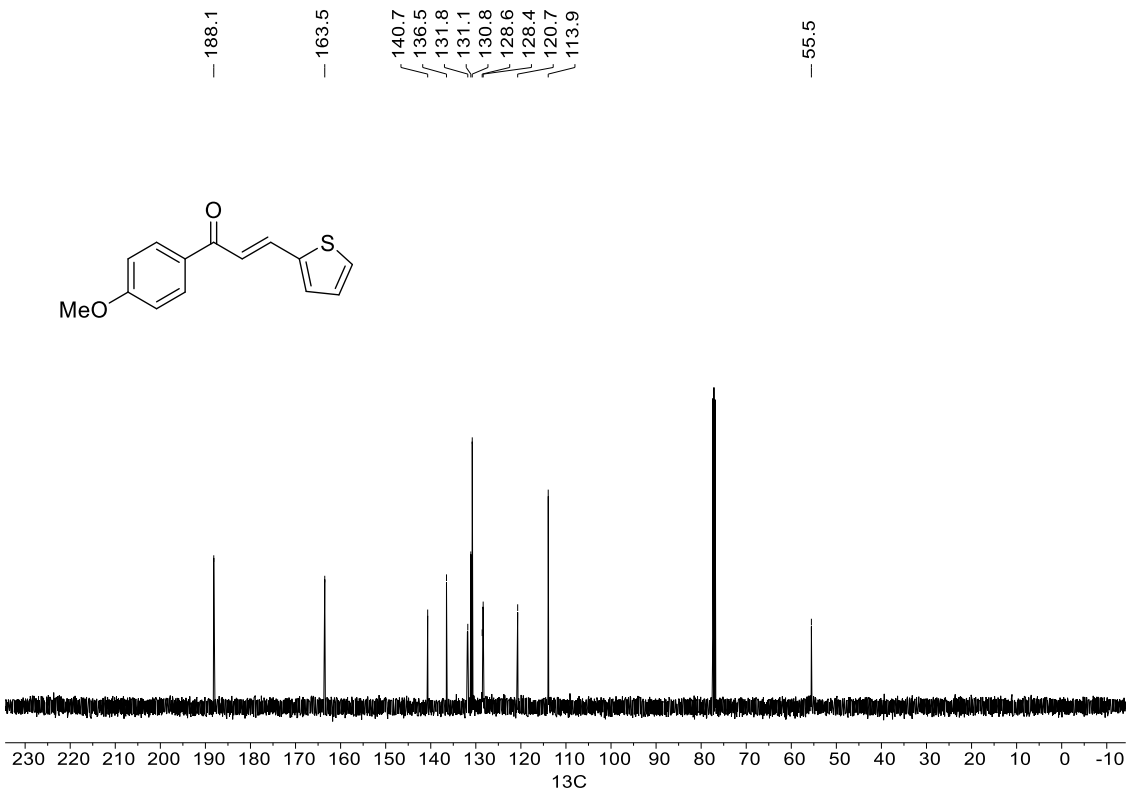
^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) of 31



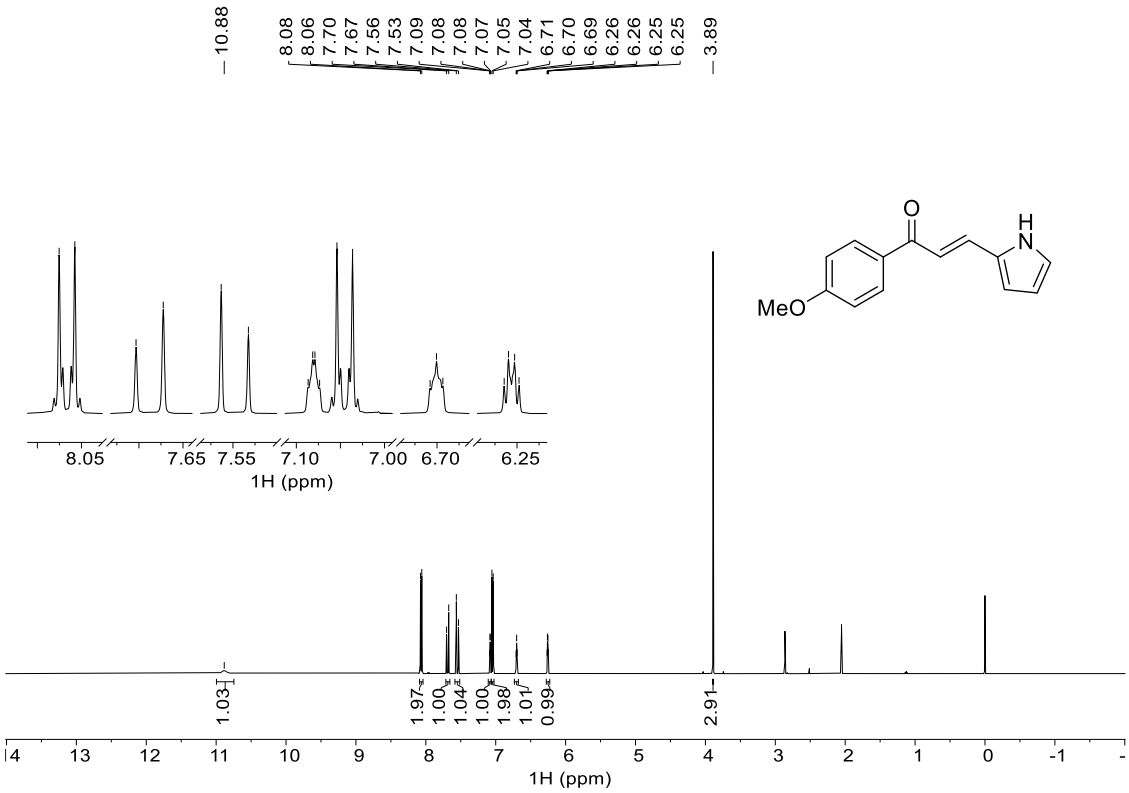
^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) spectrum of 32



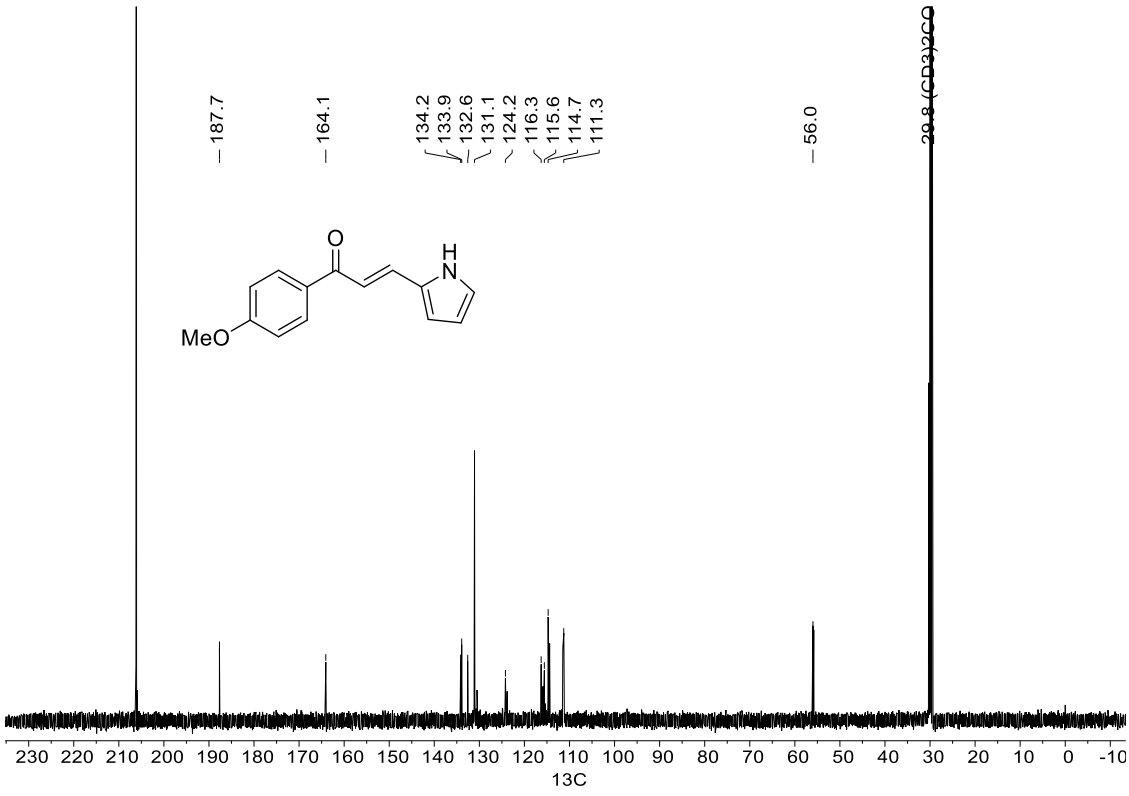
^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) of 32



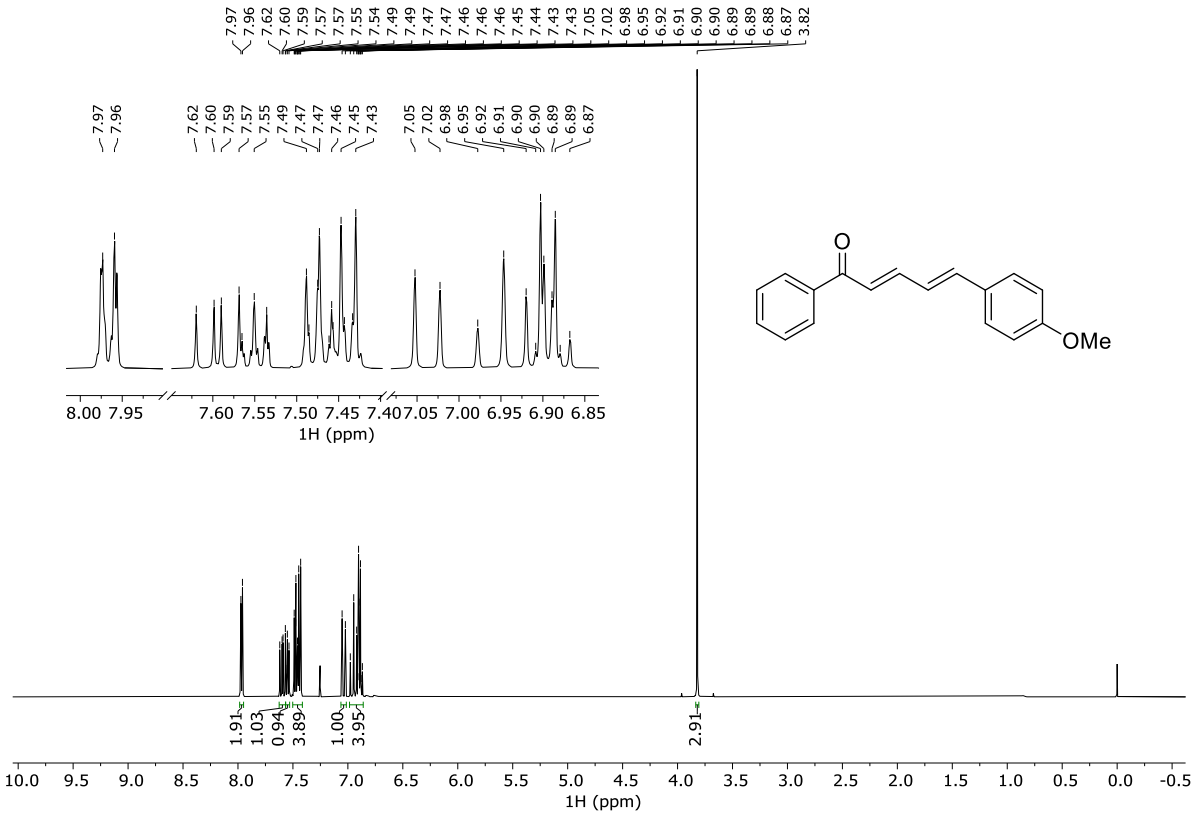
^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) spectrum of 33



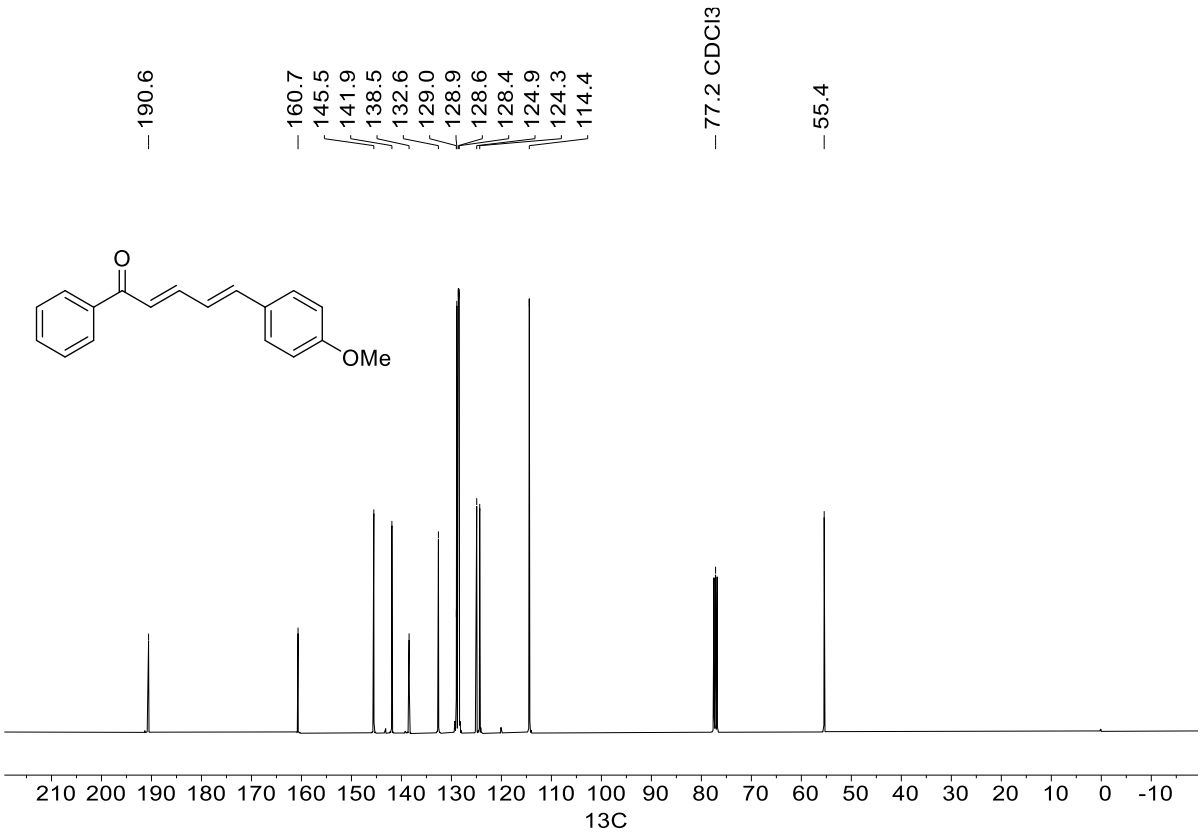
^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) of 33



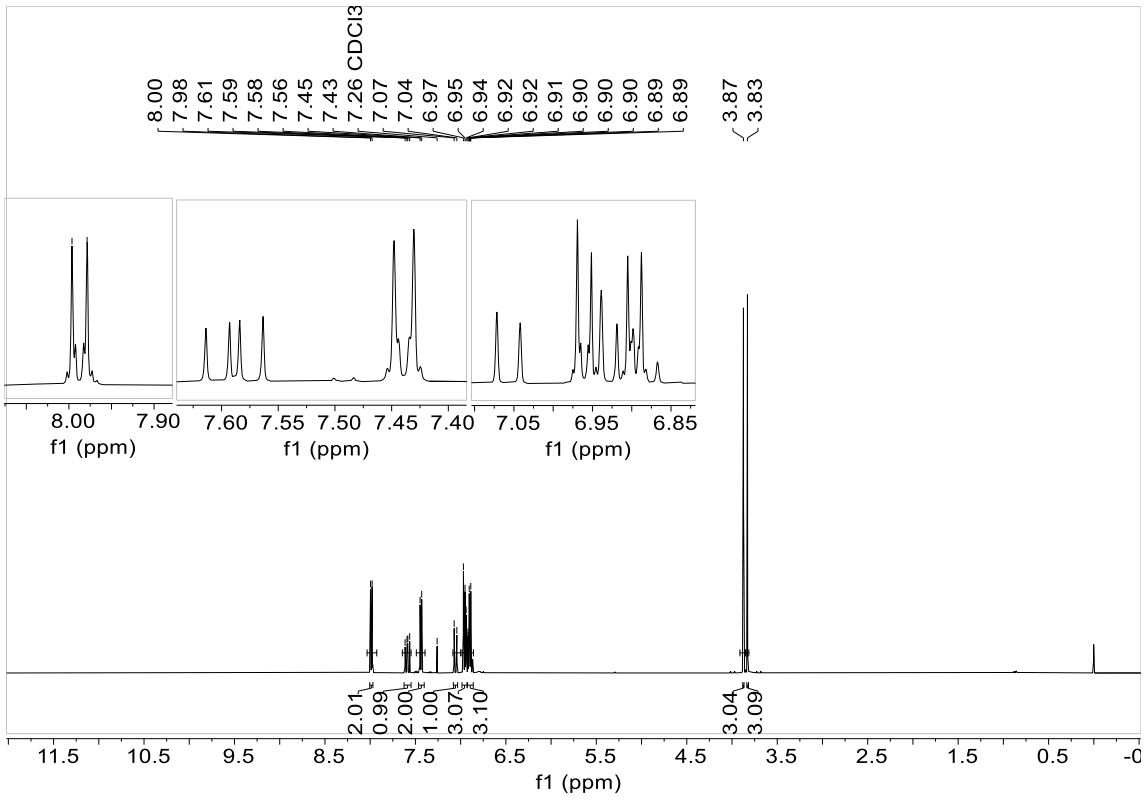
^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) spectrum of 34



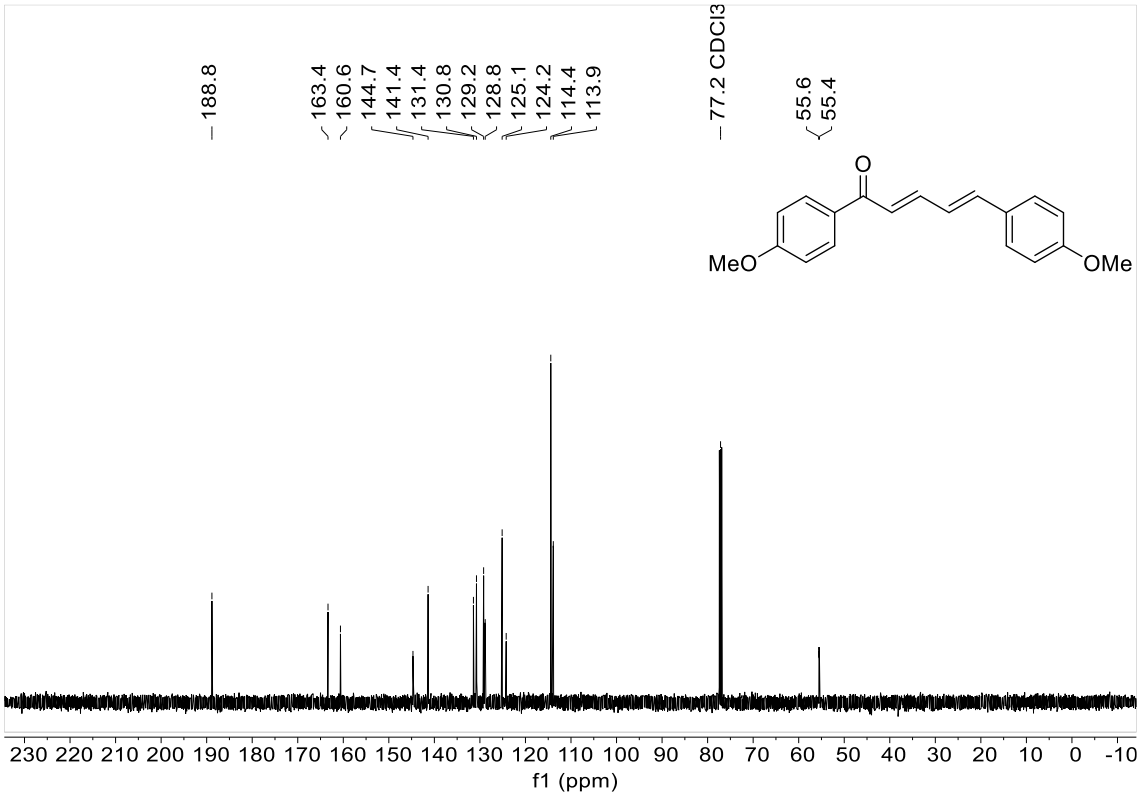
^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) of 34



^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) spectrum of 35



^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) of 35


188.8
163.4
160.6
144.7
141.4
131.4
130.8
129.2
128.8
125.1
124.2
114.4
113.9
77.2 CDCl3
55.6
55.4
O
MeO
OMe
230 220 210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0 -10
f1 (ppm)