



**GUSTAVO HENRIQUE ANDRADE MACHADO**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS N-  
HETEROCICLICOS SUBSTITUÍDOS E TRIAGEM *IN VITRO* DO  
POTENCIAL ANTIBACTERIANO E MODULADOR  
ENZIMÁTICO**

**LAVRAS-MG**

**2021**

**GUSTAVO HENRIQUE ANDRADE MACHADO**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS N-HETEROCICLICOS  
SUBSTITUÍDOS E TRIAGEM *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO E  
MODULADOR ENZIMÁTICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Química/Bioquímica para a obtenção do título de Doutor.

Dra. Silvana Marcussi  
Orientadora

Dr. Sérgio Scherrer Thomasi  
Coorientador

**LAVRAS-MG**

**2021**

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

Machado, Gustavo Henrique Andrade.

Síntese e caracterização de compostos n-heterocíclicos substituídos e triagem *in vitro* do potencial antibacteriano e modulador enzimático / Gustavo Henrique Andrade Machado. - 2021.

162 p. : il.

Orientador(a): Silvana Marcussi.

Coorientador(a): Sérgio Scherrer Thomasi.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Síntese Multicomponente. 2. Química Verde. 3. Polihidroquinolinas.  
I. Marcussi, Silvana. II. Thomasi, Sérgio Scherrer. III. Título.

**GUSTAVO HENRIQUE ANDRADE MACHADO**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS N-HETEROCICLICOS  
SUBSTITUÍDOS E TRIAGEM *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO E  
MODULADOR ENZIMÁTICO**

**SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF SUBSTITUTED N-HETEROCYCLIC  
COMPOUNDS AND IN VITRO SCREENING OF ANTIBACTERIAL POTENTIAL  
AND ENZYMATIC MODULATOR**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Química/Bioquímica para a obtenção do título de Doutor.

APROVADO em 28 de setembro de 2021.

Dr. Norival Alves Santos Filho- Unesp

Dra. Mirelle Oliveira Sóter França - Unilavras

Dr. Rodrigo Avelaira Barbosa – UFLA

Dra. Silvana Marcussi  
Orientadora

Dr. Sérgio Scherrer Thomasi  
Coorientador

**LAVRAS-MG**

**2021**

As pessoas mais importantes da minha vida:  
Minha filha, Júlia e minha mãe, Zélia: por permitirem que eu  
busque coisas melhores, através de disciplina e força de  
vontade, e por me permitirem momentos felizes!

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

Os meus sinceros agradecimentos àqueles que diretamente e indiretamente contribuíram para esta realização:

A DEUS, por me dar força e paciência para seguir; por guiar meus passos e ser minha fortaleza.

À minha família, em especial ao meu pai, Paulo e irmãos, João Paulo e Hugo, pelo amor, confiança e por acreditarem sempre no meu potencial.

À Laize, pelo apoio, incentivo, ajuda real nas horas mais difíceis, ajuda essa que veio em forma de paciência nos meus momentos de desespero, pelo incentivo; pelas vezes que pensei em desistir e ela me ajudou a suportar com garra e força e pela ajuda quanto à escrita e desenvolvimento deste trabalho.

À minha orientadora, Professora Silvana, agradeço pelos ensinamentos, dedicação e confiança, pela disponibilidade e atenção em me orientar e me nortear nesta caminhada rumo a um sonho e pela paciência.

Ao meu coorientador, professor Sérgio, por me receber e permitir todo desenvolvimento dos experimentos de síntese, pelo fornecimento de todo material.

A todos do laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciência dos Alimentos, a quem agradeço em especial à Juliana e a professora Roberta, pela amizade e apoio e pela parceria durante toda a minha permanência na pós-graduação.

Agradeço a todos do laboratório de Bioquímica de forma geral, em especial ao Marcus pela parceria, vocês foram essenciais e muito importantes para a realização deste trabalho.

Agradeço também a banca avaliadora, Professores: Mirelle, Norival, Rodrigo, Sérgio e Silvana pela discussão enriquecedora e aprendizados somados.

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

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Química pela oportunidade, e a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos muito obrigado!

## RESUMO

Neste momento as reações multicomponentes apresentam extrema relevância dentro da química verde, sendo utilizadas para muitas modificações orgânicas, bem como para extensão e aumento da biblioteca de compostos biologicamente ativos. Além disso, as reações multicomponentes permitem a construção de várias ligações e reações em uma sequência, sem a necessidade de isolar os intermediários e sem alterar as condições de reação. Devido a flexibilidade, alto rendimento, menor gasto energético, baixo desperdício de processo e baixo custo de produção, estas reações oferecem vantagens notáveis em detrimento da síntese tradicional. Uma necessidade adicional e muito importante de procedimentos químicos ecológicos é a utilização de solventes mais ecológicos ou mesmo a não utilização destes, a fim de evitar a poluição ambiental. Nos últimos anos tem-se dado uma atenção especial para a síntese de polihidroquinolinas devido ao seu alto potencial farmacológico. Alguns derivados dessa classe foram sintetizados sem o uso de catalisadores ou solventes. Para a caracterização destas moléculas foram feitas análises de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e espectroscopia na região do Infravermelho, com transformada de Fourier, e os resultados demonstram que as moléculas foram sintetizadas com êxito, além de apresentarem atividade antimicrobiana, sendo que na técnica de diluição seriada as moléculas apresentaram resultados estatisticamente significativos tanto para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 quanto para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, com ação bactericida significativa. As moléculas não tiveram efeito sobre o plasma humano citratado, porém foram capazes de aumentar o tempo de coagulação, induzido pela peçonha de *Bothrops moojeni*, quando previamente incubadas com o plasma. A incubação prévia das moléculas com a peçonha de *B. moojeni* reduziu a atividade trombolítica da peçonha. Para a atividade fosfolipásica as doses previamente incubadas com a peçonha de *Bothrops moojeni* (20 $\mu\text{g}$ ), resultaram em inibições próximas a 30%. As moléculas também foram capazes de reduzir significativamente a citotoxicidade induzida por proteases e fosfolipases  $\text{A}_2$  presentes na peçonha de *Bothrops moojeni* (20 $\mu\text{g}$ ), nas doses testadas. Desta forma, os derivados polihidroquinolínicos se mostraram de fácil obtenção, sendo sintetizados em acordo com os padrões da química verde, além de apresentarem diversas propriedades biológicas que destacam seu potencial farmacêutico.

**Palavras-chave:** Síntese Multicomponente; Química Verde, Polihidroquinolinas, Triagem Biológica, Caracterização Química.

## ABSTRACT

In this moment, multicomponent reactions are extremely relevant inside green chemistry, being used for many organic modifications, as well as for extending and increasing the library of biologically active compounds. Furthermore, multicomponent reactions allow the construction of several bonds and reactions in a sequence, without the need to isolate the intermediates and without changing the reaction conditions. Due to their flexibility, high yield, lower energy expenditure, low process waste and low production cost, these reactions offer notable advantages over traditional synthesis. An additional and very important need for ecological solvents or even the non-use of them avoiding environmental pollution. In recent years, special attention has been given to the synthesis of polyhydroquinolines due to their high pharmacological potential. Some derivatives of this class were synthesized without use of catalysts or solvents either. For the characterization of these molecules,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance analyzes and spectroscopy in the infrared region, with Fourier transform were performed, and the results demonstrate that the molecules were successfully synthesized, in addition to showing antimicrobial activity, and in the technique of serial dilution, the molecules showed statistically significant results both for *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and for *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, with significant bactericidal action. The molecules had no effect on citrated human plasma, but were able to increase the clotting time, induced by *Bothrops moojeni* venom, when previously incubated with the plasma. Previous incubation of the molecules with *B. moojeni* venom reduced the thrombolytic activity of the venom. For phospholipase activity, doses previously incubated with the same venom resulted in inhibitions close to 30% or more. The molecules were also able to reduce significantly the cytotoxicity induced by proteases and phospholipases  $\text{A}_2$  present in venom at the doses tested. Thus, the synthesized polyhydroquinoline derivatives proved to be easy to obtain and in accordance with the standards of green chemistry, in addition to presenting several biological properties that highlight their pharmaceutical potential.

Key words: Multicomponent synthesis, Green chemistry, Polyhydroquinolines, Biological screening, Chemical characterization.



## LISTA DE FIGURA

<b>Figura 1 -</b>	Atorvastatina e seus análogos.....	<b>13</b>
<b>Figura 2 -</b>	Os alcaloides coniina e $\gamma$ -coniceína.....	<b>17</b>
<b>Figura 3 -</b>	Estrutura da ciclopamina.....	<b>17</b>
<b>Figura 4 -</b>	Núcleo piperidínico e derivado.....	<b>18</b>
<b>Figura 5 -</b>	Núcleo quinolínico e derivado.....	<b>18</b>
<b>Figura 6 -</b>	Alguns dos primeiros alcaloides isolados.....	<b>20</b>
<b>Figura 7 -</b>	Alguns exemplos de produtos (medicamentos) comerciais (em preto) inspirados em produtos naturais (em verde).....	<b>21</b>
<b>Figura 8 -</b>	Síntese de anéis N-heterocíclicos altamente funcionalizados.....	<b>22</b>
<b>Figura 9 -</b>	Exemplos de medicamentos com núcleo piperidínico.....	<b>26</b>
<b>Figura 10 -</b>	Piperidina representada em cadeira.....	<b>28</b>
<b>Figura 11 -</b>	Estrutura do medicamento Donepezil.....	<b>29</b>
<b>Figura 12 -</b>	Estrutura geral de uma 1,4-Di-hidropiridina.....	<b>29</b>
<b>Figura 13 -</b>	Fármacos disponíveis comercialmente, com núcleo DHP.....	<b>30</b>
<b>Figura 14 -</b>	Estrutura química do NADH, destacando o anel DHP.....	<b>31</b>
<b>Figura 15 -</b>	Síntese de derivados PHQs.....	<b>33</b>
<b>Figura 16 -</b>	Síntese de PHQs catalisadas por BiBr <sub>3</sub> .....	<b>33</b>
<b>Figura 17 -</b>	Estrutura do ácido nalidíxico.....	<b>34</b>
<b>Figura 18 -</b>	Estrutura da 4-hidroxiquinolona.....	<b>36</b>
<b>Figura 19 -</b>	Esquema reacional da síntese multicomponente para obtenção dos derivados hexahidroquinolínicos.....	<b>37</b>

## ARTIGO 1

<b>Figure 1 -</b>	Aldol condensation between dimedone and benzaldehyde.....	<b>49</b>
<b>Figure 2 -</b>	Michael addition between ethyl acetoacetate and the product of the aldol condensation, followed by imine formation.....	<b>50</b>
<b>Figure 3 -</b>	Chemical equilibrium between imine and enamine.....	<b>50</b>
<b>Figure 4 -</b>	The final step in the mechanism for the hexahydroquinoline synthesis.....	<b>51</b>

- Figure 5 -** (A) Effect of the compound 4-(2-chloro-phenyl)-2,7,7-trimethyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester on the coagulation (induced by the venom of *Bothrops moojeni*) of citrated human plasma. Positive control (C+): *Bothrops moojeni* venom (40 µg). Samples: compound in the doses of 125, 100, 50, and 25 mg, previously incubated with the venom and then added to plasma for time measuring. (B) Effect of the compound 4-(2-chloro-phenyl)-2,7,7-trimethyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester on the coagulation (induced by the venom of *Bothrops moojeni*) of citrated human plasma. Positive control (C+): *Bothrops moojeni* venom (40 µg). Samples: compound in the doses of 125, 100, 50, and 25 mg, previously incubated with the plasma and subsequent addition of the venom for time measuring. Data represent the means and standard deviation of triplicates. \*Statistically significant – differs from the positive control (p <0.05)..... 55
- Figure 6 -** (A) Effect of the compound 4-(2-chloro-phenyl)-2,7,7-trimethyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester on human blood thrombi. Positive control (C+): *Bothrops moojeni* (20 µg) = 100% thrombus dissolution. Samples: compound at 125, 100, 50, and 25 mg. (B) Effect of the compound 4-(2-chloro-phenyl)-2,7,7-trimethyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester on the thrombolytic activity induced by proteases from *Bothrops moojeni* venom. Positive control (C+): *Bothrops moojeni* venom (20 µg). Samples: compound at the doses of 125, 100, 50, and 25 mg previously incubated with the venom and then added to the thrombi. Data represent the means and standard deviation of triplicates. \*Statistically significant – differs from the positive control (p <0.05)..... 57
- Figure 7 -** Effect of the compound 4-(2-chloro-phenyl)-2,7,7-trimethyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester on the phospholipase activity induced by *Bothrops moojeni* venom. Positive control (C+): *Bothrops moojeni* venom (20 µg). Samples: compound at the doses of 125, 100, 50, and 25 mg, previously incubated with venom. Data represent the means and standard deviation of triplicates. \*Statistically significant – differs from the positive control (p <0.05)..... 59
- Figure 8 -** Effect of the compound 4-(2-chloro-phenyl)-2,7,7-trimethyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester on the cytotoxic activity induced by *Bothrops moojeni* venom in human erythrocytes. Positive control (C+): *Bothrops moojeni* venom (20 µg). Samples: compound in the doses of 125, 100, 50, and 25 mg, previously incubated with the venom. Data represent the means and standard deviation of triplicates. \*Statistically significant – differs from the positive control (p <0.05)..... 61

## ARTIGO 2

- Figura 1a** - Síntese de polihidroquinolinas utilizando 5,5-dimetil-1,3-ciclohexanodiona. **68**
- Figura 1b** - Síntese de polihidroquinolinas utilizando 1,3-ciclohexanodiona..... **68**
- Figura 2** - Síntese de 4-(4-hidroxifenil)-2,7,7-trimetil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-acido carboxílico etil éster..... **69**
- Figura 3** - **(A)** Efeitos da molécula sintetizada 4-(4-hidroxifenil)-2,7,7-trimetil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-acido carboxílico etil éster sobre a coagulação de plasma humano citratado induzida por peçonha de *Bothrops moojeni*. Controle positivo (C+): peçonha de *Bothrops moojeni* (40 µg). Amostras: composto nas doses 125, 100, 50 e 25mg, previamente incubado com a peçonha e posteriormente adicionados ao plasma para a contagem do tempo. **(B)** Efeito do composto 4-(4-hidroxifenil)-2,7,7-trimetil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-acido carboxílico etil éster sobre a coagulação de plasma humano citratado, induzida por peçonha de *Bothrops moojeni*. Controle positivo (C+): peçonha de *Bothrops moojeni* (40 µg). Amostras: composto nas doses 125, 100, 50 e 25 mg, previamente incubado com o plasma e posterior adição da peçonha e contagem do tempo. Dados representam as médias e desvio padrão das triplicatas. \*Estatisticamente significativo – difere do controle positivo (p <0,05)..... **79**
- Figura 4** - **(A)** Efeitos sobre trombos sanguíneos humanos da molécula 4-(4-hidroxifenil)-2,7,7-trimetil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-acido carboxílico etil éster. Controle positivo (C+): *Bothrops moojeni* (20 µg) = 100% dissolução do trombo. Amostras: composto nas doses 125, 100, 50 e 25 mg. **(B)** Efeito da 4-(4-hidroxifenil)-2,7,7-trimetil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-acido carboxílico etil éster sobre a atividade trombolítica induzida por proteases da peçonha de *Bothrops moojeni*. Controle positivo (C+): *Bothrops moojeni* (20 µg) = 100% dissolução do trombo. Amostras: composto nas doses 125, 100, 50 e 25 mg, previamente incubado com a peçonha. Dados representam as médias e desvio padrão das triplicatas. \*Estatisticamente significativo – difere do controle positivo (p <0,05)..... **81**
- Figura 5** - Efeitos da molécula 4-(4-hidroxifenil)-2,7,7-trimetil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-acido carboxílico etil éster sobre a atividade de fosfolipases A<sub>2</sub> de *Bothrops moojeni*. Controle positivo (C+): peçonha de *Bothrops moojeni* (20 µg). Amostras: composto nas doses 125, 100, 50 e 25mg, previamente incubado com a peçonha. Dados representam as médias e desvio padrão das triplicatas. \*Estatisticamente significativo – difere do controle positivo (p <0,05)..... **82**
- Figura 6** - Efeitos da molécula 4-(4-hidroxifenil)-2,7,7-trimetil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-acido carboxílico etil éster sobre a atividade citotóxica induzida por peçonha de *Bothrops moojeni* em eritrócitos humanos. Controle positivo (C+): peçonha de *Bothrops moojeni* (20 µg). Amostras: composto nas doses 125, 100, 50 e 25mg, previamente incubado com a peçonha. Dados representam as médias e desvio padrão das triplicatas. \*Estatisticamente significativo – difere do controle positivo (p <0,05)..... **83**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Hexahidroquinolinas que foram obtidas a partir da variação dos grupamentos $-R^1$ e $-R^2$ nos reagentes 1 e 2.....	<b>38</b>
-------------------	---	-----------

### ARTIGO 1

<b>Table 1 -</b>	Effect of the compound 4-(2-chloro-phenyl)-2,7,7-trimethyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester and positive control on the viability and replication of <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923. CV (%): Coefficient of Variation. P-value less than 0.05 is statistically significant. * Data have a normal distribution....	<b>52</b>
------------------	--	-----------

<b>Table 2 -</b>	Effect of the compound 4-(2-chloro-phenyl)-2,7,7-trimethyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester and positive control on the viability and replication of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853. CV (%): Coefficient of Variation. P-value less than 0.05 is statistically significant. * Data have a normal distribution.....	<b>53</b>
------------------	--	-----------

### ARTIGO 2

<b>Table 1 -</b>	Efeito do composto 4-(4-hidroxifenil)-2,7,7-trimetil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-acido carboxílico etil éster e do controle positivo sobre a viabilidade e multiplicação de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923. CV (%): Coeficiente de Variação. P valor: Nível Descritível. * Dados normalizados.....	<b>76</b>
------------------	---	-----------

<b>Table 2 -</b>	<b>Tabela 2.</b> Efeito do composto 4-(4-hidroxifenil)-2,7,7-trimetil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-acido carboxílico etil éster e do controle positivo sobre a viabilidade e multiplicação de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853. CV (%): Coeficiente de Variação. P valor: Nível Descritível. * Dados normalizados.....	<b>76</b>
------------------	---	-----------

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>18</b>
<b>3 REFERENCIAL TEORICO .....</b>	<b>18</b>
<b>3.1 Alcaloides e compostos N-heterocíclicos .....</b>	<b>18</b>
<b>3.2 Síntese de compostos N-heterocíclicos .....</b>	<b>23</b>
<b>3.3 Necessidade de novos fármacos: resistência microbiana .....</b>	<b>25</b>
<b>3.4 Alcalóides piperidínicos.....</b>	<b>28</b>
<b>3.4.1 Piperidina.....</b>	<b>31</b>
<b>3.5 Alcalóides piridínicos e quinolínicos.....</b>	<b>32</b>
<b>3.6 Derivados quinolônicos e seu uso como antibióticos .....</b>	<b>38</b>
<b>4 MATERIAL E METODOS.....</b>	<b>40</b>
<b>4.1. Plano de síntese .....</b>	<b>40</b>
<b>4.1.1 Síntese dos derivados hexaidroquinolínicos .....</b>	<b>40</b>
<b>ARTIGO 1.....</b>	<b>43</b>
<b>ARTIGO 2.....</b>	<b>68</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>88</b>
<b>APENDICE A.....</b>	<b>102</b>
<b>APENDICE B.....</b>	<b>115</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Todo conhecimento científico depende, em grande parte, dos instrumentos técnicos que se dispõe numa determinada época. Analogicamente, isso pode ser observado a respeito da química de produtos naturais em relação ao seu objetivo fundamental que é o desenvolvimento de fármacos, principalmente pela síntese ou modificação molecular de estruturas biológicas (KHAN, R. A., 2018; WU; BOGER, 2020; YUNES; PEDROSA; FILHO, 2001).

Produtos naturais provenientes de plantas, animais e microrganismos, os quais possuem atividade biológica, são utilizados pela humanidade por milênios, possuindo os mais variados fins, sendo que o uso terapêutico dessas substâncias é a aplicação mais relevante (ABDEL-RAZEK *et al.*, 2020; BAKER *et al.*, 2007; SULEIMAN *et al.*, 2020). Estes produtos têm sido a fonte da maioria dos princípios ativos de medicamentos, e ainda todo o processo de desenvolvimento de novos fármacos se inicia na descoberta de uma nova molécula natural que apresente ação terapêutica e que possa ser posteriormente sintetizada (HARVEY, 2008).

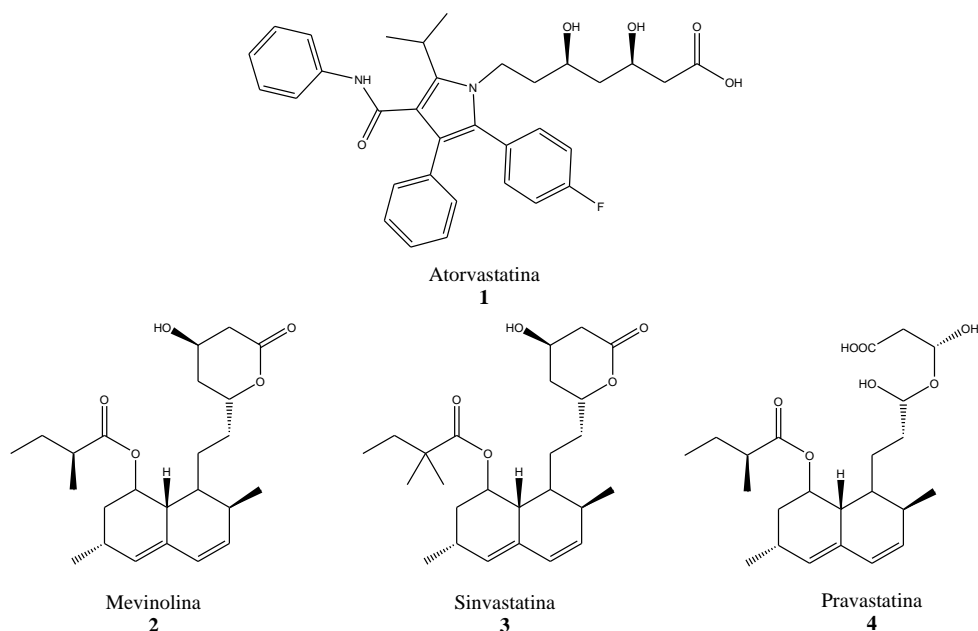
Segundo Schreiber (2011) cerca de 50% dos fármacos são produtos naturais ou inspirados em produtos naturais, sendo que eles representam uma abundante fonte de diversidade química para descoberta de novos agentes terapêuticos, podendo ser obtido tanto por modificação química direta como servindo de inspiração para a racionalização de moléculas mais eficientes e seguras.

Um exemplo que pode ser dado para esta última abordagem é a descoberta do agente hipocolesterolêmico Atorvastatina **1**, que foi baseado no composto natural Mevinolina **2**, isolado de culturas de fungos *Penicillium citrinum* (ABE *et al.*, 2004). Outros medicamentos também foram descobertos através de modificações químicas ou biotransformações da Mevinolina, como a Sinvastatina **3** e a Pravastatina **4**, sendo que a Atorvastatina é um dos medicamentos mais vendidos no mundo (CHAST, 2008) (Figura 1).

Para se ter uma ideia do processo, uma pesquisa feita pelo Rosenstiel Basic Medicinal Sciences Research Center (Brandeis University, Massachusetts, USA) mostra que, para cada fármaco aprovado nos Estados Unidos, uma média de 6.300 compostos são sintetizados, destes, somente 21 chegam a ser testados quanto a toxicologia subaguda, sendo que 6,5 são testados em humanos e apenas 2,5 passam nos testes clínicos finais para que, um deles possa

ser aceito como fármaco, sendo que este processo leva aproximadamente 12,5 anos e representa um custo de US\$ 350 milhões de dólares.

**Figura 1 - Atorvastatina e seus análogos.**



Na realidade, no processo de desenvolvimento de um fármaco, a etapa limitante da velocidade é, geralmente, a correspondente às sínteses químicas, gerando escassez de compostos para serem testados (CALIXTO, 2001).

Um outro levantamento afirma o já exposto, mostrando que o custo do processo de produção e distribuição de medicamentos gira em torno de R\$ 1,4 bilhões de reais e pode levar entre 10 e 24 anos, considerando desde o início das pesquisas até o lançamento de um novo fármaco no mercado (ENSERINK, 2009; HERRLING, 2009; SANTOS *et al.*, 2008).

Os produtos naturais continuam sendo uma fonte de protótipos para a obtenção de novos fármacos. Primeiro, devido à grande parte de importantes fármacos ser oriunda de produtos naturais, ou estes terem sido utilizados como modelos moleculares para obtenção destes fármacos. Segundo, porque para a maioria dos fármacos desenvolvidos por via sintética, existem produtos naturais com o mesmo modo de ação já identificados e terceiro, existem muitos alvos moleculares relacionados a problemas patológicos, para os quais os compostos naturais podem ser considerados protótipos, mesmo que ainda não tenham sido

desenvolvidos os fármacos correspondentes, sinteticamente (ABDEL-RAZEK *et al.*, 2020; SULEIMAN *et al.*, 2020; TULP; BOHLIN, 2002).

Sendo assim, a síntese orgânica possui papel fundamental como ferramenta para obtenção de novas moléculas de interesse clínico-farmacêutico, utilizando os produtos naturais como fonte de possíveis descobertas e revisão de novos padrões estruturais para a obtenção de fármacos com ações terapêuticas, bem como de novas metodologias capazes de fornecer estes produtos (SCHAUB, 2021; SCHREIBER, 2011; WILSON; DANISHEFSKY, 2006).

Um dos grandes problemas enfrentados pela saúde mundial é a resistência aos antimicrobianos existentes, uma vez que a descoberta desses medicamentos envolve anos e até mesmo décadas de pesquisa sendo pouco comuns no meio científico, e ainda observa-se uma evolução da resistência para cada antibiótico colocado na prática clínica, independentemente da classe química ou alvo molecular da droga. Novos mecanismos antimicrobianos são necessários para combater a disseminação global de doenças causadas por agentes patogênicos, principalmente bactérias cada vez mais desafiadoras; mesmo excluindo o declínio mediado pela resistência na eficácia, os antimicrobianos atuais têm efeitos colaterais em curto e longo prazo, dificuldades com o regime de dosagem e restrições de uso, particularmente para crianças, sendo assim ainda há uma grande necessidade, e oportunidade comercial, para novos antimicrobianos com menos efeitos colaterais e que não apresentem resistência por parte dos microrganismos (KUMAR, M.; CURTIS; HOSKINS, 2018; MURTHY *et al.*, 2012; NATHAN, 2004; PAYNE *et al.*, 2007).

Um outro ponto importante a ser mencionado é que a utilização irresponsável, a falta de hábitos higiênicos (para a não disseminação de doenças) e a limitação na escolha da droga para microrganismos de forma geral são as causas do aumento de resistência microbiana às drogas comerciais, sendo que, um dos maiores obstáculos no desenvolvimento de novas drogas alternativas parecem ser: (1) falta de incentivo da indústria farmacêutica (2) dificuldade em encontrar drogas de baixa toxicidade que não compartilhem rotas ou intermediários metabólicos com os hospedeiros (ROSSI, 2011).

Os anéis de piperidina são onipresentes em produtos naturais e farmacêuticos que desempenham papéis fundamentais no tratamento de doenças (CHEN *et al.*, 2015; HARKISS; SUTHERLAND, 2018; ROUGHLEY; JORDAN, 2011). Como mencionado, as piperidinas e seus análogos são importantes heterociclos que estão presentes em muitos alcaloides de origem natural, em compostos biologicamente ativos e na síntese orgânica (KHAN, A. T.;



LAL; KHAN, 2010). Estes compostos que contêm piperidina como subestrutura exibem atividade antibacteriana (ZHOU *et al.*, 2007), anti-malária (MISRA *et al.*, 2009), dentre outras.

Por outro lado, muita atenção tem sido dada na síntese de compostos de 1,4-dihidropiridil (DHPs) e nas chamadas polihidroquinolinas (PHQs), devido à sua atividade biológica significativa (NGUYEN; NGUYEN; TRAN, 2021; PAKDAMAN; ALLAMEH; SHAKER, 2018). Alguns agentes cardiovasculares, como a nifedipina, nicardipina, amlodipina e outros compostos derivados destas estruturas, são eficazes para o tratamento da hipertensão. As DHPs são análogas das coenzimas NADH, que foram exploradas quanto a sua atividade em canais de cálcio e os anéis heterocíclicos são encontrados em uma variedade de compostos bioativos, como agentes broncodilatadores, antiateroscleróticos, antitumorais, vasodilatadores, antidiabéticos, hepatoprotetores, dentre outros.

Diversos estudos indicam que esses compostos apresentam variadas funções médicas, podendo atuar como neuroprotetores, antiagregantes plaquetários, agentes anti-isquêmicos cerebrais e quimiossensibilizadores. Por todas estas atividades, os compostos derivados das DHPs e PHQs não só atraíram a atenção dos químicos sintéticos, mas também representam interessantes moléculas para pesquisa de novos medicamentos (DEKAMIN *et al.*, 2018; KO; YAO, 2006; MURTHY *et al.*, 2012; NGUYEN; NGUYEN; TRAN, 2021).

Assim, a síntese de piperidinas e quinolinas altamente substituídas ganhou atenção considerável e, como resultado, várias metodologias foram desenvolvidas utilizando abordagens que envolvem uma variedade de técnicas de ciclização. Porém, existem poucos métodos que possibilitem a preparação eficaz de derivados destes compostos (BULL *et al.*, 2012; NGUYEN; NGUYEN; TRAN, 2021; PAKDAMAN; ALLAMEH; SHAKER, 2018; SILVA; VARANDAS; SILVA, 2013; TAIT; BUTTERWORTH; CLAYDEN, 2015).

A modificação estrutural é o método para obtenção de novos fármacos mais utilizado e o mais recompensador até o momento. Ele consiste basicamente em tornar uma substância química de estrutura determinada e com ação biológica conhecida, um modelo ou protótipo, e a partir daí sintetizar e ensaiar novos compostos que sejam homólogos ou análogos estruturais do composto matriz (LOPEZ, 2018).

Diante do exposto, a síntese de polihidroquinolinas (PHQs) torna-se de grande interesse com vistas à avaliação de seu potencial como candidatos a novos fármacos antimicrobianos. A ausência de relatos na literatura de algumas destas substâncias com potencial atividade antimicrobiana faz das substâncias propostas, novos promissores

candidatos a fármacos. Em vista da estrutura original das substâncias propostas, pode-se esperar que apresentem modo de ação diferente daqueles descritos para os fármacos já existentes, o que, além de ser considerada uma inovação, é desejável no caso de associações, devido à menor possibilidade de surgimento de resistência.

## **2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA**

Sintetizar derivados de polihidroquinolinas substituídas cujas estruturas gerais serão mostradas no plano de síntese, por meio de síntese orgânica.

Realizar a caracterização dos compostos obtidos por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e infravermelho (IV), e avaliar sua atividade antimicrobiana *in vitro* contra linhagens de bactérias responsáveis pelo desenvolvimento de doenças em humanos, principalmente no que tange a infecções da pele.

Realizar a caracterização biológica dos compostos sintetizados, utilizando ensaios de modulação enzimática com foco em fosfolipases A<sub>2</sub> e proteases que atuam em processos relacionados à inflamação e hemostasia sanguínea.

A relevância do presente projeto se destaca no contexto mundial atual, no qual há a evidente necessidade de desenvolvimento de novos antimicrobianos que atuem sobre diferentes alvos e mostrem-se efetivos contra patógenos resistentes às drogas existentes no mercado. Em adição, as “doenças da atualidade” possuem origem e desenvolvimento baseadas em inflamações crônicas subclínicas e distúrbios na hemostasia, destacando a necessidade de prospecção de novos compostos que atuem diminuindo a intensidade dessas desordens fisiológicas por meio de mecanismos diferentes dos exercidos pelos fármacos comerciais existentes.

## **3 REFERENCIAL TEORICO**

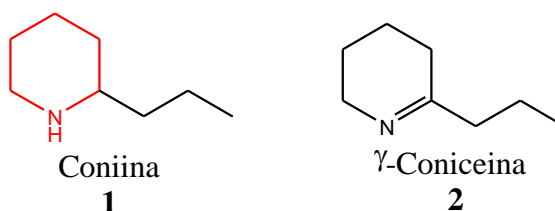
### **3.1 Alcaloides e compostos N-heterocíclicos**

Alguns compostos nitrogenados constituem metabólitos secundários, com função na defesa das plantas contra a herbivoria, como os glicosídeos cianogênicos, os glicosinolatos e em destaque os alcalóides, os quais são de grande interesse na medicina devido ao seu efeito tóxico e suas propriedades farmacológicas (ADAMSKI *et al.*, 2020; BHAMBHANI; KONDHARE; GIRI, 2021; TAI, L. & ZEIGER, 2013).

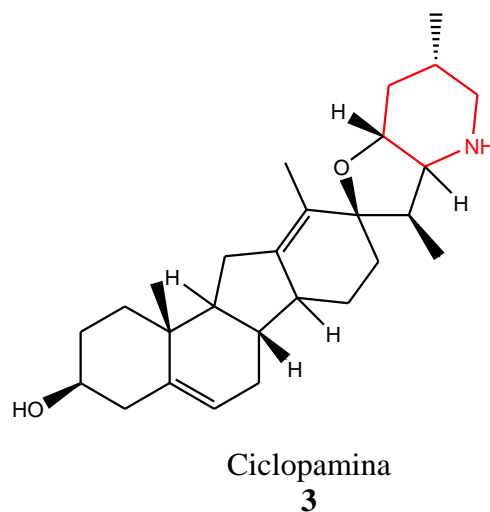
A definição para alcaloides dada pela IUPAC, refere-se a compostos básicos contendo nitrogênio (principalmente heterocíclico) ocorrendo em maior parte no reino vegetal, mas não excluindo os de origem animal (MOSS; SMITH; TAVERNIER, 1995).

Em geral, nessas substâncias o átomo de nitrogênio faz parte do anel heterocíclico (alcaloides verdadeiros) e em sua grande maioria possuem caráter alcalino devido à presença de um par de elétrons não pareados no nitrogênio (BHAMBHANI; KONDHARE; GIRI, 2021; KUTCHAN, 1995). São substâncias farmacologicamente ativas possuindo acentuado efeito no sistema nervoso dos vertebrados. São utilizados desde a Grécia antiga, como no caso do filósofo Sócrates que foi executado pela ingestão de uma bebida (veneno) preparada à base de cicuta (*Cicuta maculata*), contendo os alcaloides coniina **1** (derivado de piperidina) e  $\gamma$ -coniceína **2** (GREEN *et al.*, 2012) Figura 2.

**Figura 2** - Os alcaloides coniina e  $\gamma$ -coniceína.

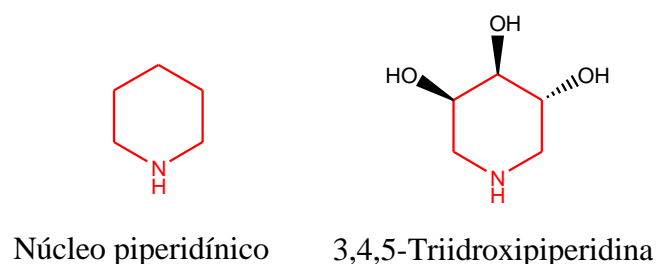


Fattorusso e Tagliatela-Scafati (2007), afirmaram que a maioria dos alcaloides tem um gosto amargo ou são venenosos quando ingeridos. A produção destes compostos pela planta parece ter evoluído em resposta ao ataque de animais herbívoros, sendo que alguns compostos podem produzir alterações no desenvolvimento da prole de animais que os consomem (BHAMBHANI; KONDHARE; GIRI, 2021). Como exemplo, pode-se citar o alcaloide ciclopamina encontrado nas folhas de milho lírio que na década de 1950, desencadeou uma séria deformação facial em cordeiros nascidos de ovelhas que pastavam deste milho. Sendo que apenas na década de 1980, após anos de pesquisas, o composto responsável por estas deformações foi identificado como sendo o alcaloide deoxijervina, mais tarde renomeado como ciclopamina **3** (Figura 3).

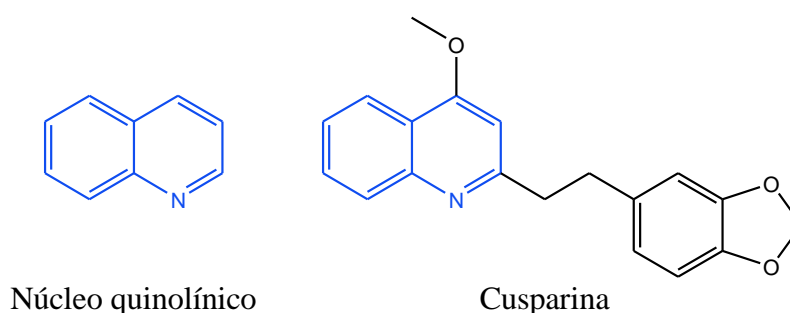
**Figura 3** - Estrutura da ciclopamina

Nestas estruturas pode estar presente um ou mais átomos de nitrogênio, tipicamente como aminas primárias, secundárias ou terciárias, o que geralmente confere a basicidade destas substâncias, tornando-as mais fáceis de isolar e purificar, devido à possível formação de sais solúveis em água na presença de ácidos minerais. A atividade biológica destas substâncias é muitas vezes dependente da função amina. Alcaloides são classificados de acordo com a natureza da estrutura contendo o átomo de nitrogênio, como exemplo, têm-se os grupos das: pirrolidinas, indolizidinas, quinolizidinas, isoquinolinas, indóis e em destaque as piperidinas e quinolinas (BHAMBHANI; KONDHARE; GIRI, 2021; DEWICK, 2002) (Figuras 4 e 5).

**Figura 4** - Núcleo piperidínico e derivado.



**Figura 5** - Núcleo quinolínico e derivado.



De fato, a principal função dos alcalóides é a de defesa da planta, devido a sua toxicidade e ao seu gosto amargo (BHAMBHANI; KONDHARE; GIRI, 2021; SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; PALAZZO DE MELLO, J. C.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, 2002). Devido a descoberta destas funções os compostos heterocíclicos se tornaram de grande importância em síntese orgânica. Eles fazem parte de inúmeros produtos naturais com propriedades biológicas com diversas aplicações farmacêuticas e em agroindústrias (OESTREICH, 2009). Moléculas contendo o heteroátomo nitrogênio e anéis aromáticos destacam-se como princípios ativos de vários produtos, com aplicações em medicina, agroquímica e cosmetologia. É sabido que vários alcalóides inibem o crescimento de microrganismos (BHAMBHANI; KONDHARE; GIRI, 2021; BRAVO *et al.*, 2010).

Sendo assim, a crescente investigação do potencial terapêutico de plantas medicinais, das quais compostos como alcaloides, podem ser isolados, resulta em informações para a pesquisa de rotas sintéticas, de interesse para o desenvolvimento de fármacos com aplicação no tratamento de vários tipos de infecções humanas (ADAMSKI *et al.*, 2020; BHAMBHANI;

KONDHARE; GIRI, 2021; DOS SANTOS, S. C. *et al.*, 2010)(DOS SANTOS, S. C. *et al.*, 2010).

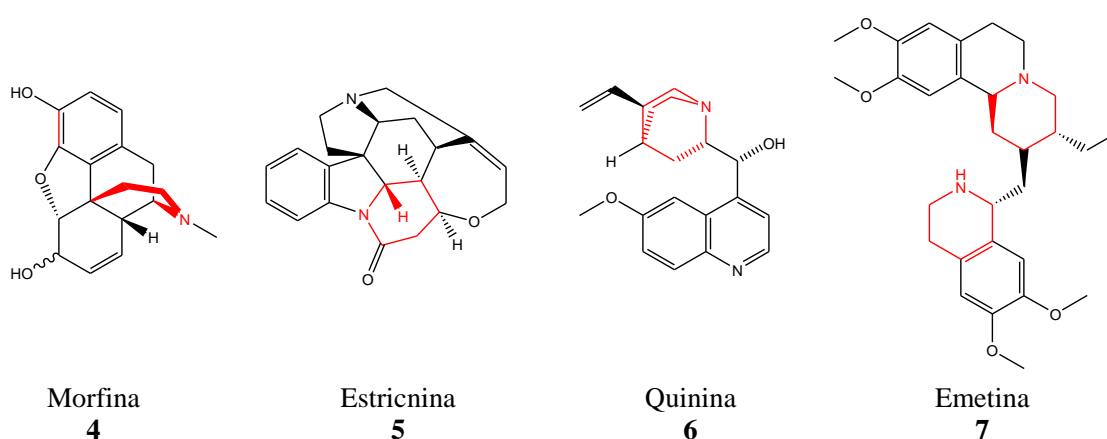
O estudo dos alcaloides possui uma grande relação com a história da civilização humana. Plantas contendo alcaloides são usadas pelo homem para fins medicinais desde tempos antigos, como exemplo o uso de Ephedra e papoulas na medicina tradicional chinesa, entre os séculos I e III a.C. (BHAMBHANI; KONDHARE; GIRI, 2021; CORREIA, 2001).

Porém, somente a partir do século XIX, foi possível isolar e experimentar essas substâncias em forma semi-pura. Podemos destacar a morfina **4**, isolada (pura) pela primeira vez em 1805 por Seturner e alguns outros alcaloides isolados por volta de 1820, como estricnina **5**, quinina **6** e emetina **7** que foram isolados por Pelletier e Caventou (CORREIA, 2001) (Figura 6).

Algumas aminas, como exemplo a serotonina, encontradas nos animais superiores, as quais desempenham funções importantes como neurotransmissor, são semelhantes aos alcaloides na sua estrutura e biossíntese, sendo por vezes chamadas de alcaloides (ANISZEWSKI, 2007).

Compostos heterocíclicos são compostos cíclicos contendo, no anel, um ou mais átomos diferentes do carbono, sendo que os heteroátomos mais comuns são o nitrogênio, o oxigênio e o enxofre. Os compostos N-heterocíclicos pertencem a uma classe especial de compostos, uma vez que eles apresentam um grande destaque na área da química medicinal e são ditas estruturas privilegiadas devido ao seu amplo espectro de atividades biológicas e farmacológicas com diversos alvos terapêuticos (DUARTE; SANGI; CORRÊA, 2010; KAWAMURA *et al.*, 2017).

**Figura 6** - Alguns dos primeiros alcaloides isolados.



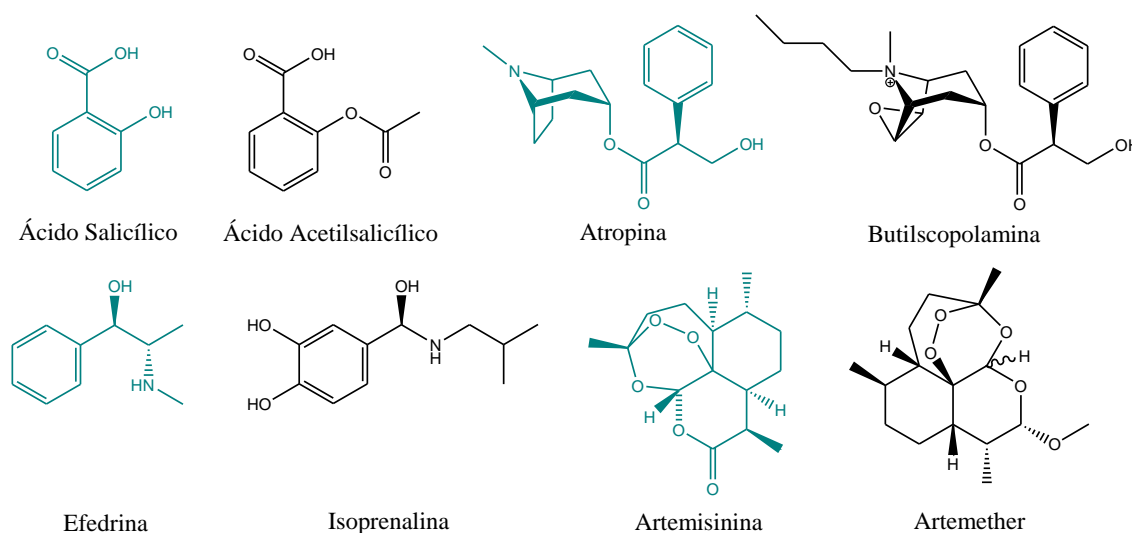
### 3.2 Síntese de compostos N-heterocíclicos

Os fármacos sintéticos representam uma parcela significativa no mercado farmacêutico, sendo observado que 90% dos medicamentos empregados na terapêutica contêm pelo menos um núcleo heterocíclico na estrutura dos fármacos. Isso demonstra a importância da síntese química dessa classe de compostos destacando diversas atividades biológicas, das quais podemos citar ações como: antibióticos, antifúngicos, anti-inflamatórios, antivirais, anticâncer, anticonvulsivantes, anti-histamínicos, anti-hipertensivo, antidepressivos e antiparasitários (DUA *et al.*, 2011).

O desenvolvimento da síntese orgânica está intimamente ligado ao conhecimento de moléculas provenientes de produtos naturais. A diferença entre as moléculas naturais e sintéticas está no grau de complexidade das estruturas, que muitas vezes, representam um verdadeiro desafio para os químicos orgânicos sintéticos (SCHAUB, 2021; WILSON; DANISHEFSKY, 2006).

Alguns exemplos da importância da síntese destas moléculas podem ser ilustrados (Figura 7) pelo desenvolvimento de muitos medicamentos utilizados na prática clínica, os quais tiveram suas sínteses baseadas em produtos naturais (SCHREIBER, 2011; WILSON; DANISHEFSKY, 2006).

**Figura 7** - Alguns exemplos de produtos (medicamentos) comerciais (em preto) inspirados em produtos naturais (em verde).



Partindo desse pressuposto de que a natureza nos fornece essa enorme diversidade molecular, o planejamento de novas metodologias mais eficientes se faz necessário. Por isso, obter o composto alvo não é mais o objetivo primário de uma rota sintética, mas sim, alcançá-lo de maneira mais eficiente. Dessa forma, intermediários chave avançados podem ser preparados de forma rápida e aplicados na preparação de diversos alvos (LLOBAT *et al.*, 2020; WILSON; DANISHEFSKY, 2006).

Devido a vasta gama de atividades farmacológicas desempenhadas por anéis N-heterocíclicos uma série de metodologias foram desenvolvidas envolvendo uma variedade de técnicas de ciclização (KHAN, A. T.; KHAN; BANNURU, 2010), tais como reações de imino Diels-Alder (SALES; CHARETTE, 2005; SON *et al.*, 2021), ciclizações aza-Prins (MURTY; RAM; YADAV, 2008), ciclização de ciclopropano em tandem/ciclização Conia-ene (LEBOLD *et al.*, 2009), reações intra-moleculares de Michael (FUSTERO *et al.*, 2007), e a reação intramolecular de Mannich em íons imínio (DAVIS; CHAO; RAO, 2001).

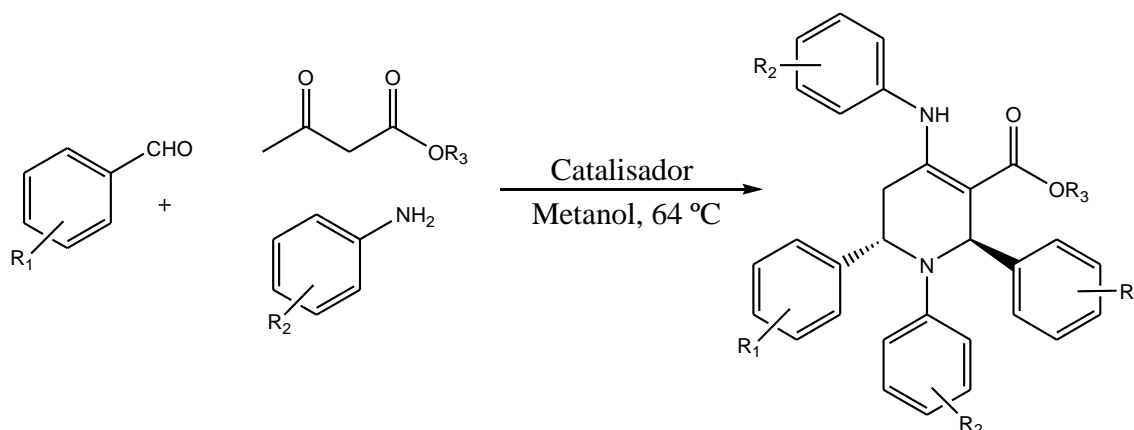
Contudo, estes métodos têm limitações devido a necessidade de quantidades onerosas e excessivas de catalisadores, diversidade de produtos e rendimentos. Por isso, o desenvolvimento de protocolos simples, de alto rendimento e ecologicamente corretos para a síntese multicomponente, envolvendo uma única etapa de preparação destes anéis heterocíclicos densamente funcionalizados, ainda se faz necessário (BRAHMACHARI; DAS, 2012).

Como parte dos esforços em curso para alcançar novos catalisadores para a síntese de compostos heterocíclicos, Palermo *et al.* (2016) relataram em seus trabalhos uma síntese multicomponente (SM) para potencializar a obtenção de derivados de piperidina altamente funcionalizados (Figura 8). No atual contexto da Química Verde, o design e desenvolvimento de sequências que permitem um acesso altamente seletivo aos andaimes moleculares elaborados, combinando a diversidade estrutural e a compatibilidade ecológica, são grandes desafios para os químicos orgânicos (ISAMBERT *et al.*, 2011; SCHAUB, 2021).

Essa RMCs para obtenção de piperidinas ou outros N-heterociclos altamente substituídas se torna de extrema importância, uma vez que três ou mais reações são combinadas em um passo sintético para obter um produto único sem a formação de subprodutos, com um rendimento mais satisfatório (DEKAMIN *et al.*, 2018; NGUYEN; NGUYEN; TRAN, 2021; PALERMO *et al.*, 2016).

**Figura 8** - Síntese de anéis N-heterocíclicos altamente funcionalizados.





Nos últimos anos, as reações multicomponentes que envolvem processos com três materiais de partida diferentes, como compostos de 1,3-dicarbonilo, aldeídos e compostos nucleofílicos, receberam atenção especial devido ao seu potencial em fornecer diferentes produtos de condensação dependendo das condições e estruturas específicas dos blocos de construção (BRAHMACHARI *et al.*, 2015; BRAHMACHARI; DAS, 2012; DEKAMIN *et al.*, 2018; NGUYEN; NGUYEN; TRAN, 2021).

### 3.3 Necessidade de novos fármacos: resistência microbiana

A resistência bacteriana está em ascensão e constitui um problema de saúde pública em todo o mundo. Para os profissionais de saúde, tem se tornado um desafio crescente, na medida em que as opções terapêuticas para o tratamento de algumas infecções causadas por Microrganismos Resistentes (MR) são cada vez mais restritas. Nos EUA uma pesquisa realizada na década passada constatou que cerca de 70% dos patógenos isolados em hospitais americanos são resistentes a pelo menos um antimicrobiano, reafirmando a preocupação com tal cenário; sendo que cerca de dois milhões de pacientes por ano estão infectados, o que resulta em aproximadamente 90.000 mortes (LIMA *et al.*, 2021; RAZZAQUE, 2021; SIEGEL *et al.*, 2007; ZHOU *et al.*, 2007).

Um outro estudo europeu concluiu que estas infecções afetam um em cada 10 pacientes internados e causam aproximadamente 5.000 mortes anuais no continente. No Brasil, os dados ainda são pouco documentados, devido à consolidação reduzida das informações por diversos hospitais, dificultando o conhecimento da extensão do problema no país. Contudo, o Ministério da Saúde avaliou a magnitude das infecções hospitalares em 99 hospitais terciários localizados nas capitais brasileiras e vinculados ao Sistema Único de

Saúde (SUS), identificando uma taxa de 13% de infecções entre pacientes hospitalizados (SOUZA *et al.*, 2015).

Vários fatores contribuem para a evolução da resistência bacteriana, merecendo destaque o uso indiscriminado de antibióticos (RAZZAQUE, 2021; SIEGEL *et al.*, 2007; ZIAKAS *et al.*, 2015).

Entretanto, existem bactérias naturalmente resistentes a certas classes de antimicrobianos; um exemplo clássico, os *Enterococcus* são naturalmente resistentes a qualquer cefalosporina (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Segundo Parisi *et al.* (2009) como esta resistência é fortalecida pelo uso indiscriminado de antimicrobianos, os quais aumentam o desenvolvimento de linhagens resistentes frente aos microrganismos patogênicos, esforços tem sido feitos para que haja um controle maior da saída destes medicamentos, passando a ser de uso controlado por receita médica, porém estas medidas não eliminam a questão da resistência e isto acontece devido à pressão seletiva resultante de seu uso clínico, industrial e comercial.

Além de ser um fato natural, a resistência microbiana pode ser tratada como um fenômeno ecológico que acontece como resposta de um microrganismo frente à ampla utilização de um fármaco e a presença no meio ambiente. Os microrganismos se multiplicam rapidamente, sofrem mutação e são promíscuos, podendo haver a troca de material genético entre linhagens de mesma espécie e/ou de espécies diferentes (GUIMARÃES; DA SILVA MOMESSO; PUPO, 2010; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Dentre os microrganismos mais frequentemente implicados na ocorrência de resistência, destaca-se o *S. aureus*, devido a sua alta virulência e grande prevalência nas instituições de saúde, sendo que o elevado nível de resistência que estas cepas apresentam aos antimicrobianos disponíveis é caracterizado como problema grave com possíveis consequências fatais em âmbito mundial (HOLM *et al.*, 2021; MASUNARI; TAVARES, 2006). Ainda, com o advento da resistência bacteriana, o *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) adquiriu maior repercussão no que se refere à gravidade destes acometimentos para a saúde pública. Estima-se que cerca de 30% da população geral dos Estados Unidos seja colonizada por esta bactéria e 1,5% por MRSA, ilustrando a necessidade de desenvolver novos antimicrobianos que funcionem por mecanismos diferentes dos conhecidos para as drogas já disponíveis no mercado (ELSTON; BARLOW, 2009; GUIMARÃES; DA SILVA MOMESSO; PUPO, 2010; HOLM *et al.*, 2021)

O isolamento do agente bacteriano e o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos são estratégias importantes para o diagnóstico da infecção e a utilização do fármaco adequado. Os patógenos mais comuns detectados no laboratório que apresentam resistência bacteriana dentre os cocos gram-positivos são os *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus sp.* e, dentre os bacilos gram-negativos, são *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* complexo (MADIGAN; et. al., 2016).

Existem quatro grandes mecanismos conhecidos de resistência aos antimicrobianos que são: (a) a alteração da permeabilidade; (b) a alteração do local de ação; (c) a bomba de efluxo e (d) o mecanismo enzimático que altera a estrutura química do antibiótico.

a) Alteração da permeabilidade

A permeabilidade da membrana celular é essencial para que o antibiótico tenha o efeito desejado, quer seja bactericida ou bacteriostático (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012). Nas bactérias Gram negativas, a membrana interna é constituída por fosfolípidios e a membrana externa por lipídeos. A sua constituição confere uma lenta penetração do fármaco e a passagem pela membrana externa é realizada através das porinas, que formam canais hidrofílicos. A penetração na bactéria depende das características intrínsecas das moléculas de antibiótico. Desta forma os compostos hidrofílicos penetram através das porinas (DELCOUR, 2009). Neste tipo de resistência, a modificação da permeabilidade do antibiótico pode ser explicada devido às alterações estruturais, do número, da seletividade ou do tamanho das porinas, sendo que qualquer diminuição na função ou quantidade de porinas levará à resistência da bactéria ao antibiótico, baixando o nível do mesmo presente no interior da bactéria (DELCOUR, 2009).

b) Alteração do local de ação

Este tipo de resistência caracteriza-se pela diminuição ou mesmo ausência de afinidade do antibiótico ao local de ligação, isto pode ocorrer por alteração da estrutura do peptideoglicano, interferência na síntese de proteínas ou na síntese de DNA (RICE; BONOMO, 2005). Estas alterações são promovidas por modificação na funcionalidade de enzimas que atuam na síntese do peptideoglicano, proteínas ou DNA (DZIDIC; SUSKOVIC; KOS, 2008).

c) Bomba de efluxo

As bombas de efluxo são proteínas presentes nas membranas. Neste tipo de resistência ocorre um efluxo, ou seja, o transporte ativo dos antibióticos do meio intracelular para o meio extracelular, antes mesmo que eles desempenhem seus mecanismos de ação, como exemplo para este tipo de resistência, pode-se citar a *Pseudomonas aeruginosa* (DZIDIC; SUSKOVIC; KOS, 2008).

#### d) Mecanismo enzimático

O mecanismo enzimático de resistência ocorre devido a inativação do fármaco, que é resultante da produção, pela bactéria, de enzimas que degradam ou inativam o antibiótico. Existem três grandes estratégias: hidrólise; transferência de um grupo químico ou processo redox (DZIDIC; SUSKOVIC; KOS, 2008).

A busca de novos agentes antimicrobianos que sejam eficazes no tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes se baseia na descoberta de novos alvos e a potencialização de mecanismos que apresentam atividade antimicrobiana conhecida. Com o constante avanço na área de modificação molecular ao longo dos anos, esta alternativa se mostra altamente viável para o planejamento e desenvolvimento de fármacos. Além disso, é importante lembrar que este tipo de metodologia se mostra mais vantajosa tanto em termos de investimentos como em relação ao tempo de execução (MASUNARI; TAVARES, 2006; ZHANG *et al.*, 2021).

A obtenção de fármacos diretamente de fontes vegetais requer um grande volume de material vegetal para extração, o que além de oneroso é evitado por questões ambientais. Desta forma, com o progresso da química orgânica e das técnicas de análise estrutural de compostos químicos, vários fitocompostos puderam ser isolados, identificados e então preparados por síntese total em laboratórios especializados (PATRICK, 2004). Diferentes classes químicas de produtos naturais originaram diversos protótipos que deram e dão origem a muitos fármacos sintéticos, com distintas categorias terapêuticas (ABDEL-RAZEK *et al.*, 2020; BARREIRO, 2008; SULEIMAN *et al.*, 2020).

### 3.4 Alcalóides piperidínicos

Dentre as classes de alcaloides conhecidas, os monocíclicos, piperidínicos, derivados da piperidina, destacam-se devido as diversas atividades biológicas que exercem. Muitos alcaloides com o núcleo piperidínico são medicamentos como por exemplo: Paroxetina **8**



A piperidina é uma das estruturas mais comuns encontradas nos alcalóides naturais. Muitos produtos naturais derivados de piperidina, bem como as indolizidinas e quinolizidinas possuem propriedades biológicas de grande interesse científico e para a indústria farmacêutica. Notavelmente, na busca pela descoberta de novas drogas, milhares de compostos contendo piperidina foram inseridos em estudos clínicos e pré-clínicos (BUNSUPA; YAMAZAKI; SAITO, 2012, 2017; JANA; SARKAR; MORRIS, 2020; LIU *et al.*, 2020; YANG; HARDMAN, 2017).

De fato, o anel de piperidina foi relatado como o anel não aromático mais utilizado em drogas compostas por moléculas pequenas (JANA; SARKAR; MORRIS, 2020; LIU *et al.*, 2020; TAYLOR; MACCOSS; LAWSON, 2014). Sendo assim, diversas estratégias sintéticas foram previamente exploradas para a construção de compostos à base de piperidina. Esses estudos, em última análise, permitiram a avaliação biológica intensiva de moléculas contendo piperidina e produtos naturais bioativos. No entanto, apesar do progresso nas últimas décadas, abordagens eficientes e estereo-seletivas para a construção de piperidinas polifuncionais ainda estão em alta demanda na síntese orgânica (YANG; HARDMAN, 2017; AHMED *et al.*, 2012; CHANG *et al.*, 2011; PONPANDIAN; MUTHUSUBRAMANIAN, 2011; REMUSON; GELAS-MIALHE, 2008).

As piperidinas são descritas com ação no organismo em reações de degradação, como na clivagem de moléculas de DNA (AHMED *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2020). Também é reportado que piperidinas e seus derivados exercem potente e seletiva inibição sobre enzimas envolvidas na glicólise, sendo portanto, relacionadas a doenças como câncer, diabetes e infecções de forma geral (CHANG *et al.*, 2011; JANA; SARKAR; MORRIS, 2020).

Entre as várias classes estruturais provenientes destas piperidinas, as 2,6-cis-dialquilpiperidinas inicialmente isoladas de plantas, insetos e anfíbios e posteriormente sintetizadas em laboratório, demonstraram uma ampla gama de atividades biológicas (HARKISS; SUTHERLAND, 2018).

Yang; Hardman (2017) aplicaram novas estratégias, como reação do tipo Mannich, para a síntese de derivados de piperidina 2,6-di-substituídas, proporcionando uma abordagem eficiente para a síntese de piperidinas polifuncionais substituídas, e contribuindo para sínteses concisas e enantio seletivas de múltiplos alcalóides de piperidina.

Miles *et al.* (2011) produziram vários derivados do anel piperidínico para avaliação como antimicrobianos e observaram atividade significativa contra bactérias Gram-positivas

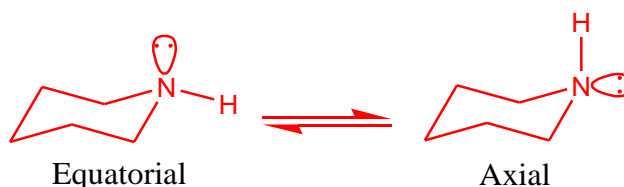
(*Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*) e Gram-negativas (*Haemophilus influenzae*). Segundo estes autores o mecanismo de ação destes derivados está diretamente relacionado a ligação a topoisomerasas, com modificação do DNA; portanto, podem ser vistos como novos antimicrobianos, possivelmente não propensos aos problemas de resistência existentes.

### 3.4.1 Piperidina

Piperidina (amina heterocíclica) é um anel de seis membros contendo cinco átomos de carbono e um átomo de nitrogênio (JANA; SARKAR; MORRIS, 2020; LIU *et al.*, 2020). Como já mencionado, várias piperidinas substituídas exibem propriedades de interesse farmacêutico, tais como: antibacteriana (ZHOU *et al.*, 2007), antimalárica (MISRA *et al.*, 2009), anti-inflamatória (HO; MICHAEL CRIDER; STABLES, 2001) e anti-hipertensiva (PETIT *et al.*, 1991); atuam também como agentes terapêuticos no tratamento de infecção por influenza (CHAND *et al.*, 2001) e metástases de câncer (GOSS *et al.*, 1995).

Quimicamente, a molécula de piperidina tem preferência pela conformação em cadeira, semelhante ao ciclohexano, podendo apresentar duas cadeiras de conformações distintas (Figura 10): uma com a ligação N-H em uma posição axial e outra em uma posição equatorial, sendo que as duas conformações se inter-convertem rapidamente através da inversão do nitrogênio, e a preferência do grupo NH é pela posição equatorial (BLACKBURNE; KATRITZKY; TAKEUCHI, 1975).

**Figura 10** - Piperidina representada em cadeira.

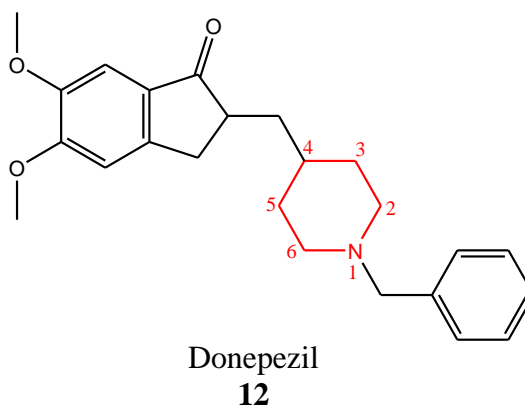


Segundo Carballeira; Pérez-Juste (1998) esta preferência pela posição equatorial no equilíbrio NH é devido, principalmente, a uma menor energia de Lewis, embora a deslocalização do par solitário de nitrogênio seja favorecida em formas NH axiais.

Muitos compostos que utilizam o andaime de piperidina entraram em ensaios pré-clínicos e clínicos nos últimos anos. Em particular, os andaimes de piperidina 1,4-

dissubstituídas possuem aplicações como fármacos, como é o caso do donepezil **12** (Figura 11), um inibidor da acetilcolinesterase utilizado no tratamento da doença de Alzheimer (BRAHMACHARI *et al.*, 2015).

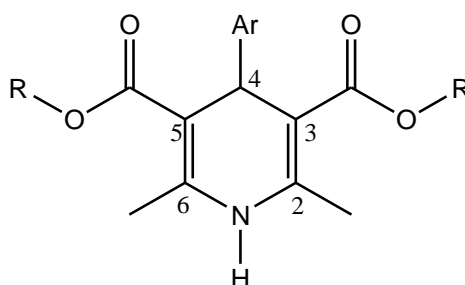
**Figura 11** - Estrutura do medicamento Donepezil.



### 3.5 Alcalóides piridínicos e quinolínicos

As di-hidropiridinas (DHPs) também pertencem à uma importante classe de heterociclos nitrogenados que apresentam um amplo espectro de perfis farmacológicos e clínicos, sendo representadas pelo grupo 1,4-di-hidropiridina, um farmacóforo com núcleo heterocíclico penta-substituído (NUNEZVERGARA *et al.*, 1996; RUCINS *et al.*, 2020) (Figura 12).

**Figura 12** - Estrutura geral de uma 1,4-Di-hidropiridina.



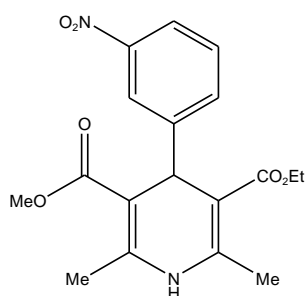
Nas 1,4-DHPs os substituintes incluem um anel lipofílico na posição 4, pequenos grupos alquílicos nas posições 2 e 6 e funções éster com cadeias de tamanhos variáveis nas posições 3 e 5. Existindo assim, dentro deste contexto uma ampla variedade de compostos



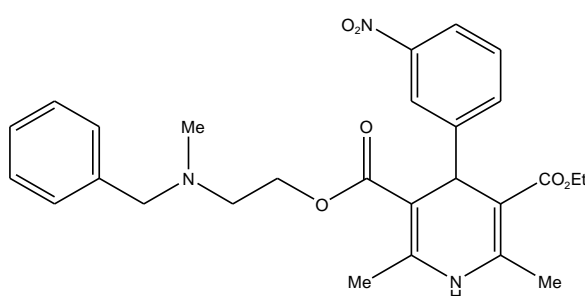
derivados da classe 1,4-DHPs, como por exemplo, aldeídos, aminas, cetoésteres e cetocetonas (RUCINS *et al.*, 2020; SWARNALATHA; PRASANTHI, 2011).

As DHPs e seus derivados estão presentes em fármacos disponíveis comercialmente, tais como a nitrendipina **13**, nicardipina **14**, amlodipina **15** e felodipina **16**, (Figura 13) que desempenham a função de bloqueadores de canais de cálcio, utilizados como agentes cardiovasculares para o tratamento de hipertensão (RUCINS *et al.*, 2020; SAINI; KUMAR; SANDHU, 2008).

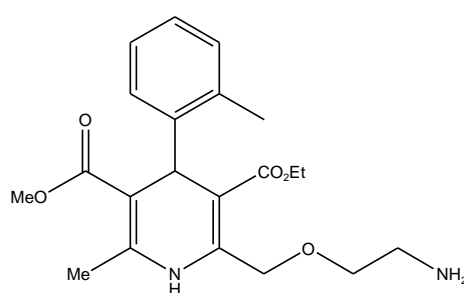
**Figura 13** - Fármacos disponíveis comercialmente, com núcleo DHP.



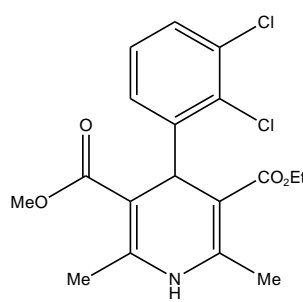
Nitrendipina  
**13**



Nicardipina  
**14**



Amlodipina  
**15**



Felodipina  
**16**

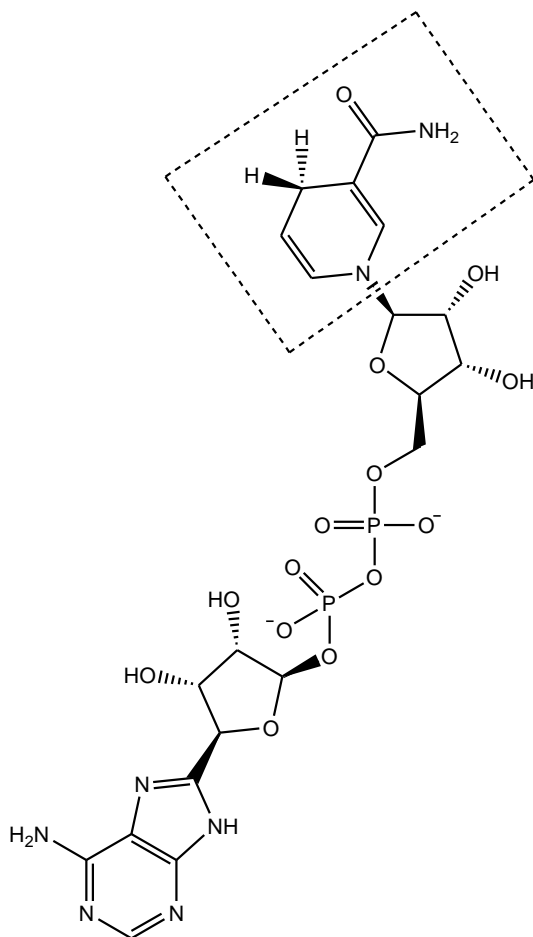
### DHPs biologicamente ativas

As 1,4-Di-hidropiridinas apresentam-se como um aliado no tratamento de câncer, pois além de corresponderem a uma classe importante de bloqueadores de canais de cálcio, também representam uma nova classe de reversores da multirresistência a drogas utilizadas no tratamento de doenças relacionadas à atividade destes canais (CHOVANCOVA *et al.*, 2020; KAWASE *et al.*, 2002; MIRI; MEHDIPOUR, 2008).

Em ensaios clínicos as DHPs comerciais apresentaram atividades farmacológicas, tais como anticâncer, anticoagulante, leishmanicida, anticonvulsivante, anti-hipertensiva, antimicrobiana, anti-tuberculostática, antioxidante, antiarrítmica, antimalárica e neuroprotetora (CHOVANCOVA *et al.*, 2020; EDRAKI *et al.*, 2009; KHEDKAR; AUTI, 2014; RUCINS *et al.*, 2020; SAINI; KUMAR; SANDHU, 2008).

Estas estruturas são compostos heterocíclicos nitrogenados de grande interesse por serem análogos ao NADH, coenzima responsável pela transferência de hidrogênio em rotas metabólicas dos seres vivos, pois é através do anel DHP, presente no NADH **17** (Figura 14), que ocorrem os processos redutivos em vários organismos vivos (KHEDKAR; AUTI, 2014; SAINI; KUMAR; SANDHU, 2008).

**Figura 14** - Estrutura química do NADH, destacando o anel DHP.



NADH  
17

Por isso, a partir da década de 1970 as 1,4-DHPs foram estabelecidas como fármacos de primeira linha para o tratamento de hipertensão devido ao seu promissor efeito depressor e baixa toxicidade celular, bem como suas funções terapêuticas no tratamento de uma variedade de doenças, tais como doenças cardiovasculares, câncer e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (RUCINS *et al.*, 2020; SHEN *et al.*, 2009).

Porém, apesar dessas drogas terem sido originalmente desenvolvidas para atuar como agentes cardiovasculares, vários derivados foram utilizados para aplicações médicas variadas, como exemplo, agente anti-iscêmico no tratamento de Alzheimer, para o tratamento da cardiomiopatia hipertrófica e Síndrome de Raynaud; para o tratamento de neuropatia diabética; como quimio-sensibilizadores com baixas propriedades hipotensoras; agentes vasodilatadores, broncodilatadores, hepatoprotetores, anti-aterosclerose e anticonvulsivante (CHOVANCOVA *et al.*, 2020; KO; YAO, 2006).

Outra classe de compostos que também são sintetizadas através do mesmo processo das DHPs são as polihidroquinolinas (PHQs) (NGUYEN; NGUYEN; TRAN, 2021; REDDY; RAGHU, 2008; SHARMA; SINGH; SINGH, 2021), derivados assimétricos das 1,4-dihidropiridinas, 1,3-dicetonas cíclicas, aldeídos, acetoacetato de etila e acetato de amônio (DAVOODNIA; KHASHI; TAVAKOLI-HOSEINI, 2013; NGUYEN; NGUYEN; TRAN, 2021; SHARMA; SINGH; SINGH, 2021).

Esta classe de compostos tem emergido como a mais importantes para o tratamento de doenças cardiovasculares, incluindo hipertensão. Em geral, estes compostos apresentam diferentes funções medicinais, atuando como neuroprotetores, antiagregantes plaquetários, agentes anti-isquêmicos cerebrais e potencializadores em quimioterapia, dentre outras (JOSHI; PAWAR, 2013; NGUYEN; NGUYEN; TRAN, 2021; SHARMA; SINGH; SINGH, 2021).

Assim, como as DHPs as PHQs também apresentam diversas atividades de interesse médico, como antioxidante (MONTES-AVILA *et al.*, 2012), anticâncer, anti-hiperglicêmica e anti-dislipidêmica (KUMAR, A. *et al.*, 2010).

Várias PHQs sintetizadas por Ladani *et al.* (2011) demonstraram atividade antimicrobiana, sendo mais efetivas contra fungos.

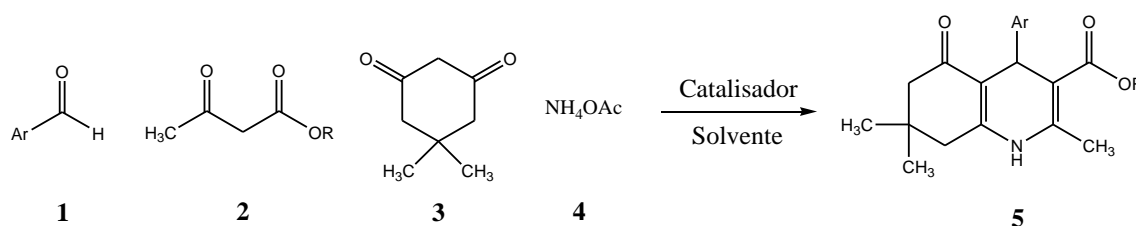
A família dos alcaloides quinolínicos é uma das mais estudadas farmacologicamente (SUÁREZ *et al.*, 2011), tendo sido descrita com ação antibacteriana (XIN HUANG, WEI LI, 2012), citotóxica e antimitótica, antiplaquetária, antimalária, anti-Leishmania e anti-Plasmodium, além de atuarem como protetores cardiovasculares (HAN *et al.*, 2007; ALBARICI *et al.*, 2010; OLIVA *et al.*, 2003).

Estudo recente desenvolvido por JAMALE *et al.*, 2019 demonstrou que derivados PHQs se demonstraram eficientes contra cepas causadoras de tuberculose em humanos.

Numerosos métodos foram relatados para a síntese de derivados de PHQs. O método clássico envolve o acoplamento de três componentes, sendo um aldeído com acetoacetato de etila e amônia em ácido acético ou em álcool sob refluxo. Pesquisadores têm desenvolvido métodos alternativos e mais eficientes, de maior rendimento, para a síntese de derivados de PHQs, no entanto, esses métodos apresentam desvantagens, como um longo tempo de reação, a necessidade de grandes volumes de solventes orgânicos, o uso de catalisadores prejudiciais ao meio ambiente e condições de refluxo severas (DEKAMIN *et al.*, 2018; KO; YAO, 2006; NGUYEN; NGUYEN; TRAN, 2021).

Atualmente, a via mais comum de síntese para as PHQs **5** envolve uma reação modificada de Hantzsch, onde há o acoplamento multicomponente de um aldeído **1** com um  $\beta$ -cetoéster (como acetato de etila) **2**, uma dicetona (como dimedona) **3** e acetato de amônio **4**, e a crescente busca por RMCs cada vez com menor utilização de solventes, ou mesmo de catalisadores, ou pelo menos algo que possa ser recuperado por reciclagem e esteja em acordo com a química verde (DEKAMIN *et al.*, 2018; NGUYEN; NGUYEN; TRAN, 2021; PAKDAMAN; ALLAMEH; SHAKER, 2018) (Figura 15).

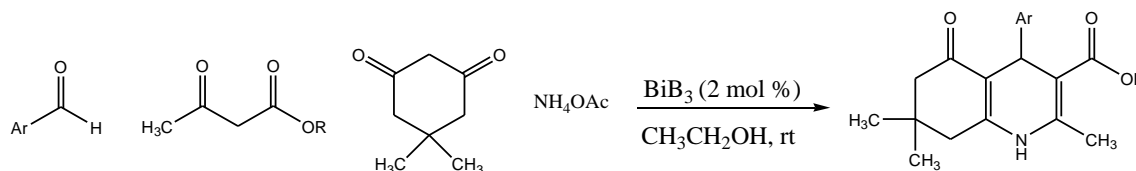
**Figura 15** - Síntese de derivados PHQs.



Yoo *et al.* (2015) realizaram a síntese de uma variedade de PHQs utilizando brometo de bismuto (III) como catalisador e etanol como solvente (Figura 16). As reações são rápidas e o produto é isolado por filtração, não havendo a geração de fluxo de resíduos aquosos.

Os autores constataram também que na ausência de BiBr<sub>3</sub>, as reações levaram um tempo consideravelmente maior para ocorrerem, com rendimentos mais baixos, sendo seu uso recomendado devido a sua natureza notavelmente não tóxica e a facilidade de manuseio. Em suma, trata-se de um método suave e eficiente para a síntese multicomponente de PHQs.

**Figura 16** - Síntese de PHQs catalisadas por BiBr<sub>3</sub>.



Paidepala *et al.* (2014) também sintetizaram uma série de derivados de PHQs e estes mostraram-se citotóxicos *in vitro* sobre as linhagens de células cancerosas MCF-7-adenocarcinoma de mama humano, HeLa- cancro de colo do útero humano e SK-N-SH-neuroblastoma humano.

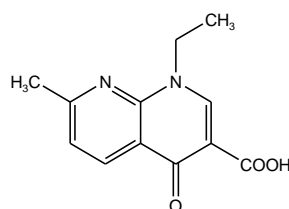
### 3.6 Derivados quinolônicos e seu uso como antibióticos

O interesse pela síntese de quinolonas é crescente, visto que o anel característico está presente em uma gama de compostos de origem natural, devido à sua estrutura simples e associada a diversas atividades biológicas e à possibilidade de sintetizá-las através de compostos disponíveis comercialmente (ARAYNE *et al.*, 2011; WUBE *et al.*, 2011).

Segundo Michael (2008), alguns alcalóides derivados da quinolona, como os alcalóides 2-alkilquinolin-4(1H)-onas isolados dos frutos verdes da planta chinesa *Evodia rutaecarpa* exibiram atividade antimicrobiana promissora em testes *in vitro* com *Mycobacterium fortuitum*, *M. smegmatis* e *M. phlei*.

O desenvolvimento sintético das quinolonas iniciou-se na década de 1960 por meio da descoberta acidental do ácido nalidíxico **18** (Figura 17), um produto secundário da síntese do fármaco antimalárico Cloroquina. A partir disto deu-se início ao estudo desta classe de compostos, levando a excelentes resultados de sua utilização farmacológica (ANDRIOLE, 2005).

**Figura 17** - Estrutura do ácido nalidíxico.



Ácido nalidíxico  
**18**

Atualmente, seus derivados, como as quinolin-4(1H)-onas constituem uma das mais importantes classes de heterocíclicos (SAALIM; VILLEGAS-MORENO; CLARK, 2020), sendo responsáveis também por atividades biológicas como antiviral, anti-inflamatória, antitumoral, ansiolítica e anti-isquêmica (MUGNAINI *et al.*, 2011), antibacteriana e antiparasitária (BETECK *et al.*, 2021).

A família dos alcaloides quinolônicos é uma das mais estudadas devido às suas variadas propriedades farmacológicas (SUÁREZ *et al.*, 2011). Podendo desenvolver funções das mais diversas, como atividade antibacteriana (BETECK *et al.*, 2021; XIN HUANG, WEI

LI, 2012), citotóxica com ação antimitótica, antiplaquetária e antimalárica, além de atuarem como protetores cardiovasculares (HAN *et al.*, 2007), são também de grande interesse no combate de protozoários causadores de doenças como a Leishmaniose e a Doença de Chagas (ALBARICI *et al.*, 2010; OLIVA *et al.*, 2003).

Essa classe de compostos representa uma das maiores classes de agentes antimicrobianos que são prescritos para tratamento de infecções urinárias, respiratórias, gastrointestinais, ginecológicas, algumas infecções da pele e ossos, além de doenças sexualmente transmissíveis (MAGUIÑA-VARGAS, C. SOLARI-ZERPA, 2002).

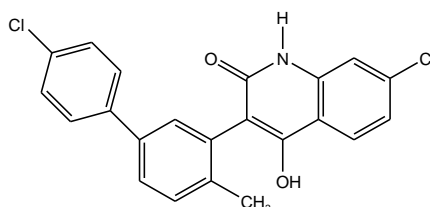
A grande maioria dos derivados quinolônicos existentes no mercado é de origem sintética, e essa classe de compostos tem sido um alvo bastante atrativo devido à diversidade estrutural e às suas inúmeras propriedades biológicas (MITSCHER, 2005).

As quinolonas, estruturalmente, são moléculas derivadas do heterobicycloquinolina, estando distribuídas na natureza como produto do metabolismo secundário de várias espécies de plantas e fungos, principalmente em espécies da família Rutaceae (SAALIM; VILLEGAS-MORENO; CLARK, 2020; SUÁREZ *et al.*, 2011). Sendo que dessa família têm sido isolados diversos derivados do tipo quinolona com atividade analgésica, amebicida, antiviral, herbicida e fungicida (COY; SUAREZ, 2007). Ensaio farmacológico com esta planta comprovaram seu efeito como anti-helmíntica, febrífuga e abortiva (LORENZI, 2007).

As quinolonas também são conhecidas pela sua ampla utilização em tratamentos clínicos como no combate às infecções respiratórias, gastrointestinais e ginecológicas, doenças sexualmente transmissíveis, osteomielites crônicas, além de outras infecções que acometem a próstata, ossos e pele (ALMEIDA; SILVA; CAVALEIRO, 2010). Há relatos também de atividades como anticâncer, antibacteriana, anti-hipertensiva e estimulante do sistema cardíaco (ZHAO *et al.*, 2010).

A empresa Bayer Crop science AG, em 2003 patenteou a síntese da 4-hidroxiquinolona **19** (Figura 18), que apresenta atividade nematicida, herbicida, inseticida e fungicida (FISCHER *et al.*, 2003).

**Figura 18** - Estrutura da 4-hidroxiquinolona.



4-Hidroxiquinolona  
**19**

A funcionalidade química do núcleo quinolônico é bastante atrativa, e já resultou no desenvolvimento de várias quinolonas substituídas com melhores propriedades farmacocinéticas (EMAMI; SHAFIEE; FOROUMADI, 2010; SAALIM; VILLEGAS-MORENO; CLARK, 2020).

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho é sintetizar derivados de compostos N-heterocíclicos, inéditos, com ações farmacológicas de interesse médico, sendo principalmente avaliadas, *in vitro*, as ações antimicrobianas sobre patógenos que causam infecções e doenças em humanos.

## 4 MATERIAL E METODOS

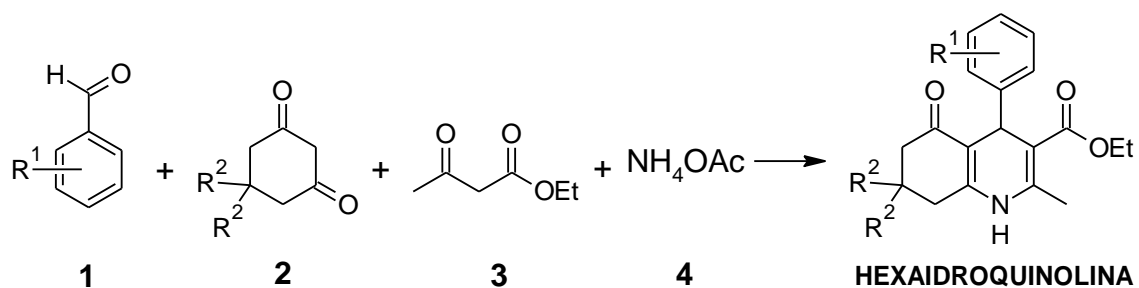
### 4.1. Plano de síntese

#### 4.1.1 Síntese dos derivados hexaidroquinolínicos

Todos os derivados hexaidroquinolínicos foram sintetizados através da mesma metodologia (SAINI; KUMAR; SANDHU, 2008). Uma mistura do aldeído **1** (2 mmol), dimedone **2** (2 mmol) [ou 5,5-dimetilcicloexa-1,3-diona – 2 mmol], acetoacetato de etila **3** (2 mmol) e acetato de amônio **4** (3 mmol) (figura 19), foram macerados em graal e pistilo até o término da reação, de acordo com dados coletados na literatura – (10 a 40 minutos). O material resultante foi lavado com água para remover qualquer resíduo de acetato de amônio não reagido e então seco à temperatura ambiente. O material seco obtido foi recristalizado com etanol e então caracterizado por RMN e espectroscopia no infravermelho.



**Figura 19** – Esquema reacional da síntese multicomponente para obtenção dos derivados hexahidroquinolínicos.



Foram obtidos seis (6) derivados hexaidroquinolínicos de acordo com a variação dos grupamentos  $-R^1$  e  $-R^2$  nos reagentes benzaldeído **1** e **2** [dimedone ou 5,5-dimetilcicloexano-1,3-diona].

**Tabela 1** – Hexahidroquinolinas que foram obtidas a partir da variação dos grupamentos  $-R^1$  e  $-R^2$  nos reagentes 1 e 2.

Síntese	-R	Produto	Síntese	-R	Produto
1 <sup>a</sup>	$-R^1 = 4\text{-OH}$  $-R^2 = \text{-CH}_3$		4 <sup>a</sup>	$-R^1 = 2\text{-Cl}$  $-R^2 = \text{-H}$	
2 <sup>a</sup>	$-R^1 = 4\text{-OH}$  $-R^2 = \text{-H}$		5 <sup>a</sup>	$-R^1 = 4\text{-H}$  $-R^2 = \text{-CH}_3$	
3 <sup>a</sup>	$-R^1 = 2\text{-Cl}$  $-R^2 = \text{-CH}_3$		6 <sup>a</sup>	$-R^1 = 4\text{-H}$  $-R^2 = \text{-H}$	

**ARTIGO 1****Synthesis of the polyhydroquinoline derivative 4-(2-chloro-phenyl)-2,7,7-trimethyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester: antimicrobial and enzyme modulator**

Gustavo Henrique Andrade Machado<sup>1</sup>, Marcus Vinicius Cardoso Trento<sup>1</sup>, Juliana Junqueira Pinelli<sup>2</sup>, Roberta Hilsdorf Piccoli<sup>2</sup>, Sergio Scherrer Thomasi<sup>1</sup>, Silvana Marcussi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry. Universidade Federal de Lavras (UFLA), Campus Universitário, Lavras, MG, Brazil, PO Box 3037, Zip code 37200-900, Phone no. +55(35)3829-1893.

<sup>2</sup>Department of Food Sciences. Universidade Federal de Lavras (UFLA), Campus Universitário, Lavras, MG, Brazil, Zip code 37200-900.

**Corresponding author:** Dr. Gustavo Henrique Andrade Machado. Department of Chemistry, Biochemistry Laboratory. Universidade Federal de Lavras (UFLA), Campus Universitário, Lavras, MG, Brazil, PO Box 3037, Zip Code 37200-900, phone no. +55(35)3829-1893. andradegh@gmail.com

## **ABSTRACT**

Multicomponent reactions are extremely relevant in green chemistry. They offer better conditions than traditional synthesis and are, therefore, used for many organic modifications. Recently, the synthesis of polyhydroquinolines has received much attention for its high pharmacological potential. In the present study, a polyhydroquinoline derivative was synthesized without the use of catalysts or solvents. The results of nuclear magnetic resonance and infrared spectroscopy demonstrated that the molecule was successfully synthesized. The molecule presents significant results of antimicrobial activity for the bacteria tested in the serial dilution method. It also increased the clotting time by 25.66 seconds for the highest dose and 12.66 seconds for the other doses tested. Prior incubation with the dose of 125 mg reduced the thrombolytic activity to 73%. The 125, 100, and 50 mg doses previously incubated with *Bothrops moojeni* venom inhibited approximately 30% of the phospholipase activity. The molecule was also able to reduce the cytotoxicity induced by proteases significantly. In conclusion, the molecule presents several biological properties, which highlights its pharmaceutical potential.

**Keywords:** Multicomponent reactions, Chemical Characterization, Green Chemistry, Biological activities, anti-inflammatory, anticoagulant.

## 1. INTRODUCTION

Green chemistry is based on environmental factors and arose from a natural need to adapt previously performed techniques. In order to develop environmentally-friendly strategies that minimize waste production and avoid the use of hazardous chemicals, green chemistry has been used in the pharmaceutical, food, and chemical industries (NAVEENKUMAR; BASKAR, 2021; OUTILI *et al.*, 2020).

Multicomponent reaction (MCR) corresponds to convergent reactions in which three or more starting materials react in a single step to form a product. In discovering and developing new drugs, MCRs offer several advantages over traditional synthesis, such as shorter experimentation time, fewer laboratory techniques and solvents used, and the generation of smaller amounts of waste (PINTO *et al.*, 2021). Thus, the multicomponent reaction method is in accordance with the principles of green chemistry.

Numerous methods have been reported for the synthesis of polyhydroquinoline derivatives (PHQs). The classical method involves coupling three components under reflux: aldehyde, ethyl acetoacetate, and ammonium acetate in acetic acid or alcohol. However, new techniques to obtain these derivatives have been developed and studied. Said methods seek greater efficiency and yield, using reagents that can be recycled and are less toxic (DEKAMIN *et al.*, 2018; NGUYEN; NGUYEN; TRAN, 2021).

PHQs has emerged as one of the most important compounds for the treatment of cardiovascular diseases (e.g., hypertension). These compounds have different medicinal functions, including neuroprotection, platelet aggregation inhibitor, antimicrobial, anti-ischemic agent, and potentiators in chemotherapy (NGUYEN; NGUYEN; TRAN, 2021; SHARMA; SINGH; SINGH, 2021).

Therefore, the objective in the present work was to carry out the multicomponent reaction of a PHQ derivative and perform its structural characterization using the Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C- nuclear magnetic resonance (NMR).

In addition, the biological activities exerted by the synthesized compound were also evaluated (antimicrobial activity and modulatory potential on enzymes that act in hemostatic and inflammatory processes).

## **2. MATERIAL AND METHODS**

### **2.1. Characterization by Nuclear Magnetic Resonance (NMR)**

The NMR spectra were obtained at the Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) using a Bruker Avance III – 14.1 Tesla (600.23 MHz for  $^1\text{H}$  frequency) with an Ultrashield Plus® magnet. The spectrometer is equipped with a 5 mm TCI (Triple Resonance Inverse) CryoProbe -  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  nuclei- and cold preamplifiers (temperature at approximately 77K). The probe has a Z-Gradient (53G/cm) and an Automatic Tuning and Matching accessory (ATMA).

### **2.2. Attenuated Total Reflection- Fourier transform infrared (FTIR/ATR) spectroscopy**

The ATR infrared spectra were obtained using a Varian equipment coupled to a diamond ATR accessory (GladiATR - PIKE Technologies), with a spectral range of 4000 to 400  $\text{cm}^{-1}$  and resolution of 2000 to 4  $\text{cm}^{-1}$ .

The analysis of the functional groups in the synthesized molecule was performed by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The IR absorption spectra were obtained with KBr pellets, where 2.0 mg of the sample was added into 200.0 mg of KBr. The analyses were performed at the Chemical Analysis and Prospection Center (CAPQ), located at the Department of Chemistry/UFLA.

### **2.3. Evaluation of the Antimicrobial Activity**

The antimicrobial activity of the molecule 4-(2-chloro-phenyl)-2,7,7-trimethyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester was evaluated by susceptibility testing using the agar diffusion method (antibiogram) and pour-plate technique with serial dilution (broth microdilution), according to the recommendations of the CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI, 2018).

### 2.3.1. Obtaining the microorganisms and inoculum

The microorganisms used were *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, which were obtained from Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil. These strains were chosen because of their presence in wounds and interference in the healing process. The stock cultures were stored in a cell freezing medium (glycerol: 15 mL; peptone, bacteriological: 0.5 g; yeast extract: 0.3 g; NaCl: 0.5 g; distilled water: 100 mL) and kept frozen during the experiment. The reactivation of the strains was performed under aerobic conditions by inoculating 100  $\mu$ L of the culture into tubes containing 10 mL of Brain Heart Infusion (BHI) broth for 24h at 37°C. The inoculum was standardized (McFarland standards) to a cell density corresponding to  $10^8$  CFU/mL.

### 2.3.2. Antimicrobial testing

For the antibiogram, aliquots of the *S. aureus* and *P. aeruginosa* cultures were spread on Petri dishes containing Trypticase Soy Agar (TSA). Disks with the molecule 4-(2-chlorophenyl)-2,7,7-trimethyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester in the doses of 500 mg, 250 mg, 125 mg, and 100 mg were added to the medium. The dishes were incubated at 37 °C for 24h. After that period, inhibition halos were measured around the disks. The antibiotic Chloramphenicol (CLSI, 2018) was used as a positive control (30  $\mu$ g).

A solution containing 500 mg of the compound diluted in 1 mL DMSO was used for broth microdilution. 500  $\mu$ L of this solution were incubated with 500  $\mu$ L of BHI broth for 48 hours (stock solution), obtaining a final dose of 250 mg. The cell count was performed three times: 0 hours (preparation of the incubation), 24 hours, and 48 hours. Dilutions (900  $\mu$ L of distilled water for each 100  $\mu$ L of the stock solution) were performed in Eppendorf tubes to count the viable cells. Petri dishes containing TSA were incubated at 37°C for 24h with *S. aureus* and 37°C for 48h with *P. aeruginosa*. The spread plate technique was performed at 0, 24, and 48 hours, with serial dilutions to obtain an adequate number of colonies (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - CLSI, 2018). *S. aureus* or *P. aeruginosa* in 1000  $\mu$ L of BHI were used as positive controls, which were performed at 0, 24, and 48 hours.

Both tests and all doses were evaluated in triplicate.

## 2.4. Obtaining human biological material

Experimental protocols (coagulation, cytotoxicity on erythrocytes, and thrombolytic) that require the collection and use of human blood were previously approved by the Committee for Ethics in Research on Human Beings (COEP) of the Universidade Federal de Lavras (registration number: 10991019.4.0000.5148/ 3.288.976).

The volunteers (between 18 and 35 years old) were non-smokers and declared that they did not use prescription medication, nor did they work under chemical or biological risk conditions.

## **2.5. Effects on the coagulation of citrated human plasma**

The coagulation activity was evaluated following the methodology described by MOURAO *et al.* (1996). Human plasma was collected on a citrate tube (200  $\mu$ L) and stabilized at 37°C. Treatments were added to the tube, and the time until the formation of a rigid clot was measured. The potential to inhibit coagulation was evaluated by adding different doses of the compound to the citrated plasma and incubating them for 10 minutes. After that, 40 $\mu$ g of *Bothrops moojeni* venom was added to the tube, and the clotting time was measured. This experiment allows the observation of possible interactions between the compound and proteins of the coagulation cascade.

In addition, the assay was also performed by incubating the compound at different doses with the venom and only then adding citrated plasma. The results obtained allow the observation of possible interactions between the compound and serine proteases present in the venom.

All treatments were evaluated in triplicates.

## **2.6. Effects on human blood thrombi and venom-induced thrombolytic activity**

The thrombolytic activity was evaluated on blood clots formed *in vitro*, according to the methodology described by CINTRA *et al.* (2012). Thrombi were obtained by applying 100  $\mu$ L of freshly collected blood (without anticoagulant) into the wells of a 96-well microplate. The treatments were added to the thrombi in triplicates, and then the microplates remained in a cell culture chamber for 24 hours at 36°C. The results were evaluated by measuring the volume of liquids released by the thrombi. The compound was evaluated at different doses. The same doses were also previously incubated with *Bothrops moojeni*



(20 $\mu$ g) venom for 30 minutes at 37°C to assess their activity on thrombolytic proteases. 30  $\mu$ L of phosphate-buffered saline (PBS) was used as the negative control, which corresponds to the same volume as the treatments. *Bothrops moojeni* (20 $\mu$ g) was used as the positive control. The results were converted into percentages, and the positive control was considered as 100% of activity.

### **2.7. Effects on the activity of phospholipases A<sub>2</sub>**

The phospholipase activity was evaluated according to the methodology described by GUTIÉRREZ *et al.* (1988), with few adaptations. A medium was formed with 0.01 mol L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, egg yolk phospholipids (phosphatidylcholine, phosphatidylserine, and phosphatidylethanolamine), 0.005% sodium azide (to prevent the growth of microorganisms in the medium), and 1% bacteriological agar dissolved in PBS (pH 7.2). The medium was poured into Petri dishes, and after solidification, the samples were applied to holes made in the gel (~ 0.5 cm diameter). The dishes were kept in a cell culture chamber at 36°C for 18 hours, and the activity was evaluated by measuring the translucent halo formed around the hole (in millimeters - mm). The anti-inflammatory potential of the compound was evaluated by observing its effects on the activity of phospholipases A<sub>2</sub> present in *Bothrops moojeni* venom. Thus, the compound was previously incubated in different doses with the venom (20 $\mu$ g), for 30 minutes at 37°C, with subsequent evaluation of the phospholipase activity. Positive controls were performed using only the venom. All treatments were evaluated in triplicates.

### **2.8. Cytotoxic activity on human erythrocytes**

This activity was evaluated using a solid medium, as previously described by Gutiérrez *et al.* (1988). However, the phospholipids were replaced by human erythrocytes. The blood collected in tubes containing heparin was immediately centrifuged, and the supernatant discarded. 10 mL of PBS was added to the erythrocytes, which were washed twice more in PBS with centrifugations at 1200 g for 10 minutes. The obtained erythrocytes concentrate (1:3 v v<sup>-1</sup> in PBS) was used to compose the gel, which also included 0.01 mol L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 0.005% sodium azide, and 1% bacteriological agar dissolved in PBS (pH 7.2). After solidification, the treatments were applied to ~0.5 cm diameter holes made in the gel. The Petri dishes were kept in a cell culture chamber at 36°C for 18 hours. The formation of a translucent halo around the hole characterizes hemolysis, which was measured (millimeters)

with a caliper. The compound was evaluated in different doses to observe if it induced erythrocyte lysis. Then, to verify its anti-cytotoxic potential, the compound was evaluated after pre-incubation with *B. moojeni* venom (20 µg) for 30 minutes at 36°C. *B. moojeni* venom was used as a positive control. All treatments were evaluated in triplicates.

## 2.9. Statistical Analysis

The data obtained were submitted to the Shapiro-Wilk test at a 5% significance level to verify their normality. Dunnett's test was performed for the data that had a normal distribution. A normalization attempt was made using the RANK procedure (PROC RANK) on the data that did not show a normal distribution. Non-normalized data were compared by the Kruskal-Wallis test at a 5% significance level. The statistical software used was SAS (version 9.0).

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

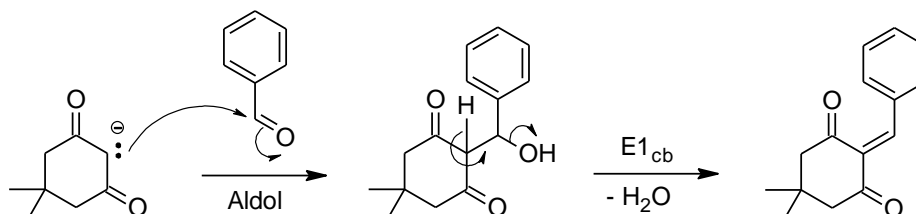
### 3.1. Synthesis and Structural Characterization

The hexahydroquinoline derivative was synthesized according to the methodology described by Kumar *et al.* (2008), which did not use catalysts and solvents. The following reagents were used in the reaction (Figure 1): 5,5- dimethyl -1,3-cyclohexanedione (2 mmol), 2-chlorobenzaldehyde (2mmol), ethyl acetoacetate (2 mmol), and ammonium acetate (3 mmol).

The mechanism of the general reaction for obtaining PHQs derivatives (MATADA; YERNALE, 2021) begins with the removal of an  $\alpha$ -hydrogen from dimedone by a base, forming an enolate ion that has an area of a high concentration negative charge on the  $\alpha$ -carbon. This compound is stabilized by the resonance between the electron pairs and the carbonyl groups bonded to the carbon. These electrons on the  $\alpha$ -carbon are the ones that attack the carbon of the carbonyl group of benzaldehyde, which has a positive charge density because of the inductive effect caused by the oxygen. The oxygen on the carbonyl group acquires a negative charge after the nucleophilic attack since it breaks one of its bonds with the carbon that was attacked. The carbon captures a hydrogen from the reaction components and forms a secondary alcohol to stabilize this excess negative charge.

The compound still has another  $\alpha$ -hydrogen that can be removed by the base present in the reaction. The electron pair that formed the C-C bond now forms a C=C double bond, eliminating the hydroxyl group. Although the -OH group is an unfavorable leaving group, its elimination in this synthesis step is justified by the high stability of the product formed - an

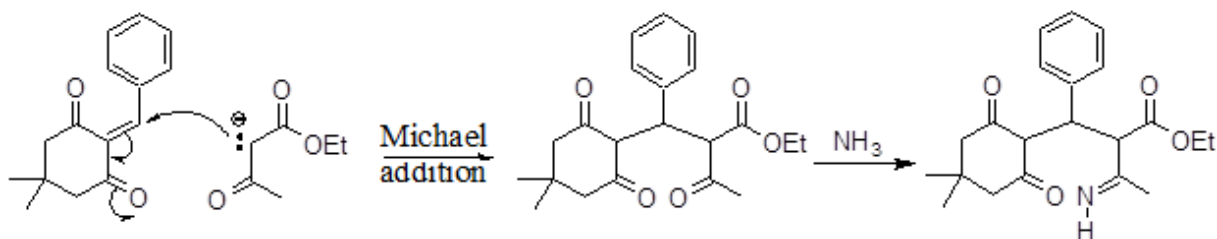
$\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated carbonyl compound. The electrons of the new double bond can perform resonance with both the carbonyl groups and the aromatic ring (PERRIN; CHANG, 2016; WARREN, STUART; WYATT, 2009) observed in Figure 1.



**Figure 1.** Aldol condensation between dimedone and benzaldehyde.

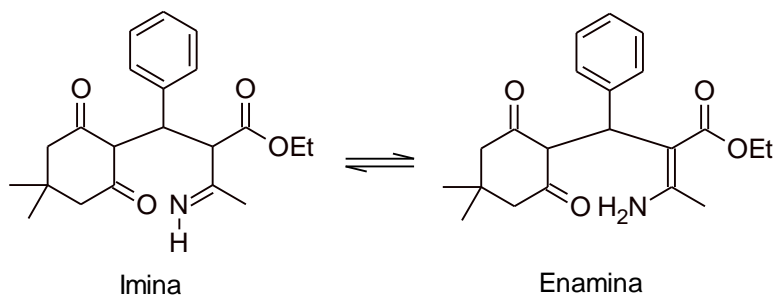
Since the electrons of the double bond can perform resonance with the carbonyl groups, the  $\beta$ -carbon gets a positive charge density and becomes an electrophilic center. Another enolate ion, formed from ethyl acetoacetate, reacts with the compound previously formed by a Michael addition. After the attack, the oxygen in the dimedone acquires a negative charge that is stabilized by capturing hydrogen and forming a  $-OH$ . However, the  $C=O$  double bond is repaired by tautomerism, and the negative charge passes to the neighboring carbon, which is stabilized by a hydrogen bond. This compound then reacts with ammonia to form an imine.

The mechanism begins with the protonation of the carbonyl group. Consequently, the inductive effect caused by the now positively charged oxygen increases, enabling the attack of the ammonia electron pairs on the carbon of the protonated carbonyl group. After the charges are stabilized, amino alcohol is formed. Then, the nitrogen can make a  $C=N$  double bond and force out the  $-OH$  group in the form of water, carrying one of its hydrogens and finally forming imine (WARREN, STUART; WYATT, 2009), as per Figure 2.



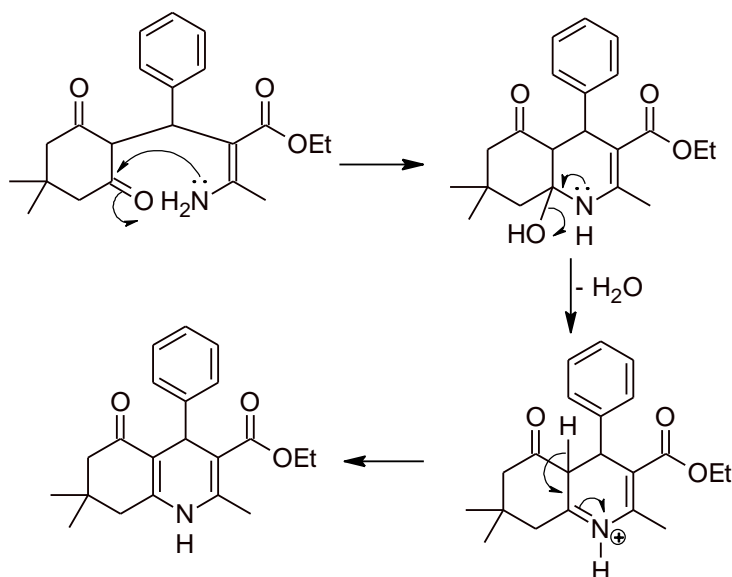
**Figure 2.** Michael addition between ethyl acetoacetate and the product of the aldol condensation, followed by imine formation.

The imine can still tautomerize and get into equilibrium with an enamine. Due to the inductive effect, the carbon bonded to the ester's carbonyl group and imine has an excessive acidity. Therefore, it can be removed by a base from the reaction, which forms the double bond of the enamine. The electrons of the C=N double bond are concentrated on the nitrogen, which stabilizes this charge by bonding to hydrogen (WARREN, STUART; WYATT, 2009), as shown in Figure 3.



**Figure 3.** Chemical equilibrium between imine and enamine.

Due to their proximity, the free electrons of the nitrogen can attack the carbon of the carbonyl group of dimedone. This attack breaks the C=O double bond and places the electrons on the oxygen, which is stabilized by a proton transfer with one of the hydrogens of the amine, forming a hydroxyl group. Afterwards, nitrogen's lone pair can form a double bond by removing the hydroxyl group, which leaves a positive charge. This charge is stabilized by forming a double bond in the central ring with the removal of hydrogen. Once more, removing the hydroxyl group is favorable because of the possibility of resonance in the double bond formed (WARREN, STUART; WYATT, 2009). This final step for the synthesis of hexahydroquinoline is demonstrated in Figure 4.



**Figure 4.** The final step in the mechanism for the hexahydroquinoline synthesis.

$^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR and IR were performed to characterize the derivative, which used 2-chlorobenzaldehyde as the aromatic aldehyde. In this case, a chlorine atom is expected to be connected in an ortho position in relation to the nitrogen ring. The  $^1\text{H}$ -NMR spectrum shows resonances in  $\delta_{\text{H}}$  5.38 (H4, 1H, *s*), 4.04 (H12, 2H, *q*,  $^3J_{\text{H12-H13}} = 7.0$  Hz), 2.33-2.09 (H7 and H9, 4H, *m*), 2.30 (H1, 3H, *s*), 1.17 (H13, 3H, *t*,  $^3J_{\text{H13-H12}} = 7.0$  Hz), 1.06 (H8', 3H, *s*), and 0.94 (H8'', 3H, *s*), which is expected for this class of molecule. In the olefinic and aromatic region, four well-separated and defined multiplets that integrate to 4 hydrogen atoms confirm the presence of a disubstituted aromatic ring:  $\delta_{\text{H}}$  7.40-7.38 (H19, 1H, *m*), 7.27-7.22 (H16, 1H, *m*), 7.13-7.11 (H17, 1H, *m*), and 7.04-7.01 (H18, 1H, *m*) ppm.

It is possible to identify the  $\delta_{\text{C}}$  133.2 (C15) ppm signal in the  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum, which is compatible with the  $sp^2$  hybridized carbon of the aromatic ring connected directly to a chlorine atom. The  $\delta_{\text{C}}$  143.6 (C14) ppm signal is also observed, according to the non-hydrogenated  $sp^2$  hybridized carbon of the aromatic ring neighboring the chlorinated carbon. The C16, C17, C18, and C19 carbons have their resonance in  $\delta_{\text{C}}$  132.1, 129.6, 126.2, and 127.2, respectively. The other peaks observed also corroborate to the structural characterization:  $\delta_{\text{C}}$  195.3 (C6), 167.4 (C11), 148.89 (C2), 111.1 (C5), 105.3 (C3), 59.8 (C12), 50.6 (C7), 41.1 (C9), 36.0 (C4), 32.5 (C8), 29.3 (C8'), 27.2 (C8''), 19.2 (C1), and 14.2 (C13) ppm.

Stretches were observed in the infrared (IR) spectrum of the synthesized compound: primary amine N-H stretch in  $3296\text{ cm}^{-1}$ ,  $\text{C}_{sp^2}\text{-H}$  stretch in  $3068\text{ cm}^{-1}$ ,  $\text{C}_{sp^3}\text{-H}$  stretch in  $2954$

and 2931  $\text{cm}^{-1}$ , ester C=O stretch in 1613  $\text{cm}^{-1}$  (more weakly bonded carbonyl group due to resonance), ketone C=O stretch in 1696  $\text{cm}^{-1}$ , aromatic C=C stretch in 1485  $\text{cm}^{-1}$ , and asymmetrical stretch of C-O-C (ester) in 1207 and 1068  $\text{cm}^{-1}$ . The band in 772  $\text{cm}^{-1}$  probably refers to the stretching of the C-Cl bond.

### 3.2. Biological Activities

#### Antimicrobial activity

No halos were formed in the antibiogram (agar diffusion test), which may be a result of the compound's inability to diffuse into the solid culture medium. However, when evaluated by the pour-plate technique with serial dilution (broth microdilution) in a liquid medium, the compound showed significant antimicrobial activity for both *S. aureus* and *P. aeruginosa*, as seen in Tables 1 and 2.

Antimicrobial activity					
Time (h)	(Colony Forming Units, CFU)				
	Control	Compound	CV (%)	P-value	
*	0	5.12	5.27	3.91	0.624
*	24	11.99	4.04	54.59	0.033
*	48	16.92	0.00	109.62	0.011

**Table 1.** Effect of the compound 4-(2-chloro-phenyl)-2,7,7-trimethyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester and positive control on the viability and replication of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. CV (%): Coefficient of Variation. P-value less than 0.05 is statistically significant. \* Data have a normal distribution.

Antimicrobial activity					
Time (h)	(Colony Forming Units, CFU)				
	Control	Compound	CV (%)	P-value	
*	0	4.67	4.75	3.31	0.574
*	24	12.31	0.00	109.55	0.011
*	48	18.41	0.00	109.70	0.011

**Table 2.** Effect of the compound 4-(2-chloro-phenyl)-2,7,7-trimethyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester and positive control on the viability and

replication of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. CV (%): Coefficient of Variation. P-value less than 0.05 is statistically significant. \* Data have a normal distribution.

As observed in the tables above, there is no significant difference at time zero for both bacteria. Since the Petri dishes containing TSA are incubated exactly when the dilutions are performed (time zero), there is not enough time for the bacteria to interact with the synthesized molecule. However, when they are incubated after 24 and 48 hours with the treatment, significant inhibitory results are observed for both *S. aureus* and *P. aeruginosa*.

*S. aureus* has a decrease in the CFU number after 24h in the presence of the compound. After 48h, there are no more colonies grown. A total absence of colony growth was observed after 24h of treatment in *P. aeruginosa*, and the same results are observed after 48h. Therefore, the molecule 4-(2-chloro-phenyl)-2,7,7-trimethyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester shows antimicrobial activity for both the Gram-positive and Gram-negative bacteria evaluated. These are promising data, considering the relevance and necessity of developing new drugs with broad-spectrum antimicrobial activity.

The synthesized molecule proves to be more efficient against Gram-negative bacteria, which are more challenging to treat (JUBEH; BREIJYEH; KARAMAN, 2020). Thus, it is essential to study the class of polyhydroquinolines and their various biological activities.

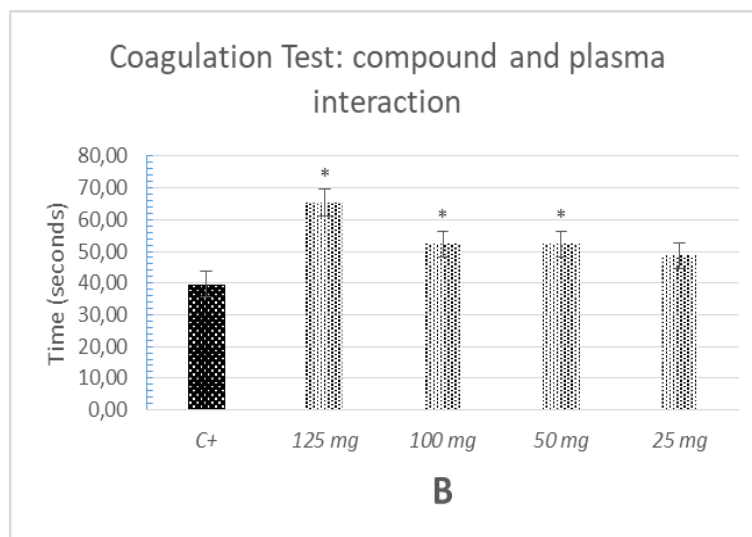
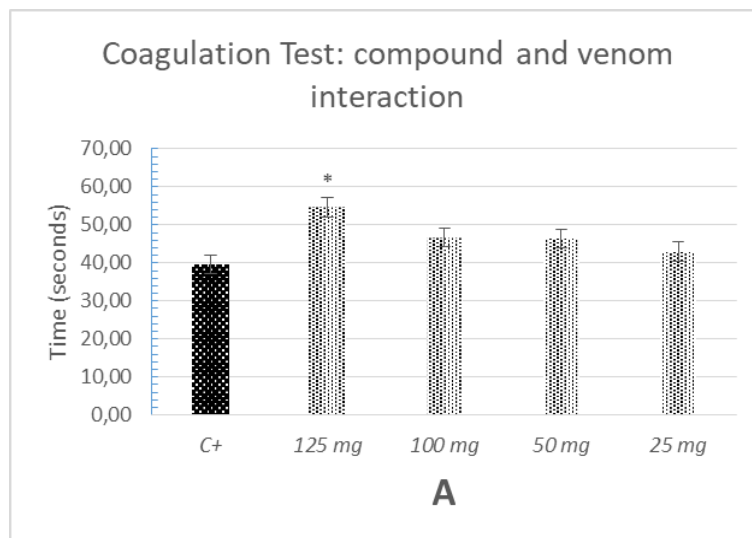
Jamale *et al.* (2019) showed that their polyhydroquinoline derivatives had significant potential as an antimicrobial. Some of the compounds were effective against *Mycobacterium tuberculosis*, which is an extremely difficult microorganism to eradicate. The derivatives were tested at 0.8, 1.6, 3.2, 6.25, 12.5, 25, 50, and 100 µg/mL on the strain *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 to determine the minimum inhibitory concentration (MIC). Two synthesized compounds exhibited the most promising anti-TB activity, with a MIC of 1.6 µg/mL. They were considered more potent than the standard drugs used as positive controls (pyrazinamide, streptomycin, and ciprofloxacin).

Recently (MANE *et al.*, 2021), various polyhydroquinoline derivatives were evaluated to determine the minimum inhibitory concentration on Gram-positive (*Bacillus subtilis*) and Gram-negative (*Escherichia coli*) bacteria, filamentous fungi (*Aspergillus niger*), and yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). According to the authors, some derivatives had significant antimicrobial activity, especially those with nitro, chlorine, bromine, and fluorine as the substituted functional group in the aromatic aldehyde. Their results corroborate the findings in

the present study. Therefore, polyhydroquinoline derivatives can be promising molecules in the development of antimicrobial drugs.

### Effects on the coagulation of citrated human plasma

The synthesized compound did not induce plasma coagulation in the tested doses (data not shown). When incubated with *Bothrops moojeni* venom (40 $\mu$ g), the compound prolonged the clotting time. However, when compared to the positive control, a statistically significant difference was observed only for the higher dose - 125 mg (Figure 5A). In contrast, when the venom is added later to plasma previously incubated with the compound, a protective effect was observed at 125, 100, and 50 mg ( $p < 0.05$ ). In this case, there was a significant increase in the clotting time (25.66 seconds for the 125 mg dose and 12.66 seconds for the 100 and 50 mg doses) (Figure 5B).





**Figure 5.** (A) Effect of the compound 4-(2-chloro-phenyl)-2,7,7-trimethyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester on the coagulation (induced by the venom of *Bothrops moojeni*) of citrated human plasma. Positive control (C+): *Bothrops moojeni* venom (40 µg). Samples: compound in the doses of 125, 100, 50, and 25 mg, previously incubated with the venom and then added to plasma for time measuring. (B) Effect of the compound 4-(2-chloro-phenyl)-2,7,7-trimethyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester on the coagulation (induced by the venom of *Bothrops moojeni*) of citrated human plasma. Positive control (C+): *Bothrops moojeni* venom (40 µg). Samples: compound in the doses of 125, 100, 50, and 25 mg, previously incubated with the plasma and subsequent addition of the venom for time measuring. Data represent the means and standard deviation of triplicates. \*Statistically significant – differs from the positive control (p <0.05).

Thrombi are formed by abnormal control of coagulation factors and clot lysis. Blood coagulation occurs by the activation of intrinsic and extrinsic pathways (CHOI, 2016). It is important to note that the compound did not present coagulant activity but rather has anticoagulant activity.

When previously incubated with the venom, the compound exerted partial inhibition on proteases. It also interacted with coagulation cascade components when previously incubated with the plasma, interfering with the activation of the factors induced by snake venom proteases. Some enzymes present in the *Bothrops* spp. venoms can activate coagulation and have a similar action to human thrombin - breakdown of fibrinogen molecules and generating fibrin networks (ALBUQUERQUE *et al.*, 2020; SITPRIJA; SITPRIJA, 2012).

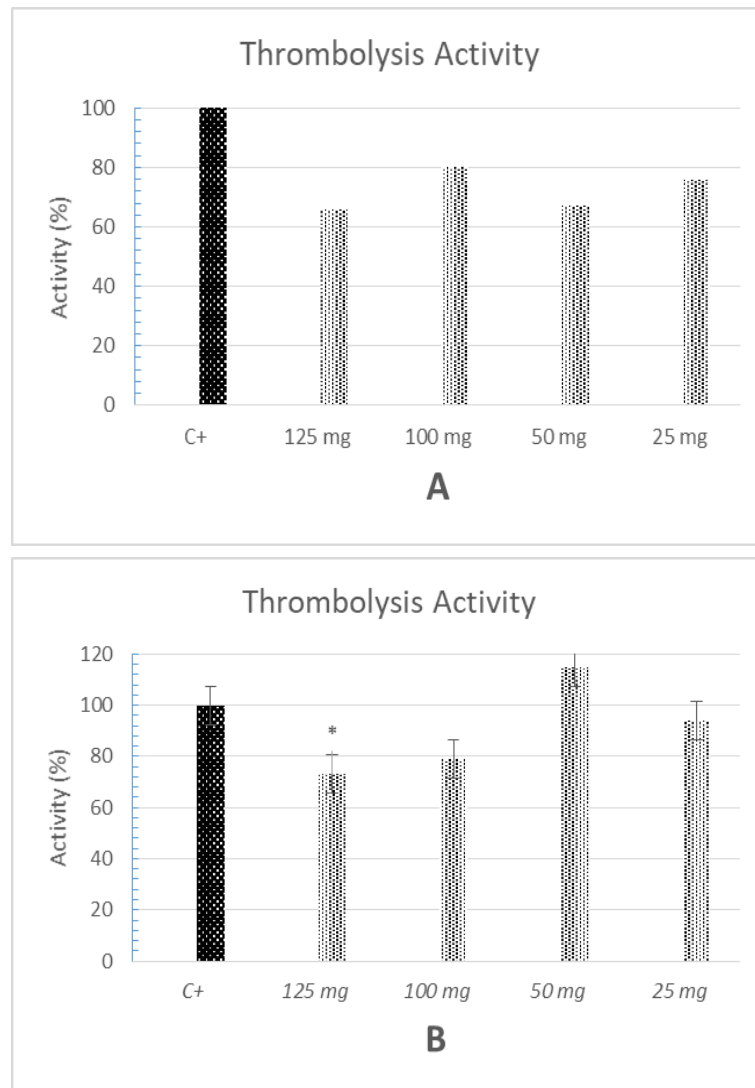
Anticoagulants are used for prophylaxis (preventive healthcare) and treatment of thromboembolic disorders, such as deep vein thrombosis (DVT), pulmonary and systemic embolism, and cerebral ischemia. These disorders are characterized by the formation of blood clots in the vasculature. Anticoagulants that target fibrin formation (e.g., heparin, warfarin, and more recently direct thrombin inhibitors) are mainly used for conditions involving venous blood clots in deep vein thrombosis and pulmonary embolism. They can also be used for people with atrial fibrillation or transient ischemic attack to prevent ischemic stroke (FISCHER, 2018).

Thrombotic events due to blood clotting are a severe problem in cardiovascular diseases. Although heparin (protease inhibitor) has been used as an anticoagulant to prevent these diseases, its prolonged use may result in the development of thrombocytopenia and an exaggerated response of the immune system. Other drugs such as aspirin and clopidogrel can cause serious adverse effects. Thus, the discovery of new anticoagulant agents would result in alternatives for preventing and treating thrombosis. Cotabarren *et al.* (2021) synthesized, based on natural alkaloids, a cystatin isolated from the plant *Moringa oleifera*. The authors tested its action as an alternative anticoagulant agent.

### **Effects on human blood thrombi and venom-induced thrombolytic activity**

The synthesized molecule induced lysis of blood thrombi at all doses tested, which were statistically similar to the positive control (*Bothrops moojeni* - 20 $\mu$ g) (Figure 6A). While this result is consistent with the activity observed in the previous experiment, it should be noted that the activities shown here were biologically lower than the control (approximately 20% difference between C+ and treatments).

When incubating the synthesized compound with *B. moojeni* venom, a significant reduction ( $p < 0.05$ ) in the venom-induced thrombolytic activity was observed for the 125 and 100 mg doses (73% and 79%, respectively). The other doses were not statistically different from the positive control (Figure 6B).



**Figure 6.** (A) Effect of the compound 4-(2-chloro-phenyl)-2,7,7-trimethyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester on human blood thrombi. Positive control (C+): *Bothrops moojeni* (20  $\mu$ g) = 100% thrombus dissolution. Samples: compound at 125, 100, 50, and 25 mg. (B) Effect of the compound 4-(2-chloro-phenyl)-2,7,7-trimethyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester on the thrombolytic activity induced by proteases from *Bothrops moojeni* venom. Positive control (C+): *Bothrops moojeni* venom (20  $\mu$ g). Samples: compound at the doses of 125, 100, 50, and 25 mg, previously incubated with the venom and then added to the thrombi. Data represent the means and standard deviation of triplicates. \*Statistically significant – differs from the positive control ( $p < 0.05$ ).

Thus, it is possible to observe that the compound has a thrombolytic activity, which corroborates with the data obtained in the coagulation test using citrated human plasma.

Cardiovascular diseases are caused by disorders of the heart and blood vessels. Nowadays, endogenous thrombi formation in these vessels is one of the leading causes of death. Therefore, many types of research have been performed in the field of prevention and treatment for these diseases (BRODMANN *et al.*, 2020).

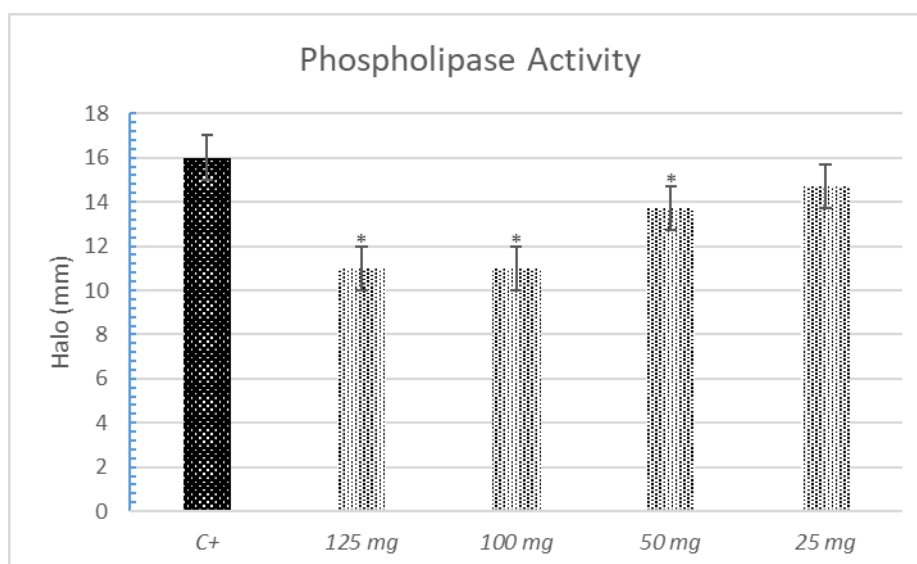
Silva *et al.* (2018) tested the thrombolytic activity of the fibrinolytic enzyme purified from *Chlorella vulgaris*. They found an estimated lysis rate of 25.6% after 90 minutes of reaction, while the negative and positive controls showed 3.5% and 30%, respectively. Drozdov *et al.* (2020) investigated the thrombolytic activity of magnetic polyelectrolyte-based composites and showed results of enoxaparin and poly (acrylic acid) -based composites close to pure urokinase (positive control).

The antithrombotic effects of chlorogenic acid were evaluated using the blood clot assay, which is similar to the test performed in the present work. The acid showed a high level of clot degradation compared to the control (CHOI, 2016).

It can be inferred from the results obtained in the present work that the synthesized compound has promising thrombolytic characteristics and a protective effect on human plasma components. However, further testing is needed since there are no complementary data in the literature for polyhydroquinoline derivatives.

### **Effects on the activity of phospholipases A<sub>2</sub>**

The synthesized molecule 4-(2-chloro-phenyl)-2,7,7-trimethyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester, when incubated with *Bothrops moojeni* venom (20 $\mu$ g), showed inhibitory activity on phospholipases A<sub>2</sub> at the doses of 125, 100, and 50 mg (p<0.05). The positive control (crude venom) induced a halo of 16 mm, while the halos formed after incubations with the molecule were 11 mm for the 125 and 100 mg doses and 13.7 mm for 50 mg (Figure 7).



**Figure 7.** Effect of the compound 4-(2-chloro-phenyl)-2,7,7-trimethyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester on the phospholipase activity induced by *Bothrops moojeni* venom. Positive control (C+): *Bothrops moojeni* venom (20  $\mu$ g). Samples: compound at the doses of 125, 100, 50, and 25 mg, previously incubated with venom. Data represent the means and standard deviation of triplicates. \*Statistically significant – differs from the positive control ( $p < 0.05$ ).

Phospholipases are lipolytic enzymes fundamental to living organisms. The phospholipase A<sub>2</sub> family is involved in the cleavage of an sn-2 ester bond of the glycerophospholipid. This breakdown generates 1-acyl-lysophospholipids and free fatty acids, mainly polyunsaturated fatty acids, which are metabolized into bioactive lipid mediators such as prostaglandins and leukotrienes. PLA<sub>2</sub>s have a fundamental role in inflammation processes and arachidonic acid metabolism in mammals, making the study of these enzymes attractive (PEGGION; TONELLO, 2021).

Zhao *et al.* (2021) tested the anti-inflammatory potential of three alkaloids and observed activities similar to the commercial drug used as a positive control. Preciado *et al.* (2016) tested the ethanolic extract of *Swietenia macrophylla* leaves on the phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops asper* venom, using egg yolk as the source of phospholipids. The extract exhibited an effect of  $87.2 \pm 11\%$  on neutralizing the enzyme activity. These data found in the literature corroborates the results obtained in the present study with the polyhydroquinoline derivative since they highlight alkaloids with inhibitory action on phospholipases A<sub>2</sub>. Therefore, they are potential candidates for the development of new anti-inflammatory drugs.

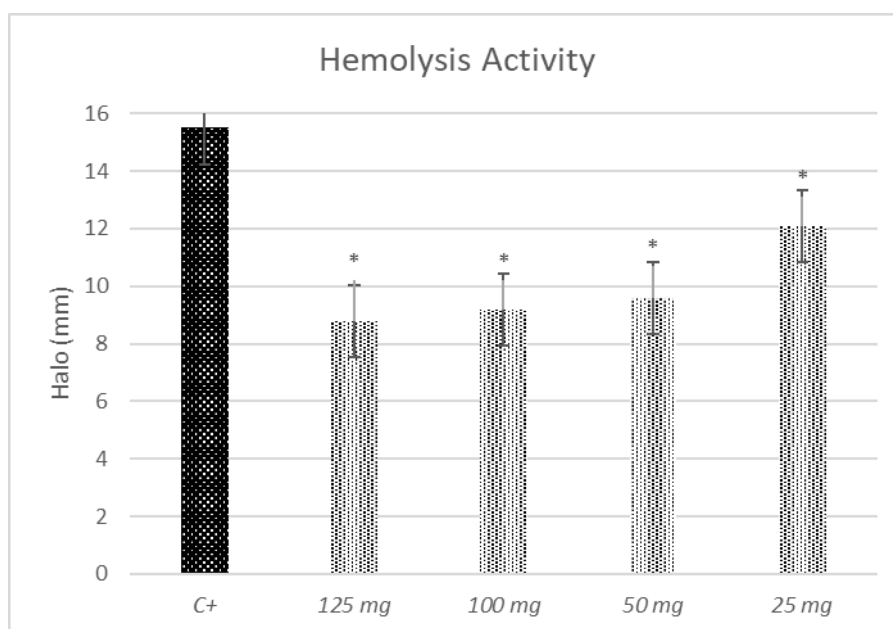
Kashid *et al.* (2020) tested some compounds derived from 2,5-disubstituted-1,3,4-oxadiazole, which contains a heterocyclic ring structure. The anti-inflammatory activity screening showed promising results compared to diclofenac sodium, used as a positive control.

The anti-inflammatory activity of the molecule N-(3-methoxyphenyl)-3-(pyridin-4-yl)-1H-pyrazole-5-carboxamide was also tested. The results were compared to diclofenac sodium (positive control), and the concentrations evaluated (10, 50, 100, 250, and 500  $\mu$ M) showed higher anti-inflammatory activity than the control (NITHYABALAJI; KRISHNAN; SRIBALAN, 2019).

### **Cytotoxic activity on human erythrocytes**

4-(2-chloro-phenyl)-2,7,7-trimethyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester did not exhibit cytotoxic activity on human erythrocytes under the conditions and doses tested (data not shown).

However, the synthesized molecule was able to inhibit the activity of cytotoxic proteases present in *Bothrops moojeni* venom (20 $\mu$ g) in all doses evaluated ( $p < 0.05$ ). The positive control had an activity halo of 15.5 mm, and the pre-incubation of the venom with doses 125, 100, 50, and 25 mg resulted in halos of 8.8, 9.2, 9.6, and 12.1 mm, respectively (Figure 8).



**Figure 8.** Effect of the compound 4-(2-chloro-phenyl)-2,7,7-trimethyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester on the cytotoxic activity induced by *Bothrops moojeni* venom in human erythrocytes. Positive control (C+): *Bothrops moojeni* venom (20  $\mu$ g). Samples: compound in the doses of 125, 100, 50, and 25 mg, previously incubated with the venom. Data represent the means and standard deviation of triplicates. \*Statistically significant – differs from the positive control ( $p < 0.05$ ).

The erythrocyte membrane is an appropriate and representative model to study the interaction of natural or synthetic compounds with cell membranes. Colina *et al.* (2019) performed tests with different concentrations of epigallocatechin gallate to determine its protective activity on human erythrocyte lysis induced by hypochlorous acid (HClO). The authors observed progressive inhibition of hemolysis after adding the oxidizing agent, reaching a minimum of 4.5% hemolysis with 100  $\mu$ M of gallate. The polyhydroquinoline derivative in our study performed the same protection on the red cells membrane.

Diosmin is a flavone glycoside that is naturally found in many citrus fruits. This substance is known to act on the circulatory system's veins, improving blood circulation and venous tonus. In microcirculation, diosmin normalizes permeability and reinforces the resistance of the capillary vessels, which reduces edema. However, despite the broad therapeutic potential of this substance, it is characterized by low solubility in water and most organic solvents. Since diosmin has low bioavailability, high dosages (500 mg) are required for the oral regimen (SZELESZCZUK *et al.*, 2017).

Therefore, finding new molecules with protective and anti-inflammatory activities is extremely necessary. As can be seen, the molecule 4-(2-chloro-phenyl)-2,7,7-trimethyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester has effects that deserve attention and expanded studies since it is pharmacologically active at a dosage that is considered low when compared to marketed drugs.

## CONCLUSION

In the present work, it was possible to synthesize the polyhydroquinoline derivative 4-(2-chloro-phenyl)-2,7,7-trimethyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester without the use of solvents and catalysts, which is in accordance with green chemistry. The molecule showed anticoagulant, thrombolytic, anti-cytotoxic, and antimicrobial (Gram-positive and Gram-negative bacteria) activities and inhibited the action of phospholipase A<sub>2</sub> and thrombolytic proteases *in vitro*. The results obtained are a starting point to further investigations with this molecule and other polyhydroquinoline derivatives. These molecules are promising candidates as active ingredients in the development of new drugs for the treatment of cardiovascular and inflammatory diseases.

## REFERENCES

- ALBUQUERQUE, P. L. M. M. *et al.* Clinical assessment and pathophysiology of Bothrops venom-related acute kidney injury: A scoping review. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, v. 26, p. 1–17, 2020.
- BRODMANN, M. *et al.* Global Burden of Cardiovascular Diseases. *Journal of the American College of cardiology*, v. 76, n. 25, p. 2982–3021, 2020.
- CHOI, J. Investigation of the anticoagulant and antithrombotic effects of chlorogenic acid. *Journal Biochemistry Mol Toxicol.*, v. 31, n. September, p. 1–6, 2016.
- CINTRA, A. C. O. *et al.* Batroxase, a new metalloproteinase from *Bothrops atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity. *Toxicon*, v. 60, n. 1, p. 70–82, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.03.018>>.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). *Clinical and Laboratory Standards Institute Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically Standard., Approval CDM-A.; M07 Methods for dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*. [S.l.: s.n.], 2018.
- CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved*



- Standard-Eleventh Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute. . [S.l: s.n.], 2018.*
- COLINA, J. R. *et al.* Protective effect of epigallocatechin gallate on human erythrocytes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 173, p. 742–750, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.10.038>>.
- COTABARREN, J. *et al.* Purification and characterization of a novel thermostable papain inhibitor from moringa oleifera with antimicrobial and anticoagulant properties. *Pharmaceutics*, v. 13, n. 4, p. 1–11, 2021.
- DEKAMIN, M. G. *et al.* Alginic acid: A mild and renewable bifunctional heterogeneous biopolymeric organocatalyst for efficient and facile synthesis of polyhydroquinolines. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 108, p. 1273–1280, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.050>>.
- DROZDOV, A. S. *et al.* Magnetic polyelectrolyte-based composites with dual anticoagulant and thrombolytic properties: towards optimal composition. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, v. 95, n. 3, p. 771–782, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10971-020-05313-z>>.
- FISCHER, P. M. Design of Small-Molecule Active-Site Inhibitors of the S1A Family Proteases as Procoagulant and Anticoagulant Drugs. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 61, n. 9, p. 3799–3822, 2018.
- GUTIÉRREZ, J. *et al.* An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon*, v. 26, n. 4, p. 411–413, jan. 1988.
- JAMALE, D. K. *et al.* Glycerol Mediated Synthesis, Biological Evaluation, and Molecular Docking Study of 4-(1H-pyrazol-4-yl)-polyhydroquinolines as Potent Antitubercular Agents. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, v. 56, n. 2, p. 608–618, 2019.
- JOSHI, V. M.; PAWAR, R. P. Microwave Assisted Expeditious Synthesis of Bioactive Polyhydroquinoline Derivatives. *Eur. Chem. Bull.*, v. 2, n. 9, p. 679–682, 2013.
- JUBEH, B.; BREIJYEH, Z.; KARAMAN, R. Resistance of gram-positive bacteria to current antibacterial agents and overcoming approaches. *Molecules*, v. 25, n. 12, p. 1–23, 2020.
- KASHID, B. B. *et al.* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters their in vitro anti-inflammatory , anti-oxidant evaluation , and molecular docking study. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 30, n. 12, p. 127136, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127136>>.
- KO, S.; YAO, C. F. Ceric Ammonium Nitrate (CAN) catalyzes the one-pot synthesis of polyhydroquinoline via the Hantzsch reaction. *Tetrahedron*, v. 62, n. 31, p. 7293–7299, 2006.

- KUMAR, S. *et al.* An efficient, catalyst- and solvent-free, four-component, and one-pot synthesis of polyhydroquinolines on grinding. *Tetrahedron*, v. 64, n. 3, p. 536–542, 2008.
- MANE, P. *et al.* Biogenic synthesis of ZnO nanoparticles from *Parthenium hysterophorus* extract and its catalytic activity for building bioactive polyhydroquinolines. *Research on Chemical Intermediates*, v. 47, n. 5, p. 1743–1758, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11164-020-04365-8>>.
- MATADA, B. S.; YERNALE, N. G. The contemporary synthetic recipes to access versatile quinoline heterocycles. *Synthetic Communications*, v. 51, n. 8, p. 1133–1159, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/00397911.2021.1876240>>.
- MOURAO, P. A. S. *et al.* Structure and anticoagulant activity of a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm. Sulfated fucose branches on the polysaccharide account for its high anticoagulant action. *Journal of Biological Chemistry*, v. 271, n. 39, p. 23973–23984, 1996.
- NAVEENKUMAR, R.; BASKAR, G. Process optimization, green chemistry balance and technoeconomic analysis of biodiesel production from castor oil using heterogeneous nanocatalyst. *Bioresource Technology*, v. 320, n. PA, p. 1–10, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124347>>.
- NGUYEN, V. T.; NGUYEN, H. T.; TRAN, P. H. One-pot three-component synthesis of 1-amidoalkyl naphthols and polyhydroquinolines using a deep eutectic solvent: a green method and mechanistic insight. *New Journal of Chemistry*, v. 45, n. 4, p. 2053–2059, 2021.
- NITHYABALAJI, R.; KRISHNAN, H.; SRIBALAN, R. Synthesis, molecular structure and multiple biological activities of N-. *Journal of Molecular Structure*, v. 1186, p. 1–10, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.02.095>>.
- OUTILI, N. *et al.* Biodiesel production optimization from waste cooking oil using green chemistry metrics. *Renewable Energy*, v. 145, p. 2575–2586, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.07.152>>.
- PEGGION, C.; TONELLO, F. Short linear motifs characterizing snake venom and mammalian phospholipases A2. *Toxins*, v. 13, n. 4, p. 1–15, 2021.
- PERRIN, C. L.; CHANG, K. L. The Complete Mechanism of an Aldol Condensation. *Journal of Organic Chemistry*, v. 81, n. 13, p. 5631–5635, 2016.
- PINTO, L. M. A. *et al.* A single-step multicomponent synthesis of a quinoline derivative and the characterization of its cyclodextrin inclusion complex. *Journal of Molecular Structure*, v. 1237, p. 1–10, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.130391>>.
- PRECIADO, L. *et al.* Characterization of the most promising fraction of *Swietenia*

*macrophylla* active against myotoxic phospholipases A2: Identification of catechin as one of the active compounds. *Vitae*, v. 23, n. 2, p. 124–133, 2016.

SHARMA, S.; SINGH, U. P.; SINGH, A. P. Synthesis of MCM-41 supported cobalt (II) complex for the formation of polyhydroquinoline derivatives. *Polyhedron*, v. 199, p. 1–11, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.poly.2021.115102>>.

SILVA, P. E. DA C. E. *et al.* In vitro thrombolytic activity of a purified fibrinolytic enzyme from *Chlorella vulgaris*. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 1092, n. January, p. 524–529, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.04.040>>.

SITPRIJA, V.; SITPRIJA, S. Renal effects and injury induced by animal toxins. *Toxicon*, v. 60, n. 5, p. 943–953, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.06.012>>.

SZELESZCZUK, Ł. *et al.* Spectroscopic and structural studies of the diosmin monohydrate and anhydrous diosmin. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 529, n. 1–2, p. 193–199, 2017.

WARREN, STUART; WYATT, P. *Designing Organic Syntheses: a programmed introduction to the synthon approach*. 2. ed. New York: [s.n.], 2009.

ZHAO, L. *et al.* Alkaloids bearing rare skeletons from *Forsythia suspensa* with anti-inflammatory and anti-viral activities in vitro. *Phytochemistry*, v. 186, n. November 2020, p. 1–7, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112739>>.

## ARTIGO 2

### **Síntese verde da 4-(4-hidroxifenil)-2,7,7-trimetil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-ácido carboxílico-etil éster com atividade antimicrobiana e moduladora de fosfolipases A<sub>2</sub> e proteases com ação na hemostasia e resposta inflamatória**

Gustavo Henrique Andrade Machado<sup>1</sup>, Marcus Vinicius Cardoso Trento<sup>1</sup>, Juliana Junqueira Pinelli<sup>2</sup>, Roberta Hilsdorf Piccoli<sup>2</sup>, Sergio Scherrer Thomasi<sup>1</sup>, Silvana Marcussi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Química. Universidade Federal de Lavras (UFLA), Campus Universitário, Lavras, MG, Brasil, Caixa Postal 3037, CEP 37200-900, telefone +55(35)3829-1893.

<sup>2</sup> Departamento de Ciência dos Alimentos. Universidade Federal de Lavras (UFLA), Campus Universitário, Lavras, MG, Brasil, CEP 37200-900.

**Autor correspondente:** Dr. Gustavo Henrique Andrade Machado. Departamento de Química, Laboratório de Bioquímica. Universidade Federal de Lavras (UFLA), Campus

Universitário, Lavras, MG, Brasil, Caixa postal 3037, CEP 37200-900, telefone +55(35)3829-1893. andradegh@gmail.com

## RESUMO

Nos últimos anos tem-se dado uma atenção especial para a síntese de polihidroquinolinas (PHQs) devido ao seu alto nível biológico e farmacológico. O derivado hexahidroquinolínico 4-(4-hidroxifenil)-2,7,7-trimetil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-acido carboxílico etil éster foi sintetizado através de reação multicomponente (MRC) sem o uso de catalisadores ou solventes, concordante aos princípios da química verde. Para a caracterização desta molécula foram feitas análises de ressonância magnética nuclear RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e espectroscopia vibracional na região do Infravermelho (IV), com transformada de Fourier, e os resultados demonstram que a molécula esperada foi sintetizada com um rendimento de 38%. Nas atividades biológicas, soluções teste foram preparadas em diversas doses que variavam de 25 a 500 mg. Para a técnica de diluição seriada o composto sintetizado apresentou atividade antimicrobiana estatisticamente significativa tanto para *Staphylococcus aureus* quanto para *Pseudomonas aeruginosa*. A molécula isoladamente não teve efeitos na coagulação do plasma humano citratado, mas foi capaz de prolongar o tempo de coagulação induzida pela peçonha de *Bothrops moojeni*, quando previamente incubados, em 16,66, 12,66 e 7,33 segundos, nas doses de 125, 100 e 50 mg, respectivamente ( $p < 0,05$ ). Quando a peçonha é adicionada posteriormente ao plasma previamente incubado com o composto, apenas as doses de 125 mg (26,33 seg) e 100 mg (12,66 seg) apresentam valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) do controle positivo. 4-(4-hydroxy-phenyl)-2,7,7-trimethyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydro-quinoline-3-carboxylic-acid ethyl ester quando testada sobre trombos sanguíneos humanos apresentou resultado estatisticamente diferente do controle positivo apenas para a dose de 125 mg ( $p < 0,05$ ). Porém, quando incubada com a peçonha de *B. moojeni* para avaliar seu potencial inibitório sobre proteases trombolíticas, esta molécula promoveu a redução da atividade exercida pela peçonha para 69%, quando avaliada na dose de 100 mg ( $p < 0,05$ ). A avaliação da atividade fosfolipásica resultou em efeito inibidor do composto sobre estas enzimas, nas doses de 125 e 100 mg ( $p < 0,05$ ), formando halos 3 mm menores do que o controle positivo (*B. moojeni*). A molécula sintetizada também protegeu a membrana de eritrócitos contra a atividade citotóxica induzida pela peçonha de *B. moojeni*, onde foram formados halos com média de 15,5mm para o controle positivo, enquanto os tratamentos tiveram halos de 11,1, 12,5, 13, e 12,6 mm para as doses de 125, 100, 50 e 25 mg ( $p < 0,05$ ), respectivamente. Desta forma, podemos concluir que a molécula foi sintetizada com sucesso e em acordo com os padrões da química verde, e nos ensaios biológicos apresentou propriedades farmacológicas.

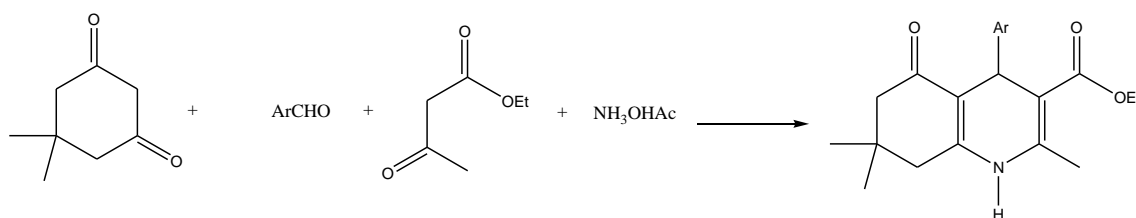
**Palavras-chave:** Síntese Multicomponente, Química Verde, polihidroquinolinas, antimicrobiano, anti-citotóxico, trombolítico, anticoagulante, anti-inflamatório.

## INTRODUÇÃO

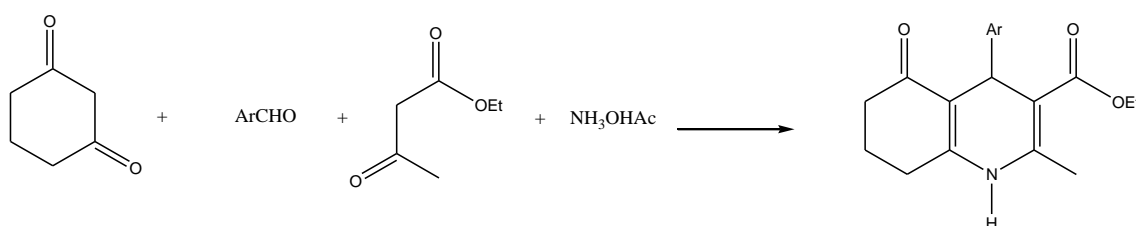
As reações multicomponentes (MCRs) permitem a síntese de diversas moléculas em uma única etapa e ficaram conhecidas como uma ferramenta eficiente e poderosa para obtenção de moléculas orgânicas complexas, além de ser uma maneira rápida, sem produção de intermediários reacionais (DEKAMIN *et al.*, 2018; NGUYEN; NGUYEN; TRAN, 2021; PAKDAMAN; ALLAMEH; SHAKER, 2018).

As MRCs fornecem a obtenção de uma biblioteca química extensa de fármacos e compostos heterocíclicos. Nos últimos anos tem-se dado uma atenção especial para a síntese de polihidroquinolinas (PHQs) devido ao seu alto nível biológico e farmacológico, podendo atribuir a estes derivados ações como antimicrobianas, neuroprotetores e antitumorais (DEKAMIN *et al.*, 2018; MURTHY *et al.*, 2012; NGUYEN; NGUYEN; TRAN, 2021).

Os procedimentos gerais para obtenção de PHQs utilizam como princípio a reação de Hantzsch através de uma condensação com dimedona, aldeídos aromáticos, acetoacetato de etila e acetato de amônio (Fig. 1a, 1b), utilizando ou não catalisadores para obtenção destas moléculas (NGUYEN; NGUYEN; TRAN, 2021; PAKDAMAN; ALLAMEH; SHAKER, 2018).



**Figura 1a.** Síntese de polihidroquinolinas utilizando 5,5-dimetil-1,3-ciclohexanodiona



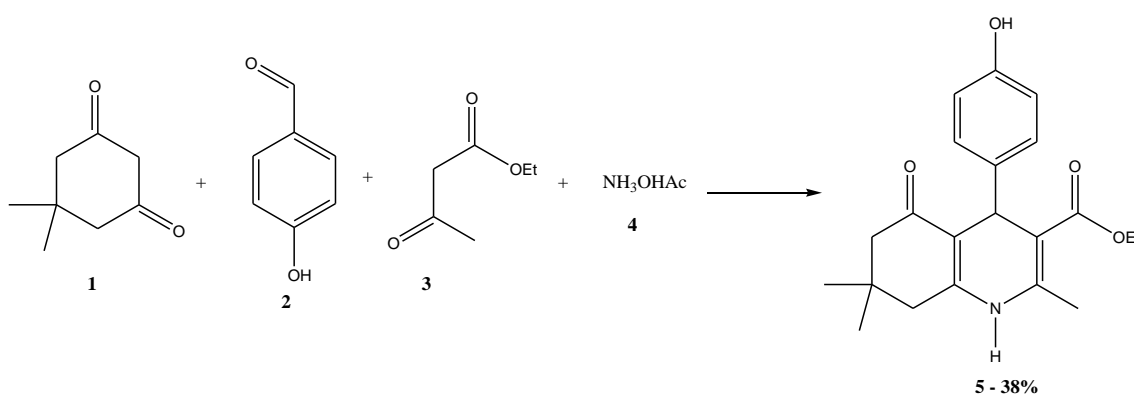
**Figura 1b.** Síntese de polihidroquinolinas utilizando 1,3-ciclohexanodiona

O objetivo do presente trabalho foi obter um derivado de polihidroquinolina através de MRCs, sem a utilização de catalisadores, nem tão pouco de solventes, à temperatura ambiente, com um rendimento satisfatório, por meio de um procedimento que seja ambientalmente favorável, respeitando os princípios da química verde (DEKAMIN *et al.*, 2018). Em seguida, avaliar a ação antimicrobiana e potencial modulador sobre enzimas, que atuam em processos hemostáticos e inflamatórios, desta molécula.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Síntese Orgânica

A síntese do derivado hexahidroquinolínico 4-(4-hidroxifenil)-2,7,7-trimetil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-acido carboxílico etil éster foi baseada na metodologia descrita por SAINI, KUMAR, SANDHU (2008) e partiu dos seguintes reagentes: 5,5-dimetil-1,3-cicloexanodiona **1** (2 mmol), 4-hidroxibenzaldeído **2** (2mmol), acetoacetato de etila **3** (2 mmol) e acetato de amônio **4** (3 mmol), conforme a Figura 2.



**Figura 2.** Síntese de 4-(4-hidroxifenil)-2,7,7-trimetil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-acido carboxílico etil éster.

### Caracterização por ressonância magnética nuclear - RMN

Os espectros de RMN foram obtidos em um equipamento Bruker Avance III – 14,1 Tesla (600,23 MHz para frequência do hidrogênio) com magneto blindado (Ultrashield Plus®) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). O espectrômetro é equipado com sonda criogênica TCI (Triple Resonance Cryoprobe Inverse) de 5 mm, com bobinas de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e pré-amplificador refrigerados a uma temperatura de aproximadamente 77K. A sonda possui bobina de gradiente de campo no eixo z (53G/cm) e unidade de ajuste automático de sintonia – ATMA® (Automatic Tuning and Matching).

## **Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho (IV), com transformada de Fourier**

Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com reflectância total atenuada (FTIR-ATR). Os espectros na região do infravermelho com reflexão total atenuada foram obtidos a partir de um equipamento Varian acoplado a um acessório de ATR de diamante. Pike GladiATR Technologies, com faixa espectral de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  a 2000  $\text{cm}^{-1}$ .

A análise dos grupos funcionais das moléculas sintetizadas foi realizada por FTIR. Os espectros de absorção de IV foram obtidos com pastilhas de 34 KBr, em que foram pesados 2,0 mg da amostra em 200,0 mg de KBr. As análises foram feitas na Central de Análise e Prospecção Química (CAPQ) localizada no Departamento de Química/UFLA.

## **Soluções Teste**

Devido à baixa polaridade dos compostos, eles foram dissolvidos em dimetil sulfóxido (DMSO). Testes de solubilidade foram realizados para cada composto com o objetivo de obter amostras parcialmente diluídas em PBS ( $\text{NaCl}$  137  $\text{mmol L}^{-1}$ ,  $\text{KCl}$  2.7  $\text{mmol L}^{-1}$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  10  $\text{mmol L}^{-1}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2  $\text{mmol L}^{-1}$ ), de forma a diminuir a possível interferência do DMSO nos ensaios a serem realizados. Para cada ensaio, foi realizada uma triagem de diferentes doses dos compostos, permitindo assim identificar as doses passíveis de terem seus efeitos farmacológicos avaliados, sem que estas promovam alterações no ambiente reacional. As doses dos controles contendo enzimas, reagentes químicos ou medicamentos, inerentes à cada ensaio, também foram previamente determinadas após avaliação de diferentes doses.

Nos testes para a avaliação do potencial modulador sobre enzimas que atuam em processos hemostáticos e inflamatórios, quatro doses foram definidas: 25, 50, 100, e 125 mg.

Para a atividade antimicrobiana, as seguintes doses foram utilizadas: 100, 125, 250 e 500 mg, para o teste de difusão em ágar, já para o teste de diluição seriada com plaqueamento em superfície partiu-se da dose de 500 mg.

## **Avaliação da Atividade antimicrobiana**

A atividade antimicrobiana da molécula 4-(4-hidroxifenil)-2,7,7-trimetil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-acido carboxílico etil éster, foi avaliada por testes de sensibilidade pelos métodos de difusão em ágar (antibiograma) e pela técnica de diluição



seriada com plaqueamento em superfície (microdiluição em caldo), de acordo com as recomendações do CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) (CLSI, 2018).

### **Microrganismos e obtenção do inóculo**

Os microrganismos utilizados foram *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 obtidos da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brasil. Estas cepas foram escolhidas devido sua importância em feridas e no retardo do processo de cicatrização. As culturas de estoque foram armazenadas em meio de congelamento (glicerol: 15 mL; peptona bacteriológica: 0,5 g; extrato de levedura: 0,3 g; NaCl: 0,5 g; água destilada: 100 mL). A reativação das cepas foi realizada inoculando 100 µL da cultura em tubos contendo 10 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion) com incubação a 37°C/24h em condições aeróbias, e o inóculo padronizado com densidade celular correspondente a 10<sup>8</sup> UFC/mL, pela escala de McFarland.

### **Técnicas para testagem antimicrobiana da polihidroquinolina**

Para o antibiograma uma alíquota das culturas de *S. aureus* e *P. aeruginosa* foi espalhada em TSA (Tryptic Soy Agar) e discos contendo a molécula 4-(4-hidroxifenil)-2,7,7-trimetil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-acido carboxílico etil éster, nas dosagens de 500 mg, 250 mg, 125 mg e 100 mg, foram colocados sobre o meio. As placas foram incubadas a 37 °C/24h e após esse período os halos de inibição foram medidos ao redor dos discos. Como controle positivo foi utilizado o antibiótico Cloranfenicol (CLSI, 2018).

Para a microdiluição em caldo, foi preparada uma solução primária com concentração de 500 mg/mL, a seguir foram retirados 500 µL dessa solução e incubados com mais 500 µL do meio de cultura BHI + 1 µL da bactéria padronizada em 10<sup>8</sup> UFC/mL em eppendorfs, na estufa a 37 °C, obtendo então uma dosagem de 250 mg do composto. Os plaqueamentos em placa de Petri contendo TSA foram realizados nos tempos 0 horas (momento da incubação do composto), após 24 horas e após 48h para conferir a evolução de crescimento bacteriano. Para realizar a contagem das colônias foram realizadas diluições no momento de plaquear, colocando 900 µL de água destilada para cada 100 µL da solução incubada. O plaqueamento foi feito com as diluições sucessivas possibilitando a contagem de colônias (células viáveis),

seguindo critérios de padronização. As placas contendo meio TSA foram incubadas a 37°C e as colônias contadas em 24h para *S. aureus*, a 37°C e em 48h para *P. aeruginosa*. Como controle positivo utilizou-se as mesmas bactérias padronizadas, incubadas em 1000 µL de BHI, sem a presença da molécula; e, a contagem das unidades formadoras de colônias eram feitas em meio TSA, seguindo o mesmo padrão de diluição, de acordo com CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI, 2018).

Ambos os testes e dosagens foram realizados em triplicata.

### **Obtenção de material biológico humano**

Os protocolos experimentais relativos aos testes de coagulação, citotoxicidade sobre eritrócitos e trombolítico, foram previamente submetidos à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos (COEP) da Universidade Federal de Lavras (CAAE: 10991019.4.0000.5148; número do parecer: 3.288.976).

Foram convidados 5 voluntários nas seguintes condições: pessoas entre 18 e 35 anos, que não fazem uso de medicamentos continuamente, não fumantes e que não trabalhem em condições de risco químico ou biológico. Os voluntários também não haviam sido submetidos a qualquer procedimento cirúrgico e/ou feito administração de medicamentos cuja prescrição médica seja obrigatória (ex: quimioterápicos e antibióticos) ou outras drogas. Além disso, sua forma de participação e possíveis riscos e benefícios inerentes à pesquisa foram esclarecidos e os voluntários assinaram o TCLE (Termo de Consentimento Livre Esclarecido).

### **Efeitos sobre a coagulação de plasma humano citratado**

A atividade coagulante foi realizada utilizando como referência a metodologia descrita por (MOURAO *et al.*, 1996). AO plasma citratado (200 µL), estabilizado à temperatura de 37°C, foram adicionados os tratamentos em diferentes doses e o tempo imediatamente contato, até a formação de um coágulo rígido. O potencial do composto em inibir a coagulação foi avaliado com adição do tratamento ao plasma citratado, incubação pelo tempo de 10 minutos e posterior adição de peçonha de *Bothrops moojeni* (40 µg) e contagem do tempo. Nesse ensaio o composto teria tempo de interagir com os fatores da cascata de coagulação presentes no plasma. O tempo necessário para a coagulação foi medido em segundos, sendo que a inibição da atividade foi observada de acordo com o aumento médio do tempo de coagulação em relação ao controle contendo apenas peçonha. Foram também realizadas incubações prévias do composto em diferentes doses, com a peçonha, e posterior adição dos incubados ao plasma, seguindo com contagem do tempo. Nesse segundo ensaio, o

composto poderia interagir com as enzimas coagulantes presentes na peçonha, principalmente serinoproteases, podendo exercer inibição sobre sua atividade.

### **Efeitos sobre trombos sanguíneos humanos e sobre a atividade trombolítica induzida por proteases**

A atividade trombolítica foi avaliada sobre coágulos sanguíneos formados *in vitro* de acordo com a metodologia descrita por (CINTRA *et al.*, 2012). Os trombos foram obtidos distribuindo 100 µL de sangue total fresco em cada poço de microplacas e os deixando coagular por 15 minutos em temperatura ambiente. Após esse tempo os coágulos foram incubados por 24 horas a 37°C com o composto nas diferentes doses. Os controles positivo e negativo foram realizados com peçonha de *Bothrops moojeni* (20 µg) PBS (30 µL), respectivamente. A peçonha de *Bothrops moojeni* também foi utilizada nesse ensaio como ferramenta laboratorial, permitindo avaliar o potencial do composto em modular a atividade de proteases trombolíticas presentes na peçonha. Após incubação do composto, em diferentes doses, com a peçonha, por 30 minutos a 37°C, os incubados foram adicionados sobre os trombos sanguíneos e as placas permaneceram em câmara de cultura celular por 24h em mesma temperatura. As atividades foram avaliadas medindo-se o volume de líquido liberado por cada trombo, os quais foram convertidos em porcentagem. O controle positivo contendo peçonha de *B. moojeni* (20µg) foi considerado como 100% de atividade.

### **Efeitos sobre a atividade de fosfolipases A<sub>2</sub>**

A atividade fosfolipásica foi realizada seguindo a metodologia descrita por (GUTIÉRREZ *et al.*, 1988), com algumas adaptações. Para isso foi elaborado um gel contendo CaCl<sub>2</sub> 0,01 mol L<sup>-1</sup>, e fosfolipídios de gema de ovo (fosfatidilcolina, fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina), azida de sódio 0,005% (para inibir o crescimento de microorganismos no meio) e ágar bacteriológico 1% dissolvido em PBS (pH 7,2). Este preparado foi vertido em placas de Petri e, após sua solidificação, o composto foi aplicado em orifícios de tamanho uniforme (~ 0,5 cm de diâmetro), em diferentes doses. Também foi analisada a atividade anti-inflamatória e moduladora enzimática do composto, fazendo uso de fosfolipases A<sub>2</sub> presentes na peçonha de *Bothrops moojeni* (20µg) para indução da quebra dos fosfolipídios. O composto foi previamente incubado com a peçonha, em diferentes proporções, por 30 minutos a 37°C, e em seguida foi realizada a avaliação da atividade fosfolipásica. Os halos translúcidos, resultantes da atividade fosfolipásica (expressos em

milímetros), foram medidos após 18 horas de permanência das placas em câmara de cultura celular a 37°C.

### **Atividade citotóxica sobre eritrócitos humanos**

Para a avaliação desta atividade foi feito uso de meio sólido, conforme descrito por (GUTIÉRREZ *et al.*, 1988). Porém aqui foi substituído os fosfolípidios por um concentrado de eritrócitos humanos. O sangue, coletado em tubos heparinizados, foi imediatamente centrifugado, descartando-se o sobrenadante e suspendendo as células em tampão PBS, que em seguida foram lavadas mais 2 vezes com centrifugações de 1200 g por 10 minutos, usando volumes aproximados de 10 mL do mesmo tampão. Após as centrifugações, o concentrado de eritrócitos obtido foi utilizado para a preparação do gel ( $\text{CaCl}_2$  0,01 mol L<sup>-1</sup>; eritrócitos lavados em PBS 1:3 v v<sup>-1</sup> PBS; azida de sódio 0,005%; ágar bacteriológico 1% dissolvido em PBS, pH 7,2), que foi vertido em placas de petri, e após sua solidificação recebeu a aplicação dos tratamentos, em orifícios de tamanho uniforme (~ 0,5 cm de diâmetro), nas diferentes doses. A atividade anti-citotóxica foi também avaliada realizando pré-incubação do composto com a peçonha de *B. moojeni* (20 µg), em diferentes proporções, e os controles positivo e negativo corresponderam a peçonha pura e PBS, respectivamente. Os efeitos do composto foram avaliados após a permanência das placas em câmara de cultura celular a 37°C por 18 horas. A formação de halo translúcido ao redor do orifício no gel caracteriza a atividade hemolítica, o diâmetro dos halos formados são então medidos por meio de um paquímetro, expressos em milímetros.

### **Análises Estatísticas**

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk ao nível de 5% para a verificação de normalidade dos dados. Nos dados que foram constatados a distribuição normal, o teste de Dunnett foi realizado. Os dados que não apresentarem distribuição normal, uma tentativa de normalização pelo procedimento PROC RANK foi realizada, e os dados não normalizados foram comparados pelo teste Kruskal-Wallis ao nível de 5%. O programa estatístico utilizado foi o SAS (9.0).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Síntese e Caracterização**

O derivado hexahidroquinolínico 4-(4-hidroxifenil)-2,7,7-trimetil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-acido carboxílico etil éster foi sintetizado e obtido sem a utilização de catalisadores e solventes. O rendimento para este derivado foi de 38%.

Segundo KUMAR *et al.* (2008) a síntese desta mesma molécula teve um rendimento de 83%, o que não pôde ser observado em nenhuma tentativa de síntese realizada pelo nosso grupo de pesquisa. Entretanto, os trabalhos envolvendo estes derivados polihidroquinolínicos sempre buscam utilizar catalisadores menos poluentes, mas os autores citados não conseguiram êxito na síntese sem o uso de um catalisador, o que pode explicar este rendimento.

Para a caracterização desta molécula foram feitos RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e IV e os resultados demonstram que a molécula esperada foi sintetizada com sucesso. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  mostra ressonâncias em  $\delta_{\text{H}}$  4,79 (H4, 1H, *s*), 4,03 (H12, 2H, *q*,  $^3J_{\text{H12-H13}} = 7,0$  Hz), 2,55-1,99 (H7 e H9, 4H, *m*), 2,31 (H1, 3H, *s*), 1,18 (H13, 3H, *t*,  $^3J_{\text{H13-H12}} = 7,0$  Hz), 1,05 (H8', 3H, *s*) e 0,90 (H8'', 3H, *s*) compatível com o que é esperado para essa classe de moléculas. Na região de olefínicos e aromáticos, dois multipletos bem separados e definidos, integrando para 4 átomos de hidrogênios, confirmam a presença de um anel aromático dissubstituído com padrão *para*:  $\delta_{\text{H}}$  6,99-6,96 (H15 e H16, 2H, *m*) e 6,61-6,59 (H16 e H18, 2H, *m*) ppm.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  é possível identificar o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  155,7 (C17) ppm, compatível com carbono  $sp^2$  de anel aromático conectado diretamente à um átomo de oxigênio de hidroxila, além do sinal em  $\delta_{\text{C}}$  138,8 (C14) ppm de acordo com carbono  $sp^2$  de anel aromático não hidrogenado em posição *para* ao carbono oxigenado. Os carbonos C15, C19, C16 e C18 têm ressonância, respectivamente, em  $\delta_{\text{C}}$  128,8 e 114,9. Os demais picos observados, também corroboram para a caracterização estrutural:  $\delta_{\text{C}}$  194,7 (C6), 167,4 (C11), 149,6 (C10), 144,8 (C2), 110,8 (C5), 104,6 (C3), 59,4 (C12), 50,7 (C7), ~41,1 (C9), 35,2 (C4), 32,6 (C8), 29,6 (C8'), 26,9 (C8''), 18,7 (C1) e 14,6 (C13) PPM.

É possível observar para o espectro de infravermelho (IV) uma banda de estiramento O-H de álcool (fenol) em  $3453\text{ cm}^{-1}$ , que não se encontra alargada devido à dificuldade que essas moléculas têm de interagir entre si por ligação de hidrogênio devido ao impedimento estérico, a banda de estiramento N-H de amina primária em  $3472\text{ cm}^{-1}$ , estiramento  $\text{C}_{sp^2}\text{-H}$  em  $3076\text{ cm}^{-1}$ , estiramento de  $\text{C}_{sp^3}\text{-H}$  em  $2988$  e  $2968\text{ cm}^{-1}$ , estiramento de C=O de éster em  $1606\text{ cm}^{-1}$ , já que esta é uma carbonila com ligação mais fraca devido à ressonância, estiramento de C=O de cetona em  $1681\text{ cm}^{-1}$ , estiramento da ligação C=C aromática em  $1485\text{ cm}^{-1}$  e bandas de estiramento assimétrico das ligações C-O-C (éster) em  $1193$  e  $1060\text{ cm}^{-1}$ . A banda em  $860$

cm<sup>-1</sup> provavelmente se refere ao dobramento fora do plano de anel aromático com padrão de substituição *para*. Estes resultados além de mostrar a obtenção da molécula esperada, é corroborado por trabalhos anteriores, como o de KO; YAO (2006).

### Ensaio antimicrobianos

Para os ensaios antimicrobianos, o teste de difusão em ágar não mostrou-se adequado para a avaliação do composto sintetizado, possivelmente pela impossibilidade de difusão deste em meio sólido. Entretanto quando avaliado pela técnica de diluição seriada o composto apresenta atividade antimicrobiana, estatisticamente significativa, contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*, conforme se observa nas Tabelas 1 e 2.

Atividade antimicrobiana					
	Tempo (h)	(Unidades Formadoras de Colônias, UFC)			
		Controle	Composto	CV (%)	P valor
*	0	5,03	4,86	3,50	0,294
*	24	10,35	2,51	70,69	0,004
*	48	18,75	0,00	109,58	0,011

**Tabela 1.** Efeito do composto 4-(4-hidroxifenil)-2,7,7-trimetil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3-acido carboxílico etil éster e do controle positivo sobre a viabilidade e multiplicação de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. CV (%): Coeficiente de Variação. P valor: Nível Descritível. \* Dados normalizados.

Atividade antimicrobiana					
	Tempo (h)	(Unidades Formadoras de Colônias, UFC)			
		Controle	Composto	CV (%)	P valor
*	0	4,53	4,52	0,74	0,836
*	24	12,27	0,00	109,55	0,011
*	48	18,23	0,00	109,67	0,011

**Tabela 2.** Efeito do composto 4-(4-hidroxifenil)-2,7,7-trimetil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3-acido carboxílico etil éster e do controle positivo sobre a viabilidade e multiplicação de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. CV (%): Coeficiente de Variação. P valor: Nível Descritível. \* Dados normalizados.

Para ambas as bactérias no tempo zero não há diferença significativa, o que já era esperado, uma vez que as bactérias ainda não tiveram tempo de entrar em contato com a molécula. Entretanto, quando as placas contendo TSA são semeadas e incubadas nos tempos de 24h e 48h, respectivamente, observa-se resultados significativos tanto para *S. aureus*

quanto para *P. aeruginosa*. A primeira cepa bacteriana tem uma diminuição do número de células viáveis em 24h e a eliminação em 48h, enquanto a segunda é totalmente eliminada no tempo de 24h de tratamento, mostrando que o composto tem ação microbicida e esta ação é mais acentuada para a bactéria Gram negativa avaliada, quando comparada com a Gram positiva. As cepas Gram negativas são sabidamente mais difíceis de eliminar do organismo humano (JUBEH; BREIJYEH; KARAMAN, 2020).

Sugere-se, portanto, que o composto no primeiro teste não tenha gerado resposta por que não conseguiu se difundir pelo meio de cultura, porém apresentou efetividade como antimicrobiano quando avaliado em ambiente líquido, resultados estes que são corroborados por dados de literatura (JAMALE *et al.*, 2019), comprovando que derivados de polihidroquinolinas tem potencial promissor como antimicrobiano e antituberculose.

LADANI *et al.* (2011) testaram vários derivados de polihidroquinolinas e mostraram que estes compostos apresentaram ação antimicrobiana, utilizando como controle positivo a ampicilina, e observaram que a ação fungicida destes compostos foi maior que a ação bactericida, embora tenham apresentado resultados positivos para ambos, mostrando o potencial destes compostos a ser mais bem explorado.

KALARIA; SATASIA; RAVAL (2014) realizaram uma análise mais completa sobre derivados polihidroquinolínicos incorporados com imidazopirazol e demonstraram ação antibacteriana, antifúngica, contra *M. tuberculosis* H37Rv e também atividade antimalárica. Todos os compostos testados apresentaram atividade inibitória moderada a muito boa contra bactérias, sendo a maioria eficiente contra cepas Gram positivas: *Bacillus subtilis* e *Clostridium tetani* em comparação com o controle positivo (ampicilina) e contra bactérias Gram negativas: *Salmonella typhi* e *Escherichia coli*.

Recentemente (MANE *et al.*, 2021), foram realizados testes antimicrobianos de vários derivados de polihidroquinolinas contra cepas de bactérias Gram positivas e Gram negativas e contra fungos filamentosos e leveduras para determinação da concentração inibitória mínima (MIC) e, segundo os autores, aqueles derivados que possuíam como grupos funcionais substituídos no aldeído aromático: nitro, cloro, bromo e flúor obtiveram excelentes resultados, desempenhando um papel significativo na atividade inibitória microbiana, corroborando também os dados do presente trabalho.

### **Efeitos sobre a coagulação de plasma humano citratado**

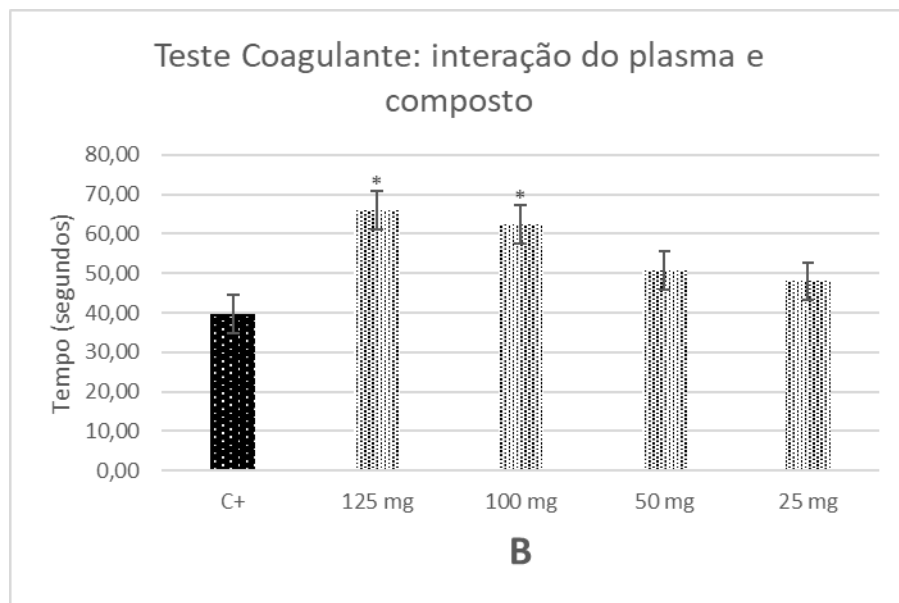
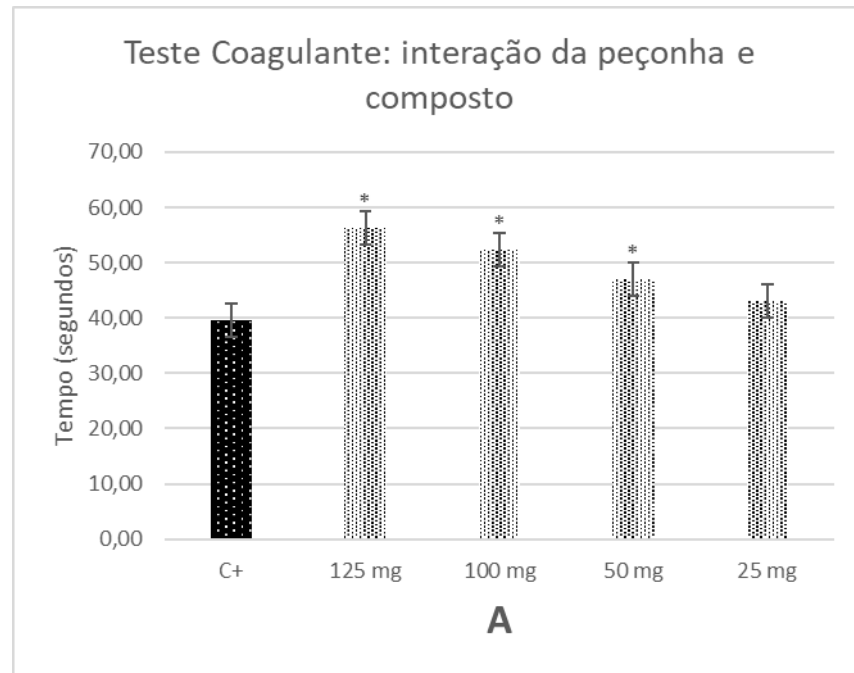
A molécula isoladamente não induziu coagulação ao plasma humano citratado (dados não mostrados). Entretanto, quando incubada previamente com a peçonha de *Bothrops moojeni* (40µg), a molécula sintetizada foi capaz de prolongar o tempo de coagulação do plasma, induzido pela peçonha em 16,66, 12,66 e 7,33 segundos ( $p < 0.05$ ) nas doses de 125, 100 e 50 mg, respectivamente, quando comparadas ao controle (Figura 3A).

Quando a peçonha é adicionada posteriormente no plasma previamente incubado com o composto, apenas as doses de 125 e 100 mg apresentam valores estatisticamente diferentes ( $p < 0.05$ ) do controle positivo (*Bothrops moojeni* 40µg), e a dose de 50 apresenta uma tendência ( $p < 0.10$ ). A molécula na dose de 125 mg prolonga em 26,33 segundos, enquanto na dose de 100 mg prolonga em 12,66 segundos a coagulação induzida pela peçonha (Figura 3B). Com relação à dose de 50 mg, a tendência é de retardar a coagulação em aproximadamente 11 segundos, quando comparada ao controle positivo.

Pelos resultados apresentados neste experimento podemos inferir que a molécula sintetizada pode interagir com componentes da cascata de coagulação presentes no plasma humano, assim como com proteases (principalmente serinoproteases coagulantes) presentes na peçonha. De acordo com a Encyclopædia Britannica (FEDAN, 2019) medicamentos anticoagulantes atuam na prevenção da formação de coágulos no sangue, e são receitados a pacientes que tem alto risco de desenvolverem doenças relacionadas a tal condição (ex., derrame, ataque cardíaco, trombose). Alguns anticoagulantes podem induzir efeitos adversos que incluem a presença de sangue em urina e fezes, sangramentos pelo nariz e gengiva, hematomas severos e até mesmo resultar no desenvolvimento de osteoporose (ELANGO *et al.*, 2021; SIGNORELLI *et al.*, 2019; VEIRAIHAH; ROUTLEDGE, 2009). Desta forma, pesquisar e desenvolver novos medicamentos é de suma valia no setor farmacêutico, sempre buscando melhores atividades com doses menores e menos efeitos adversos.

Como exemplo, os autores (DRABINA; FEIXOVÁ; SEDLÁK, 2019) desenvolveram um método novo de sintetizar o medicamento Rivaroxabana, o qual é utilizado na tratamento e prevenção de trombose venosa profunda e embolia pulmonar. Neste estudo, os autores descreveram uma síntese envolvendo apenas 6 etapas e com reagentes de baixo custo e fácil acesso.





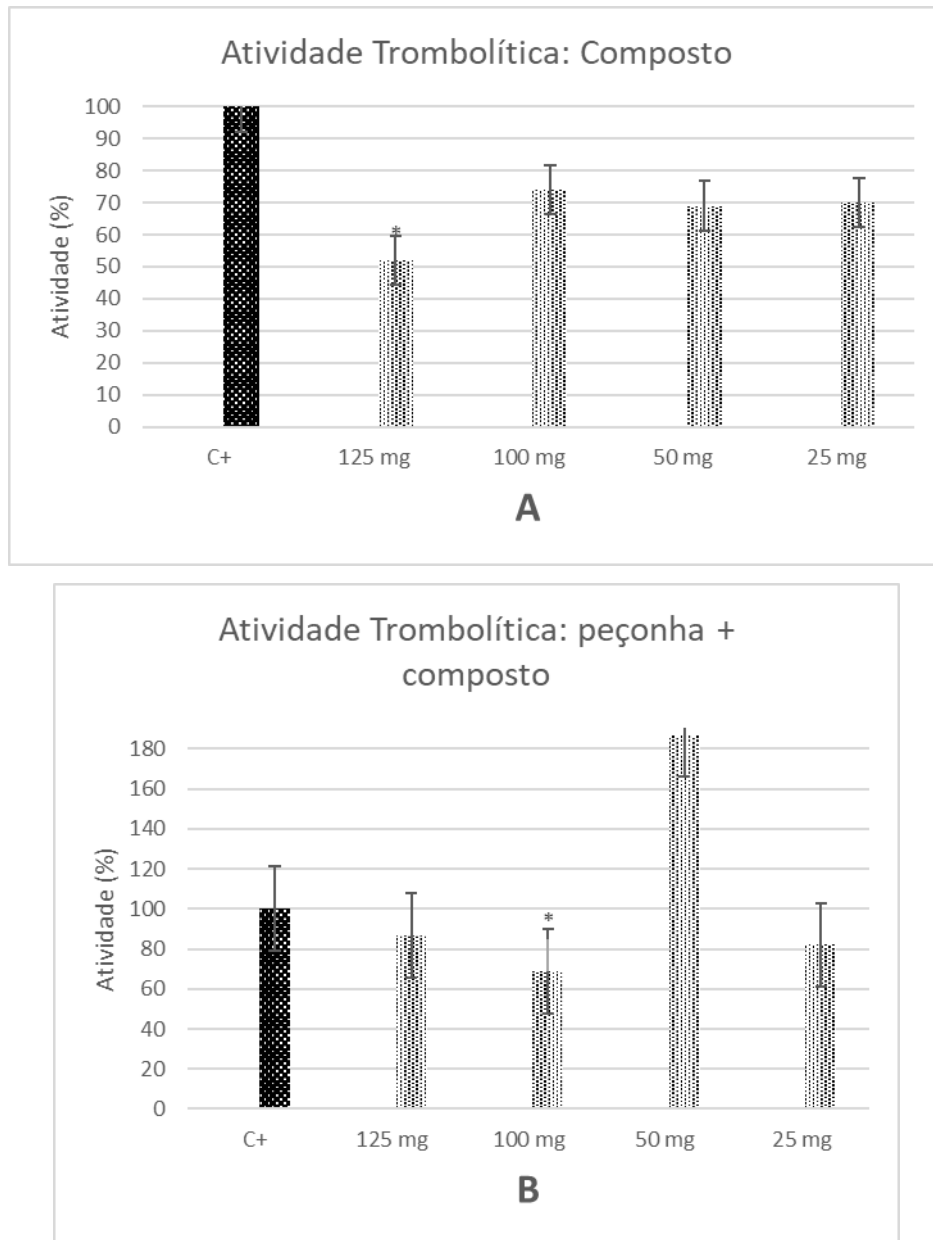
**Figura 3.** (A) Efeitos da molécula sintetizada 4-(4-hidroxifenil)-2,7,7-trimetil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-acido carboxílico etil éster sobre a coagulação de plasma humano citratado induzida por peçonha de *Bothrops moojeni*. Controle positivo (C+): peçonha de *Bothrops moojeni* (40 µg). Amostras: composto nas doses 125, 100, 50 e 25mg, previamente incubado com a peçonha e posteriormente adicionados ao plasma para a contagem do tempo. (B) Efeito do composto 4-(4-hidroxifenil)-2,7,7-trimetil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-acido carboxílico etil éster sobre a coagulação de plasma humano citratado, induzida por peçonha de *Bothrops moojeni*. Controle positivo (C+): peçonha de *Bothrops moojeni* (40 µg). Amostras: composto nas doses 125, 100, 50 e 25 mg,

previamente incubado com o plasma e posterior adição da peçonha e contagem do tempo. Dados representam as médias e desvio padrão das triplicatas. \*Estatisticamente significativa – difere do controle positivo ( $p < 0,05$ ).

### **Efeitos sobre trombos sanguíneos humanos e sobre a atividade trombolítica induzida por proteases**

4-(4-hidroxifenil)-2,7,7-trimetil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-acido carboxílico etil éster quando testada sobre trombos sanguíneos humanos apresentou resultado estatisticamente diferente do controle positivo, apenas para a dose de 125 mg ( $p < 0,05$ ), a qual teve 52% de atividade trombolítica comparada ao controle (peçonha de *Bothrops moojeni*). As outras doses testadas, embora apresentassem atividade sobre trombos menores do que o controle, não diferiram estatisticamente do mesmo (Figura 4A). Esse resultado é condizente com o apresentado na atividade coagulante, corroborando a existência de interações entre o composto e moléculas presentes no sangue, possivelmente proteínas. Vale ressaltar que embora a atividade encontrada para a maior dose tenha sido diferente e menor do que o controle, isso é considerado um ponto positivo, visto que os fármacos são elaborados pensando em doses 50% efetivas para não afetarem processos metabólicos/fisiológicos normais e não induzir efeitos adversos.

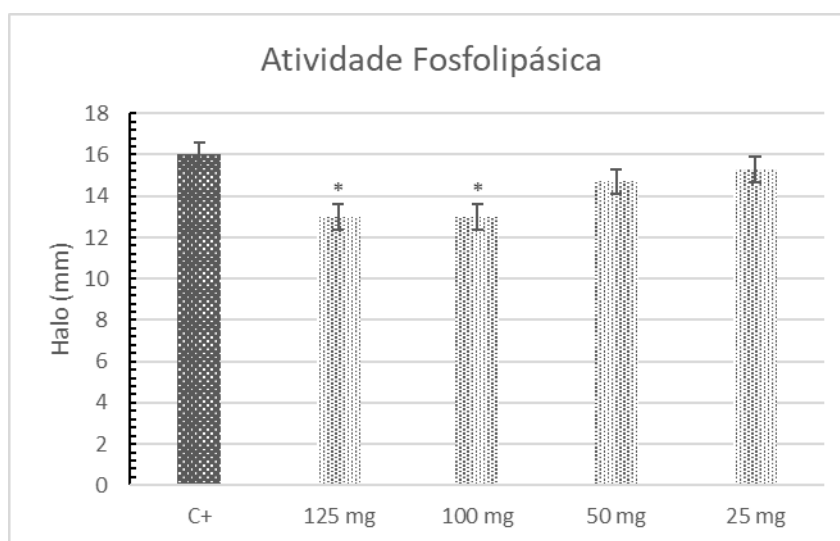
Essa mesma molécula, quando testada sobre a atividade trombolítica induzida por proteases da peçonha de *Bothrops moojeni* (20 $\mu$ g), apresentou resultados diferentes. Apenas a dose de 100 mg foi estatisticamente diferente do controle positivo ( $p < 0,05$ ), reduzindo o efeito da peçonha para 69% (Figura 4B). Embora a dose de 50 mg tenha apresentado valor de 187%, ou seja, potencializando a atividade trombolítica, o resultado não foi estatisticamente diferente do controle. Assim, destaca-se a necessidade de novos estudos que possibilitem o entendimento dos mecanismos de ação dessa molécula, tornando-a uma candidata à futuras aplicações farmacêuticas.



**Figura 4.** (A) Efeitos sobre trombos sanguíneos humanos da molécula 4-(4-hidroxifenil)-2,7,7-trimetil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-acido carboxílico etil éster. Controle positivo (C+): *Bothrops moojeni* (20  $\mu$ g) = 100% dissolução do trombo. Amostras: composto nas doses 125, 100, 50 e 25 mg. (B) Efeito da 4-(4-hidroxifenil)-2,7,7-trimetil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-acido carboxílico etil éster sobre a atividade trombolítica induzida por proteases da peçonha de *Bothrops moojeni*. Controle positivo (C+): *Bothrops moojeni* (20  $\mu$ g) = 100% dissolução do trombo. Amostras: composto nas doses 125, 100, 50 e 25 mg, previamente incubado com a peçonha. Dados representam as médias e desvio padrão das triplicatas. \*Estatisticamente significativa – difere do controle positivo ( $p < 0,05$ ).

### Efeitos sobre a atividade de fosfolipases A<sub>2</sub>

A molécula sintetizada não teve efeito sobre os fosfolipídios (dados não mostrados). Entretanto, exerceu ação inibitória sobre as fosfolipases A<sub>2</sub>, quando previamente incubada com a peçonha de *Bothrops moojeni* (20µg). As doses de 125 e 100 mg reduziram a atividade das fosfolipases ( $p < 0,05$ ), formando halos 3 mm menores do que o controle positivo (16mm) (Figura 5). Pode-se observar uma tendência ( $p < 0,10$ ) na dose de 50 mg, na qual a média dos halos formados foi de 14,7mm.



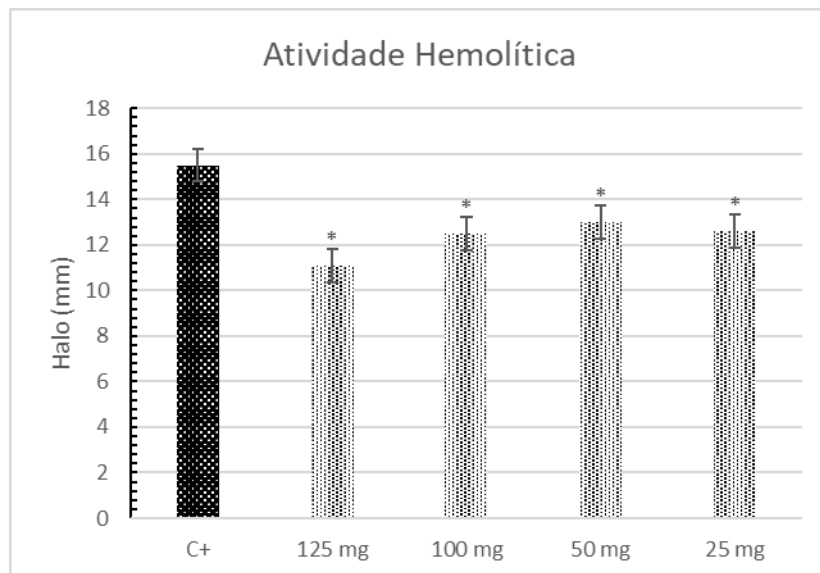
**Figura 5.** Efeitos da molécula 4-(4-hidroxifenil)-2,7,7-trimetil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3-acido carboxílico etil éster sobre a atividade de fosfolipases A<sub>2</sub> de *Bothrops moojeni*. Controle positivo (C+): peçonha de *Bothrops moojeni* (20 µg). Amostras: composto nas doses 125, 100, 50 e 25mg, previamente incubado com a peçonha. Dados representam as médias e desvio padrão das triplicatas. \*Estatisticamente significativa – difere do controle positivo ( $p < 0,05$ ).

Sintetizar moléculas baseadas em compostos presentes na natureza que já possuem suas atividades descritas é importante no desenvolvimento de possíveis novos fármacos. Na natureza existem diversos compostos, que assim como o deste trabalho, possuem a presença de nitrogênio (e.g., alcaloides) e apresentam atividades biológicas de interesse médico-científico. Como exemplo, temos a piperina, um alcaloide presente na pimenta do reino, que apresenta propriedades anti-inflamatórias. SON *et al.* (2014) testaram sua atividade em

fosfolipases A<sub>2</sub> citosólicas em plaquetas e comprovaram a redução na atividade de cPLA<sub>2</sub> exercida pela piperina em concentrações entre 100 e 300 µM. SILVA *et al.* (2017) demonstraram a atividade inibitória sobre fosfolipases A<sub>2</sub> do alcalóide homarine, presente nos extratos aquosos de *Actinia equina* (0,5 e 1 mg/mL) e *Anemonia sulcata* (1 mg/mL). Os autores também testaram o homarine isolado e observaram seu efeito inibidor sobre PLA<sub>2</sub>s nas duas maiores concentrações testadas (0,5 e 1 mg/mL).

### Atividade citotóxica sobre eritrócitos humanos

Da mesma forma como a atividade sobre fosfolipases A<sub>2</sub>, o composto sintetizado isoladamente não causou atividade citotóxica sobre eritrócitos humanos (dados não mostrados). Contudo, quando avaliado sobre um indutor de atividade citotóxica (peçonha de *Bothrops moojeni* - 20µg), o composto apresentou efeito protetor, reduzindo a lise dos eritrócitos em todas as doses testadas (p<0,05). A peçonha de *B. moojeni* formou halos com diâmetro médio de 15,5 mm, enquanto os tratamentos tiveram halos de 11,1, 12,5, 13, e 12,6 mm para as doses de 125, 100, 50 e 25 mg, respectivamente (Figura 6).



**Figura 6.** Efeitos da molécula 4-(4-hidroxifenil)-2,7,7-trimetil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3-acido carboxílico etil éster sobre a atividade citotóxica induzida por peçonha de *Bothrops moojeni* em eritrócitos humanos. Controle positivo (C+): peçonha de *Bothrops moojeni* (20 µg). Amostras: composto nas doses 125, 100, 50 e 25mg, previamente incubado com a peçonha. Dados representam as médias e desvio padrão das triplicatas. \*Estatisticamente significativa – difere do controle positivo (p <0,05).

KARAD *et al.* (2015) sintetizaram diversos derivados polihidroquinolínicos utilizando um método de ciclocondensação em um pote com três componentes e piperidina como catalisador. Os autores demonstraram as atividades que os compostos exibiam, entre elas antimalárica, antibacteriana e antituberculose. Os compostos também apresentaram toxicidade sobre células de *Schizosaccharomyces pombe*.

## CONCLUSÃO

No presente trabalho obtivemos a molécula, 4-(4-hidroxifenil)-2,7,7-trimetil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-acido carboxílico etil éster, derivada de polihidroquinolinas, sem a utilização de solventes e catalizadores, conforme os princípios da química verde. A molécula exibe significativa atividade antimicrobiana, considerando as dosagens de antibióticos utilizados clinicamente. Em adição, a molécula apresenta propriedades biológicas de interesse farmacêutico, uma vez que, exerceu efeito modulador sobre fosfolipases A<sub>2</sub> e proteases, enzimas estas envolvidas em processos como coagulação sanguínea, fibrinólise, inflamação, regeneração de tecidos e resposta imunológica. Entretanto, novos estudos são necessários para ampliar o entendimento sobre os mecanismos de ação desta molécula, identificar moléculas e células alvos, definir a efetividade e biodisponibilidade de diferentes doses, possibilitando por fim o desenvolvimento futuro de formulações aplicáveis em humanos.

## REFERENCES

- “ANTICOAGULANT”. ENCYCLOPEDIA BRITANNICA. In: FEDAN, Jeffrey S. *Encyclopedia Britannica*. [S.l: s.n.], 2019. p. 3.
- CINTRA, A. C. O. *et al.* Batroxase, a new metalloproteinase from *Bothrops atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity. *Toxicon*, v. 60, n. 1, p. 70–82, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.03.018>>.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). *Clinical and Laboratory Standards Institute Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically Standard, Approval CDM-A.; M07 Methods for dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*. [S.l: s.n.], 2018.
- CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved Standard-Eleventh Edition. Clinical and Laboratory Standards Institue.* . [S.l: s.n.], 2018.

- DEKAMIN, M. G. *et al.* Alginic acid: A mild and renewable bifunctional heterogeneous biopolymeric organocatalyst for efficient and facile synthesis of polyhydroquinolines. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 108, p. 1273–1280, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.050>>.
- DRABINA, P.; FEIXOVÁ, V.; SEDLÁK, M. New synthetic strategy for preparation of the anticoagulant drug Rivaroxaban via an asymmetric Henry reaction. *Tetrahedron Letters*, v. 60, n. 2, p. 99–101, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2018.11.067>>.
- ELANGO, K. *et al.* The Effects of Warfarin and Direct Oral Anticoagulants on Systemic Vascular Calcification : A Review. *Cells*, v. 10, p. 1–14, 2021.
- GUTIÉRREZ, J. *et al.* An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon*, v. 26, n. 4, p. 411–413, jan. 1988.
- JAMALE, D. K. *et al.* Glycerol Mediated Synthesis, Biological Evaluation, and Molecular Docking Study of 4-(1H-pyrazol-4-yl)-polyhydroquinolines as Potent Antitubercular Agents. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, v. 56, n. 2, p. 608–618, 2019.
- JUBEH, B.; BREIJYEH, Z.; KARAMAN, R. Resistance of gram-positive bacteria to current antibacterial agents and overcoming approaches. *Molecules*, v. 25, n. 12, p. 1–23, 2020.
- KALARIA, P. N.; SATASIA, S. P.; RAVAL, D. K. Synthesis, characterization and pharmacological screening of some novel 5-imidazopyrazole incorporated polyhydroquinoline derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 78, p. 207–216, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.02.015>>.
- KARAD, S. C. *et al.* Green synthesis and pharmacological screening of polyhydroquinoline derivatives bearing a fluorinated 5-aryloxy pyrazole nucleus. *RSC Advances*, v. 5, n. 21, p. 16000–16009, 2015.
- KO, S.; YAO, C. F. Ceric Ammonium Nitrate (CAN) catalyzes the one-pot synthesis of polyhydroquinoline via the Hantzsch reaction. *Tetrahedron*, v. 62, n. 31, p. 7293–7299, 2006.
- KUMAR, S. *et al.* An efficient, catalyst- and solvent-free, four-component, and one-pot synthesis of polyhydroquinolines on grinding. *Tetrahedron*, v. 64, n. 3, p. 536–542, 2008.
- LADANI, N. K. *et al.* Microwave assisted synthesis of novel Hantzsch 1,4-dihydropyridines, acridine-1,8-diones and polyhydroquinolines bearing the tetrazolo[1,5-a] quinoline moiety and their antimicrobial activity assess. *Chinese Chemical Letters*, v. 22, n. 12, p. 1407–1410, 2011.
- MANE, P. *et al.* Biogenic synthesis of ZnO nanoparticles from *Parthenium hysterophorus* extract and its catalytic activity for building bioactive polyhydroquinolines. *Research on*

*Chemical Intermediates*, v. 47, n. 5, p. 1743–1758, 2021. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1007/s11164-020-04365-8>>.

MOURAO, P. A. S. *et al.* Structure and anticoagulant activity of a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm. Sulfated fucose branches on the polysaccharide account for its high anticoagulant action. *Journal of Biological Chemistry*, v. 271, n. 39, p. 23973–23984, 1996.

MURTHY, Y. L. N. *et al.* Design, solvent free synthesis, and antimicrobial evaluation of 1,4 dihydropyridines. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 22, n. 18, p. 6016–6023, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.05.003>>.

NGUYEN, V. T.; NGUYEN, H. T.; TRAN, P. H. One-pot three-component synthesis of 1-amidoalkyl naphthols and polyhydroquinolines using a deep eutectic solvent: a green method and mechanistic insight. *New Journal of Chemistry*, v. 45, n. 4, p. 2053–2059, 2021.

PAKDAMAN, F.; ALLAMEH, S.; SHAKER, M. Synthesis of Pharmaceutical Polyhydroquinolines Catalyzed by Cobalt ( II ) Complex as Reusable Catalyst. v. 6, n. 1, p. 192–195, 2018.

SAINI, A.; KUMAR, S.; SANDHU, J. S. Hantzsch reaction: Recent advances in Hantzsch 1,4-dihydropyridines. *Journal of Scientific and Industrial Research*, v. 67, n. 2, p. 95–111, 2008.

SIGNORELLI, S. S. *et al.* Anticoagulants and osteoporosis. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 21, p. 1–12, 2019.

SILVA, T. C. *et al.* In vitro anti-inflammatory and cytotoxic effects of aqueous extracts from the edible sea anemones *Anemonia sulcata* and *Actinia equina*. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 3, 2017.

SON, D. J. *et al.* Piperine Inhibits the Activities of Platelet Cytosolic Phospholipase A2 and Thromboxane A2 Synthase without Affecting Cyclooxygenase-1 Activity: Different Mechanisms of Action Are Involved in the Inhibition of Platelet Aggregation and Macrophage Inflammation. *Nutrients*, v. 6, n. 8, p. 3336–3352, 2014.

VEIRAIHAH, A.; ROUTLEDGE, P. A. Adverse effects of anticoagulants. *Adverse Drug Reaction Bulletin*, v. 1, n. 258, p. 991–994, 2009.

## REFERENCIAS

ABDEL-RAZEK, A. S. *et al.* Microbial natural products in drug discovery. *Processes*, v. 8, n.



4, p. 1–19, 2020.

ABE, Y. *et al.* Molecular basis of ML-236B production in the high-producing mutant No. 41520 of *Penicillium citrinum*. *The Journal of general and applied microbiology*, v. 50, n. 3, p. 169–76, 2004.

ADAMSKI, Z. *et al.* Biological activities of alkaloids: From toxicology to pharmacology. *Toxins*, v. 12, n. 4, p. 10–13, 2020.

AHMED, A. *et al.* The Importance of Six Membered Saturated Nitrogen Containing Ring in Psychological disorders. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, v. 4, n. 1, p. 872–880, 2012.

ALBARICI, T. R. *et al.* Cumarinas e alcaloides de *Rauia resinosa* (rutaceae). *Quimica Nova*, v. 33, n. 10, p. 2130–2134, 2010.

ALMEIDA, A. I. S.; SILVA, A. M. S.; CAVALEIRO, J. A. S. Reactivity of 3-iodo-4-quinolones in heck reactions: Synthesis of novel (E)-3-styryl-4-quinolones. *Synlett*, n. 3, p. 462–466, 2010.

ANDRIOLE, V. T. The Quinolones : Past , Present , and Future. v. 41, n. Suppl 2, p. 113–119, 2005.

ANISZEWSKI, T. *Alkaloids - Secrets of Life: Alkaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role*. [S.l: s.n.], 2007.

ARAYNE, M. S. *et al.* RP-HPLC method for the quantitative determination of fexofenadine hydrochloride in coated tablets and human serum. *Medicinal Chemistry Research*, v. 20, n. 1, p. 55–61, 2011.

BAKER, D. D. *et al.* The value of natural products to future pharmaceutical discovery. *Natural Product Reports*, v. 24, n. 6, p. 1225–1244, 2007.

BALAKRISHNAN, P. *et al.* Formulation and in vitro assessment of minoxidil niosomes for enhanced skin delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 377, n. 1–2, p. 1–8, 2009.

BALDWIN, D. *et al.* Paroxetine in social phobia/social anxiety disorder: Randomised, double-blind, placebo-controlled study. *British Journal of Psychiatry*, v. 175, n. AUG., p. 120–126, 1999.

BARREIRO, E. J. *Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos*. 2. ed. [S.l.: s.n.], 2008.

BETECK, R. M. *et al.* Easy-to-access quinolone derivatives exhibiting antibacterial and anti-parasitic activities. *Molecules*, v. 26, n. 4, p. 1–19, 2021.

BHAMBHANI, S.; KONDHARE, K. R.; GIRI, A. P. Review: Diversity in Chemical Structures and Biological Properties of Plant Alkaloids. *Molecules*, v. 26, n. 3374, p. 1–29, 2021.

BLACKBURNE, I. D.; KATRITZKY, A. R.; TAKEUCHI, Y. Conformation of Piperidine and of Derivatives with Additional Ring Heteroatoms. *Accounts of Chemical Research*, v. 8, n. 9, p. 300–306, 1975.

BRAHMACHARI, G. *et al.* In vitro evaluation and in silico screening of synthetic acetylcholinesterase inhibitors bearing functionalized piperidine pharmacophores. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 23, n. 15, p. 4567–4575, 2015.

BRAHMACHARI, G.; DAS, S. Bismuth nitrate-catalyzed multicomponent reaction for efficient and one-pot synthesis of densely functionalized piperidine scaffolds at room temperature. *Tetrahedron Letters*, v. 53, n. 12, p. 1479–1484, 2012.

BRAVO, H. *et al.* Phytotoxicity of indole alkaloids from cereals. *Revista Latinoamericana de Química*, v. 38, n. 2, p. 123–129, 2010.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman*. 12. ed. Porto Alegre: [s.n.], 2012.

BULL, J. A. *et al.* Synthesis of pyridine and dihydropyridine derivatives by regio- and stereoselective addition to n-activated pyridines. *Chemical Reviews*, v. 112, n. 5, p. 2642–2713, 2012.

BUNSUPA, S.; YAMAZAKI, M.; SAITO, K. Lysine-derived Alkaloids: Overview and

Update on Biosynthesis and Medicinal Applications with Emphasis on Quinolizidine Alkaloids. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 17, n. 12, p. 1002–1012, 2017.

BUNSUPA, S.; YAMAZAKI, M.; SAITO, K. Quinolizidine alkaloid biosynthesis: recent advances and future prospects. *Frontiers in Plant Science*, v. 3, n. October, p. 1–7, 2012.

CALIXTO, J. B. *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*. 1. ed. Chapecó: [s.n.], 2001.

CARBALLEIRA, L.; PÉREZ-JUSTE, I. Influence of calculation level and effect of methylation on axial/equatorial equilibria in piperidines. *Journal of Computational Chemistry*, v. 19, n. 8, p. 961–976, 1998.

CELESTINI, P. *et al.* Trans -6-Aminocyclohept-3-enols , a New Designed Polyfunctionalized Chiral Building Block for the Asymmetric 2-Substituted-4-hydroxypiperidines. *Organic Letters*, v. 4, n. 8, p. 1991–1994, 2002.

CHAND, P. *et al.* Systematic structure-based design and stereoselective synthesis of novel multisubstituted cyclopentane derivatives with potent antiinfluenza activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 44, n. 25, p. 4379–4392, 2001.

CHANG, Y. F. *et al.* Parallel synthesis of natural product-like polyhydroxylated pyrrolidine and piperidine alkaloids. *Molecular Diversity*, v. 15, n. 1, p. 203–214, 2011.

CHAST, F. *General Aspects of Medicinal Chemistry*. 3. ed. [S.l: s.n.], 2008.

CHEN, S. *et al.* Regio- and Diastereoselective Synthesis of Highly Substituted, Oxygenated Piperidines from Tetrahydropyridines. *Journal of Organic Chemistry*, v. 80, n. 13, p. 6660–6668, 2015.

CHOVANCOVA, B. *et al.* Calcium signaling affects migration and proliferation differently in individual cancer cells due to nifedipine treatment. *Biochemical Pharmacology*, v. 171, n. September 2019, p. 1–15, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.113695>>.

CORREIA, C. R. D. *Síntese Estereoseletiva de Alcaloides e N-Heterociclos*. São Carlos: [s.n.], 2001.

COY, C. A.; SUAREZ, L. E. C. METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS DE LOS GÉNEROS *Raputia* y *Esenbeckia*. *Scientia et Technica*, v. XIII, n. 33, p. 337–338, 2007.

DAVIS, F. A.; CHAO, B.; RAO, A. Intramolecular Mannich reaction in the asymmetric synthesis of polysubstituted piperidines: Concise synthesis of the dendrobate alkaloid (+)-241D and its C-4 epimer. *Organic Letters*, v. 3, n. 20, p. 3169–3171, 2001.

DAVOODNIA, A.; KHASHI, M.; TAVAKOLI-HOSEINI, N. Tetrabutylammonium hexatungstate [TBA]<sub>2</sub>[W<sub>6</sub>O<sub>19</sub>]: Novel and reusable heterogeneous catalyst for rapid solvent-free synthesis of polyhydroquinolines via unsymmetrical Hantzsch reaction. *Chinese Journal of Catalysis*, v. 34, p. 1173–1178, 2013.

DEKAMIN, M. G. *et al.* Alginic acid: A mild and renewable bifunctional heterogeneous biopolymeric organocatalyst for efficient and facile synthesis of polyhydroquinolines. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 108, p. 1273–1280, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.050>>.

DELCOUR, A. H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1794, n. 5, p. 808–816, 2009.

DEWICK, P. M. . *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. 2. ed. University of Nottingham, UK: [s.n.], 2002.

DOS SANTOS, S. C. *et al.* Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos de *Avicennia schaueriana* Stapf & Leechm. ex Moldenke, Verbenaceae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 20, n. 1, p. 124–129, 2010.

DUA, R. *et al.* Pharmacological Significance of Synthetic Heterocycles Scaffold: A Review. *Advances in Biological Research*, v. 5, n. 3, p. 120–144, 2011.

DUARTE, P. D.; SANGI, D. P.; CORRÊA, A. G. Microwave-Assisted Synthesis of N - Heterocyclic Compounds. *Revista Virtual de Química*, v. 2, n. 3, p. 204–213, 2010.

DZIDIC, S.; SUSKOVIC, J.; KOS, B. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. *Food, Technology and Biotechnology*, v. 46, n. 1, p. 11–21, 2008.

EDRAKI, N. *et al.* Dihydropyridines: evaluation of their current and future pharmacological applications. *Drug Discovery Today*, v. 14, n. 21–22, p. 1058–1066, 2009.

ELSTON, J. W. T.; BARLOW, G. D. Community-associated MRSA in the United Kingdom. *Journal of Infection*, v. 59, n. 3, p. 149–155, 2009.

EMAMI, S.; SHAFIEE, A.; FOROUMADI, A. Quinolones: Recent Structural and Clinical Developments. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, n. October, p. 123–136, 2010.

ENSERINK, M. GLOBAL HEALTH: Some Neglected Diseases Are More Neglected Than Others. *Science*, v. 323, n. 5915, p. 700–700, 2009.

FATTORUSSO, E.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O. *Modern Alkaloids: Structure, Isolation, Synthesis, and Biology*. Wiley-VCH ed. [S.l: s.n.], 2007.

FISCHER, R. *et al.* BIPHENYL-SUBSTITUTED 4-HYDROXY-QUINOLONES AND THEIR USE AS PESTICIDES AND HERBICIDES. . [S.l: s.n.], 2003

FUSTERO, S. *et al.* Enantioselective Organocatalytic Intramolecular Aza-Michael Reaction: a Concise Synthesis of (+)-Sedamine, (+)-Allosedamine, and (+)-Coniine. *Organic Letters*, v. 9, n. 25, p. 5283–5286, 2007.

GOSS, P. E. *et al.* Inhibitors of Carbohydrate processing: a new class of Anticancer Agents. *Clinical Cancer Research*, v. 1, n. September, p. 935–944, 1995.

GREEN, B. T. *et al.* Piperidine alkaloids: Human and food animal teratogens. *Food and Chemical Toxicology*, v. 50, n. 6, p. 2049–2055, 2012.

GUIMARÃES, D. O.; DA SILVA MOMESSO, L.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Quimica Nova*, v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010.

HAN, X. H. *et al.* Quinolone alkaloids from *evodiae fructus* and their inhibitory effects on monoamine oxidase. *Archives of pharmacal research*, v. 30, n. 4, p. 397–401, 2007.

HARKISS, A. H.; SUTHERLAND, A. Access to 2,6-Disubstituted 4-Oxopiperidines Using a 6- Endo - trig Cyclization: Stereoselective Synthesis of Spruce Alkaloid and (+)-241D. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 83, n. 1, p. 535–542, 2018.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*, v. 13, n. 19–20, p. 894–901, 2008.

HEAL, D. J. P. Methylphenidate and its isomers: Their role in the treatment of attention-deficit hyperactivity disorder using a transdermal delivery system. *CNS Drugs*, v. 20, n. 9, p. 713–738, 2006.

HERRLING, P. L. Financing R&D for neglected diseases. *NATURE REVIEWS / DRUG DISCOVERY*, v. 8, n. February, p. 91–91, 2009.

HO, B.; MICHAEL CRIDER, A.; STABLES, J. P. Synthesis and structure-activity relationships of potential anticonvulsants based on 2-piperidinecarboxylic acid and related pharmacophores. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 36, n. 3, p. 265–286, 2001.

HOLM, M. K. A. *et al.* Prevalence of MRSA nasal carriage among pregnant women in Copenhagen. *PLoS ONE*, v. 16, n. 1 January, p. 1–6, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0246343>>.

ISAMBERT, N. *et al.* Multicomponent reactions and ionic liquids: a perfect synergy for eco-compatible heterocyclic synthesis. *Chemical Society Reviews*, v. 40, n. 3, p. 1347–1357, 2011.

JAMALE, D. K. *et al.* Glycerol Mediated Synthesis, Biological Evaluation, and Molecular Docking Study of 4-(1H-pyrazol-4-yl)-polyhydroquinolines as Potent Antitubercular Agents. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, v. 56, n. 2, p. 608–618, 2019.

JANA, S.; SARKAR, S.; MORRIS, S. A. Recent developments towards the synthesis of paroxetine: A 3,4-disubstituted piperidine. *Tetrahedron*, v. 76, n. 25, p. 1–14, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tet.2020.131215>>.

JOSHI, V. M.; PAWAR, R. P. Microwave Assisted Expeditious Synthesis of Bioactive Polyhydroquinoline Derivatives. *Eur. Chem. Bull.*, v. 2, n. 9, p. 679–682, 2013.

KAWAMURA, S. *et al.* N-Heterocycle-Forming Amino/Carboperfluoroalkylations of Aminoalkenes by Using Perfluoro Acid Anhydrides: Mechanistic Studies and Applications Directed Toward Perfluoroalkylated Compound Libraries. *Journal of Organic Chemistry*, v. 82, n. 23, p. 12539–12553, 2017.

KAWASE, M. *et al.* 3,5-Diacetyl-1,4-dihydropyridines: Synthesis and MDR reversal in tumor cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 10, n. 1 A, p. 1051–1055, 2002.

KHAN, A. T.; KHAN, M. M.; BANNURU, K. K. R. Iodine catalyzed one-pot five-component reactions for direct synthesis of densely functionalized piperidines. *Tetrahedron*, v. 66, n. 39, p. 7762–7772, 2010.

KHAN, A. T.; LAL, M.; KHAN, M. M. Synthesis of highly functionalized piperidines by one-pot multicomponent reaction using tetrabutylammonium tribromide (TBATB). *Tetrahedron Letters*, v. 51, n. 33, p. 4419–4424, 2010.

KHAN, R. A. Natural products chemistry: The emerging trends and prospective goals. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v. 26, n. 5, p. 739–753, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.02.015>>.

KHEDKAR, S.; AUTI, P. 1, 4-Dihydropyridines: A Class of Pharmacologically Important Molecules. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 14, n. 3, p. 282–290, 2014.

KO, S.; YAO, C. F. Ceric Ammonium Nitrate (CAN) catalyzes the one-pot synthesis of polyhydroquinoline via the Hantzsch reaction. *Tetrahedron*, v. 62, n. 31, p. 7293–7299, 2006.

KUMAR, A. *et al.* Design and synthesis of 2,4-disubstituted polyhydroquinolines as prospective antihyperglycemic and lipid modulating agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 18, n. 11, p. 4138–4148, 2010.

KUMAR, M.; CURTIS, A.; HOSKINS, C. Application of nanoparticle technologies in the combat against anti-microbial resistance. *Pharmaceutics*, v. 10, n. 1, p. 1–17, 2018.

KUTCHAN, T. M. Alkaloid Biosynthesis—The Basis for Metabolic Engineering of Medicinal Plants. *the Plant Cell Online*, v. 7, n. 7, p. 1059–1070, 1995.

LADANI, N. K. *et al.* Microwave assisted synthesis of novel Hantzsch 1,4-dihydropyridines, acridine-1,8-diones and polyhydroquinolines bearing the tetrazolo[1,5-a] quinoline moiety and their antimicrobial activity assess. *Chinese Chemical Letters*, v. 22, n. 12, p. 1407–1410, 2011.

LEBOLD, T. P. *et al.* A Zn ( II ) Catalyzed Synthesis of Piperidines from Propargyl Amines and Cyclopropanes. *Organic Letters*, v. 11, n. 16, p. 3770–3772, 2009.

LIMA, P. G. *et al.* Synthetic antimicrobial peptides: Characteristics, design, and potential as alternative molecules to overcome microbial resistance. *Life Sciences*, v. 278, n. May, p. 1–11, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119647>>.

LIU, W. *et al.* Functionalization of Piperidine Derivatives for the Site-Selective and Stereoselective Synthesis of Positional Analogues of Methylphenidate. *Chemistry - A European Journal*, v. 26, n. 19, p. 4236–4241, 2020.

LLOBAT, A. *et al.* The Ruthenium-Catalyzed Domino Cross Enyne Metathesis/Ring-Closing Metathesis in the Synthesis of Enantioenriched Nitrogen-Containing Heterocycles. *European Journal of Organic Chemistry*, n. 27, p. 4193–4207, 2020.

LOPEZ, C. A. *Introducción a la química farmacéutica*. [S.l.: s.n.], 2018.

LORENZI, H. *Plantas medicinais no Brasil. Nativas e exóticas*. 2. ed. [S.l.]: Plantarum, 2007.

MADIGAN, M. T.; AL., E. *Microbiologia de Brock*. 14. ed. Porto Alegre: [s.n.], 2016.

MAGUIÑA-VARGAS, C. SOLARI-ZERPA, L. Nuevas y viejas quinolonas. *Rev. méd. hered*, v. 13, n. 4, p. 153–160, 2002.

MASUNARI, A.; TAVARES, L. C. Síntese e determinação da atividade antimicrobiana de derivados 5-nitro- 2-tiofilidênicos frente a *Staphylococcus aureus* multi-resistente. v. 42, n. 3, p. 461–471, 2006.

MICHAEL, J. P. Quinoline, quinazoline and acridonealkaloids. *Nat. Prod. Rep.*, v. 25, n. 1, p. 166–187, 2008.

MILES, T. J. *et al.* Novel amino-piperidines as potent antibacterials targeting bacterial type IIA topoisomerases. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 21, n. 24, p. 7489–7495, 2011.

MIRI, R.; MEHDIPOUR, A. Dihydropyridines and atypical MDR: A novel perspective of designing general reversal agents for both typical and atypical MDR. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 16, n. 18, p. 8329–8334, 2008.



MISRA, M. *et al.* Organocatalyzed highly atom economic one pot synthesis of tetrahydropyridines as antimalarials. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 17, n. 2, p. 625–633, 2009.

MITSCHER, L. A. Bacterial Topoisomerase Inhibitors : Quinolone and Pyridone Antibacterial Agents. *Society*, v. 105, n. January, p. 559–592, 2005.

MONTES-AVILA, J. *et al.* Microwave-assisted synthesis of hydroxyridines and study of the DPPH-scavenging activity. *RSC Advances*, v. 2, n. 5, p. 1827, 2012.

MOSS, G. P.; SMITH, P. A S.; TAVERNIER, D. *Glossary of Class Names of Organic Compounds and Reactive Intermediates Based on Structure*. [S.l: s.n.], 1995. v. 67.

MUGNAINI, C. *et al.* Regioselective functionalization of quinolin-4(1H)-ones via sequential palladium-catalyzed reactions. *Tetrahedron*, v. 67, n. 32, p. 5776–5783, 2011.

MURTHY, Y. L. N. *et al.* Design, solvent free synthesis, and antimicrobial evaluation of 1,4 dihydropyridines. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 22, n. 18, p. 6016–6023, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.05.003>>.

MURTY, M. S. R.; RAM, K. R.; YADAV, J. S. BiCl<sub>3</sub> promoted aza-Prins type cyclization: a rapid and efficient synthesis of 2,4-disubstituted piperidines. *Tetrahedron Letters*, v. 49, n. 7, p. 1141–1145, 2008.

NGUYEN, V. T.; NGUYEN, H. T.; TRAN, P. H. One-pot three-component synthesis of 1-amidoalkyl naphthols and polyhydroquinolines using a deep eutectic solvent: a green method and mechanistic insight. *New Journal of Chemistry*, v. 45, n. 4, p. 2053–2059, 2021.

NUNEZVERGARA, L. J. *et al.* Reactivity of the one-electron reduction product from nimodipine, nitrendipine and nicardipine with relevant biological thiols. *Boletín De La Sociedad Chilena De Química*, v. 41, n. 4, p. 363–370, 1996.

OESTREICH, M. *The mizoroki-heck reaction*. [S.l.]: Wiley, 2009.

OLIVA, A. *et al.* Natural fungicides from *Ruta graveolens* L. leaves, including a new quinolone alkaloid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, n. 4, p. 890–896,

2003.

PAIDEPALA, H. *et al.* Catalyst-free efficient synthesis of polyhydroquinolines using polyethylene glycol as a solvent and evaluation of their cytotoxicity. *Medicinal Chemistry Research*, v. 23, n. 2, p. 1031–1036, 2014.

PAKDAMAN, F.; ALLAMEH, S.; SHAKER, M. Synthesis of Pharmaceutical Polyhydroquinolines Catalyzed by Cobalt ( II ) Complex as Reusable Catalyst. v. 6, n. 1, p. 192–195, 2018.

PALERMO, V. *et al.* Calix[n]arenes: Active organocatalysts for the synthesis of densely functionalized piperidines by one-pot multicomponent procedure. *Tetrahedron Letters*, v. 57, n. 19, p. 2049–2054, 2016.

PANDEY, P.; CHAWLA, P. Syntheses, characterization and biological activity of novel 2,6-di substituted piperidine-4-one derivatives ethanol 80 °C propan-2-one. *INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICAL, CHEMICAL AND BIOLOGICAL SCIENCES*, v. 2, n. 3, p. 305–309, 2012.

PARISI, A. S. *et al.* Avaliação da atividade antibacteriana da microalga *Spirulina platensis*. *Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada*, v. 30, n. 3, p. 297–301, 2009.

PATRICK, G. L. *Organic Chemistry*. 2. ed. [S.l: s.n.], 2004.

PETIT, S. *et al.* Synthkses et activitb psychotropes de 3,4-diarylpipkridines. Corr&ation structure-activitk et recherche d'une activitk antihypertensive. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 26, p. 19–32, 1991.

PONPANDIAN, T.; MUTHUSUBRAMANIAN, S. A new method of synthesising (±)-thalictroidine and (±)-hygrine. *Tetrahedron Letters*, v. 52, n. 13, p. 1520–1522, 2011.

RAZZAQUE, M. S. Commentary: Microbial Resistance Movements: An Overview of Global Public Health Threats Posed by Antimicrobial Resistance, and How Best to Counter. *Frontiers in Public Health*, v. 8, n. January, p. 10–13, 2021.

REDDY, C. S.; RAGHU, M. Facile ZrCl<sub>4</sub> promoted four-component coupling one-pot synthesis of polyhydroquinoline derivatives through unsymmetric Hantzsch reaction. *Indian Journal of Chemistry - Section B Organic and Medicinal Chemistry*, v. 47, n. 10, p. 1578–1582, 2008.

REMUSON, R.; GELAS-MIALHE, Y. A Convenient Access to the Piperidine Ring by Cyclization of Allylsilyl Substituted N-Acyliminium and Iminium Ions: Application to the Synthesis of Piperidine Alkaloids. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, v. 5, p. 193–208, 2008.

RICE, L.; BONOMO, R. *Genetic and Biochemical mechanisms of bacterial*. In *Victor Lorian, M. D., Antibiotics in Laboratory Medicine*. 5. ed. New York: [s.n.], 2005.

ROSSI, F. The Challenges of Antimicrobial Resistance in Brazil. *Antimicrobial Resistance*, v. 52, p. 1138–1143, 2011.

ROUGHLEY, S. D.; JORDAN, A. M. The medicinal chemist's toolbox: An analysis of reactions used in the pursuit of drug candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 54, n. 10, p. 3451–3479, 2011.

RUCINS, M. *et al.* Recent approaches to chiral 1,4-dihydropyridines and their fused analogues. *Catalysts*, v. 10, n. 9, p. 1–21, 2020.

SAALIM, M.; VILLEGAS-MORENO, J.; CLARK, B. R. Review: Bacterial Alkyl-4-quinolones: Discovery, Structural Diversity and Biological Properties. *Molecules*, v. 25, p. 1–26, 2020.

SAINI, A.; KUMAR, S.; SANDHU, J. S. Hantzsch reaction: Recent advances in Hantzsch 1,4-dihydropyridines. *Journal of Scientific and Industrial Research*, v. 67, n. 2, p. 95–111, 2008.

SALES, M.; CHARETTE, A. B. A Diels – Alder Approach to the Stereoselective Synthesis of 2,3,5,6-Tetra- and 2,3,4,5,6-Pentasubstituted Piperidines. *Organic Letters*, v. 7, n. 26, p. 5773–5776, 2005.

SANTOS, D. O. *et al.* Leishmaniasis treatment - A challenge that remains: A review. *Parasitology Research*, v. 103, n. 1, p. 1–10, 2008.

SCHAUB, T. Efficient Industrial Organic Synthesis and the Principles of Green Chemistry. *Chemistry - A European Journal*, v. 27, n. 6, p. 1865–1869, 2021.

SCHREIBER, S. L. Organic synthesis toward small-molecule probes and drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 108, n. 17, p. 6699–6702, 2011.

SHARMA, S.; SINGH, U. P.; SINGH, A. P. Synthesis of MCM-41 supported cobalt (II) complex for the formation of polyhydroquinoline derivatives. *Polyhedron*, v. 199, p. 1–11, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.poly.2021.115102>>.

SHEN, L. *et al.* A revisit to the Hantzsch reaction: Unexpected products beyond 1,4-dihydropyridines. *Green Chemistry*, v. 11, n. 9, p. 1414, 2009.

SIEGEL, J. D. *et al.* Management of multidrug-resistant organisms in health care settings, 2006. *American Journal of Infection Control*, v. 35, n. 10 SUPPL. 2, p. S165–S193, 2007.

SILVA, E. M. P.; VARANDAS, P. A. M. M.; SILVA, A. M. S. *Developments in the synthesis of 1,2-dihydropyridines*. [S.l.: s.n.], 2013. v. 45.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; PALAZZO DE MELLO, J. C.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 4ª ed. Porto Alegre: [s.n.], 2002.

SON, J. H. *et al.* Davis–Beirut reaction inspired nitroso Diels–Alder reaction. *Tetrahedron Letters*, v. 69, p. 4–7, 2021.

SOUZA, E. S. *et al.* Mortalidade e riscos associados a infecção relacionada à assistência à saúde. *Texto e Contexto Enfermagem*, v. 24, n. 1, p. 220–228, 2015.

SUÁREZ, L. E. C. *et al.* Actividad antibacteriana de terpenoides y alcaloides aislados de tres plantas colombianas. *Revista Cubana de Farmacia*, v. 45, n. 2, p. 275–282, 2011.

SUGIURA, M.; KOBAYASHI, S. Lewis Acid-Catalyzed Ring-Opening Reactions of Semicyclic N, O -Acetals. *Organic Letters*, v. 3, n. 3, p. 477–480, 2001.

SULEIMAN, S. *et al.* Anticancer effects of an extract from a local planarian species on human acute myeloid leukemia HL-60 cells in vitro. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 130, n. June, p. 110549, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110549>>.

SWARNALATHA, G.; PRASANTHI, G. 1, 4-Dihydropyridines: A Multifunctional

Molecule-A Review. *International Journal of ChemTech Research*, v. 3, n. 1, p. 75–89, 2011.

TAIT, M. B.; BUTTERWORTH, S.; CLAYDEN, J. 2,2- and 2,6-Diarylpiperidines By Aryl Migration Within Lithiated Urea Derivatives of Tetrahydropyridines. *Organic Letters*, v. 17, n. 5, p. 1236–1239, 2015.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 5<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: [s.n.], 2013.

TAYLOR, R. D.; MACCOSS, M.; LAWSON, A. D. G. Rings in drugs. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 57, n. 14, p. 5845–5859, 2014.

TORTORA, G.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 10. ed. Porto Alegre: [s.n.], 2012.

TULP, M.; BOHLIN, L. Chemical diversity: independent of functional diversity. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 23, n. 9, p. 405–405, 2002.

WILSON, R. M.; DANISHEFSKY, S. J. Small molecule natural products in the discovery of therapeutic agents: The synthesis connection. *Journal of Organic Chemistry*, v. 71, n. 22, p. 8329–8351, 2006.

WU, Z. C.; BOGER, D. L. The quest for supernatural products: The impact of total synthesis in complex natural products medicinal chemistry. *Natural Product Reports*, v. 37, n. 11, p. 1511–1531, 2020.

WUBE, A. A. *et al.* Synthesis of N-substituted 2-[(1E)-alkenyl]-4-(1H)-quinolone derivatives as antimycobacterial agents against non-tubercular mycobacteria. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 46, n. 6, p. 2091–2101, 2011.

XIN HUANG, WEI LI, X.-W. Y. New cytotoxic quinolone alkaloids from fruits of *Evodia rutaecarpa*. *Fitoterapia*, v. 83, p. 709–714, 2012.

YANG, Y.; HARDMAN, C. Synthetic versatility of 2-substituted-6-methyl 2,3-dihydropyridinones in the synthesis of polyfunctional piperidine-based compounds and related  $\beta$  amino acid derivatives. *Org. Biomol. Chem.*, v. 15, n. 40, p. 8576–8593, 2017.

YOO, J. S. *et al.* Bismuth(III) bromide catalyzed synthesis of polyhydroquinoline derivatives via the Hantzsch reaction. *Tetrahedron Letters*, v. 56, n. 27, p. 4060–4062, 2015.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; FILHO, V. C. Pharmaceutics and phytotherapies: the need for development of the industry of phytopharmaceutics and phytotherapies in Brazil. *Quimica Nova*, v. 24, n. 1, p. 147–152, 2001.

ZHANG, W. *et al.* An adjusted 3D-QSAR model for the combined activity of fluoroquinolones photodegradation and microbial degradation assisted by dynamic simulation and its application in molecular modification. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 212, p. 1–10, 2021.

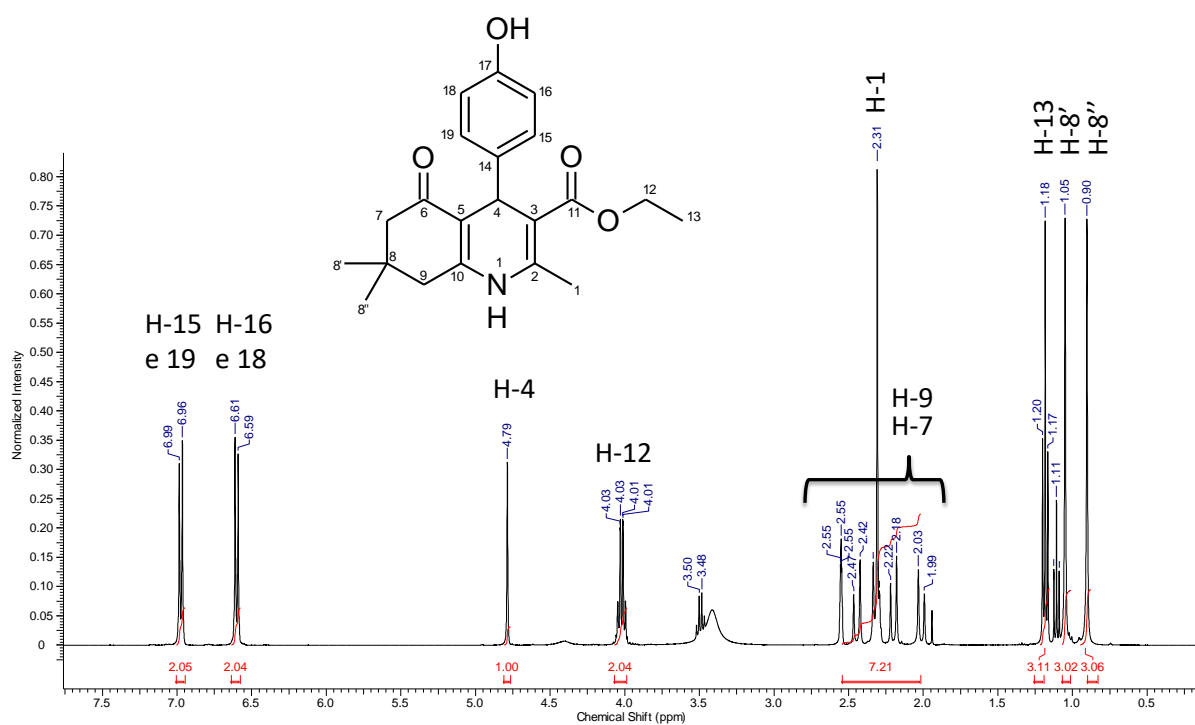
ZHAO, S. *et al.* A new general approach to 4-substituted-3-halo-2-quinolones. *Journal of Fluorine Chemistry*, v. 131, n. 5, p. 597–605, 2010.

ZHOU, Y. *et al.* Synthesis and SAR of 3,5-diamino-piperidine derivatives: Novel antibacterial translation inhibitors as aminoglycoside mimetics. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 17, n. 5, p. 1206–1210, 2007.

ZIAKAS, P. D. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prevention strategies in the ICU: A clinical decision analysis. *Critical Care Medicine*, v. 43, n. 2, p. 382–393, 2015.

## APENDICE A

**FIGURA A1** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz) de 4-(4-Hydroxy-phenyl)-2,7,7-trimethyl-5-oxo - 1,4,5,6,7,8-hexahidroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester.  $\text{DMSO-}d_6$ .



**FIGURA A2** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do produto de 4-(4-Hydroxy-phenyl)-2,7,7-trimethyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester. \* - Sinal de C9 está sobreposto com o sinal do solvente.  $\text{DMSO}-d_6$ .

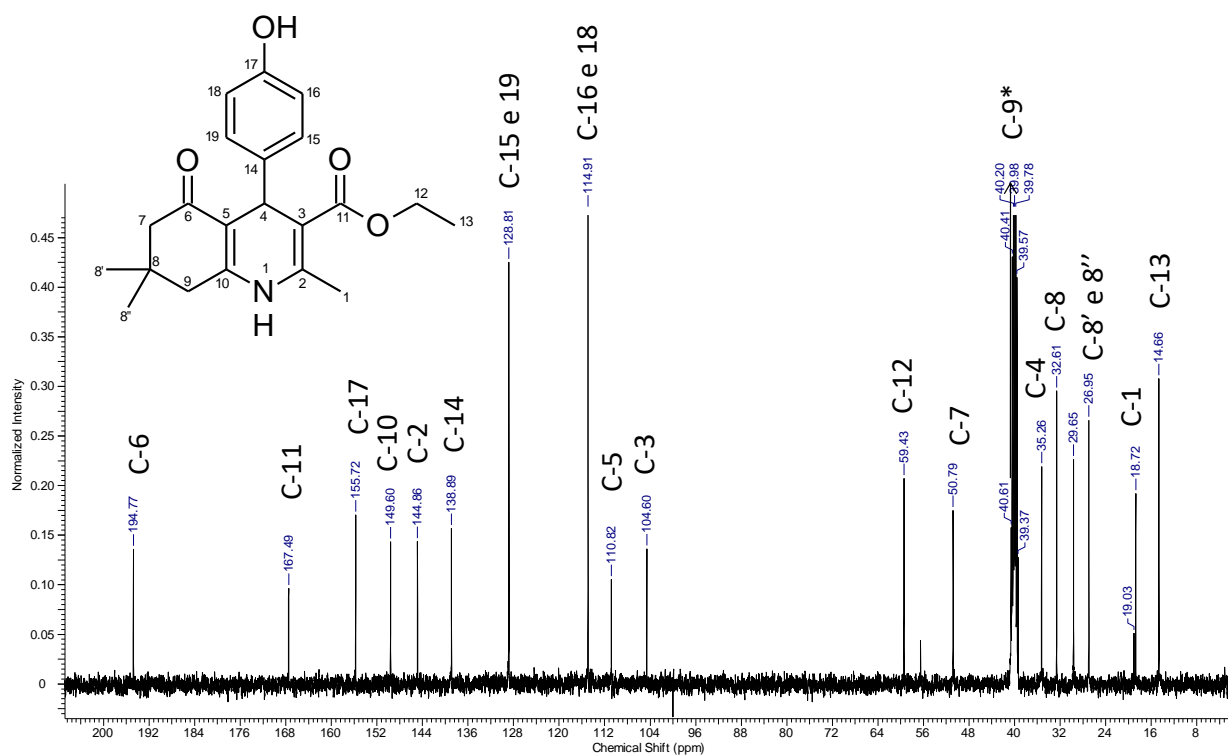


FIGURA A3 – Espectro de IV de 4-(4-Hydroxy-phenyl)-2,7,7-trimethyl-5-oxo -1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester.

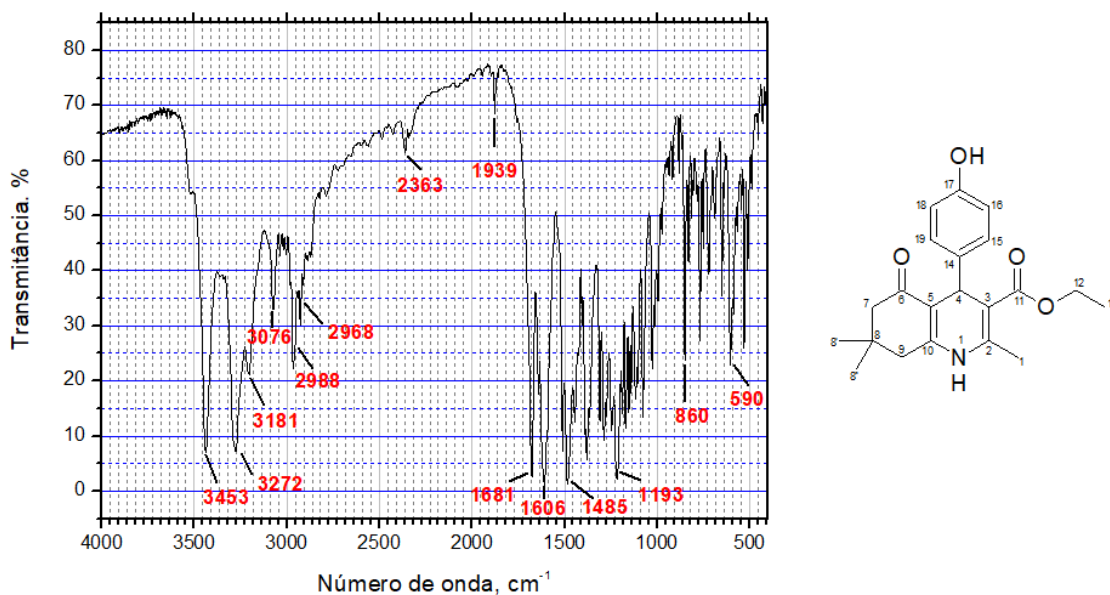
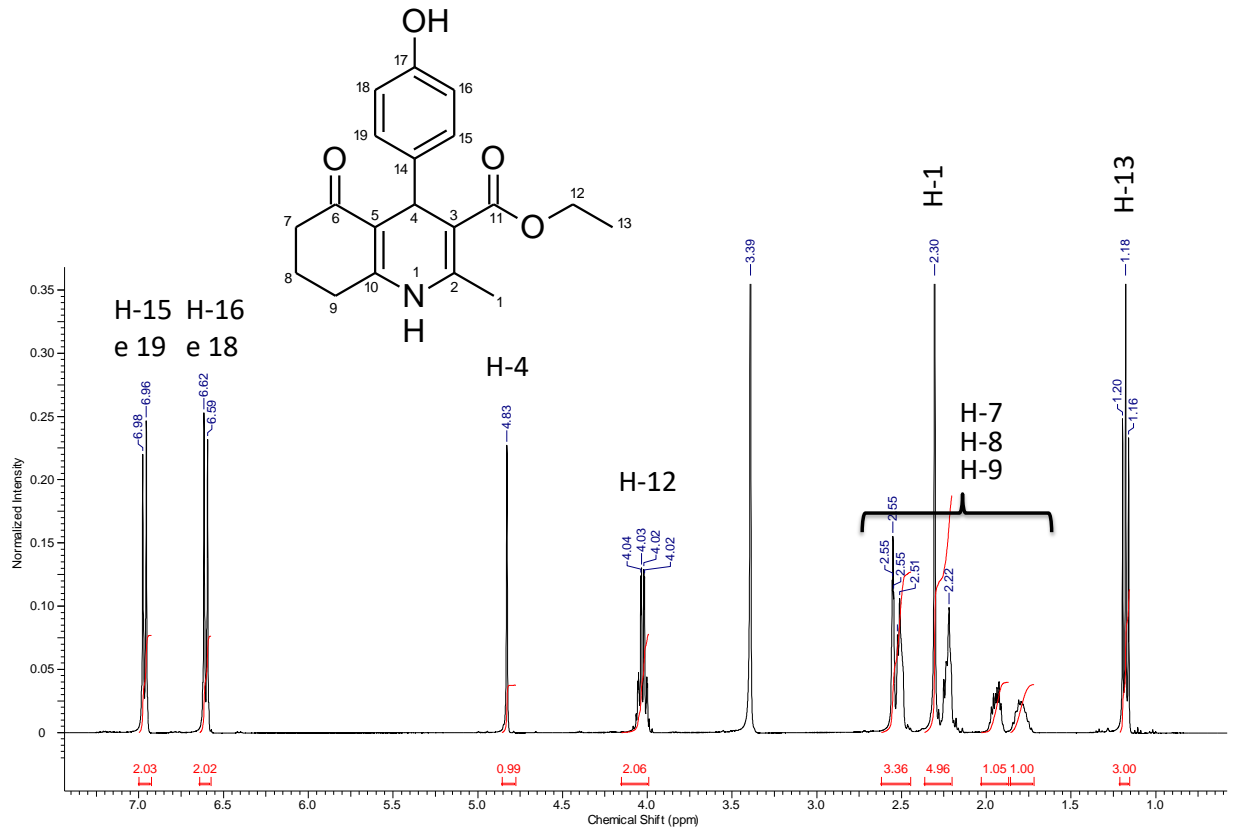
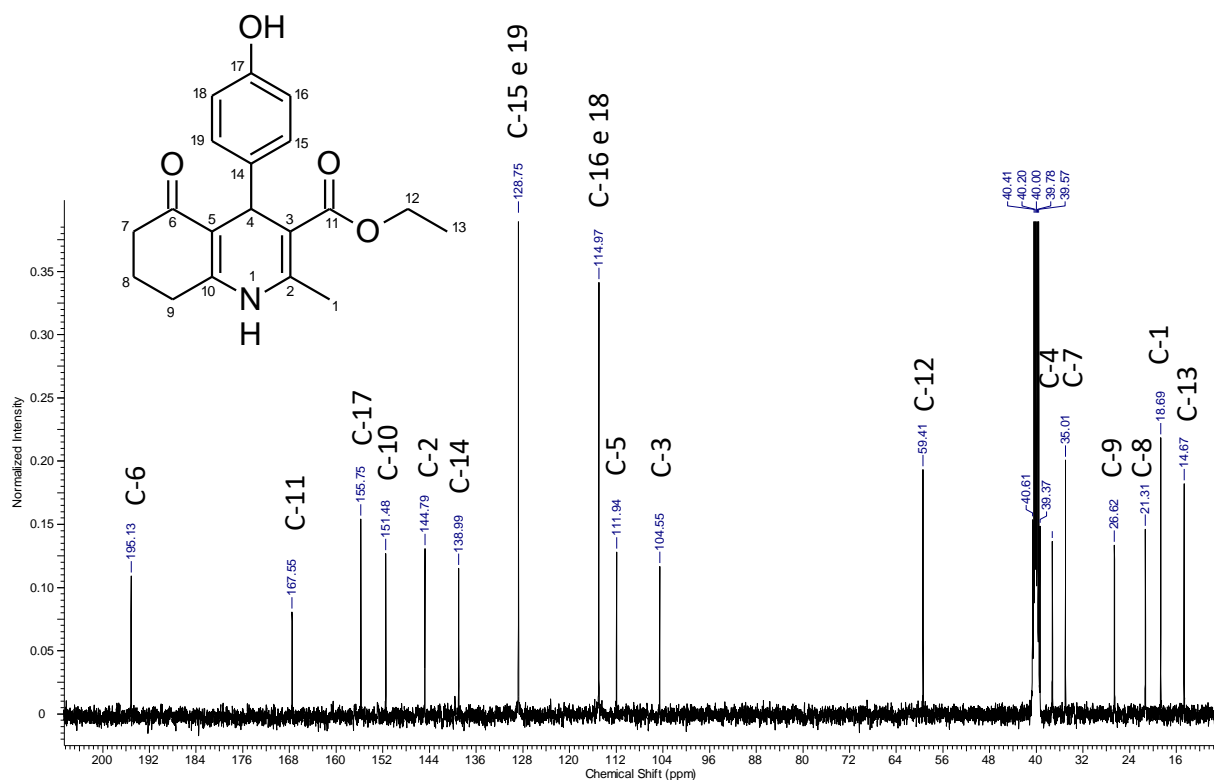


FIGURA A4 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz) de 4-(4-Hydroxy-phenyl)-2-methyl-5-oxo -1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester.  $\text{CDCl}_3-d_1$ .

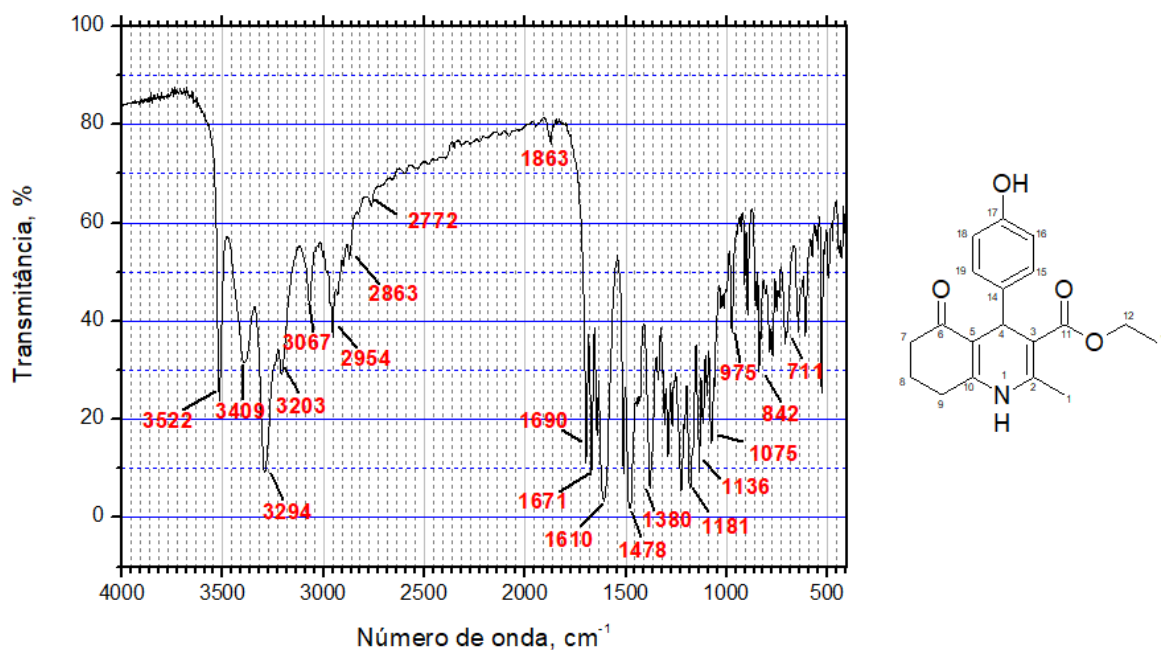




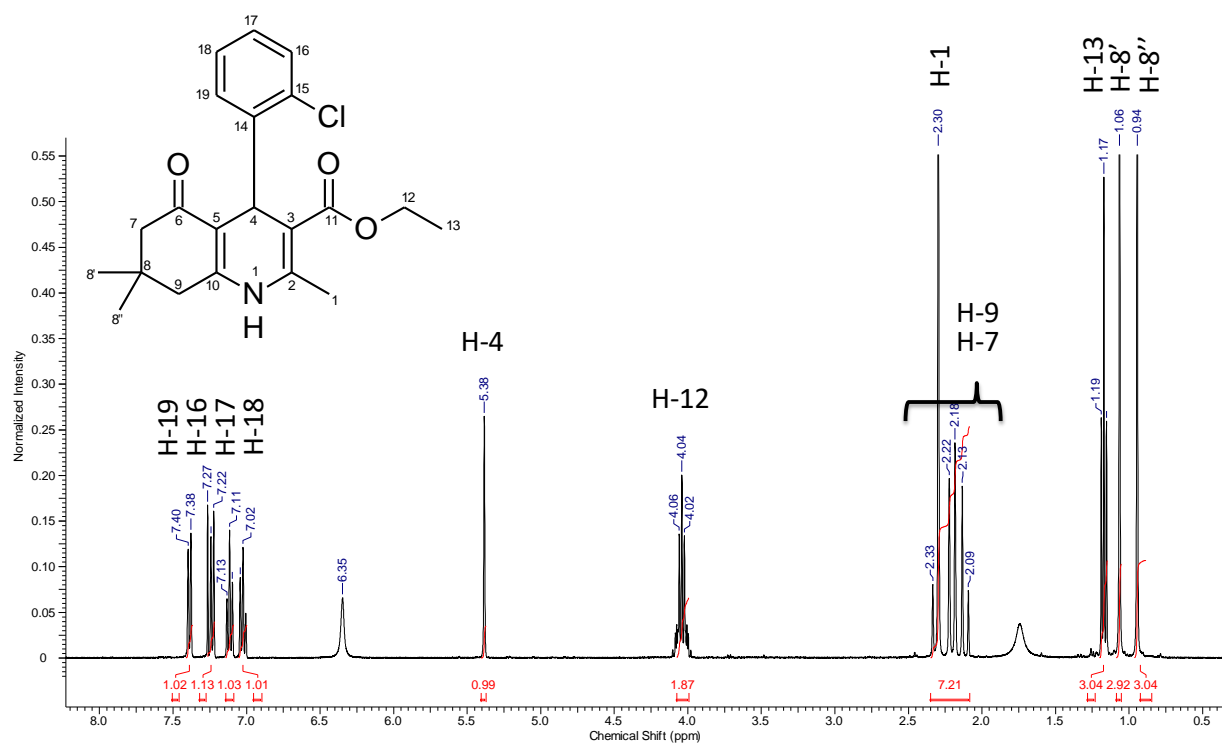
**FIGURA A5** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de 4-(4-Hydroxy-phenyl)-2-methyl-5-oxo -1,4,5,6,7,8-hexahidroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester.  $\text{CDCl}_3-d_1$ .



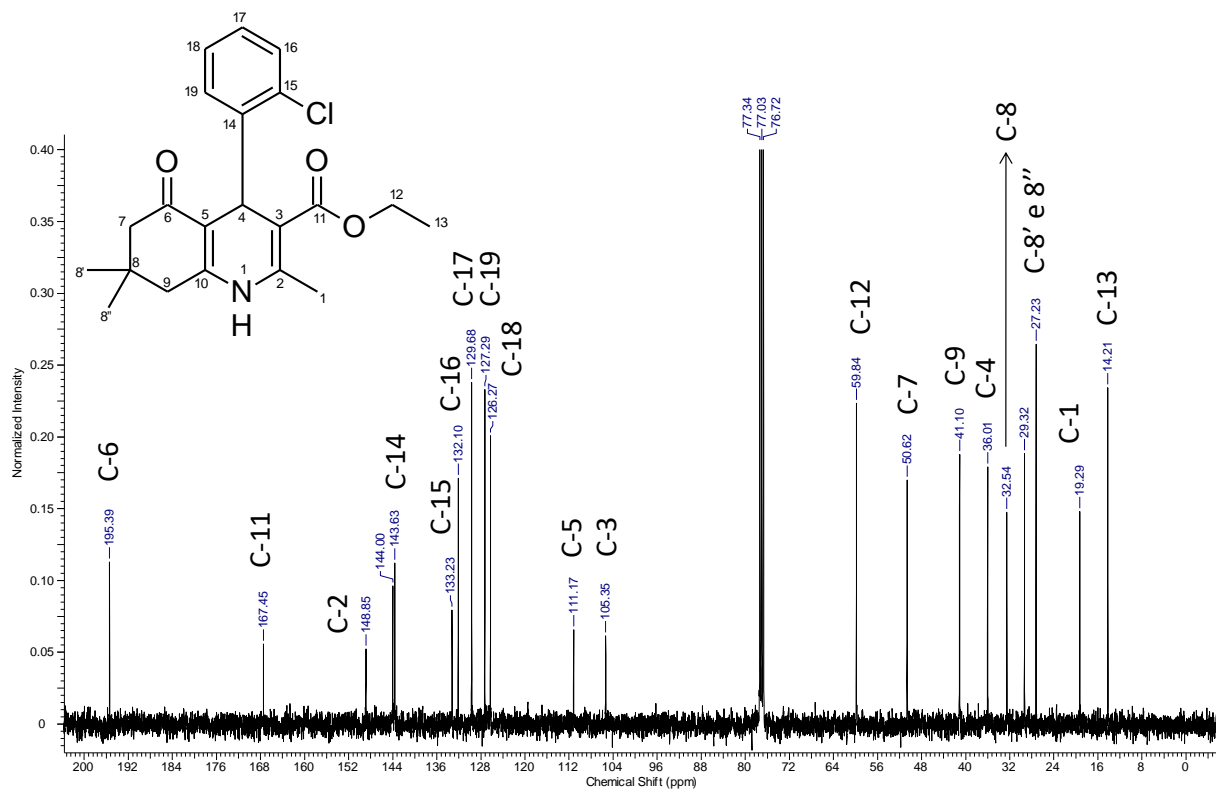
**FIGURA A6** – Espectro de IV de 4-(4-Hydroxy-phenyl)-2-methyl-5-oxo -1,4,5,6,7,8-hexahidroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester.



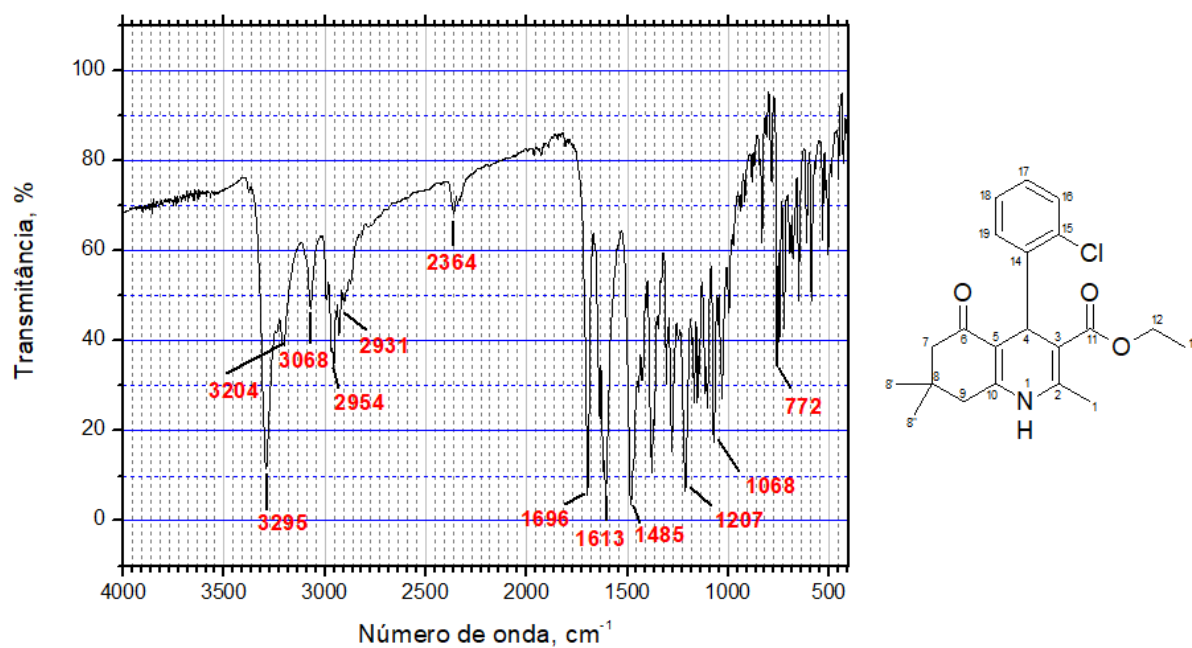
**FIGURA A7** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz) de 4-(2-cloro-fenil)-2,7,7-trimetil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3-carboxilico acido etil ester.  $\text{CDCl}_3-d_1$ .



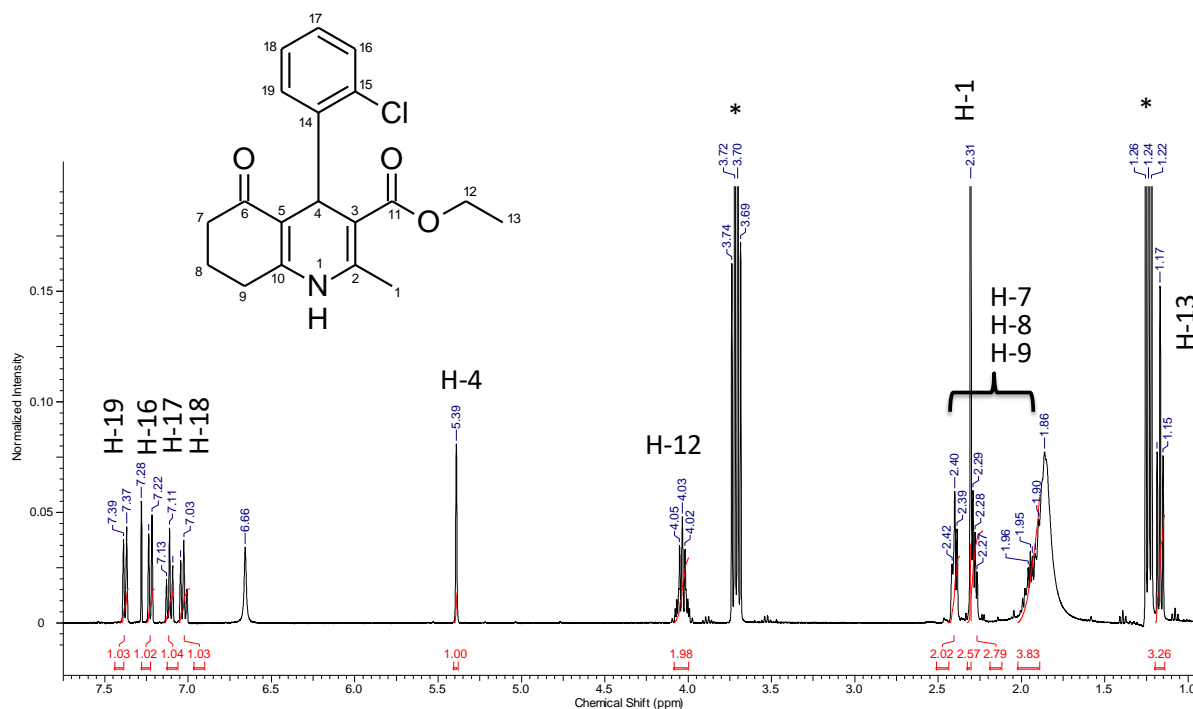
**FIGURA A8** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de 4-(2-chloro-phenyl)-2,7,7-trimethyl-5-oxo -1,4,5,6,7,8-hexahidroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester.  $\text{CDCl}_3-d_1$ .



**FIGURA A9** – Espectro de IV de 4-(2-chloro-phenyl)-2,7,7-trimethyl-5-oxo -1,4,5,6,7,8-hexahidroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester.



**FIGURA A10** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz) de 4-(2-chloro-phenyl)-2-methyl-5-oxo -1,4,5,6,7,8-hexahidroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester.  $\text{CDCl}_3-d_1$ . \* - Contaminação da amostra com etanol da lavagem dos tubos de RMN ou do processo de recristalização.



**FIGURA A11** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de 4-(2-chloro-phenyl)-2-methyl-5-oxo -1,4,5,6,7,8-hexahidroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester.  $\text{CDCl}_3-d_1$ .

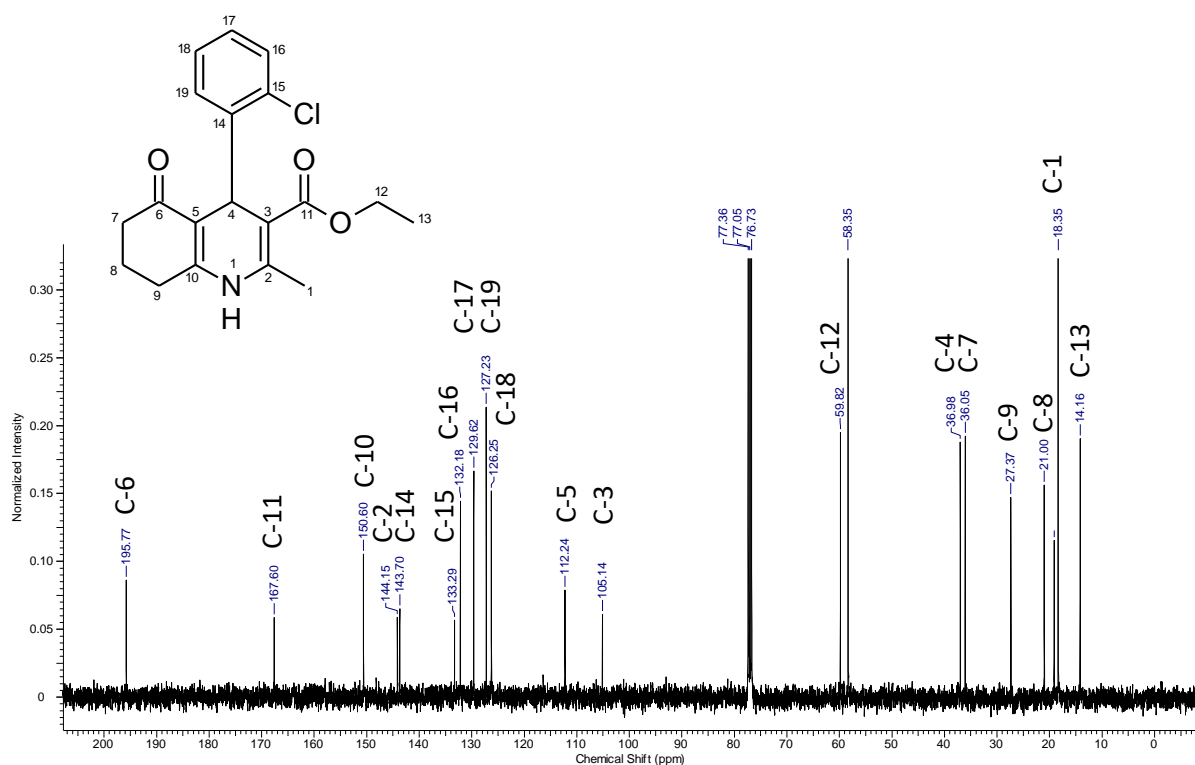


FIGURA A12 – Espectro de IV de 4-(2-chloro-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester.

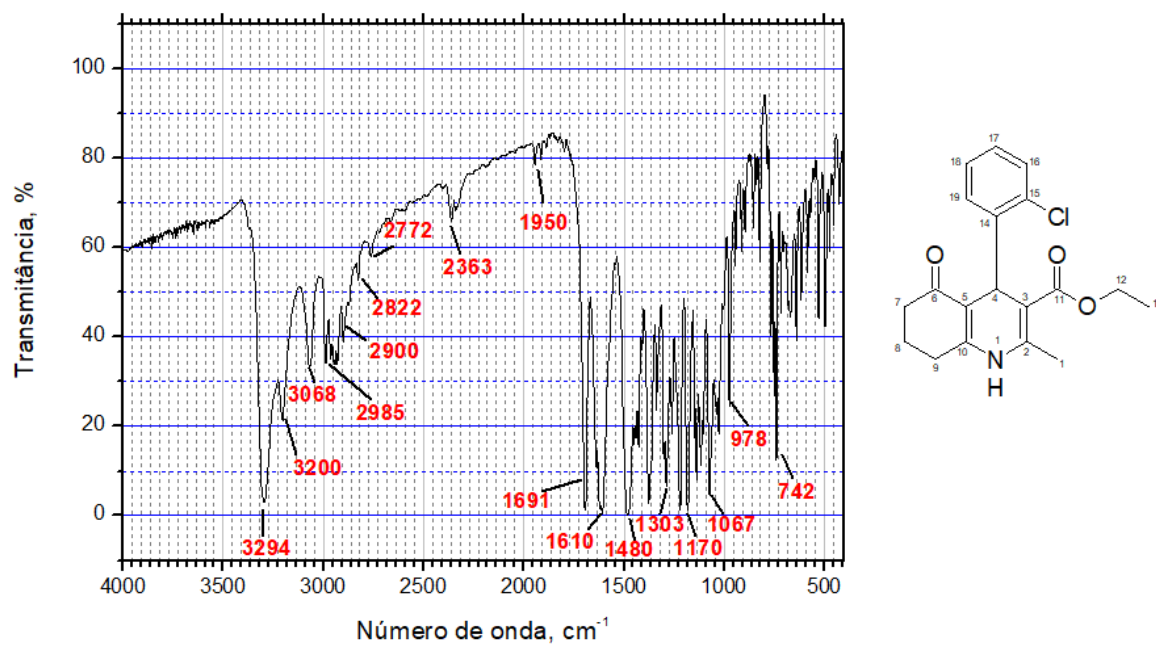
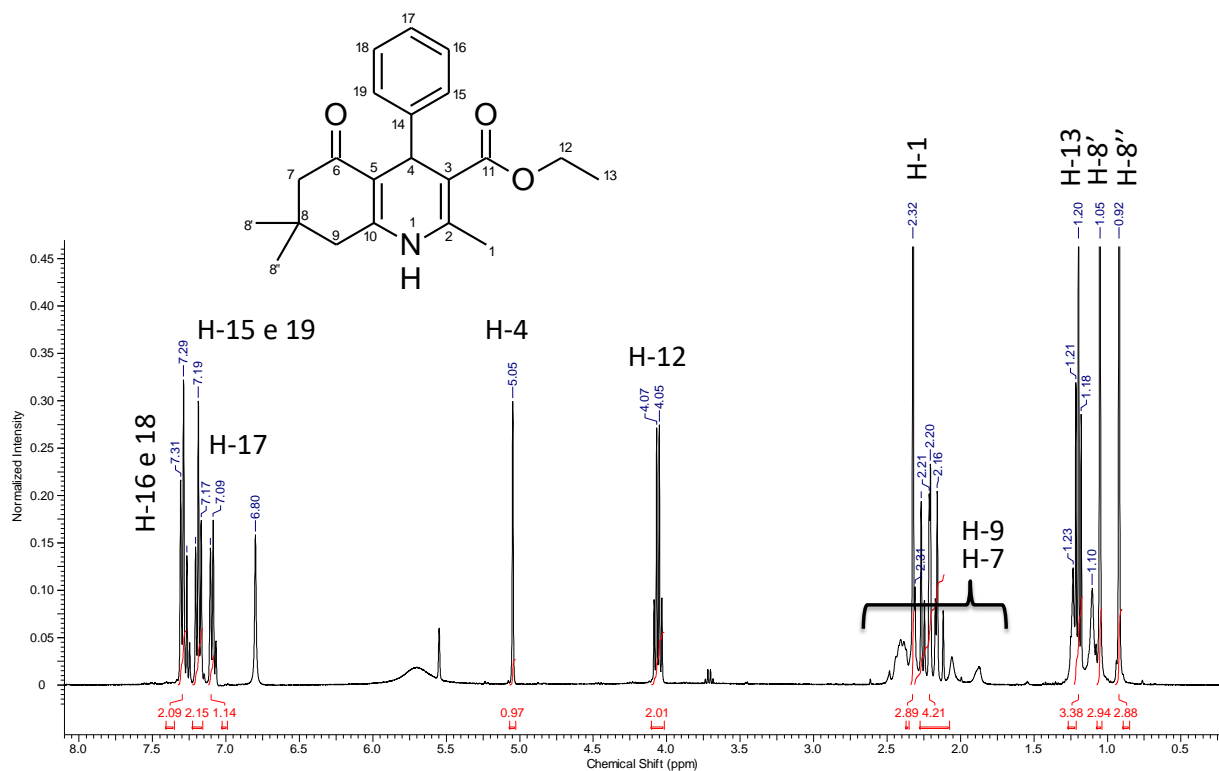
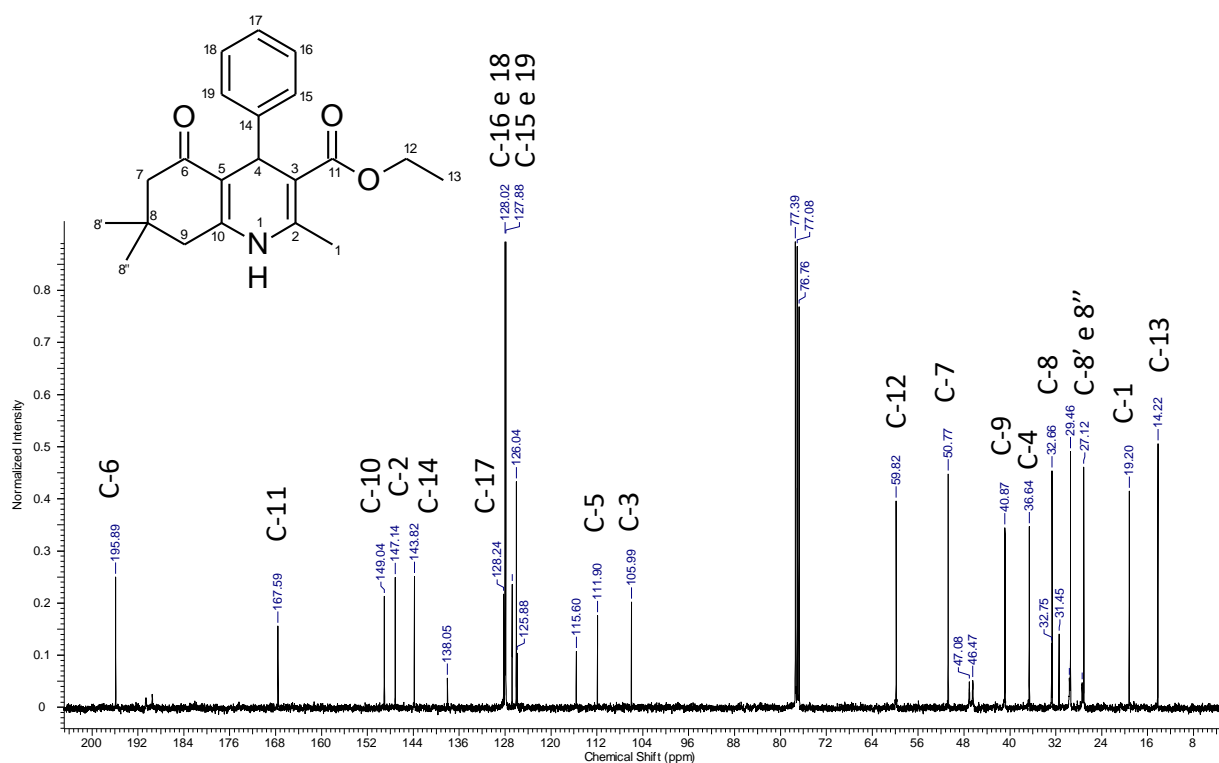


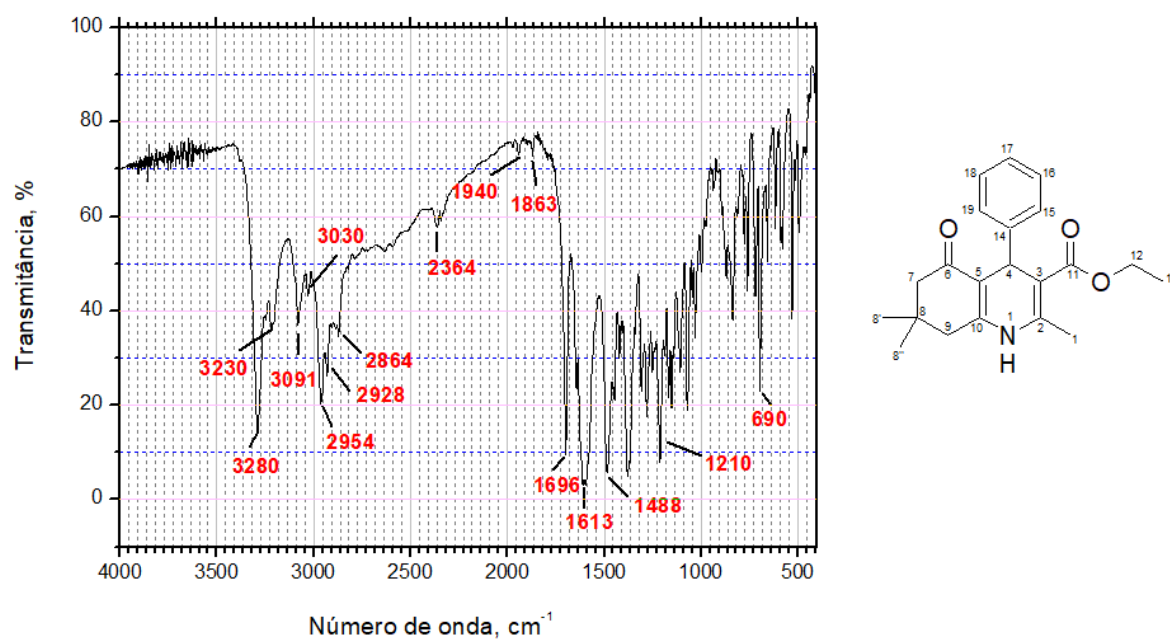
FIGURA A13 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz) de 2,7,7-trimethyl-5-oxo-4-phenyl-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester.  $\text{CDCl}_3-d_1$ .



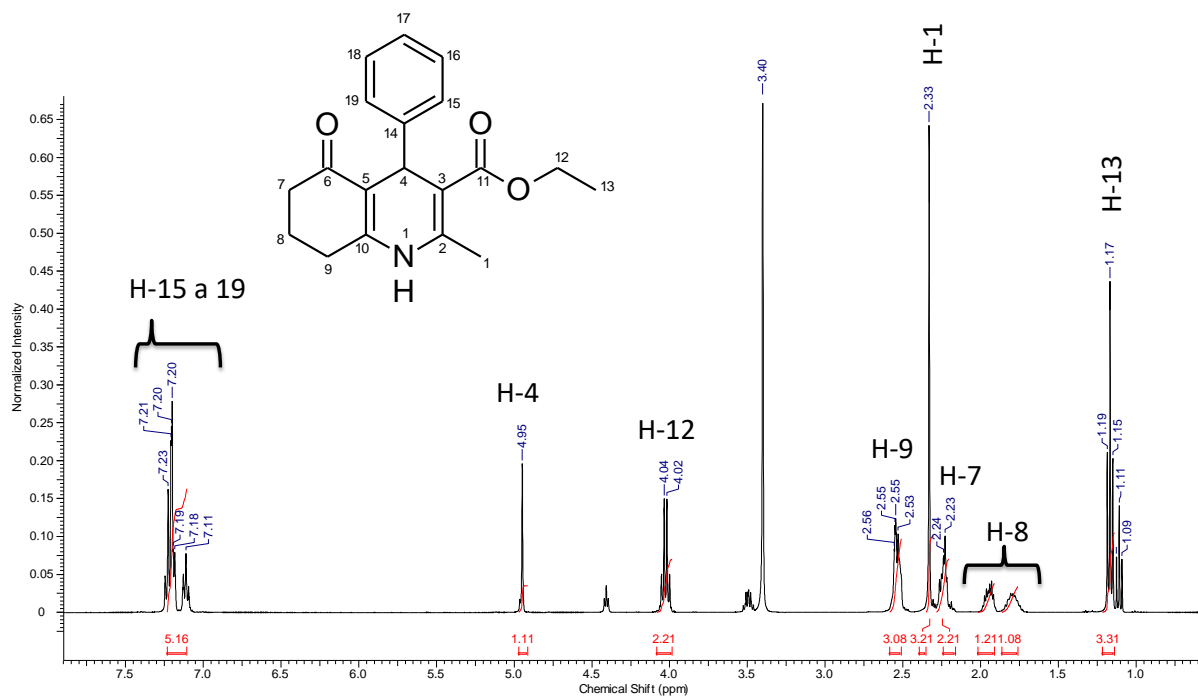
**FIGURA A14** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de 2,7,7-trimethyl-5-oxo-4-phenyl-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester.  $\text{CDCl}_3-d_1$ .



**FIGURA A15** – Espectro de IV de 2,7,7-trimethyl-5-oxo-4-phenyl-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester.

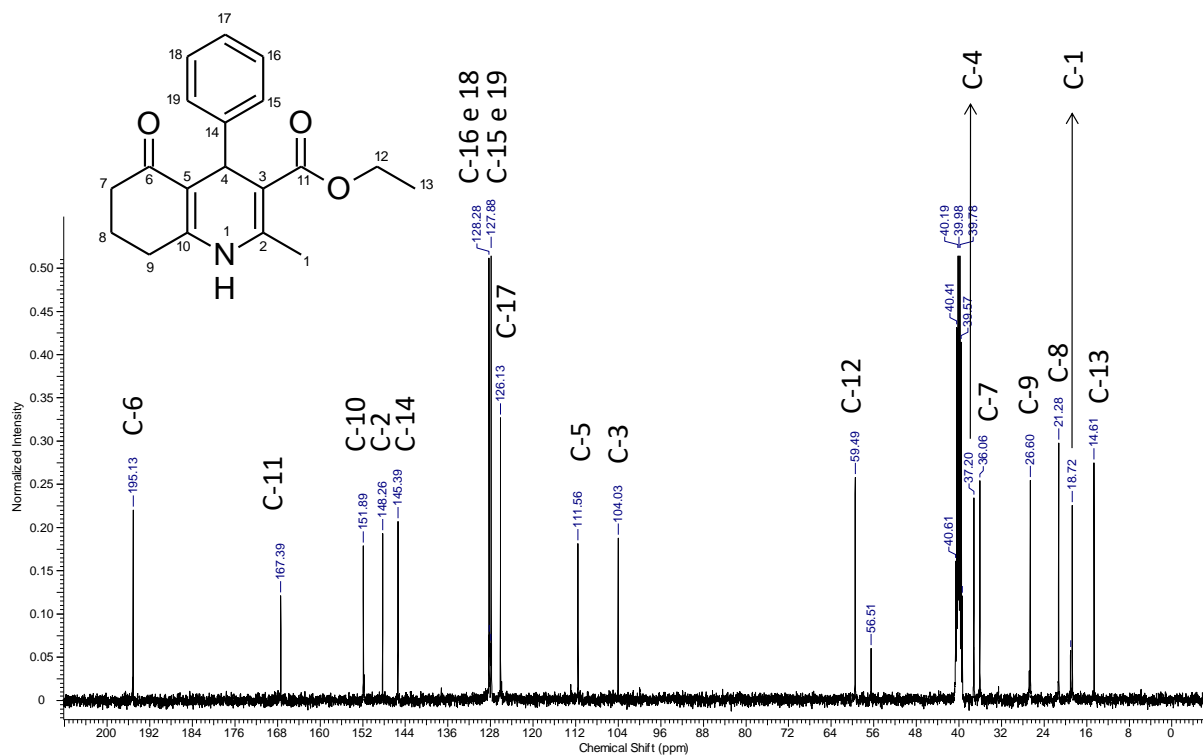


**FIGURA A16** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz) de 2-methyl-5-oxo-4-phenyl-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester.  $\text{DMSO-}d_6$ .

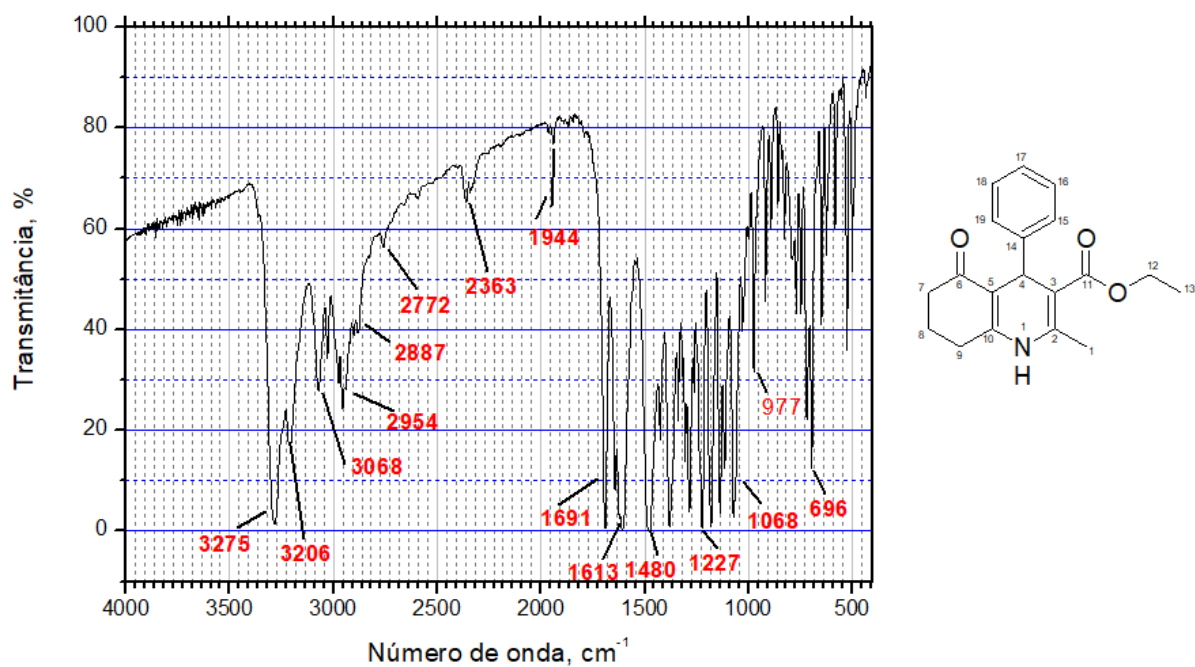




**FIGURA A17** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de 2-methyl-5-oxo-4-phenyl-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester.  $\text{DMSO-}d_6$ .



**FIGURA A18** – Espectro de IV de 2-methyl-5-oxo-4-phenyl-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester.





**APENDICE B****Modulação enzimática e ação antimicrobiana do derivado de polihidroquinolina, 4-(4-Hydroxi-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester**

Marcus Vinicius Cardoso Trento<sup>1</sup>, Gustavo Henrique Andrade Machado<sup>1</sup>, Rennan Herculano Rufino Moreira<sup>2</sup>, Sergio Scherrer Thomasi<sup>1</sup>, Silvana Marcussi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry. Universidade Federal de Lavras (UFLA), Campus Universitário, Lavras, MG, Brazil, PO Box 3037, Zip Code 37200-900, phone no. +55(35)3829-1893.

<sup>2</sup> Department of Animal Science, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil.

**Corresponding author:** MSc. Marcus Vinicius Cardoso Trento. Department of Chemistry, Biochemistry Laboratory. Universidade Federal de Lavras (UFLA), Campus Universitário, Lavras, MG, Brazil, PO Box 3037, Zip Code 37200-900, Phone no. +55(35)3829-1893. marcusvinicius.ct@gmail.com

## ABSTRACT

Compostos N-heterocíclicos são bastante utilizados na medicina e farmacologia devido à sua grande diversidade de atividades biológicas (por exemplo: antimicrobiano, anticonvulsivante, anti-inflamatória, anticâncer, anti-helmíntica, anti-histamínica, anti-hipertensiva e antidepressiva). Assim, esses compostos se mostram relevantes para a síntese de novos fármacos. A molécula 4-(4-Hydroxi-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester foi obtida utilizando uma síntese multicomponente e sua prospecção biológica incluiu ação moduladora sobre fosfolipases A<sub>2</sub> e proteases, avaliação de citotoxicidade, avaliação de seus efeitos sobre processos relacionados à hemostasia e atividade antimicrobiana. Foram testadas diversas doses da molécula em cada teste, variando de 25 a 500 mg. Para a atividade antimicrobiana, no teste de diluição seriada, a molécula exerceu inibições significativas tanto para *S. aureus* quanto para *P. aeruginosa*. Quando avaliado os efeitos sobre a coagulação de plasma humano citratado, a molécula incubada previamente com peçonha de *Bothrops moojeni* (40µg) foi capaz de retardar a coagulação do plasma, induzida pelas proteases, em 14 e 13,66 segundos ( $p < 0,05$ ) nas doses de 125 e 100 mg. Ademais, o composto sintetizado, previamente incubado com o plasma, com posterior adição da peçonha, foi capaz de prolongar o tempo de coagulação em todas as doses avaliadas ( $p < 0,05$ ). A peçonha de *B. moojeni* tem sua atividade trombolítica reduzida para 73, 88 e 82% ( $p < 0,05$ ) quando incubada com o composto nas doses de 125, 100 e 50 mg, respectivamente. A atividade fosfolipásica induzida pela peçonha foi significativamente reduzida após incubação da peçonha com o composto na maior dose (125mg). In addition, foi observado um efeito protetor sobre eritrócitos humanos, exercido pelo composto em todas as doses avaliadas, contra a peçonha de *B. moojeni* (20µg). Desta forma, neste trabalho foi apresentado um protocolo relativamente simples de síntese multicomponente (rendimento satisfatório, baixo custo e ecologicamente adequado), no qual a molécula resultante apresentou diversas atividades biológicas que podem ser melhor exploradas visando aplicações futuras da molécula no contexto da saúde humana.

## INTRODUCTION

No desenvolvimento de novas substâncias farmacológicas, a síntese orgânica está diretamente atrelada à moléculas e componentes previamente isolados de produtos naturais (ABDEL-RAZEK *et al.*, 2020; SULEIMAN *et al.*, 2020). Os alcaloides, encontrados principalmente em plantas, são compostos nitrogenados orgânicos onde um ou mais átomos de nitrogênio (aminas primárias, secundárias, ou terciárias, geralmente) estão presentes (BRAVO *et al.*, 2010). A presença do nitrogênio e/ou de anéis aromáticos em moléculas está evidenciada em diversos princípios ativos de produtos químicos encontrados na medicina, farmacologia e agroquímica (BHAMBHANI; KONDHARE; GIRI, 2021; CORDELL; QUINN-BEATTIE; FARNSWORTH, 2001; MICHAEL, 2008).

Compostos cíclicos contendo um ou mais átomos de nitrogênio, também conhecidos como compostos N-heterocíclicos, são bastante utilizados na medicina e farmacologia devido à sua grande diversidade de atividades biológicas (DUARTE; SANGI; CORRÊA, 2010; JANA; SARKAR; MORRIS, 2020). Como exemplo, podemos citar as funções: antimicrobiano, anticonvulsivante, anti-inflamatória, anticancerígena, anti-helmíntica, anti-histamínica, anti-hipertensiva e antidepressiva (CHOVANCOVA *et al.*, 2020; DUA *et al.*, 2011; NGUYEN; NGUYEN; TRAN, 2021). Assim, devido a essas diversas ações, utilizar esses compostos na síntese de um novo fármaco é de extrema importância.

Contudo, para a indústria, a síntese ainda esbarra em problemas relacionados à aprovação do novo medicamento (probabilidade de 22.900:1 para serem aprovados) e aos altos investimentos necessários (MICHILES; BOTSARIS, 2005). Além disso, são utilizadas grandes quantidades de catalisadores e uma diversidade de produtos, para obter, muitas vezes, um baixo rendimento das moléculas almeçadas.

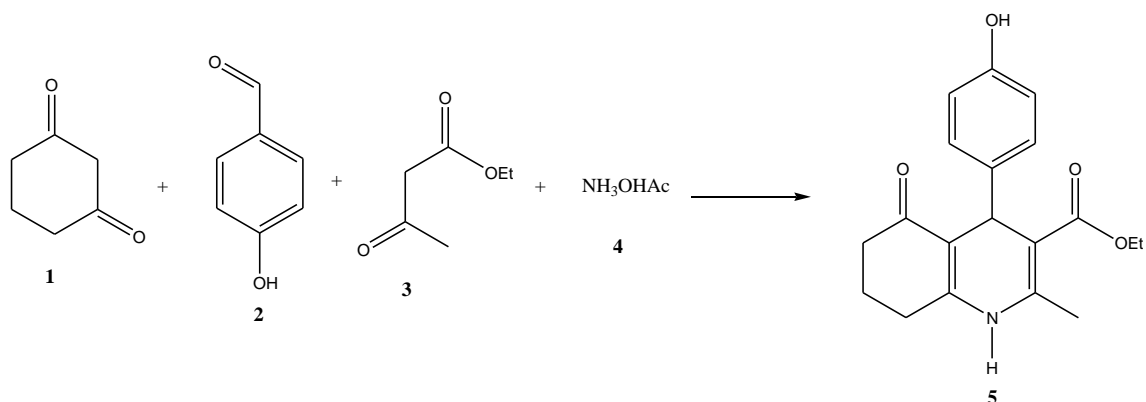
Desta forma, desenvolver um protocolo relativamente simples que resulte em alto rendimento, baixo custo e seja ecologicamente adequado, para a produção de moléculas que apresentam atividades biológicas já descritas, vem sendo um desafio para os químicos orgânicos sintéticos (WILSON; DANISHEFSKY, 2006). De tal modo, a síntese multicomponente (MCR) é uma excelente opção, uma vez que é de fácil realização, tem alta eficiência atômica, tempo de reação reduzido, resulta em menor impacto ambiental e pode ser utilizada no desenvolvimento de novos medicamentos (DEKAMIN *et al.*, 2018; NGUYEN; NGUYEN; TRAN, 2021; WEBER, 2002).

Neste presente trabalho a molécula 4-(4-Hydroxi-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester foi obtida utilizando uma síntese multicomponente simples, eficaz e confiável, sem a utilização de solventes ou catalizadores. Uma vez sintetizada, a prospecção biológica da molécula incluiu ação moduladora sobre fosfolipases A<sub>2</sub> e proteases, avaliação de citotoxicidade e de seus efeitos sobre processos relacionados à hemostasia e atividade antimicrobiana.

## MATERIAL AND METHODS

### Síntese Orgânica

A síntese foi baseada na metodologia descrita por KUMAR *et al.* (2008), sem utilização de catalizadores ou solventes, e partiu dos seguintes reagentes: 1,3-ciclohexanodiona (2mmol) **1**, 4-hidroxibenzaldeído (2mmol) **2**, acetoacetato de etila (2 mmol) **3**, e acetato de amônio (3 mmol) **4**, conforme a Figura 1.



**Figura 1.** Síntese multicomponente da molécula 4-(4-Hydroxi-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester.

### Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear - RMN

A caracterização por RMN foi realizada na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), utilizando um equipamento Bruker Avance III – 14,1 Tesla (600,23 MHz para frequência do hidrogênio) com magneto blindado (Ultrashield Plus®). O espectrômetro possui sonda criogênica TCI (Triple Resonance Cryoprobe Inverse) de 5 mm, com bobinas de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e pré-amplificador, refrigerados a uma temperatura aproximada de 77K (-196 °C). A sonda é equipada com bobina de gradiente de campo no eixo z (53G/cm) e unidade de ajuste automático de sintonia ATMA® (Automatic Tuning and Matching).

## **Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho (IV) com transformada de Fourier (FTIR-ATR)**

Um equipamento Varian acoplado a um acessório de ATR de diamante (Pike GladiATR Technologies) foi utilizado para se obter a espectroscopia na região do infravermelho, com reflexão total atenuada (faixa espectral variando entre 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  e resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  a 2000  $\text{cm}^{-1}$ ).

A análise dos grupos funcionais das moléculas sintetizadas foi realizada por FTIR, onde os espectros de absorção de IV foram obtidos com pastilhas de 34 KBr (2,0 mg da amostra em 200,0 mg de KBr). As análises foram feitas na Central de Análise e Prospecção Química (CAPQ) do Departamento de Química - UFLA.

### **Soluções Teste**

Testes de solubilidade foram realizados com o objetivo de obter amostras parcialmente diluídas em PBS (NaCl 137  $\text{mmol L}^{-1}$ , KCl 2.7  $\text{mmol L}^{-1}$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  10  $\text{mmol L}^{-1}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2  $\text{mmol L}^{-1}$ ), de forma a diminuir a possível interferência do DMSO (utilizado para dissolver o composto) nos ensaios a serem realizados. Uma triagem com o composto sintetizado foi realizada para identificar as doses passíveis de terem seus efeitos farmacológicos avaliados, sem que promovam alterações no ambiente reacional. As doses dos controles inerentes à cada ensaio, também foram previamente determinadas após avaliação de diferentes doses.

Quatro (4) doses foram definidas para os testes de avaliação do potencial modulador sobre enzimas que atuam em processos hemostáticos e anti-inflamatórios: 25, 50, 100, e 125 mg. Nas atividades antimicrobianas, as seguintes doses foram utilizadas: 100, 125, 250 e 500 mg para o teste de difusão em agar, e 500 mg para o teste de diluição seriada com plaqueamento em superfície.

### **Avaliação da Atividade Antimicrobiana**

Testes de sensibilidade por difusão em ágar (antibiograma) e diluição seriada com plaqueamento em superfície (microdiluição em caldo) foram utilizados para avaliar a atividade antimicrobiana da molécula 4-(4-Hydroxy-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydro-quinoline-3-carboxylic-acid ethyl ester, seguindo as recomendações do CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI, 2018).

### **Microrganismos e obtenção do inóculo**

Os microrganismos utilizados (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) foram obtidos da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brasil, e cedidos pelo Laboratório de Bactérias do Departamento de Ciências dos Alimentos (DCA) – UFLA-MG. As culturas estoque foram armazenadas em meio de congelamento (100 mL de água destilada; 15 mL de glicerol; 0,3 g de extrato de levedura; 0,5 g de peptona bacteriológica; 0,5 g de NaCl). Para a reativação das cepas, 100 µL da cultura foi incubada em tubos contendo 10 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion) a 37°C/24h em condições aeróbias. O inóculo foi padronizado com densidade celular de 10<sup>8</sup> UFC/mL pela escala de McFarland.

### **Técnicas para testagem antimicrobiana do derivado de polihidroquinolina**

Uma alíquota padronizada à 10<sup>8</sup> UFC/mL das culturas de *S. aureus* e *P. aeruginosa* foram espalhadas em placas contendo o meio de cultura TSA (Trypticase Soy Agar) e discos contendo a molécula sintetizada (4-(4-Hydroxy-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydro-quinoline-3-carboxylic-acid ethyl ester), nas dosagens de 500 mg, 250 mg, 125 mg e 100 mg, foram adicionados para a realização do antibiograma. As placas foram incubadas a 37 °C por 24h. Após esse período os halos de inibição foram medidos ao redor dos discos. O antibiótico cloranfenicol foi utilizado como controle positivo (CLSI, 2018).

Para a segunda técnica uma solução mãe do composto na concentração de 500 mg/mL foi previamente preparada. Em seguida, 500 µL dessa solução foram transferidos para um eppendorf e adicionados com 500 µL de meio de cultura BHI + a bactéria padronizada. Para o controle positivo foram incubados 1000 µL de BHI + a bactéria padronizada, e essa preparação ficou 24 horas em estufa a 37°C. Para realizar a contagem das células viáveis, foram realizadas diluições sucessivas em eppendorfs, com 900 µL de água destilada e 100 µL das preparações padronizadas, obedecendo o número de colônias viáveis e o tempo de incubação (0h: momento em que eram preparadas, após 24h e 48h). Após cada período, as placas contendo TSA foram incubadas (37°C/24h para *S. aureus* e 37°C/48h para *P. aeruginosa*) e as colônias contadas. O controle positivo correspondeu as bactérias em meio de cultura na ausência do composto sintetizado (CLSI, 2018).



Ambos os testes foram realizados em triplicata.

### **Obtenção de material biológico humano**

Os testes que usaram material biológico humano (coagulação, citotoxicidade sobre eritrócitos e trombolítico) foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos (COEP) da Universidade Federal de Lavras, registrados sob CAAE: 10991019.4.0000.5148 e parecer no. 3.288.976.

O plasma humano citratado foi obtido através de um banco de doação. Os voluntários para a doação de sangue foram cinco pessoas entre 18 e 35 anos que não faziam uso contínuo de medicamentos ou outras drogas, e que não haviam passado por qualquer procedimento cirúrgico ou administração de medicamentos sujeitos a prescrição e venda controladas. Eles também não eram fumantes e não trabalhavam em condições de risco químico ou biológico. Todos os voluntários assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE).

### **Efeitos sobre a coagulação de plasma humano citratado**

A atividade coagulante foi realizada de acordo com experimento descrito por MOURAO *et al.* (1996), utilizando-se 200  $\mu$ L de plasma humano citratado a 37°C. O tempo de coagulação foi medido após adição da peçonha de *Bothrops moojeni*, com leve agitação dos tubos de ensaio, até a formação de um coágulo rígido. O potencial dos compostos em inibir a coagulação foi avaliado com adição dos tratamentos em diversas doses ao plasma citratado ou á peçonha. O tempo necessário para a formação do coágulo foi medido em segundos, sendo que a inibição da atividade coagulante observada pelo aumento médio do tempo da coagulação em relação ao controle positivo.

### **Efeitos sobre trombos sanguíneos humanos e sobre a atividade trombolítica induzida por proteases**

A atividade trombolítica foi avaliada sobre coágulos sanguíneos formados *in vitro* (CINTRA *et al.*, 2012). 100  $\mu$ L de sangue fresco foram distribuídos em poços de placas de microtitulação, deixando-o por 15 minutos em temperatura ambiente para coagular. Após esse período os coágulos foram incubados por 24 horas a 37°C com o composto em diferentes doses. Peçonha de *Bothrops moojeni* (20  $\mu$ g) e PBS (30  $\mu$ L)

foram os controles positivo e negativo, respectivamente. A peçonha foi utilizada para avaliar o potencial do composto em modular a atividade das proteases trombolíticas nela presentes (incubação por 30 minutos a 37°C). The activities were estimated by measuring the volume of liquid released by each thrombus. The values were converted into percentage and the positive control containing *B. moojeni* venom (20µg) was considered as 100% of activity.

### **Efeitos sobre a atividade de fosfolipases A<sub>2</sub>**

A atividade fosfolipásica foi realizada de acordo com metodologia adaptada (GUTIÉRREZ *et al.*, 1988). Um meio contendo 0,01 mol L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, fosfolipídios de gema de ovo (fosfatidilcolina, fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina), 0,005% azida de sódio e ágar bacteriológico 1% dissolvido em PBS (pH 7,2) foi desenvolvido para esta análise. Este meio foi vertido em placas de Petri para sua solidificação. Orifícios de tamanho uniforme (~ 0,5 cm de diâmetro) foram feitos no gel, nos quais o composto foi aplicado em diferentes doses. A atividade anti-inflamatória e moduladora enzimática do composto foi avaliada utilizando-se de fosfolipases A<sub>2</sub> presentes na peçonha de *Bothrops moojeni* (20µg), a qual serviu como ferramenta indutora da quebra dos fosfolipídios. Foi realizada a incubação prévia da peçonha com o composto sintetizado em diferentes doses, por 30 minutos a 37°C. Os halos translúcidos, resultantes da atividade fosfolipásica (expressos em milímetros), foram avaliados após 18 horas de permanência das placas em câmara de cultura celular a 37°C.

### **Atividade citotóxica sobre eritrócitos humanos**

Essa atividade foi avaliada em meio sólido, com substituição dos fosfolipídios por um concentrado de eritrócitos humanos (GUTIÉRREZ *et al.*, 1988). Sangue coletado em tubos contendo heparina foi imediatamente centrifugado e seu sobrenadante descartado. As células foram suspensas em tampão PBS, e lavadas 2 vezes com centrifugações de 1200 g por 10 minutos e aproximadamente 10 mL do mesmo tampão. O concentrado de eritrócitos obtido após as centrifugações foi utilizado na composição do gel (CaCl<sub>2</sub> 0,01 mol L<sup>-1</sup>; eritrócitos lavados em PBS 1:3 v v<sup>-1</sup> PBS; azida de sódio 0,005%; ágar bacteriológico 1% dissolvido em PBS, pH 7,2). O gel foi vertido em placas de Petri, e após sua solidificação, os tratamentos foram aplicados em orifícios de tamanho uniforme (~ 0,5 cm de diâmetro). Foram avaliados: o composto em

diferentes doses; o composto previamente incubado com a peçonha de *B. moojeni*; peçonha de *B. moojeni* pura, 20 µg (controle positivo); DMSO (controle negativo). As placas permaneceram em câmara de cultura celular a 37°C por 18 horas. A formação de halo translúcido ao redor do orifício no gel caracteriza a atividade hemolítica, sendo esta representada pela medida do diâmetro do halo (em milímetros).

### **Análises Estatísticas**

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk ao nível de 5% para a verificação de normalidade dos dados. Nos dados que foram constatados a distribuição normal, o teste de Dunnett foi realizado. Os dados que não apresentarem distribuição normal, uma tentativa de normalização pelo procedimento PROC RANK foi realizada, e os dados não normalizados foram comparados pelo teste Kruskal-Wallis ao nível de 5%. O programa estatístico utilizado foi o SAS (9.0).

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **Síntese e Caracterização**

A maceração dos reagentes levou a um produto sólido amarelo, corroborando dados da literatura (KUMAR *et al.*, 2008), que foi lavado com água destilada gelada para a remoção do excesso de acetato de amônio não reagido, e em seguida permaneceu em descanso por 24h. Para a recristalização do produto, adicionou-se 20 µL de etanol à 68°C para a dissolução do produto (massa sólida), que se transformou em um líquido viscoso, e então este foi filtrado, utilizando filtro, kitassato e bomba de vácuo, gerando os cristais de hexahidroquinolinas.

Para a molécula 4-(4-Hydroxi-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester foi encontrado um grupo hidroxila conectado em posição *para* em relação ao anel nitrogenado. O espectro de RMN de <sup>1</sup>H mostra ressonâncias em δ<sub>H</sub> 4,83 (H4, 1H, *s*), 4,03 (H12, 2H, *q*, <sup>3</sup>J<sub>H12-H13</sub> = 7,0 Hz), 2,55-1,70 (H7, H8 e H9, 6H, *m*), 2,30 (H1, 3H, *s*) e 1,18 (H13, 3H, *t*, <sup>3</sup>J<sub>H13-H12</sub> = 7,0 Hz) compatível com o que é esperado para essa classe de moléculas e de acordo com o que já foi descrito anteriormente. Na região de olefínicos e aromáticos, dois multipletos bem separados e definidos, integrando para 4 átomos de hidrogênios, confirmam a presença de um anel aromático dissubstituído com padrão *para*: δ<sub>H</sub> 6,99-6,96 (H15 e H16, 2H, *m*) e 6,61-6,59 (H16 e H18, 2H, *m*) ppm.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  foi possível identificar o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  155,7 (C17) ppm, compatível com carbono  $sp^2$  de anel aromático conectado diretamente à um átomo de oxigênio de hidroxila, além do sinal em  $\delta_{\text{C}}$  138,9 (C14) ppm de acordo com carbono  $sp^2$  de anel aromático não hidrogenado em posição *para* ao carbono oxigenado. Os carbonos C15, C19, C16 e C18 têm ressonância, respectivamente, em  $\delta_{\text{C}}$  128,7 e 114,9. Os demais picos observados, também corroboram para a caracterização estrutural:  $\delta_{\text{C}}$  194,1 (C6), 167,5 (C11), 151,4 (C10), 144,7 (C2), 111,9 (C5), 104,5 (C3), 59,4 (C12), 50,7 (C7), 37,0 (C4), 35,0 (C7), 26,6 (C9), 21,3 (C8), 18,6 (C1) e 14,6 (C13) ppm.

O espectro de IV para o produto da síntese mostra a banda de estiramento O-H de álcool (fenol) em  $3409\text{ cm}^{-1}$ , que não se encontra alargada devido à dificuldade que essas moléculas têm de interagir entre si por ligação de hidrogênio devido ao impedimento estérico, a banda de estiramento N-H de amina primária em  $3522\text{ cm}^{-1}$ , estiramento  $\text{C}_{sp^2}\text{-H}$  em  $3067\text{ cm}^{-1}$ , estiramento de  $\text{C}_{sp^3}\text{-H}$  em  $2954$ , estiramento de  $\text{C=O}$  de éster em  $1610\text{ cm}^{-1}$ , já que esta é uma carbonila com ligação mais fraca devido à ressonância, estiramento de  $\text{C=O}$  de cetona em  $1671\text{ cm}^{-1}$ , estiramento da ligação  $\text{C=C}$  aromática em  $1478\text{ cm}^{-1}$  e bandas de estiramento assimétrico da ligações  $\text{C-O-C}$  (éster) em  $1181$  e  $1136\text{ cm}^{-1}$ . A banda em  $842\text{ cm}^{-1}$  provavelmente se refere ao dobramento fora do plano de anel aromático com padrão de substituição *para*.

### Ensaio antimicrobianos

O motivo da escolha das cepas testadas é devido a sua importância em infecções em humanos, assim como sua presença em feridas, o que causa o retardo no processo de cicatrização. No teste de difusão em ágar não foi possível avaliar o composto, uma vez que este mostrou-se incapaz de difundir-se no meio sólido. Entretanto, para a técnica de diluição seriada, os resultados foram estatisticamente significativos, evidenciando a ação antimicrobiana do composto tanto para *S. aureus* quanto para *P. aeruginosa*, conforme se observa nas Tabelas 1 e 2.

Atividade antimicrobiana					
Tempo (h) (Unidades Formadoras de Colônias, UFC)					
		Controle	Composto	CV (%)	P valor
*	0	5,09	5,00	1,94	0,308
*	24	10,28	4,04	47,83	0,033
*	48	15,32	2,22	83,32	0,033

**Tabela 1.** Atividade antimicrobiana do composto 4-(4-hydroxy-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydro-quinoline-3-carboxylic-acid ethyl ester e do controle positivo sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. CV (%): Coeficiente de Variação. P valor: Nível Descritível. \* Dados normalizados.

Atividade antimicrobiana					
Tempo (h)	(Unidades Formadoras de Colônias, UFC)		CV (%)	P valor	
	Control e	Composto			
*	0	4,52	4,52	0,76	0,920
*	24	12,36	0,00	109,55	0,011
*	48	18,44	0,00	109,69	0,011

**Tabela 2.** Atividade antimicrobiana do composto 4-(4-hydroxy-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydro-quinoline-3-carboxylic-acid ethyl ester e do controle positivo sobre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. CV (%): Coeficiente de Variação. P valor: Nível Descritível. \* Dados normalizados.

Para ambas as bactérias no tempo zero não há diferença significativa entre o composto e o controle, o que já era esperado, uma vez que esse tempo ocorre imediatamente após realizar a diluição do inóculo bacteriano. Entretanto, quando as placas contendo TSA são semeadas e incubadas nos tempos de 24h e 48h, respectivamente, observa-se um resultado significativo tanto para *S. aureus* quanto para *P. aeruginosa*. Para *S. aureus* observa-se uma diminuição do número de células viáveis em 24h e em 48h (tabela 1), enquanto para *P. aeruginosa* o tempo de 24h de tratamento foi suficiente para eliminar células viáveis. Desta forma, o composto apresentou uma ação bactericida acentuada para a bactéria Gram negativa, que seria mais difícil de eliminar de organismos hospedeiros segundo JUBEH; BREIJYEH; KARAMAN (2020).

JAMALE *et al.* (2019), estudando também derivados de polihidroquinolinas, afirmam que seus derivados tiveram potencial significativo como antimicrobiano e antituberculose, com alguns dos compostos se mostrando eficazes contra

*Mycobacterium tuberculosis*, considerada uma bactéria de extrema dificuldade quanto sua eliminação.

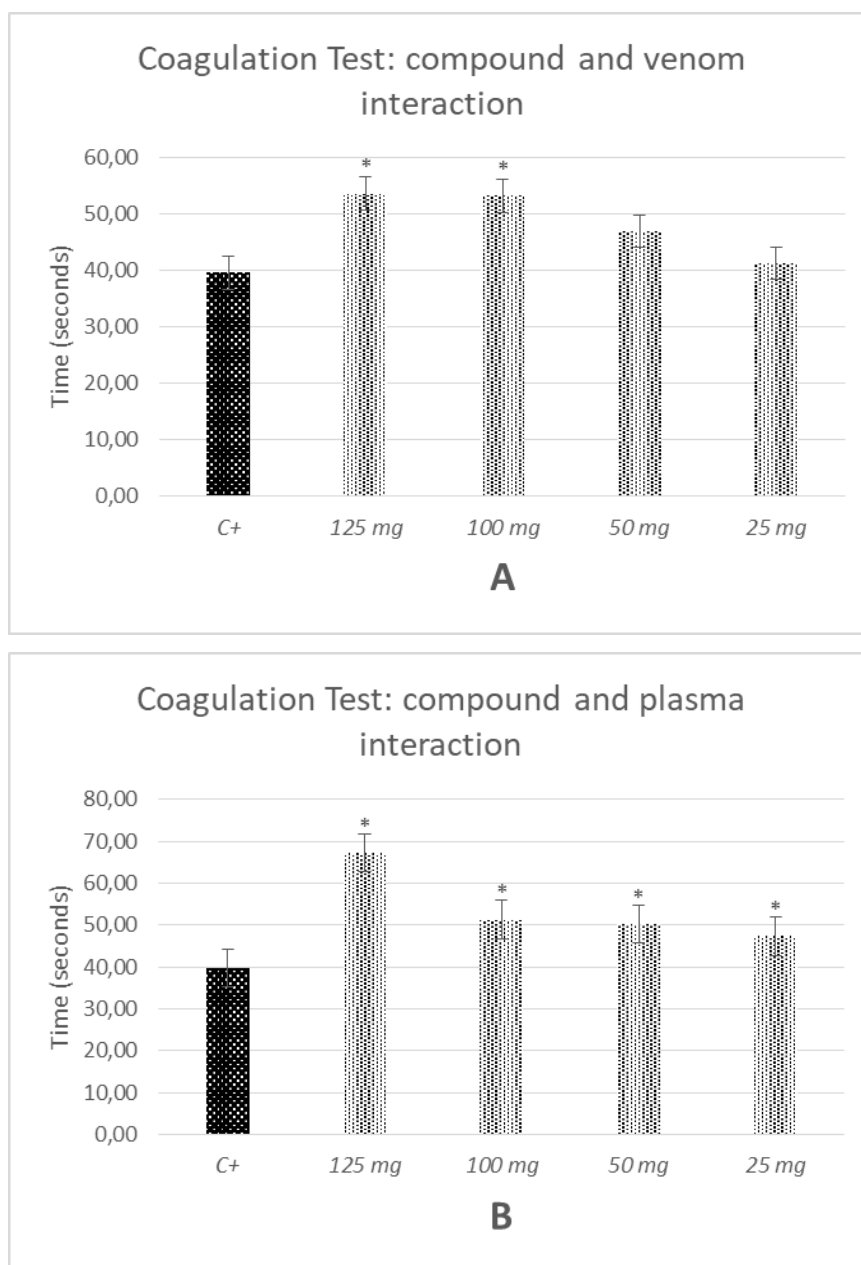
Recentemente (MANE *et al.*, 2021), testes antimicrobianos de vários derivados de polihidroquinolinas contra cepas de bactérias Gram positivas (*B. subtilis*) e Gram negativas (*E. coli*) e também contra fungos filamentosos (*A. niger*) e leveduras (*S. cerevisiae*), foram realizados objetivando a determinação da concentração inibitória mínima (MIC) e, segundo os autores, os compostos que possuíam como grupos funcionais substituídos no aldeído aromático nitro, cloro, bromo e flúor, obtiveram os melhores resultados, corroborando os dados observados no presente trabalho.

Na molécula sintetizada foi utilizado o composto 1,3-cicloexanodiona em detrimento do composto 5,5-dimetil-1,3-cicloexanodiona (dimedone), o que os diferencia em dois grupos metil no carbono de posição de número 5. Essa modificação, se for levado em consideração a absorção pelo trato gastrointestinal, poderia gerar alguma diferença significativa entre os dois compostos, uma vez que cadeias carbônicas aumentam a lipossolubilidade (CHEN *et al.*, 2020), podendo afetar a absorção em nível de membrana. Entretanto, não foi possível observar diferença significativa na ação bactericida exercida pelos dois compostos, sendo necessários estudos mais aprofundados sobre seus mecanismos de ação biológica.

### **Efeitos sobre a coagulação de plasma humano citratado**

Quando incubado previamente com a peçonha de *Bothrops moojeni* (40µg), o composto nas doses de 125 e 100 mg foi capaz de reduzir a atividade coagulante induzida pelas proteases e prolongar o tempo de coagulação do plasma em 14 e 13,66 segundos ( $p < 0,05$ ), respectivamente (Figura 2A).

No entanto, quando o composto é incubado previamente com o plasma humano citratado, seguido pela adição do indutor de coagulação (peçonha), observa-se um aumento no tempo de coagulação em todas as doses testadas ( $p < 0,05$ ). As doses de 125, 100, 50 e 25 mg induziram aumentos no tempo de coagulação de 27,66, 11,66, 10,66 e 7,66 segundos, respectivamente, em comparação ao tempo obtido no controle positivo, peçonha de *B. moojeni* (Figura 2B).



**Figura 2.** (A) Efeitos sobre a coagulação de plasma humano citratado da molécula sintetizada 4-(4-Hydroxi-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester previamente incubada com a peçonha de *Bothrops moojeni* e posteriormente adicionados ao plasma para a contagem do tempo. (B) Efeitos sobre a coagulação de plasma humano citratado da molécula 4-(4-Hydroxi-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester previamente incubada com o plasma e posterior adição da peçonha de *Bothrops moojeni* e contagem do tempo. Controle positivo (C+): peçonha de *Bothrops moojeni* (40 µg). Amostras: composto nas

doses 125, 100, 50 e 25 mg. Data represent the means and standard deviation of triplicates. \*Statistically significant – differs from the positive control ( $p < 0.05$ ).

O composto 4-(4-Hydroxi-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester não induziu coagulação quando adicionado diretamente ao plasma (data not shown), porém, foi capaz de interagir com fatores da cascata de coagulação inibindo a ação de enzimas coagulantes presentes na peçonha. Ademais, interações da molécula com as proteases indutoras de coagulação presente na peçonha, também podem ser sugeridas quando consideramos os resultados do ensaio realizado com incubação prévia destes e posterior adição do plasma.

Na prevenção e/ou tratamento da trombose e outras doenças relacionadas a ela, os medicamentos mais utilizados são anticoagulantes, agentes antiplaquetários que inibem a formação de coágulos sanguíneos e medicamentos fibrinolíticos que dissolvem o coágulo (RINGLEB, 2006). Essa doença é uma das maiores causas de infartos e doenças cardiovasculares, mesmo com diversos tipos de medicamentos já existentes (LICHOTA; SZEWCZYK; GWOZDZINSKI, 2020). Desta forma, o potencial de interação com fatores da cascata e ainda de interação com proteases similares à trombina, podem ser amplamente explorados em busca de formulações para novos fármacos. Estudos futuros que possibilitem entender os mecanismos de ação desse composto são de extrema relevância na trajetória que possibilite seu uso clínico.

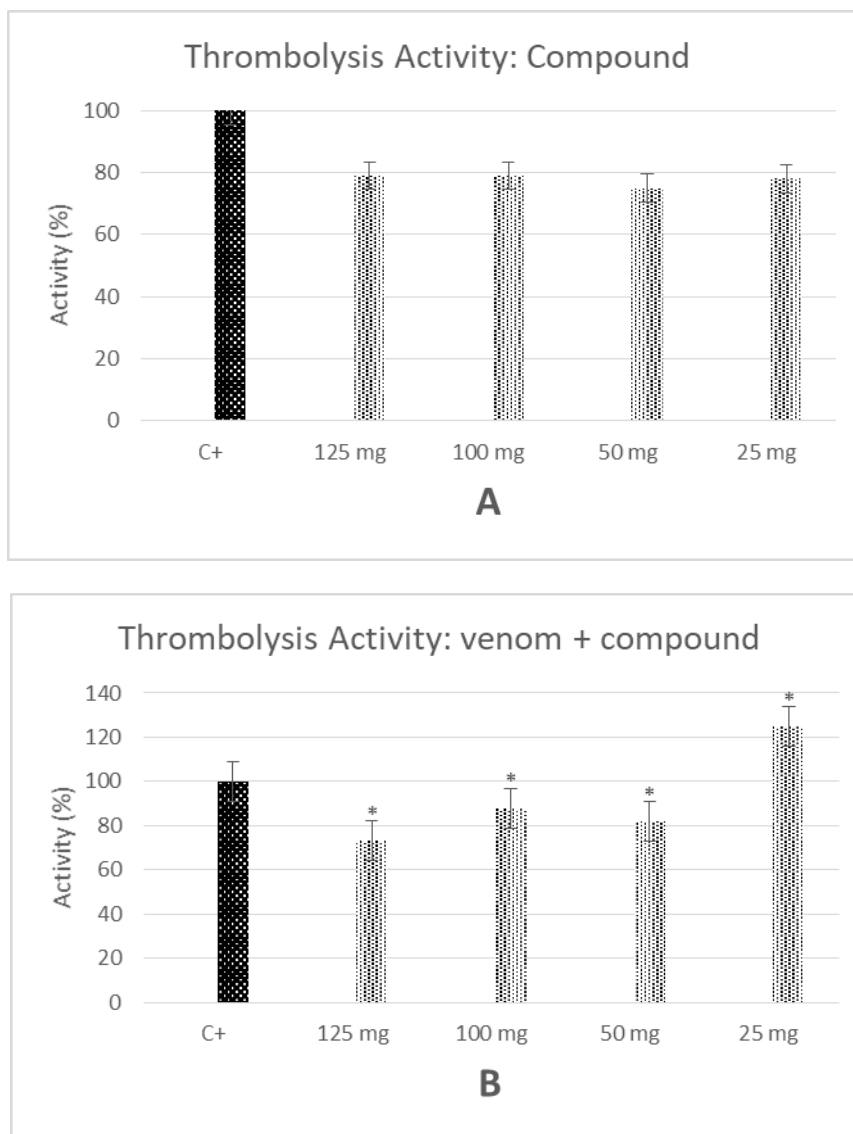
### **Efeitos sobre trombos sanguíneos humanos e sobre a atividade trombolítica induzida por proteases**

4-(4-Hydroxi-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester não diferiu estatisticamente do controle positivo (*Bothrops moojeni* - 20 $\mu$ g) nas doses avaliadas. Desta forma, observa-se que o composto sintetizado exerce efeitos de trombólise similar ao da peçonha (Figura 3A).

Quando incubada com o composto sintetizado nas doses de 125, 100 e 50 mg, a atividade trombolítica exercida pela peçonha apresentou reduções para 73, 88 e 82%, respectivamente ( $p < 0,05$ ). Estes resultados caracterizam o efeito inibitório da 4-(4-Hydroxi-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester sobre as proteases indutoras de trombólise. Entretanto, o composto possui um efeito potencializador dessa atividade na sua menor concentração (25 mg) (Figura



3B). Este resultado é condizente com o efeito apresentado no teste de coagulação, uma vez que, o composto mostrou-se capaz de interagir com proteínas do plasma/sanguíneas assim como inibiu a ação de proteases coagulantes.



**Figura 3.** (A) Atividade sobre trombos sanguíneos humanos exercida pela molécula sintetizada 4-(4-Hydroxi-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester. (B) Avaliação da atividade trombolítica induzida por peçonha de *Bothrops moojeni* quando incubada com a molécula sintetizada 4-(4-Hydroxi-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester. Controle positivo (C+): peçonha de *Bothrops moojeni* (20 µg). Amostras:

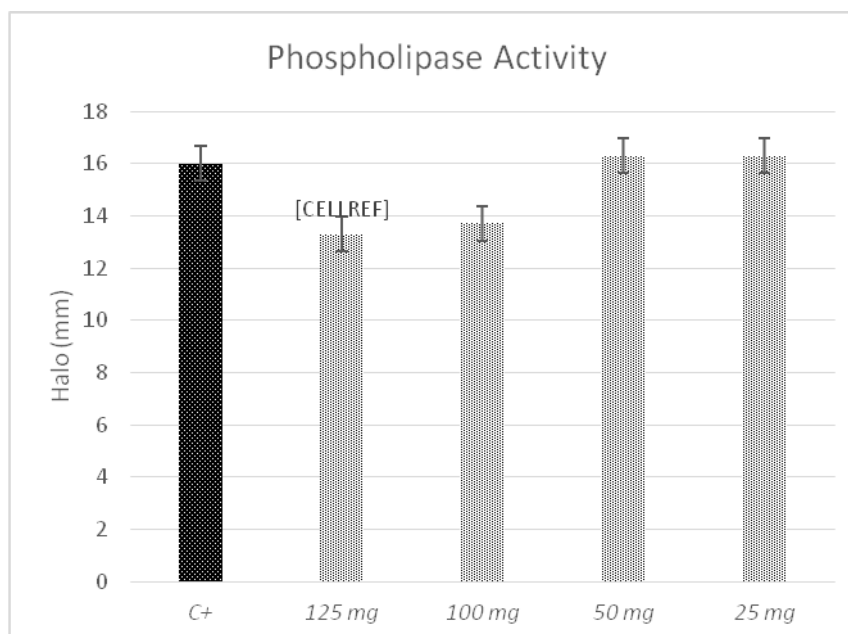
composto nas doses 125, 100, 50 e 25 mg. Data represent the means and standard deviation of triplicates. \*Statistically significant – differs from the positive control ( $p < 0.05$ ).

### **Efeitos sobre a atividade de fosfolipases A<sub>2</sub>**

O composto sintetizado não induziu atividade fosfolipásica nas condições e doses testadas (data not shown).

Entretanto, quando avaliado sobre a atividade fosfolipásica induzida pela peçonha de *Bothrops moojeni* (20 $\mu$ g), o composto 4-(4-Hydroxi-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester na dose de 125 mg, foi capaz de inibir fosfolipases A<sub>2</sub>, promovendo uma redução de 2,7mm ( $p < 0,05$ ) em relação ao halo formado no controle positivo (16mm). Houve também uma tendência de inibição da atividade fosfolipásica na dose de 100mg, a qual apresentou halo de 13,7mm ( $p = 0.06$ ) (Figura 4).

A quebra de fosfolipídeos de membrana pode desencadear processos inflamatórios no corpo humano, ao produzir metabólitos como o ácido araquidônico e lisofosfolipídeos (MEYER *et al.*, 2005). Desta forma, encontrar compostos naturais ou sintéticos que são capazes de inibir a ação das fosfolipases é de suma importância no ramo farmacêutico. As inibições significativas da atividade da PLA<sub>2</sub> observada nas maiores doses do composto destacam um potencial anti-inflamatório que pode ser melhor explorado em estudos futuros.



**Figura 4.** Efeitos da 4-(4-Hydroxi-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester sobre a atividade de fosfolipases A<sub>2</sub>. Controle positivo (C+): peçonha de *Bothrops moojeni* (20 µg). Amostras: composto nas doses 125, 100, 50 e 25 mg, previamente incubadas com peçonha. Data represent the means and standard deviation of triplicates. \*Statistically significant – differs from the positive control (p <0.05).

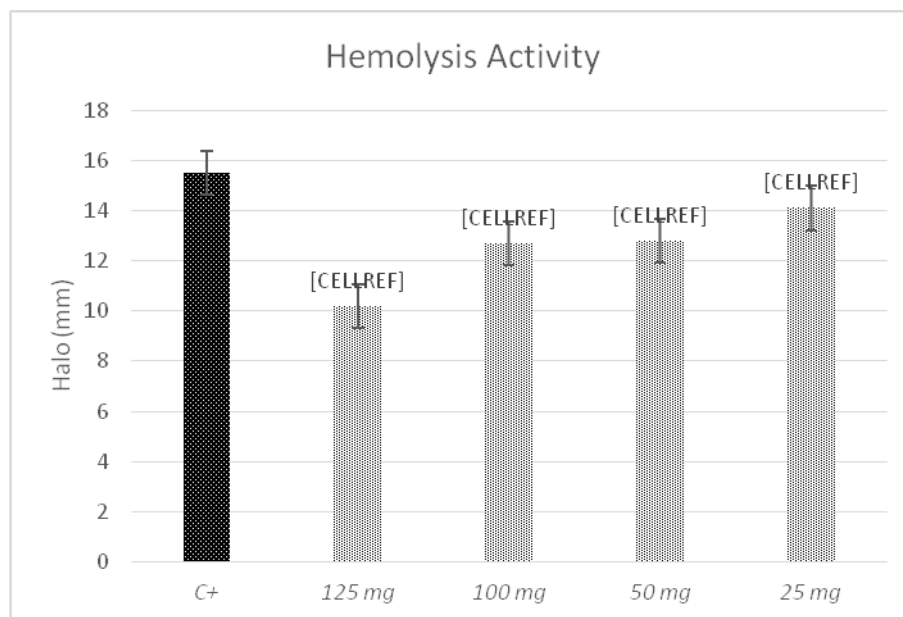
O uso da peçonha de serpentes como ferramenta para análise da ação de fosfolipases A<sub>2</sub> e seus possíveis inibidores foi avaliado em trabalho feito por (SALES *et al.*, 2017). O trabalho demonstra a similaridade entre as fosfolipases humanas e da peçonha, e utiliza de modelos computacionais e experimentais para avaliar a atividade anti-inflamatória do ácido vanílico. Desta forma, vemos que inibidores de fosfolipases, tal como o caso do composto aqui avaliado, podem servir como potenciais anti-inflamatórios.

#### Atividade citotóxica sobre eritrócitos humanos

O composto sintetizado não foi citotóxico sobre eritrócitos humanos, quando avaliado *in vitro*, nas condições e doses testadas (data not shown).

Contudo, foi observado um efeito protetor exercido pelo composto sobre as membranas dos eritrócitos, promovendo redução na citotoxicidade induzida por enzimas presentes na peçonha, quando previamente incubados. O controle positivo (*Bothrops*

*moojeni* - 20 $\mu$ g) induziu halos de 15,5 mm e as reduções da atividade exercidas pelo composto foram de 5,3, 2,8, 2,7 e 1,4 mm nas doses de 125, 100, 50 e 25 mg, respectivamente ( $p < 0.05$ ) (Figura 5).



**Figura 5.** Efeitos da molécula 4-(4-Hidroxi-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester sobre a atividade citotóxica induzida por peçonha de *Bothrops moojeni* em eritrócitos humanos. Controle positivo (C+): peçonha de *Bothrops moojeni* (20  $\mu$ g). Amostras: composto nas doses 125, 100, 50 e 25 mg, previamente incubadas com a peçonha. Data represent the means and standard deviation of triplicates. \*Statistically significant – differs from the positive control ( $p < 0.05$ ).

A atividade citotóxica de derivados de polihidroquinolinas foi avaliada em trabalhos com diversas linhagens celulares (FAN; SHEN; ZHOU, 2018), e inibições significativas foram observadas sobre células tumorais (osteosarcoma) para 3 derivados sintetizados (Methyl 2,7,7-trimethyl-4-(2-cyanophenyl)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinoline-3-carboxylate, Methyl 2,7,7-trimethyl-4-(2-methoxyphenyl)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinoline-3-carboxylate e Methyl 2,7,7-trimethyl-4-(3,4-dimethylphenyl)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinoline-3-carboxylate) com IC50 variando entre 25 e 45  $\mu$ M.

DA COSTA CABRERA *et al.* (2016) reportaram o efeito antiproliferativo de diversos derivados de PHQ sobre células gliais (glioma). Os autores observaram um

efeito decrescente e dose-dependente (concentrações variavam de 5 a 50  $\mu\text{M}$ ) das PHQ sobre a viabilidade celular. Eles também descreveram que a atividade exercida, pelos derivados analisados, era mais efetiva nos compostos que apresentavam a presença de um grupo hidroxila ligado ao anel aromático. No presente trabalho, o derivado de PHQ 4-(4-Hydroxi-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester também contém tal grupo.

## CONCLUSION

O presente trabalho demonstrou a síntese multicomponente sem a utilização de solventes e catalizadores da 4-(4-Hydroxi-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester, conforme princípios da química verde. Na triagem biológica, a molécula exibiu atividades antimicrobianas e anti-citotóxica, assim como exerceu potencial modulador sobre enzimas que atuam em processos hemostáticos e inflamatórios (fosfolipases  $A_2$ , serino e metaloproteases), devendo ser melhor explorada como um possível novo fármaco da classe dos alcaloides.

## REFERENCES

- ABDEL-RAZEK, A. S. *et al.* Microbial natural products in drug discovery. *Processes*, v. 8, n. 4, p. 1–19, 2020.
- BHAMBHANI, S.; KONDHARE, K. R.; GIRI, A. P. Review: Diversity in Chemical Structures and Biological Properties of Plant Alkaloids. *Molecules*, v. 26, n. 3374, p. 1–29, 2021.
- BRAVO, H. *et al.* Phytotoxicity of indole alkaloids from cereals. *Revista Latinoamericana de Química*, v. 38, n. 2, p. 123–129, 2010.
- CHEN, T. *et al.* A Systematic Review on Traditional Uses, Sources, Phytochemistry, Pharmacology, Pharmacokinetics, and Toxicity of Fritillariae Cirrhosae Bulbus. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2020, p. 1–26, 2020.
- CHOVANCOVA, B. *et al.* Calcium signaling affects migration and proliferation differently in individual cancer cells due to nifedipine treatment. *Biochemical Pharmacology*, v. 171, n. September 2019, p. 1–15, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.113695>>.
- CINTRA, A. C. O. *et al.* Batroxase, a new metalloproteinase from B. atrox snake venom with strong fibrinolytic activity. *Toxicon*, v. 60, n. 1, p. 70–82, 2012. Disponível

em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.03.018>>.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). *Clinical and Laboratory Standards Institute Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically Standard,, Approval CDM-A.; M07 Methods for dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*. [S.l: s.n.], 2018.

CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved Standard-Eleventh Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute. .* [S.l: s.n.], 2018.

CORDELL, G. A.; QUINN-BEATTIE, M. LOU; FARNSWORTH, N. R. The potential of alkaloids in drug discovery. *Phytotherapy Research*, v. 15, n. 3, p. 183–205, 2001.

DA COSTA CABRERA, D. *et al.* Synthesis and antiproliferative activity of novel hybrid 3-substituted polyhydroquinoline-fatty acids. *MedChemComm*, v. 7, n. 11, p. 2167–2176, 2016.

DEKAMIN, M. G. *et al.* Alginic acid: A mild and renewable bifunctional heterogeneous biopolymeric organocatalyst for efficient and facile synthesis of polyhydroquinolines. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 108, p. 1273–1280, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.050>>.

DUA, R. *et al.* Pharmacological Significance of Synthetic Heterocycles Scaffold: A Review. *Advances in Biological Research*, v. 5, n. 3, p. 120–144, 2011.

DUARTE, P. D.; SANGI, D. P.; CORRÊA, A. G. Microwave-Assisted Synthesis of N - Heterocyclic Compounds. *Revista Virtual de Química*, v. 2, n. 3, p. 204–213, 2010.

FAN, X. X.; SHEN, P.; ZHOU, X. H. Novel Pyran and Polyhydroquinoline Derivatives: Inhibiting Human Osteosarcoma Activity. *Russian Journal of General Chemistry*, v. 88, n. 6, p. 1247–1251, 2018.

GUTIÉRREZ, J. *et al.* An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon*, v. 26, n. 4, p. 411–413, jan. 1988.

JAMALE, D. K. *et al.* Glycerol Mediated Synthesis, Biological Evaluation, and Molecular Docking Study of 4-(1H-pyrazol-4-yl)-polyhydroquinolines as Potent Antitubercular Agents. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, v. 56, n. 2, p. 608–618, 2019.

JANA, S.; SARKAR, S.; MORRIS, S. A. Recent developments towards the synthesis of

- paroxetine: A 3,4-disubstituted piperidine. *Tetrahedron*, v. 76, n. 25, p. 1–14, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tet.2020.131215>>.
- JUBEH, B.; BREIJYEH, Z.; KARAMAN, R. Resistance of gram-positive bacteria to current antibacterial agents and overcoming approaches. *Molecules*, v. 25, n. 12, p. 1–23, 2020.
- KUMAR, S. *et al.* An efficient, catalyst- and solvent-free, four-component, and one-pot synthesis of polyhydroquinolines on grinding. *Tetrahedron*, v. 64, n. 3, p. 536–542, 2008.
- LICHOTA, A.; SZEWCZYK, E. M.; GWOZDZINSKI, K. Factors affecting the formation and treatment of thrombosis by natural and synthetic compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 21, p. 1–54, 2020.
- MANE, P. *et al.* Biogenic synthesis of ZnO nanoparticles from *Parthenium hysterophorus* extract and its catalytic activity for building bioactive polyhydroquinolines. *Research on Chemical Intermediates*, v. 47, n. 5, p. 1743–1758, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11164-020-04365-8>>.
- MEYER, M. C. *et al.* Phospholipase A 2 Inhibitors as Potential Anti-Inflammatory Agents CLASSIFICATION OF PHOSPHOLIPASE A 2 ENZYMES. *Current Pharmaceutical Design*, v. 11, p. 1301–1312, 2005.
- MICHAEL, J. P. Quinoline, quinazoline and acridone alkaloids. *Natural Product Reports*, v. 25, n. 1, p. 166–187, 2008.
- MICHILES, E.; BOTSARIS, A. S. Synthetic Medicines and Phytopharmaceuticals : their P otential. *Revista Fitos*, v. 1, n. 1, p. 36–42, 2005.
- MOURAO, P. A. S. *et al.* Structure and anticoagulant activity of a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm. Sulfated fucose branches on the polysaccharide account for its high anticoagulant action. *Journal of Biological Chemistry*, v. 271, n. 39, p. 23973–23984, 1996.
- NGUYEN, V. T.; NGUYEN, H. T.; TRAN, P. H. One-pot three-component synthesis of 1-amidoalkyl naphthols and polyhydroquinolines using a deep eutectic solvent: a green method and mechanistic insight. *New Journal of Chemistry*, v. 45, n. 4, p. 2053–2059, 2021.
- RINGLEB, P. A. Thrombolytics, anticoagulants, and antiplatelet agents. *Stroke*, v. 37, n. 2, p. 312–313, 2006.
- SALES, T. A. *et al.* Can inhibitors of snake venom phospholipases A2 lead to new

insights into anti-inflammatory therapy in humans? A theoretical study. *Toxins*, v. 9, n. 11, p. 1–14, 2017.

SULEIMAN, S. *et al.* Anticancer effects of an extract from a local planarian species on human acute myeloid leukemia HL-60 cells in vitro. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 130, n. June, p. 110549, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110549>>.

WEBER, L. The Application of Multi-Component Reactions in Drug Discovery. *Current Medicinal Chemistry*, v. 9, n. 23, p. 1241–1253, 2002.

WILSON, R. M.; DANISHEFSKY, S. J. Small molecule natural products in the discovery of therapeutic agents: The synthesis connection. *Journal of Organic Chemistry*, v. 71, n. 22, p. 8329–8351, 2006.



**Potencial antimicrobiano e ação sobre hemostasia e inflamação: síntese do 4-(2-chloro-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester**

Marcus Vinicius Cardoso Trento<sup>1</sup>, Gustavo Henrique Andrade Machado<sup>1</sup>, Sergio Scherrer Thomasi<sup>1</sup>, Silvana Marcussi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry. Universidade Federal de Lavras (UFLA), Campus Universitário, Lavras, MG, Brazil, PO Box 3037, Zip Code 37200-000, Phone no. +55(35)3829-1893.

**Corresponding author:** MSc. Marcus Vinicius Cardoso Trento. Department of Chemistry, Biochemistry Laboratory. Universidade Federal de Lavras (UFLA), Campus Universitário, Lavras, MG, Brazil, PO Box 3037, Zip Code 37200-000, Phone no. +55(35)3829-1893. [marcusvinicius.ct@gmail.com](mailto:marcusvinicius.ct@gmail.com)

## RESUMO

Nos últimos anos uma ênfase muito grande tem sido dada as chamadas reações multicomponentes (MRCs) que estão sendo utilizadas para obtenção de muitas rotas sintéticas, possibilitando modificações orgânicas, e a síntese de vários compostos farmacologicamente ativos com efeitos biológicos interessantes. Além disso, as MRCs permitem uma reação mais limpa pois forma pouco ou nenhum subproduto, o que é de grande valia para a indústria farmacêutica, que procura ser ambientalmente sustentável. Devido ao menor gasto energético, baixo desperdício de processo e baixo custo de produção, as MRCs oferecem vantagens notáveis. Com este avanço, tem surgido a síntese de muitos compostos heterocíclicos inspirados em compostos naturais, destacando e dando uma atenção especial para a síntese de polihidroquinolinas (PHQs) devido ao seu alto nível biológico e farmacológico, uma vez que possuem diferentes propriedades medicinais, como por exemplo, funções neuroprotetora, anti-inflamatória, hepatoprotetora, antibiótica e anti-câncer. O derivado hexahidroquinolínico 4-(2-chlorophenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester foi sintetizado sem o uso de catalisadores ou solventes, conforme critérios da química verde. Para a caracterização desta molécula foram feitas análises de ressonância magnética nuclear RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e espectroscopia na região do Infravermelho (IV), com transformada de Fourier, e os resultados demonstram que a molécula foi obtida com êxito. A molécula isoladamente não teve efeitos na coagulação no plasma humano citratado, porém ela prolonga o tempo de coagulação induzida pela peçonha de *Bothrops moojeni* em 13,33, 14,66 e 11,33 segundos, quando incubadas previamente, nas doses de 125, 100 e 50 mg ( $p < 0,05$ ). A molécula sintetizada apresentou resultado estatisticamente significativo na dissolução de trombos, apenas na dose de 50 mg ( $p < 0,05$ ). Entretanto, quando incubada com a peçonha de *B. moojeni* para avaliar seu potencial inibitório de proteases trombolíticas, esta molécula inibiu a atividade da peçonha em torno de 20% nas doses de 125, 100 e 50 mg ( $p < 0,05$ ). A pré-incubação da molécula com a peçonha (20 $\mu\text{g}$ ), nas doses de 125, 100, e 50 mg, resultou em redução da atividade das fosfolipases  $\text{A}_2$ , para halos de 13, 12 e 14,3 mm, respectivamente, em comparação ao halo de 16 mm formado pelo controle positivo. A incubação da molécula com a peçonha de *Bothrops moojeni* (20 $\mu\text{g}$ ) reduziu a citotoxicidade induzida principalmente por proteases e, conseqüentemente, demonstrou efeitos protetores aos eritrócitos humanos. Em relação a atividade antimicrobiana, o composto não foi capaz de difundir no ágar, impossibilitando sua avaliação pelo teste de difusão em ágar. Entretanto, na técnica de diluição seriada a molécula mostrou-se promissora na inibição de crescimento bacteriano, tanto para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 quanto para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, sendo avaliada com dosagem menor que alguns antimicrobianos utilizados na clínica. Desta forma, podemos concluir que a molécula foi sintetizada com êxito, com rendimento satisfatório, e apresentou propriedades biológicas (antimicrobiana, anti-inflamatória, trombolítica, inibidora de proteases e anticoagulante).

**Palavras-chave:** Síntese multicomponente, Química Verde, Triagem Biológica

## 1. INTRODUÇÃO

A síntese multicomponente (MCR) tem sido bastante utilizada para a formulação de novas estruturas moleculares complexas (FAN, WEIGANG & WANG, LIANJIE & AHMAR, MOHAMMED & JIANENG, TAN & POPOWYCZ, FLORENCE & QUENEAU, 2020; HAJI, 2016; PALLADACYCLES, 2019), pois forma pouco ou nenhum subproduto, o que é de grande valia para a indústria farmacêutica que procura ser ambientalmente sustentável (BOSICA *et al.*, 2021; DEKAMIN *et al.*, 2018). Muitas são as vantagens das MCRs sobre as sínteses comuns, tais como: alta eficiência atômica, fácil realização, baixos custos, tempo de reação reduzido e menos impacto ambiental (BRAHMACHARI; DAS, 2012; GULATI; JOHN; SHANKARAIHAH, 2021).

As polihidroquinolinas têm sido retratadas como moléculas bioativas de grande importância, uma vez que possuem diferentes propriedades medicinais, como por exemplo, funções neuroprotetora, anti-inflamatória, hepatoprotetora, antibiótica, anti-câncer, além de atuarem como anti-agregantes plaquetários, vasodilatadoras e anti-isquêmicas (BETECK *et al.*, 2021; CHEN, Y. L. *et al.*, 2001; JAMALE *et al.*, 2019; JOSHI; PAWAR, 2013; KUMAR, A. *et al.*, 2010; PAIDEPALA *et al.*, 2014; ROMA *et al.*, 2000).

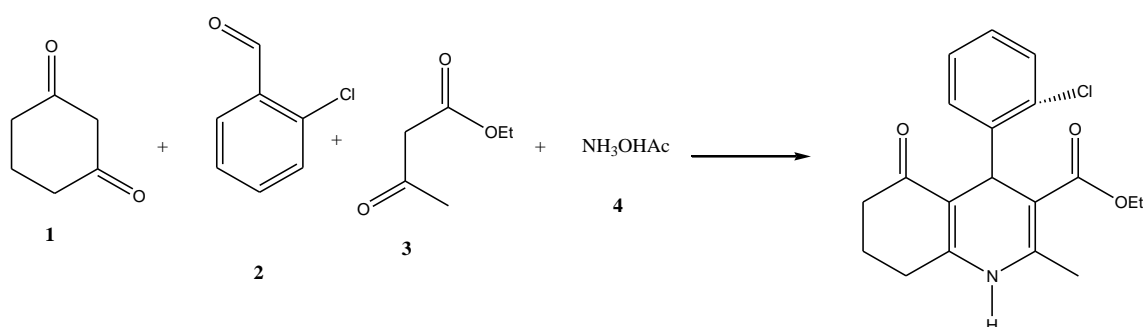
O melhor método para a síntese de polihidroquinolinas (PHQs), atualmente, envolve uma reação modificada de Hantzsch (KUMAR, S. *et al.*, 2008; SHAHEEN; EL-EMAM; EL-GOHARY, 2020). As PHQs são derivados assimétricos das 1,4-dihidropiridinas [um farmacóforo com núcleo heterocíclico pentassubstituído que possui diversas atividades biológicas (NUNEZVERGARA *et al.*, 1996; SWARNALATHA; PRASANTHI, 2011)], e os compostos 1,3-dicetonas cíclicas, aldeídos aromáticos, acetoacetato de etila e acetato de amônio (DAVOODNIA; KHASHI; TAVAKOLI-HOSEINI, 2013; REDDY; RAGHU, 2008) são incorporados a este heterociclo possibilitando a obtenção de vários derivados desta classe de compostos com efeitos biológicos.

Desta forma, este trabalho objetivou a síntese multicomponente do derivado de polihidroquinolina 4-(2-chloro-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester, sua caracterização e prospecção de funcionalidade biológica, pela avaliação de seus efeitos *in vitro* em ensaios de coagulação/anticoagulação, hemólise, trombólise, e atividade fosfolipásica, além de avaliar sua atividade antimicrobiana.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Síntese Orgânica

A síntese da molécula 4-(2-chloro-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester foi realizada sem a utilização de catalizadores ou solventes, seguindo a metodologia descrita por KUMAR *et al.* (2008). Os seguintes reagentes foram utilizados para esta síntese multicomponente: 1,3-ciclohexanodiona (2 mmol) **1**, 2-cloro-benzaldeído (2mmol) **2**, acetoacetato de etila (2 mmol) **3**, e acetato de amônio (3 mmol) **4**, de acordo com a Figura 1.



**Figura 1.** Síntese multicomponente da molécula 4-(2-chloro-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester.

### 2.2. Caracterização por ressonância magnética nuclear - RMN

Os espectros de RMN foram obtidos em um equipamento Bruker Avance III – 14,1 Tesla (600,23 MHz para frequência do hidrogênio) com magneto blindado (Ultrashield Plus®) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). O espectrômetro é equipado com sonda criogênica TCI (Triple Resonance Cryoprobe Inverse) de 5 mm, com bobinas de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e pré-amplificador refrigerados a uma temperatura de aproximadamente 77K. A sonda possui bobina de gradiente de campo no eixo z (53G/cm) e unidade de ajuste automático de sintonia – ATMA® (Automatic Tuning and Matching).

### **2.3. Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho (IV), com transformada de Fourier**

Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com reflectância total atenuada (FTIR-ATR). A espectroscopia na região do infravermelho, com reflexão total atenuada, foi obtida utilizando um equipamento Varian acoplado a um acessório de ATR de diamante. Pike GladiATR Technologies, com faixa espectral variando entre 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  e resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  a 2000  $\text{cm}^{-1}$ .

A análise dos grupos funcionais das moléculas sintetizadas foi realizada por FTIR. Os espectros de absorção de IV foram obtidos com pastilhas de 34 KBr, em que foram pesados 2,0 mg da amostra em 200,0 mg de KBr. As análises foram feitas na Central de Análise e Prospecção Química (CAPQ) localizada no Departamento de Química/UFLA.

### **2.4. Soluções Teste**

Devido à baixa polaridade dos compostos, eles foram dissolvidos em DMSO (dimetil sulfóxido). Testes de solubilidade foram realizados para cada composto com o objetivo de obter amostras parcialmente diluídas em PBS ( $\text{NaCl}$  137  $\text{mmol L}^{-1}$ ,  $\text{KCl}$  2.7  $\text{mmol L}^{-1}$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  10  $\text{mmol L}^{-1}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2  $\text{mmol L}^{-1}$ ), de forma a diminuir a possível interferência do DMSO nos ensaios a serem realizados. Para cada ensaio, foi realizada uma triagem de diferentes doses dos compostos, permitindo assim identificar as doses passíveis de terem seus efeitos farmacológicos avaliados, sem que estas promovam alterações no ambiente reacional. As doses dos controles contendo enzimas, reagentes químicos ou medicamentos, inerentes à cada ensaio, também foram previamente determinadas após avaliação de diferentes doses.

Nos testes para a avaliação do potencial modulador sobre enzimas que atuam em processos hemostáticos, quatro (4) doses foram definidas: 25, 50, 100, e 125 mg.

Para a atividade antimicrobiana, as seguintes doses foram utilizadas: 100, 125, 250 e 500 mg para o teste de difusão em ágar, e 500 mg para o teste de diluição seriada com plaqueamento em superfície.

### **2.5. Avaliação da Atividade antimicrobiana**

A atividade antimicrobiana da molécula 4-(2-chloro-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester foi avaliada por testes de

sensibilidade pelos métodos de difusão em ágar (antibiograma) e pela técnica de diluição seriada com plaqueamento em superfície (microdiluição em caldo), de acordo com as recomendações do CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI, 2018).

### **2.5.1. Microrganismos e obtenção do inóculo**

Os microrganismos utilizados foram *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 obtidos da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brasil, cedidos pelo laboratório de Bactérias do Departamento de Ciências dos Alimentos (DCA) – UFLA-MG. O motivo da escolha destas cepas é devido à sua importância em infecções em humanos, assim como sua presença em feridas, o que causa o retardo no processo de cicatrização. As culturas estoque foram armazenadas em meio de congelamento (glicerol: 15 mL; peptona bacteriológica: 0,5 g; extrato de levedura: 0,3 g; NaCl: 0,5 g; água destilada: 100 mL) e mantidas congeladas durante o período do experimento. A reativação das cepas foi realizada inoculando 100 µL da cultura em tubos contendo 10 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion) com incubação a 37°C/24h em condições aeróbias, e o inóculo padronizado com densidade celular correspondente a 10<sup>8</sup> UFC/mL, pela escala de McFarland.

### **2.5.2. Técnicas para testagem antimicrobiana da polihidroquinolina**

Para o antibiograma uma alíquota das culturas de *S. aureus* e *P. aeruginosa* foi espalhada em TSA (Trypticase Soy Agar) e discos contendo a molécula 4-(2-chlorophenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester, nas doses de 500 mg, 250 mg, 125 mg e 100 mg. As placas foram incubadas a 37 °C/24h e após esse período os halos de inibição foram medidos ao redor dos discos. Como controle positivo utilizou-se do antibiótico Cloranfenicol 30 µg (CLSI, 2018).

Para a microdiluição em caldo, foi preparada uma solução mãe do composto à 500 mg/mL, e desta solução 500 µL foram retirados e adicionados à 500 µL do meio de cultura BHI contendo o inóculo bacteriano, obtendo uma dose de 250 mg do composto. Alíquotas da mistura incubada foram plaqueadas, em placa de Petri contendo TSA, nos tempos 0 hora (no momento da adição do composto ao meio), 24 horas e 48h após a adição do composto. Para realizar a contagem das colônias em placa, diluições

sucessivas do meio incubado foram realizadas no momento do plaqueamento. As placas contendo TSA foram então incubadas a 37°C e as colônias bacterianas contadas após 24h para *S. aureus*, e após 48h para *P. aeruginosa*. Como controle positivo utilizou-se as mesmas bactérias padronizadas, incubadas em 1000 µL de BHI, sem a presença da molécula; e, a contagem das células viáveis eram feitas em meio TSA, de acordo com o CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI, 2018).

Ambos os testes e concentrações foram realizados em triplicata.

## **2.6. Obtenção de material biológico humano**

Os protocolos experimentais que necessitam da utilização e coleta de sangue (testes de coagulação, citotoxicidade sobre eritrócitos e ensaio trombolítico) foram previamente avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos (COEP) da Universidade Federal de Lavras (CAAE: 10991019.4.0000.5148; número do parecer: 3.288.976).

Os voluntários possuíam idade entre 18 e 35 anos, não faziam uso de medicamentos continuamente, não fumantes e também não trabalhavam em condições de risco químico ou biológico. Os voluntários também não haviam sido submetidos a qualquer procedimento cirúrgico e/ou administração de medicamentos cuja prescrição médica seja obrigatória (ex: quimioterápicos e antibióticos) ou outras drogas que pudessem causar alterações nas células sanguíneas.

## **2.7. Efeitos sobre a coagulação de plasma humano citratado**

A atividade coagulante foi realizada seguindo a metodologia descrita por (MOURAO *et al.*, 1996). Plasma humano citratado (200 µL), estabilizado à temperatura de 37°C, foi utilizado com a adição do composto, em diferentes doses. Foi feita a contagem do tempo de coagulação, com leve agitação dos tubos de ensaio, até a formação de um coágulo rígido. O potencial dos compostos em inibir a coagulação foi avaliado com adição dos tratamentos ao plasma citratado, incubação entre 5 a 10 minutos e posterior adição da peçonha de *Bothrops moojeni* (40 µg) e contagem do tempo. A inibição da coagulação foi observada pelo aumento médio do tempo da coagulação em relação ao controle contendo apenas peçonha. Incubações prévias do composto com a peçonha foram também realizadas, com posterior adição dos incubados ao plasma e contagem do tempo de coagulação.

## **2.8. Efeitos sobre trombos sanguíneos humanos e sobre a atividade trombolítica induzida por peçonha**

A atividade trombolítica foi avaliada sobre coágulos sanguíneos formados *in vitro* conforme metodologia descrita por (CINTRA *et al.*, 2012). Os trombos foram obtidos distribuindo 100  $\mu\text{L}$  de sangue fresco em cada poço de placas de microtitulação e os deixando coagular por 15 minutos em temperatura ambiente. Após esse período os coágulos foram incubados por 24 horas a  $37^\circ\text{C}$  com o composto em diferentes doses, PBS (30  $\mu\text{L}$ ) como controle negativo, peçonha de *Bothrops moojeni* (20 $\mu\text{g}$ ) como controle positivo, e composto previamente incubado (30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ ) com a peçonha em diferentes doses para avaliar a inibição da atividade trombolítica induzida por proteases da peçonha. The activities were estimated by measuring the volume of liquid released by each thrombus. The values were converted into percentage and the positive control containing *B. moojeni* venom was considered as 100% of activity.

## **2.9. Efeitos sobre a atividade de fosfolipases A<sub>2</sub>**

A atividade fosfolipásica realizada seguiu metodologia descrita por (GUTIÉRREZ *et al.*, 1988), com algumas adaptações. Foi elaborado um gel contendo  $\text{CaCl}_2$  0,01 mol  $\text{L}^{-1}$ , e fosfolipídios de gema de ovo (fosfatidilcolina, fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina), azida de sódio 0,005% (para inibir o crescimento de microorganismos no meio) e ágar bacteriológico 1% dissolvido em PBS (pH 7,2). O meio foi vertido em placas de Petri e, após sua solidificação, os compostos foram aplicados em orifícios de tamanho uniforme ( $\sim 0,5$  cm de diâmetro). Também foi analisada a atividade anti-inflamatória e moduladora enzimática dos compostos, utilizando-se de fosfolipases A<sub>2</sub> presentes na peçonha de *Bothrops moojeni* (20 $\mu\text{g}$ ) para indução da quebra dos fosfolipídios. O composto foi previamente incubado com a peçonha, em diferentes doses, por 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ , seguindo com aplicação ao meio contendo o substrato da enzima, permanência das placas em câmara de cultivo celular a  $37^\circ\text{C}$  por 18 horas e avaliação da atividade fosfolipásica pela medida do diâmetro dos halos translúcidos formados ao redor dos orifícios.

## **2.10. Atividade citotóxica sobre eritrócitos humanos**



Essa atividade foi avaliada pelo uso de meio sólido conforme descrito por (GUTIÉRREZ *et al.*, 1988). Porém, com substituição dos fosfolipídios por um concentrado de eritrócitos humanos. O sangue, após a coleta em tubos contendo heparina, foi imediatamente centrifugado, descartando-se o sobrenadante e suspendendo as células em tampão PBS, que a seguir foram lavadas 2 vezes com centrifugações de 1200 g por 10 minutos, usando volumes aproximados de 10 mL de mesmo tampão. Após as centrifugações, o concentrado de eritrócitos obtido foi utilizado na composição do gel. Desta forma, foi realizado um gel ( $\text{CaCl}_2$  0,01 mol L<sup>-1</sup>; eritrócitos lavados em PBS 1:3 v v<sup>-1</sup> PBS; azida de sódio 0,005%) com ágar bacteriológico 1% dissolvido em PBS, pH 7,2, e após sua solidificação em placas de petri, os tratamentos (composto em diferentes doses e peçonha pura como controle positivo) foram aplicados em orifícios de tamanho uniforme (~ 0,5 cm de diâmetro). Os efeitos dos compostos foram avaliados após a permanência das placas em câmara de cultura celular a 37°C por 18 horas. A formação de halo translúcido ao redor do orifício no gel caracteriza a atividade hemolítica, sendo esta representada pela medida do diâmetro do halo, expressa em milímetros.

### 2.11. Análises Estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk ao nível de 5% para a verificação de normalidade dos dados. Nos dados que foram constatados a distribuição normal, o teste de Dunnet foi realizado. Os dados que não apresentarem distribuição normal, uma tentativa de normalização pelo procedimento PROC RANK foi realizada, e os dados não normalizados foram comparados pelo teste Kruskal-Wallis ao nível de 5%. O programa estatístico utilizado foi o SAS (9.0).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Síntese e Caracterização

O derivado hexahidroquinolínico 4-(2-chloro-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester foi sintetizado e obtido sem a utilização de catalisadores e solventes, seguindo como referência a metodologia descrita por (KUMAR *et al.*, 2008). Esta metodologia foi escolhida com o objetivo de obter o derivado por meio de uma reação que não envolvesse a utilização de solventes

nem tão pouco de catalizadores atendendo aos padrões da química verde. O rendimento para esta molécula foi de 59%.

Para a caracterização desta molécula foram feitos RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e IV e os resultados demonstram que a molécula sintetizada, de fato, é a 4-(2-chloro-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester. É esperada a presença de um átomo de cloro conectado em posição *orto* em relação ao anel nitrogenado. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  mostra ressonâncias em  $\delta_{\text{H}}$  5,39 (H4, 1H, *s*), 4,03 (H12, 2H, *q*,  $^3J_{\text{H12-H13}} = 7,0$  Hz), 2,42-1,70 (H7, H8 e H9, 6H, *m*), 2,31 (H1, 3H, *s*) e 1,17 (H13, 3H, *t*,  $^3J_{\text{H13-H12}} = 7,0$  Hz) compatível com o que é esperado para essa classe de moléculas. Na região de olefínicos e aromáticos, quatro multipletos bem separados e definidos, integrados a 4 átomos de hidrogênios, confirmam a presença de um anel aromático dissubstituído:  $\delta_{\text{H}}$  7,40-7,37 (H16, 1H, *m*), 7,28-7,22 (H19, 1H, *m*), 7,13-7,10 (H18, 1H, *m*) e 7,04-7,01 (H19, 1H, *m*) ppm.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  foi possível identificar o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  133,2 (C15) ppm, compatível com carbono  $sp^2$  de anel aromático, conectado diretamente à um átomo de cloro, além do sinal em  $\delta_{\text{C}}$  143,7 (C14) ppm de acordo com carbono  $sp^2$  de anel aromático não hidrogenado vizinho ao carbono clorado. Os carbonos C16, C17, C18 e C19 têm ressonância, respectivamente, em  $\delta_{\text{C}}$  132,1, 129,6, 126,2 e 127,2. Os demais picos observados, também corroboram para a caracterização estrutural:  $\delta_{\text{C}}$  195,7 (C6), 167,6 (C11), 144,1 (C2), 112,4 (C5), 105,1 (C3), 59,8 (C12), 36,9 (C4), 36,0 (C7), 27,3 (C9), 21,0 (C8), 18,3 (C1) e 14,1 (C13).

Já para o Espectro de IV pôde ser observado uma banda de estiramento N-H de amina primária em  $3294\text{ cm}^{-1}$ , estiramento  $\text{C}_{sp^2}\text{-H}$  em  $3068\text{ cm}^{-1}$ , estiramento de  $\text{C}_{sp^3}\text{-H}$  em  $2985$  e  $2900\text{ cm}^{-1}$ , estiramento de C=O de éster em  $1610\text{ cm}^{-1}$ , já que esta é uma carbonila com ligação mais fraca devido à ressonância, estiramento de C=O de cetona em  $1691\text{ cm}^{-1}$ , estiramento da ligação C=C aromática em  $1480\text{ cm}^{-1}$  e bandas de estiramento assimétrico da ligação C-O-C (éster) em  $1170$  e  $1067\text{ cm}^{-1}$ . Uma banda encontrada em  $742\text{ cm}^{-1}$  provavelmente se refere ao estiramento da ligação C-Cl. Estes resultados demonstram a obtenção da molécula esperada, e corrobora dados obtidos em trabalho anteriormente publicado (KO; YAO, 2006).

### 3.2. Ensaios antimicrobianos

Para os ensaios antimicrobianos, o teste de difusão não se mostrou adequado para a avaliação da molécula. Entretanto, a molécula apresentou atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*, quando avaliada pela técnica de diluição seriada, conforme demonstrado nas Tabela 1 e 2.

Atividade antimicrobiana					
Tempo (h)	(Unidades Formadoras de Colônias, UFC)				
	Controle	Composto	CV (%)	P valor	
* 0	4,94	4,69	4,90	0,235	
* 24	12,38	1,52	88,85	0,025	
* 48	17,30	1,18	96,58	0,017	

**Tabela 1.** Efeito do composto 4-(2-chloro-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester e do controle positivo sobre a viabilidade e multiplicação de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. CV (%): Coeficiente de Variação. P valor: Nível Descritível. \* Dados normalizados.

Atividade antimicrobiana					
Tempo (h)	(Unidades Formadoras de Colônias, UFC)				
	Controle	Composto	CV (%)	P valor	
* 0	4,57	4,68	5,32	0,619	
* 24	12,42	0,00	109,58	0,011	
* 48	19,53	0,00	109,55	0,011	

**Tabela 2.** Efeito do composto 4-(2-chloro-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester e do controle positivo sobre a viabilidade e multiplicação de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. CV (%): Coeficiente de Variação. P valor: Nível Descritível. \* Dados normalizados.

Para ambas as bactérias não foi observada ação bactericida no tempo zero, uma vez que este corresponde ao momento de colocação do composto em contato com as bactérias. Entretanto, nas placas em que foram semeados os incubados correspondentes

aos tempos de 24h e 48h, atividade antimicrobiana estatisticamente significativa é observada tanto para *S. aureus* quanto para *P. aeruginosa*. Para *S. aureus* observa-se uma diminuição do número de células viáveis em 24h e em 48h (tabela 1). Já para *P. aeruginosa*, no tempo de 24h de tratamento não foram detectadas células viáveis, mostrando que o composto tem ação microbicida e esta ação é acentuada para as bactérias Gram negativas em detrimento as Gram positivas avaliadas. Devido a diferença da composição da parede celular de bactérias, aquelas ditas Gram negativas são mais difíceis de eliminar do organismo hospedeiro (JUBEH; BREIJYEH; KARAMAN, 2020), o que torna esta molécula uma candidata promissora para estudos de desenvolvimento de novos antibióticos.

Alguns pesquisadores têm sintetizado derivados de polihidroquinolinas utilizando solventes e catalisadores diferentes, objetivando uma síntese mais limpa e um maior rendimento, além de testar estas moléculas para diversos efeitos biológicos. Segundo JAMALE *et al.* (2019) derivados de polihidroquinolinas tiveram um resultado promissor como antimicrobianos. Os compostos mostraram-se efetivos contra a linhagem de *Mycobacterium tuberculosis* (bacilo da tuberculose), com resultados melhores que os controles avaliados.

LADANI *et al.* (2011) testaram vários derivados de polihidroquinolinas e observaram a ação antimicrobiana destes, tanto para bactérias como para fungos, demonstrando o potencial destes compostos para a continuidade dos estudos e possível desenvolvimento de novos fármacos.

KALARIA; SATASIA; RAVAL (2014) avaliaram a ação de derivados polihidroquinolínicos incorporados com imidazopirazol contra bactérias, fungos e protozoários, e observaram principalmente atividade antifúngica, antibacteriana sobre *M. tuberculosis* H37Rv e anti-malária. Todos os compostos testados também foram capazes de inibir de forma significativa o crescimento de cepas Gram positivas: *Bacillus subtilis* e *Clostridium tetani* em comparação com o controle positivo, ampicilina; e cepas Gram negativas: *Salmonella typhi* e *Escherichia coli*.

Um estudo foi recentemente realizado (MANE *et al.*, 2021) utilizando derivados de polihidroquinolinas contra cepas de bactérias Gram positivas e Gram negativas e contra fungos filamentosos e leveduras para determinação da concentração inibitória mínima (MIC). De acordo com os autores, aqueles derivados que possuíam como substitutos no aldeído aromático os grupos funcionais nitro, cloro, bromo e flúor

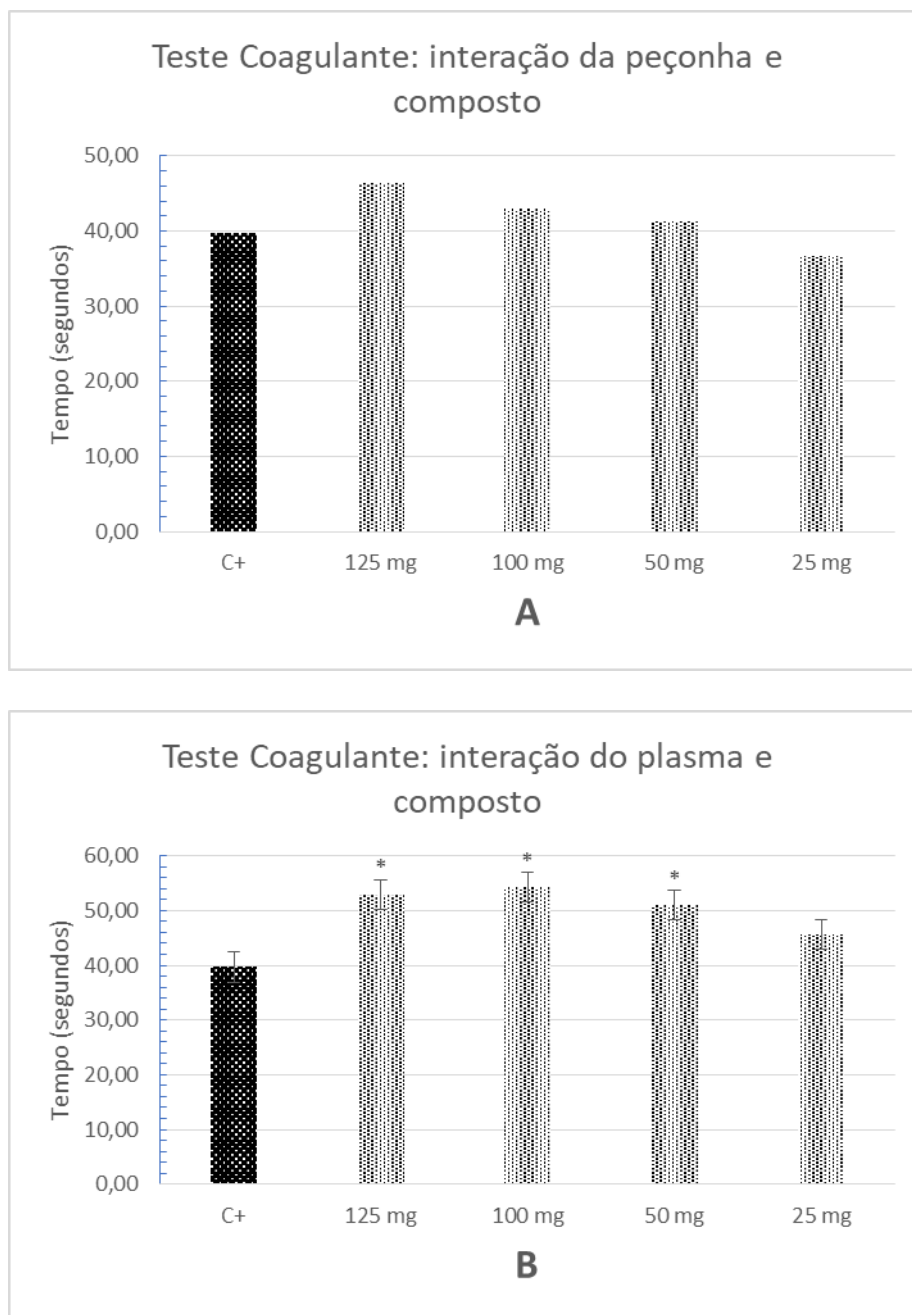
obtiveram os melhores resultados, desempenhando um papel significativo na atividade inibitória microbiana, corroborando também o presente trabalho com a utilização do reagente o 2-clorobenzaldeído.

Para esta molécula sintetizada foi utilizado o reagente 1,3-cicloexanodiona e não o composto 5,5-dimetil-1,3-cicloexanodiona (dimedona), o que diferencia os dois reagentes em dois grupos metil no carbono de posição de número 5. Essa modificação, levando em consideração estudos de nível clínico, como absorção pelo trato gastrointestinal, poderia gerar alguma diferença entre os dois reagentes, uma vez que cadeias carbônicas aumentam a lipossolubilidade do produto (CHEN *et al.*, 2020), e isso poderia afetar a absorção em nível de membrana. Entretanto não foi possível observar diferença significativa em nível pré-clínico, de sua ação bactericida, sendo observada a mesma resposta ao utilizar o 1,3-cicloexanodiona ou o 5,5-dimetil-1,3-cicloexanodiona.

### **3.3. Efeitos sobre a coagulação de plasma humano citratado**

A molécula, nas doses avaliadas, não apresentou efeito significativo sobre a atividade coagulante induzida pela peçonha de *Bothrops moojeni* (40µg) quando incubada previamente com a peçonha ( $p < 0,05$ ) (Figura 2A).

No entanto, quando a molécula é incubada previamente com o plasma humano e em seguida é aplicada a peçonha de *B. moojeni* para induzir a atividade coagulante, observa-se um aumento no tempo de coagulação para as doses de 125, 100 e 50 mg ( $p < 0,05$ ). O controle positivo induziu coagulação em aproximadamente 39,67 segundos, enquanto que os tratamentos aumentaram o tempo em 13,33 (125 mg), 14,66 (100 mg) e 11,33 (50 mg) segundos (Figura 2B).



**Figura 2.** (A) Efeitos sobre a coagulação de plasma humano citratado da molécula sintetizada 4-(2-chloro-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester, previamente incubada com a peçonha e posteriormente adicionados ao plasma para a contagem do tempo. (B) Efeitos sobre a coagulação de plasma humano citratado da molécula sintetizada 4-(2-chloro-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester, previamente incubada com o plasma e posterior adição da peçonha e contagem do tempo. Controle positivo (C+): peçonha de *Bothrops moojeni* (40 µg). Amostras: composto nas doses 125, 100,

50 e 25 mg. Dados representam a média e o desvio padrão de triplicatas.  
\*Estatisticamente significativa – difere do controle positivo ( $p < 0,05$ ).

Dessa forma, é importante salientar que o composto não apresenta atividade coagulante, ou seja, não induz a formação de trombos; porém interfere de forma significativa na ação de proteases coagulantes sobre fatores da cascata de coagulação, prolongando o tempo para a formação do coágulo. É sabido que para a manutenção da homeostase vascular o tempo de ativação dos fatores da cascata é de suma importância, uma vez que a coagulação precisa ser rigidamente controlada (ZHANG *et al.*, 2020).

Os anticoagulantes são utilizados para profilaxia e tratamento de distúrbios de tromboembolismo, como trombose venosa profunda, embolias pulmonares e sistêmicas, e de isquemia coronariana e cerebral. Tais distúrbios são caracterizados pela formação de coágulos sanguíneos. Anticoagulantes como heparina ou varfarina e, mais recentemente, inibidores diretos de trombina, que visam a formação de fibrina, são usados principalmente para condições que envolvem coágulos venosos em trombose profunda e embolia pulmonar e atuam especialmente em pessoas com fibrilação atrial ou isquêmica transitória com intuito de prevenir derrames isquêmicos (ADCOCK; GOSELIN, 2015; FISCHER, 2018).

Eventos trombóticos, causados pela coagulação do sangue, são conhecidos por representar um problema sério em doenças cardiovasculares. Embora a heparina (um inibidor de protease amplamente utilizado) esteja sendo utilizada para esse propósito, o uso contínuo dessa substância pode resultar no desenvolvimento de trombocitopenia e resposta imune exacerbada (ELANGO *et al.*, 2021). Demais drogas como, aspirina e clopidogrel podem causar efeitos adversos graves. Sendo assim a descoberta de novos agentes anticoagulantes resultaria em alternativas contra a trombose.

COTABARREN *et al.* (2021) testaram a ação de uma fitocistatina isolada de *Moringa oleifera* como agente anticoagulante buscando uma alternativa aos agentes anticoagulantes convencionais, e a molécula apresentou atividade significativa. A molécula do presente trabalho foi obtida por meio de síntese orgânica, entretanto sua estrutura é baseada em alcalóides de origem natural.

### 3.4. Efeitos sobre trombos sanguíneos humanos e sobre a atividade trombolítica induzida por proteases

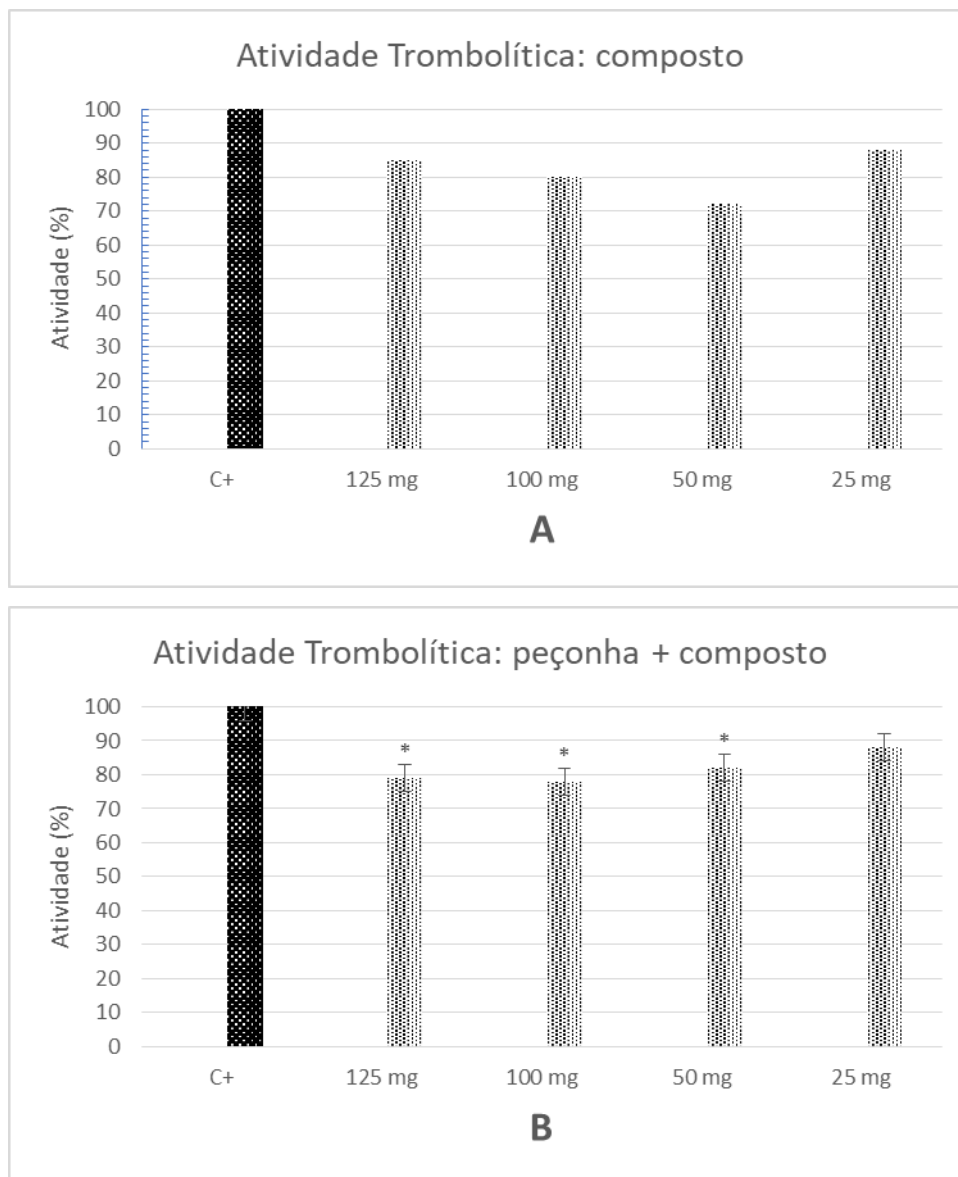
A molécula sintetizada, nas doses avaliadas, não apresentou diferenças estatísticas significantes quando comparada ao controle positivo (*Bothrops moojeni* - 20µg) ( $p < 0,05$ ). Entretanto, ao considerarmos uma tendência estatística ( $p < 0,10$ ), na dose de 50 mg observa-se uma atividade reduzida (72%) quando comparada à peçonha (Figura 3A).

Em contrapartida, quando a molécula é previamente incubada com a peçonha de *B. moojeni*, observa-se reduções de aproximadamente 20% da atividade trombolítica exercida pelas proteases, para as doses de 125 mg (79%), 100 mg (78%) e 50 mg (82%) ( $p < 0,05$ ) (Figura 3B).

Com base nos resultados obtidos é possível observar que o composto apresenta ação trombolítica comparável ao controle positivo, o que corrobora os dados do experimento de coagulação de plasma humano citratado. As doenças cardiovasculares são causadas por distúrbios do coração e dos vasos sanguíneos, sabe-se que a formação de trombos endógenos nesses vasos é uma das principais causas de morte na atualidade, por isso muitas pesquisas têm sido feitas na área de prevenção e tratamento dessas doenças (BRODMANN *et al.*, 2020).

Recentemente, SILVA *et al.* (2018) realizaram testes com a enzima fibrinolítica purificada de *Chlorella vulgaris* com intuito de mensurar a ação trombolítica desta enzima, e os autores encontraram uma taxa de lise trombolítica estimada em 25,6% após 90 min de reação, enquanto os controles negativo e positivo apresentaram 3,5% e 30%, respectivamente. DROZDOV *et al.* (2020) investigando a atividade trombolítica de compósitos à base de polieletrólito magnético observaram resultados próximos aos obtidos para a uroquinase pura, para enoxaparina e compósitos à base de ácido poliacrílico, caracterizando-os como altamente trombolíticos.



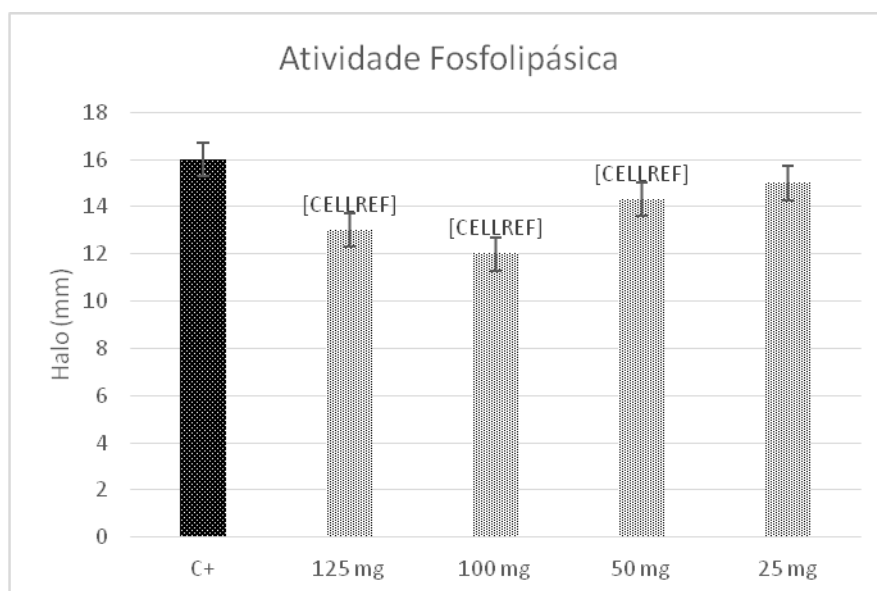


**Figura 3.** (A) Atividade sobre trombos sanguíneos humanos exercida pela molécula sintetizada 4-(2-chloro-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester. (B) Avaliação da atividade trombolítica induzida por peçonha de *Bothrops moojeni* (20 $\mu$ g) após incubação com a molécula sintetizada 4-(2-chloro-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester. Controle positivo (C+): *Bothrops moojeni* (20  $\mu$ g) = 100% dissolução do trombo. Amostras: composto nas doses 125, 100, 50 e 25 mg, previamente incubadas com a peçonha. Dados representam a média e o desvio padrão de triplicatas. \*Estatisticamente significante – difere do controle positivo ( $p < 0,05$ ).

Dessa forma pode-se inferir, com base nos resultados apresentados pelo presente trabalho que o composto sintetizado possui características trombolíticas promissoras e ainda um efeito protetor sobre os substratos de origem humana contra enzimas presentes na peçonha (ex: serino e metaloproteases). Contudo, como não existe na literatura dados para estes derivados polihidroquinolínicos, novos testes e aprofundamento dos estudos se fazem necessários.

### 3.5. Efeitos sobre a atividade de fosfolipases A<sub>2</sub>

A incubação prévia do composto sintetizado, nas doses de 125, 100, e 50 mg com a peçonha de *Bothrops moojeni* (20µg), resultou em diminuição da atividade das fosfolipases A<sub>2</sub> presentes na peçonha ( $p < 0,05$ ). O controle positivo exibiu halos de 16 mm, enquanto os tratamentos tiveram halos de 13, 12 e 14,3 mm para as doses de 125, 100, e 50 mg, respectivamente (Figura 4).



**Figura 4.** Efeitos da 4-(2-chloro-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester sobre a atividade de fosfolipases A<sub>2</sub> da peçonha de *Bothrops moojeni*. Controle positivo (C+): peçonha de *Bothrops moojeni* (20 µg). Amostras: composto nas doses 125, 100, 50 e 25 mg, previamente incubado com a peçonha. Dados representam a média e o desvio padrão de triplicatas. \*Estatisticamente significante – difere do controle positivo ( $p < 0,05$ ).

As fosfolipases são enzimas lipolíticas fundamentais para os organismos vivos, a família de fosfolipases A<sub>2</sub> atuam liberando lisofosfolipídios e ácidos graxos livres por meio da hidrólise dos glicerofosfolipídios da membrana na posição sn-2, o que causa desestabilização da membrana celular permitindo o influxo descontrolado de cálcio e sódio, promovendo alterações intracelulares. Estes ácidos graxos liberados podem ativar a cascata do ácido araquidônico, que é responsável pela biossíntese de mediadores da resposta inflamatória, como prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, o que torna essas enzimas muito estudadas (LOMONTE; LINA; SPOLAORE, 2019; MARINHO *et al.*, 2021).

A inflamação é uma resposta fisiológica com objetivo de eliminar, neutralizar ou destruir estímulos decorrentes de infecção ou lesão tecidual. Entretanto, quando acontece de forma desregulada, pode ser prejudicial aos tecidos do hospedeiro, podendo desencadear diversas doenças, como o câncer e doenças neurodegenerativas (MOREIRA *et al.*, 2020).

Estudos recentes (ZHAO *et al.*, 2021) demonstram a atividade anti-inflamatória exercida por alcalóides conhecidos, sendo esta comparável ao controle positivo avaliado. PRECIADO *et al.* (2016) realizaram testes com o extrato etanólico das folhas de *Swietenia macrophylla* e este exibiu um efeito de 87,2 +/- 11% na neutralização da atividade enzimática de fosfolipases A<sub>2</sub> de peçonha de *Bothrops asper*, para tal estudo, assim como o presente trabalho, os autores utilizaram gema de ovo como substrato.

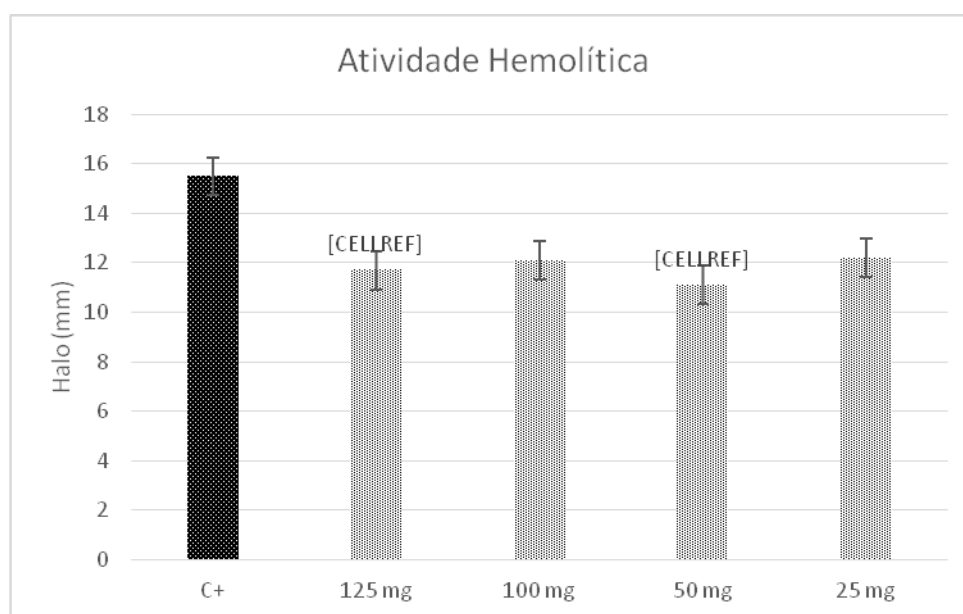
MOREIRA *et al.* (2020) estudando extratos alcalóides provenientes do mel, contra a ação inflamatória provocada pelo óxido nítrico (NO), produzido por células de defesa, demonstraram que estes extratos reduziram os níveis de NO em 30%, na concentração mais alta testada, o que corrobora dados do presente estudo no qual um alcalóide derivado de polihidroquinolinas, obtido de forma sintética, se mostrou ativo em inibir fosfolipases A<sub>2</sub> e, portanto, apresentar potencial anti-inflamatório.

### **3.6. Atividade citotóxica sobre eritrócitos humanos**

A molécula sintetizada não teve efeito citotóxico sobre eritrócitos humanos, nas doses avaliadas (data not shown).

A incubação da molécula com a peçonha de *Bothrops moojeni* reduziu a citotoxicidade induzida por proteases e, conseqüentemente, demonstrou efeitos protetores aos eritrócitos. Nas doses de 125 e 50 mg foram observados halos

significativamente menores ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao controle positivo (*Bothrops moojeni* - 20 $\mu$ g), com tamanhos de 11,7 e 11,1 mm, respectivamente (Figura 5). As outras doses também apresentaram halos menores (12,1 e 12,2 mm para as doses de 100 e 25 mg, respectivamente), e tiveram uma tendência estatística ( $p < 0,10$ ) quando comparadas ao controle.



**Figura 5.** Efeitos da 4-(2-chloro-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester sobre a atividade citotóxica induzida por peçonha de *Bothrops moojeni* em eritrócitos humanos. Controle positivo (C+): peçonha de *Bothrops moojeni* (20  $\mu$ g). Amostras: composto nas doses 125, 100, 50 e 25 mg, previamente incubado com a peçonha. Dados representam a média e o desvio padrão de triplicatas. \*Estatisticamente significativo – difere do controle positivo ( $p < 0,05$ ).

A hemólise representa a ruptura ou alteração da integridade da membrana dos eritrócitos, causando a liberação de hemoglobina. A hemoglobina é especializada no transporte de gases sanguíneos em animais, e portanto, a hemólise compromete toda a funcionalidade do tecido (LUNA-V *et al.*, 2021).

A membrana eritrocitária é um modelo apropriado para estudar a interação de compostos naturais ou sintéticos com as membranas celulares. Estas células possuem

funções em comum com diversas células suficientes para serem considerados um modelo representativo das demais membranas (COLINA *et al.*, 2019b).

Partindo deste pressuposto e com o objetivo de determinar o papel protetor do ácido cafeico (ácido fenólico) na lise provocada pelo ácido hipocloroso (HClO), um conhecido e potente oxidante natural, em eritrócitos humanos, COLINA *et al.* (2019a) realizaram testes e observaram que dentro de uma faixa de concentração variando entre 0,1-1,0 mM o ácido cafeico foi capaz de inibir progressivamente a hemólise, chegando a uma redução de 45% de hemólise na maior concentração testada, comprovando assim a ação protetora sobre membranas e a atividade anti-citotóxica.

Os mesmos autores puderam relatar que o composto colocado em contato com as hemácias sem a presença do indutor de hemólise, não induziu hemólise, assim como o composto avaliado no presente trabalho.

A Diosmina é um exemplo de molécula glicosídica natural de flavona encontrada em diversas frutas cítricas, é uma substância conhecida que age sobre as veias do sistema circulatório, diminuindo a dificuldade de circulação do sangue, melhorando o tônus venoso, sendo que na microcirculação normaliza a permeabilidade e reforça a resistência dos vasos capilares, diminuindo o edema de origem venosa. Porém, apesar do seu amplo potencial terapêutico ela é caracterizada por uma baixa solubilidade em água e na maioria dos solventes orgânicos, tendo uma baixa disponibilidade sistêmica, sendo necessário altas dosagens (500 mg) para a ingestão oral (SZELESZCZUK *et al.*, 2017).

Dito isto, encontrar novas moléculas com ações protetivas e anti-inflamatórias é extremamente necessário e como pode ser observado, a molécula 4-(2-chloro-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester possui estes efeitos, merecendo atenção científica e aprofundamento de seus estudos. Vale ressaltar também que ela possui tais ações em uma dosagem considerada baixa quando comparada com outros controles e fármacos comercializados.

## CONCLUSÃO

Um derivado de polihidroquinolina foi sintetizado dentro dos padrões da química verde. A avaliação das atividades biológicas do composto demonstrou propriedades promissoras, tais como, trombolítica, inibidora de proteases, inibidora de fosfolipases A<sub>2</sub>, protetora sobre membranas biológicas, além de ação antimicrobiana *in*

*vitro* tanto para bactérias Gram positivas como Gram negativas. Esses resultados revelaram um ponto de partida para investigar esta molécula e demais derivados polihidroquinolínicos como potenciais modelos para o desenvolvimento de futuros fármacos. O aprofundamento dos estudos se faz necessário, possibilitando assim prospectar possíveis utilizações eficazes e seguras para este composto.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADCOCK, D. M.; GOSSELIN, R. Direct Oral Anticoagulants ( DOACs ) in the Laboratory: 2015 Review. *Thrombosis Research*, v. 136, n. 1, p. 7–12, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2015.05.001>>.

BETECK, R. M. *et al.* Easy-to-access quinolone derivatives exhibiting antibacterial and anti-parasitic activities. *Molecules*, v. 26, n. 4, p. 1–19, 2021.

BOSICA, G. *et al.* Efficient One-Pot Synthesis of 3,4-Dihydropyrimidin-2(1H)-ones via a Three-Component Biginelli Reaction. *Molecules*, v. 26, n. 12, p. 3753, 2021.

BRAHMACHARI, G.; DAS, S. Bismuth nitrate-catalyzed multicomponent reaction for efficient and one-pot synthesis of densely functionalized piperidine scaffolds at room temperature. *Tetrahedron Letters*, v. 53, n. 12, p. 1479–1484, 2012.

BRODMANN, M. *et al.* Global Burden of Cardiovascular Diseases. *Journal of the American College of cardiology*, v. 76, n. 25, p. 2982–3021, 2020.

CHEN, T. *et al.* A Systematic Review on Traditional Uses, Sources, Phytochemistry, Pharmacology, Pharmacokinetics, and Toxicity of *Fritillariae Cirrhosae Bulbus*. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2020, p. 1–26, 2020.

CHEN, Y. L. *et al.* Synthesis and antibacterial evaluation of certain quinolone derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 44, n. 14, p. 2374–2377, 2001.

CINTRA, A. C. O. *et al.* Batroxase, a new metalloproteinase from *B. atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity. *Toxicon*, v. 60, n. 1, p. 70–82, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.03.018>>.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). *Clinical and Laboratory Standards Institute Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically Standard, Approval CDM-A.; M07 Methods for*

*dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*. [S.l: s.n.], 2018.

CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved Standard-Eleventh Edition*. Clinical and Laboratory Standards Institute. . [S.l: s.n.], 2018.

COLINA, J. R. *et al.* An in vitro study of the protective effect of caffeic acid on human erythrocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 662, p. 75–82, 2019a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.12.006>>.

COLINA, J. R. *et al.* Protective effect of epigallocatechin gallate on human erythrocytes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 173, p. 742–750, 2019b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.10.038>>.

COTABARREN, J. *et al.* Purification and characterization of a novel thermostable papain inhibitor from moringa oleifera with antimicrobial and anticoagulant properties. *Pharmaceutics*, v. 13, n. 4, p. 1–11, 2021.

DAVOODNIA, A.; KHASHI, M.; TAVAKOLI-HOSEINI, N. Tetrabutylammonium hexatungstate [TBA]2[W6O19]: Novel and reusable heterogeneous catalyst for rapid solvent-free synthesis of polyhydroquinolines via unsymmetrical Hantzsch reaction. *Chinese Journal of Catalysis*, v. 34, p. 1173–1178, 2013.

DEKAMIN, M. G. *et al.* Alginic acid: A mild and renewable bifunctional heterogeneous biopolymeric organocatalyst for efficient and facile synthesis of polyhydroquinolines. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 108, p. 1273–1280, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.050>>.

DROZDOV, A. S. *et al.* Magnetic polyelectrolyte-based composites with dual anticoagulant and thrombolytic properties: towards optimal composition. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, v. 95, n. 3, p. 771–782, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10971-020-05313-z>>.

ELANGO, K. *et al.* The Effects of Warfarin and Direct Oral Anticoagulants on Systemic Vascular Calcification : A Review. *Cells*, v. 10, p. 1–14, 2021.

FAN, WEIGANG & WANG, LIANJIIE & AHMAR, MOHAMMED & JIANENG, TAN & POPOWYCZ, FLORENCE & QUENEAU, Y. *5-(Hydroxymethyl)furfural and 5-(glucosyloxymethyl)furfural in multicomponent reactions*. [S.l: s.n.], 2020. v. 2017.

FISCHER, P. M. Design of Small-Molecule Active-Site Inhibitors of the S1A Family Proteases as Procoagulant and Anticoagulant Drugs. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 61, n. 9, p. 3799–3822, 2018.

GULATI, S.; JOHN, S. E.; SHANKARAIHAH, N. Microwave-assisted multicomponent reactions in heterocyclic chemistry and mechanistic aspects. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, v. 17, p. 819–865, 2021.

GUTIÉRREZ, J. *et al.* An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon*, v. 26, n. 4, p. 411–413, jan. 1988.

HAJI, M. Multicomponent reactions: A simple and efficient route to heterocyclic phosphonates. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, v. 12, p. 1269–1301, 2016.

JAMALE, D. K. *et al.* Glycerol Mediated Synthesis, Biological Evaluation, and Molecular Docking Study of 4-(1H-pyrazol-4-yl)-polyhydroquinolines as Potent Antitubercular Agents. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, v. 56, n. 2, p. 608–618, 2019.

JOSHI, V. M.; PAWAR, R. P. Microwave Assisted Expeditious Synthesis of Bioactive Polyhydroquinoline Derivatives. *Eur. Chem. Bull.*, v. 2, n. 9, p. 679–682, 2013.


JUBEH, B.; BREIJYEH, Z.; KARAMAN, R. Resistance of gram-positive bacteria to current antibacterial agents and overcoming approaches. *Molecules*, v. 25, n. 12, p. 1–23, 2020.

KALARIA, P. N.; SATASIA, S. P.; RAVAL, D. K. Synthesis, characterization and pharmacological screening of some novel 5-imidazopyrazole incorporated polyhydroquinoline derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 78, p. 207–216, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.02.015>>.

KO, S.; YAO, C. F. Ceric Ammonium Nitrate (CAN) catalyzes the one-pot synthesis of polyhydroquinoline via the Hantzsch reaction. *Tetrahedron*, v. 62, n. 31, p. 7293–7299, 2006.

KUMAR, A. *et al.* Design and synthesis of 2,4-disubstituted polyhydroquinolines as prospective antihyperglycemic and lipid modulating agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 18, n. 11, p. 4138–4148, 2010.



- KUMAR, S. *et al.* An efficient, catalyst- and solvent-free, four-component, and one-pot synthesis of polyhydroquinolines on grinding. *Tetrahedron*, v. 64, n. 3, p. 536–542, 2008.
- LADANI, N. K. *et al.* Microwave assisted synthesis of novel Hantzsch 1,4-dihydropyridines, acridine-1,8-diones and polyhydroquinolines bearing the tetrazolo[1,5-a] quinoline moiety and their antimicrobial activity assess. *Chinese Chemical Letters*, v. 22, n. 12, p. 1407–1410, 2011.
- LOMONTE, B.; LINA, M.; SPOLAORE, B. Toxicon Enzymatic labelling of snake venom phospholipase A 2 toxins  n Fern a. *Toxicon*, v. 170, n. September, p. 99–107, 2019.
- LUNA-V, R. *et al.* Hemolysis of Human Erythrocytes by Argovit™ AgNPs from Healthy and Diabetic Donors : An In Vitro Study. *Materials*, v. 14, n. 2792, p. 1–12, 2021.
- MANE, P. *et al.* Biogenic synthesis of ZnO nanoparticles from Parthenium hysterophorus extract and its catalytic activity for building bioactive polyhydroquinolines. *Research on Chemical Intermediates*, v. 47, n. 5, p. 1743–1758, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11164-020-04365-8>>.
- MARINHO, A. D. *et al.* Toxicon Bothrops pauloensis snake venom-derived Asp-49 and Lys-49 phospholipases A2 mediates acute kidney injury by oxidative stress and release of inflammatory cytokines. *Toxicon*, v. 190, n. December 2020, p. 31–38, 2021.
- MOREIRA, R. *et al.* Echium plantagineum L . honey : Search of pyrrolizidine alkaloids and polyphenols , anti-in fl ammatory potential and cytotoxicity. *Food Chemistry*, v. 328, n. April, p. 127169, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127169>>.
- MOURAO, P. A. S. *et al.* Structure and anticoagulant activity of a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm. Sulfated fucose branches on the polysaccharide account for its high anticoagulant action. *Journal of Biological Chemistry*, v. 271, n. 39, p. 23973–23984, 1996.
- NUNEZVERGARA, L. J. *et al.* Reactivity of the one-electron reduction product from nimodipine, nitrendipine and nicardipine with relevant biological thiols. *Boletín De La Sociedad Chilena De Química*, v. 41, n. 4, p. 363–370, 1996.

PAIDEPALA, H. *et al.* Catalyst-free efficient synthesis of polyhydroquinolines using polyethylene glycol as a solvent and evaluation of their cytotoxicity. *Medicinal Chemistry Research*, v. 23, n. 2, p. 1031–1036, 2014.

PALLADACYCLES, M. H. *Multicomponent Reaction Sequences Using Palladacyclic Complexes*. Amsterdam: [s.n.], 2019.

PRECIADO, L. *et al.* Characterization of the most promising fraction of *Swietenia macrophylla* active against myotoxic phospholipases A2: Identification of catechin as one of the active compounds. *Vitae*, v. 23, n. 2, p. 124–133, 2016.

REDDY, C. S.; RAGHU, M. Facile ZrCl<sub>4</sub> promoted four-component coupling one-pot synthesis of polyhydroquinoline derivatives through unsymmetric Hantzsch reaction. *Indian Journal of Chemistry - Section B Organic and Medicinal Chemistry*, v. 47, n. 10, p. 1578–1582, 2008.

ROMA, G. *et al.* 1,8-Naphthyridines IV . 9-Substituted N , N -dialkyl-5- ( alkylamino or compounds with anti-aggressive and potent anti-inflammatory activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 35, p. 1021–1035, 2000.

SHAHEEN, M. A.; EL-EMAM, A. A.; EL-GOHARY, N. S. Design, synthesis and biological evaluation of new series of hexahydroquinoline and fused quinoline derivatives as potent inhibitors of wild-type EGFR and mutant EGFR (L858R and T790M). *Bioorganic Chemistry*, v. 105, n. July, p. 104274, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104274>>.

SILVA, P. E. DA C. E. *et al.* In vitro thrombolytic activity of a purified fibrinolytic enzyme from *Chlorella vulgaris*. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 1092, n. January, p. 524–529, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.04.040>>.

SWARNALATHA, G.; PRASANTHI, G. 1, 4-Dihydropyridines: A Multifunctional Molecule-A Review. *International Journal of ChemTech Research*, v. 3, n. 1, p. 75–89, 2011.

SZELESZCZUK, Ł. *et al.* Spectroscopic and structural studies of the diosmin monohydrate and anhydrous diosmin. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 529, n. 1–2, p. 193–199, 2017.

ZHANG, Y. *et al.* Migrasome and Tetraspanins in Vascular Homeostasis: Concept ,

Present , and Future. *Frontiers in cell and developmental biology*, v. 8, n. June, p. 1–13, 2020.

ZHAO, L. *et al.* Alkaloids bearing rare skeletons from *Forsythia suspensa* with anti-inflammatory and anti-viral activities in vitro. *Phytochemistry*, v. 186, n. November 2020, p. 1–7, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112739>>.