



**MARCUS VINÍCIUS CARDOSO TRENTO**

**PROSPECÇÃO *IN VITRO* DE POLIHIDROQUINOLINAS  
SINTETIZADAS: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E  
POTENCIAL MODULADOR SOBRE ENZIMAS QUE ATUAM  
EM PROCESSOS HEMOSTÁTICOS E INFLAMATÓRIOS**

**LAVRAS-MG  
2021**

**MARCUS VINÍCIUS CARDOSO TRENTO**

**PROSPECÇÃO *IN VITRO* DE POLIHIDROQUINOLINAS SINTETIZADAS:  
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E POTENCIAL MODULADOR SOBRE ENZIMAS  
QUE ATUAM EM PROCESSOS HEMOSTÁTICOS E INFLAMATÓRIOS**

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.

Prof. Dra. Silvana Marcussi  
Orientadora

Prof. Dr. Sergio 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).

Trento, Marcus Vinicius Cardoso.

Prospecção *in vitro* de polihidroquinolinas sintetizadas:  
atividade antimicrobiana e potencial modulador sobre enzimas que  
atuam em processos hemostáticos e inflamatórios / Marcus Vinicius  
Cardoso Trento. - 2021.

116 p. : il.

Orientador(a): Silvana Marcussi.

Coorientador(a): Sérgio Scherrer Thomasi.

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

Bibliografia.

1. síntese multicomponente. 2. hemostasia. 3. inibidor  
enzimático. I. Marcussi, Silvana. II. Thomasi, Sérgio Scherrer. III.  
Título.

**MARCUS VINÍCIUS CARDOSO TRENTO**

**PROSPECÇÃO *IN VITRO* DE POLIHIDROQUINOLINAS SINTETIZADAS:  
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E POTENCIAL MODULADOR SOBRE ENZIMAS  
QUE ATUAM EM PROCESSOS HEMOSTÁTICOS E INFLAMATÓRIOS**

***IN VITRO* PROSPECTION OF SYNTHESIZED POLYHYDROQUINOLINES:  
ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND MODULATORY POTENTIAL ON ENZYMES  
THAT ACT IN HEMOSTASIS AND INFLAMMATORY PROCESSES**

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.

APROVADA em 21 de outubro de 2021.

DR. CLAYTON ZAMBELI OLIVEIRA- USP  
DRA. JULIANA MESQUITA FREIRE -UFLA  
DR. PAULO RICARDO DA SILVA- UFLA  
DRA. SILVANA MARCUSSI – UFLA  
DR. SÉRGIO SCHERRER THOMASI – UFLA

Prof. Dra. Silvana Marcussi  
Orientadora  
Dr. Sergio Scherrer Thomasi  
Coorientador

**LAVRAS-MG  
2021**

**Aos que, infelizmente, partiram antes da hora e não  
puderam compartilhar deste momento, em especial ao meu  
pai Marco Antônio Trento e sogra Cristiane Loureiro  
Matni: DEDICO!**

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a minha mãe Núbia, por ser o alicerce da família. Você sempre fez bem sem olhar a quem, se desdobrou em milhares de pessoas para que eu pudesse estudar e ter um futuro, e no meio do caminho ainda tirava tempo para ajudar todos os integrantes da nossa família sem esperar nada em troca. Com você eu aprendi a ser uma pessoa melhor, a respeitar a todos, e pensar no próximo. Aprendi que com estudo e dedicação, eu conseguiria alcançar todos os meus objetivos.

Com meu pai Marco aprendi que devemos viver a vida da nossa maneira, com leveza e um sorriso no rosto. Fazer piadas em momentos de tensão ajudam a descontrair. Gostaria de te agradecer por me ensinar tanto no tempo que tivemos juntos nessa vida, e sei que estaria orgulhoso de mim por chegar até aqui. Prometo ainda fazer mais, Pai.

À minha irmã Ana Paula, agradeço por me apoiar e dividir comigo os momentos felizes e difíceis da nossa família desde pequeninos. Sou muito sortudo de ter essa irmandade com você, algo que tenho certeza nenhuma outra pessoa tem. Crescemos e nos espelhamos um no outro, e por isso somos mais fortes juntos.

À minha namoradasmilda Ligia, pelo companheirismo, amor e paciência. Obrigado por me ajudar a crescer com tantos ensinamentos diários, a me dar forças em momentos dos quais achava que não teria, por estar presente e por dividir a vida comigo. Obrigado pela beleza de todos os dias que vivemos juntos, e por me ajudar tanto diretamente quanto indiretamente nessa obtenção de título. A minha criançomilda Amelie, pelas risadas e pelo carinho demonstrado.

Gostaria de agradecer também a todos os meus familiares, que desde sempre estiveram interessados em meu caminhar acadêmico. Vocês que dividiram experiências, alegrias, e que sempre deram palavras de apoio e encorajamento (Gabriel, André, Carol, Tio Celso, Tia Nádia, Tio Petrônio, Tio Paulo, Vó Lourdes, Vó Hildete, Vô Zé, Vó Nira, Vó Regina, Maurício, Cristiane, Olivia, Hugo, Dani, Paulinho, Bernadete, Felipe, Spikinho). Ao Adriano, em especial, gostaria de agradecer também pela participação ativa neste trabalho e em aguçar meus conhecimentos nas diversas áreas.

Aos meus muitos amigos que fiz ao decorrer da vida, que são a família que escolhemos. Se fosse citar todos aqui a lista ficaria maior que o trabalho, sou muito afortunado nesse quesito. Vocês sabem quem são e o que fizeram por mim, e por isso sou muito grato!

Por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer imensamente aos meus orientadores Sérgio e Silvana. Ao Sérgio por ter tido a ideia brilhante de trazer esse ramo de pesquisa ao nosso laboratório e por todo o ensinamento. Você foi um dos melhores professores que tive, por sua didática e demonstração de paixão pelo que ensina. Quanto à Silvana, me falta palavras para descrever a enorme gratidão que tenho por ter encontrado você nessa saga acadêmica. Foi uma honra ter trabalhado e dividido o caminho até aqui com você, e sei que teremos uma longa parceria ainda. Cheguei nesse momento seguindo seus passos, seus ensinamentos, sua ética de trabalho. Você tem sido muito mais que uma professora e orientadora. Meu eterno agradecimento! Gostaria de agradecer também ao Gustavo, pela colaboração, parceria, e pelos levantamentos feitos ao longo do nosso trabalho.

Gostaria de agradecer à Universidade Federal de Lavras, onde aprendi não só sobre as matérias e cursos acadêmicos, mas também sobre amizade, pensamento político, viver em sociedade, e diversos outros assuntos relevantes. Ao Departamento de Química, especialmente ao laboratório de Bioquímica e o PPG Agroquímica, meu muito obrigado a todos. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“But if you never try, you’ll never know

Just what you’re worth”

**Coldplay**

## RESUMO

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. As quinolinas fazem parte dos alcaloides (compostos nitrogenados orgânicos encontrados principalmente em plantas). As polihidroquinolinas (PHQs) são derivados assimétricos das 1,4-dihidropiridinas, 1,3-dicetonas cíclicas, aldeídos, acetoacetato de etila e acetato de amônio, e são considerados análogos ao NADH, além de possuir propriedades medicinais em diversas áreas. No desenvolvimento de novas substâncias farmacológicas, a síntese orgânica está diretamente atrelada à moléculas e componentes previamente isolados de produtos naturais. Atualmente, dados epidemiológicos destacam em todo o mundo a prevalência e crescimento de doenças relacionadas à obesidade e sobrepeso, e estas apresentam origem e/ou desenvolvimento inflamatório assim como, estão associadas à diversas alterações na homeostasia. Desta forma, o desenvolvimento de protocolos de síntese de moléculas que apresentam atividades biológicas previamente descritas e que sejam relativamente simples e baratos é de extrema importância para a obtenção de fármacos efetivos e acessíveis à maioria das populações. Assim, neste trabalho foi utilizado um modelo de síntese multicomponente simples, eficaz e confiável, para sintetizar efetivamente as moléculas 4-(4-hidroxi-fenil)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3-ácido carboxílico etil éster e 4-(2-cloro-fenil)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3-ácido carboxílico etil éster. As moléculas sintetizadas foram avaliadas *in vitro* e os resultados demonstraram que ambas apresentaram atividades biológicas (efeitos sobre membranas de eritrócitos, sobre a coagulação de plasma sanguíneo, sobre trombos humanos, e atividade antimicrobiana). Em adição, os produtos das sínteses também foram avaliados quanto a seus efeitos moduladores sobre enzimas (fosfolipases A<sub>2</sub> e proteases) que atuam em processos homeostáticos (hemólise, coagulação sanguínea, fibrinogénólise e trombólise) e inflamatórios (geração de eicosanóides que atuam na resposta inflamatória, coagulação e agregação de plaquetas). Desta forma, fica comprovada a eficácia da síntese e utilidade dos compostos.

**Palavras-chave:** Atividade coagulante. Atividade hemolítica. Atividade citotóxica. Atividade fosfolipásica. Inibidor enzimático. Síntese multicomponente.



## ABSTRACT

The presence of nitrogen and/or aromatic rings in molecules is evidenced in several active principles of chemicals used in medicine, pharmacology, and agrochemistry. Quinolines are part of the alkaloids group (organic compounds, found mainly in plants, which have nitrogen in their structure). Polyhydroquinolines (PHQs) are asymmetric derivatives of 1,4-dihydropyridines, cyclic 1,3-diketones, aldehydes, ethyl acetoacetate, and ammonium acetate, and are considered to be analogues of NADH. They also have several medicinal properties. In the development of new pharmacological substances, the organic synthesis is directly linked to molecules and components previously isolated from natural products. Currently, epidemiological data highlight the worldwide prevalence and growth of diseases related to obesity and overweight, and these have origin and/or inflammatory development as well as are associated with various changes in hemostasis. Thus, the development of protocols for the synthesis of molecules that present biological activities previously described and that are relatively simple and inexpensive is of extreme importance to obtain effective drugs accessible to most populations. Thus, in this work a simple, effective, and reliable multicomponent reaction was used to effectively synthesize the molecules 4-(4-hydroxy-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester and 4-(2-chloro-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester. The synthesized molecules were evaluated *in vitro* and the results showed that both showed biological activities (effects on erythrocyte membranes, on blood plasma coagulation, on human thrombi, and antimicrobial activity). In addition, the molecules were also evaluated for their modulating effects on enzymes (phospholipases A<sub>2</sub> and proteases) that act in hemostatic (hemolysis, blood coagulation, fibrinogenolysis, and thrombolysis) and inflammatory processes (generation of eicosanoids that act in the inflammatory response, coagulation, and platelet aggregation). Thus, it is proven the effectiveness of the synthesis and usefulness of the compounds.

**Keywords:** Coagulant activity. Hemolysis activity. Cytotoxic activity. Phospholipase activity. Enzyme inhibitor. Multicomponent reactions.

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	<b>11</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>12</b>
2.2 SÍNTESE MULTICOMPONENTE .....	12
2.3 POLIHIDROQUINOLINAS .....	13
2.4 FÁRMACOS .....	14
2.4.1 Anti-inflamatórios .....	14
2.4.2 Anticoagulantes .....	14
2.4.3 Antibióticos .....	15
2.5 HEMOSTASIA .....	15
2.5.1 Enzimas atuantes na hemostasia .....	17
<b>3 CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	<b>17</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>19</b>
<b>SEGUNDA PARTE</b> .....	<b>25</b>
<b>ARTIGO 1</b> .....	<b>25</b>
ENZYME MODULATION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE POLYHYDROQUINOLINE DERIVATIVE 4-(4-HYDROXY-PHENYL)-2-METHYL-5-OXO-1,4,5,6,7,8- HEXAHYDROQUINOLINE-3-CARBOXYLIC ACID ETHYL ESTER .....	25
<b>ARTIGO 2</b> .....	<b>46</b>
POTENCIAL ANTIMICROBIANO E AÇÃO SOBRE HEMOSTASIA E INFLAMAÇÃO DO COMPOSTO SINTÉTICO 4-(2-CLORO-FENIL)-2-METIL-5-OXO-1,4,5,6,7,8- HEXAHIDROQUINOLINA-3- ÁCIDO CARBOXÍLICO ETIL ÉSTER .....	46
<b>APÊNDICE A - ESPECTROS DE RMN E IV</b> .....	<b>70</b>
<b>APÊNDICE B – ARTIGO 3</b> .....	<b>73</b>
<b>APÊNDICE C – ARTIGO 4</b> .....	<b>96</b>

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

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 (CORDELL; QUINN-BEATTIE; FARNSWORTH, 2001; KERRU *et al.*, 2020; MICHAEL, 2008). 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; PENG *et al.*, 2019; UR RASHID *et al.*, 2019). O aminoácido que doa o átomo de nitrogênio é a porção fundamental do esqueleto dos alcaloides e confere a classificação dos mesmos. Como exemplo, temos as pirrolidinas, indolizidinas, quinolizidinas, isoquinolinas, indóis, piperidinas e **quinolinas** (DEWICK, 2002). No caso das quinolinas, o aminoácido correspondente é o triptofano.

A presença de um núcleo heterocíclico na estrutura de um fármaco sintético é bastante comum (HERAVI; ZADSIRJAN, 2020). 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; VITAKU; SMITH; NJARDARSON, 2014; YE *et al.*, 2018). Como exemplo, podemos citar as funções: antimicrobiana, anticonvulsivante, anti-inflamatória, anticancerígena, anti-helmíntica, anti-histamínica, anti-hipertensiva e antidepressiva (DUA *et al.*, 2011). Assim, devido a essas diversas ações, utilizar esses compostos na síntese de um novo fármaco é de extrema valia.

No desenvolvimento de novas substâncias farmacológicas, a síntese orgânica está diretamente atrelada à moléculas e componentes previamente isolados de produtos naturais (MAIER, 2015). 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 (KITANOSONO; KOBAYASHI, 2021).

Desta forma, desenvolver um protocolo relativamente simples (alto rendimento, baixo custo e ecologicamente adequado), para a produção de moléculas que apresentam atividades biológicas já descritas, vem sendo um desafio para os químicos orgânicos sintéticos (PILLI; DE ASSIS, 2018; 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 (JOHN; GULATI; SHANKARAI AH, 2021; WEBER, 2002).

Assim, neste trabalho foram produzidas duas moléculas nitrogenadas derivadas de polihidroquinolinas (4-(4-Hidroxi-fenil)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3-ácido carboxílico etil éster e 4-(2-cloro-fenil)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3-ácido carboxílico etil éster) utilizando um modelo de síntese multicomponente simples, eficaz e confiável. A prospecção das moléculas sintetizadas incluiu avaliação *in vitro* das propriedades toxico-farmacológicas, dentre elas a ação moduladora sobre fosfolipases A<sub>2</sub> e proteases, avaliação da atividade antimicrobiana e seus potenciais efeitos sobre processos relacionados à hemostasia e resposta inflamatória.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.2 Síntese multicomponente

O interesse científico pela síntese multicomponente (MCR) - combinação de três ou mais componentes em um único recipiente para a formação de um novo produto - tem crescido nos últimos anos, tornando-a uma das mais importantes ferramentas para a formulação de novas estruturas moleculares complexas (HAJI, 2016; NAKHATE, INGALE; SHINDE, 2021). Na última década, essa técnica tem tido um impacto relevante na pesquisa e desenvolvimento de novas moléculas heterocíclicas com potenciais farmacêuticos (YOUNUS *et al.*, 2021). 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).

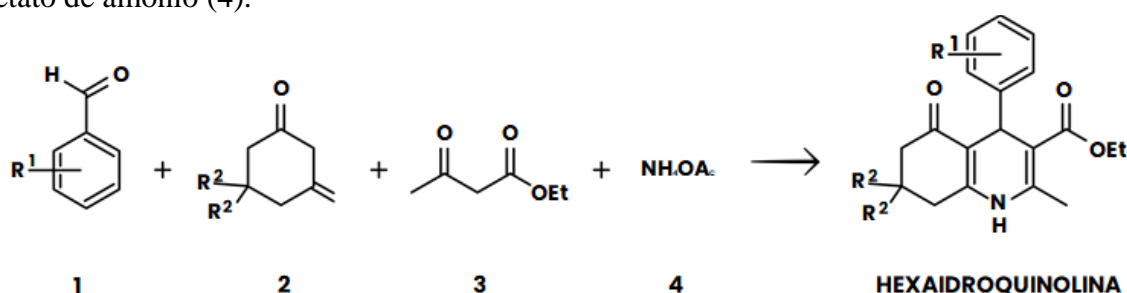
Uma das características da síntese multicomponente é que os produtos finais contêm quase todas as porções dos reagentes, formando pouco ou nenhum subproduto e sendo, então, de grande valia para a indústria farmacêutica que procura ser ambientalmente sustentável (RUIJTER; ORRU, 2013).

Diversas são as aplicações das reações multicomponentes e muitas delas são nomeadas aos pesquisadores que as desenvolveram, como por exemplo reação de Hantzsch (HANTZSCH, 1881; JASSEM *et al.*, 2020) e reação de Ugi (BOLTJES *et al.*, 2017; UGI, 1959). Essa última, inclusive, foi por onde se desenvolveu a lidocaína (Xylocain®), um anestésico tópico diversamente utilizado mundialmente (TZITZIKAS, 2017).

### 2.3 Polihidroquinolinas

Um dos melhores métodos para a síntese de polihidroquinolinas (PHQs), atualmente, envolve uma reação modificada de Hantzsch (Figura 1), onde há o acoplamento multicomponente de um aldeído, com um  $\beta$ -cetoéster (como acetoacetato de etila), uma dicetona (como dimedona), e acetato de amônio (HUSSAIN-KHIL; GHORBANI-CHOGHAMARANI; MOHAMMADI, 2021; KUMAR *et al.*, 2008; SEHOUT *et al.*, 2017). Recentemente, diversos trabalhos vêm buscando a síntese das PHQs de forma limpa e sustentável, condizente com a chamada química verde (DAVARPANAH; GHAHREMANI; NAJAFI, 2019; ROOZIFA; HAZERI; NIYA, 2021; SEPAHVAND; BUAZAR; SAYAHI, 2020).

**Figura 1.** Exemplo de polihidroquinolina sintetizada a partir de uma reação Hantzsch, utilizando-se de um aldeído aromático (1), uma dicetona (2), acetoacetato de etila (3) e acetato de amônio (4).



Fonte: Do autor (2021).

As polihidroquinolinas são derivados assimétricos das 1,4-dihidropiridinas [um farmacóforo com núcleo heterocíclico pentassubstituído que possui diversas atividades biológicas] (NUNEZVERGARA *et al.*, 1996; SWARNALATHA; PRANSHANTHI, 2011), 1,3-dicetonas cíclicas, aldeídos, acetoacetato de etila e acetato de amônio (DAVOODNIA; KHASHI; TAVAKOLI-HOSEINI, 2013; REDDY; RAGHU, 2008).

Além disso, estas estruturas são compostos heterocíclicos nitrogenados análogos ao dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido (NADH), uma coenzima encontrada nas células dos seres vivos e que é responsável pela transferência de hidrogênio em rotas metabólicas (KHEDKAR; AUTI, 2014; SAINI; KUMAR; SANDHU, 2008).

Desta forma, as PHQs têm sido retratadas como moléculas bioativas de grande importância, uma vez que possuem diferentes propriedades medicinais, como por exemplo, funções neuroprotetoras, anti-inflamatória, hepatoprotetoras, antibiótica, anticâncer, e

antioxidante, e atuam como anti-agregantes plaquetários, vasodilatadores e anti-isquêmicos (BRINKERHOFF *et al.*, 2019; CHEN *et al.*, 2001; JADHVAR *et al.*, 2017; JOSHI; PAWAR, 2013; KUMAR *et al.*, 2010; PAIDEPALA *et al.*, 2014; ROMA *et al.*, 2000; VENKATAPATHY *et al.*, 2020).

## **2.4 Fármacos**

Com o aparecimento de novas doenças, pesquisar e desenvolver novos medicamentos é de suma valia no tratamento e prevenção da saúde humana. Não obstante disso, aprimorar os medicamentos já existentes é essencial, sempre buscando doses mais adequadas, menor presença de efeitos adversos e métodos mais simples de se obter o fármaco desejado.

### **2.4.1 Anti-inflamatórios**

Anti-inflamatórios são substâncias químicas (sintéticas ou derivadas de produtos naturais) que auxiliam na redução e supressão de processos inflamatórios, reduzindo seus efeitos (vermelhidão, inchaço, febre e dor) no organismo (ROBB *et al.*, 2020). Os medicamentos anti-inflamatórios podem ser classificados em NSAID (*non-steroidal anti-inflammatory drugs* - anti-inflamatório não esteroide), os quais são fármacos muito comuns e usados mundialmente (BINDU; MAZUMDER; BANDYOPADHYAY, 2020), e SAID (*steroidal anti-inflammatory drug* - anti-inflamatórios esteroides ou corticosteroides) (PERES *et al.*, 2012). Diversos são os anti-inflamatórios conhecidos no mercado, como por exemplo a aspirina, ibuprofeno, diclofenaco, nimesulida, prednisona e hidrocortisona (GHLICHLOO; GERRIETS, 2021).

### **2.4.2 Anticoagulantes**

Antiplaquetários que inibem a formação de coágulos sanguíneos, agentes fibrinolíticos que dissolvem o coágulo e os anticoagulantes são os tipos de medicamentos mais recomendados para prevenir ou tratar a trombose e as doenças a ela relacionadas (RINGLEB, 2006). Os anticoagulantes são substâncias químicas que evitam a formação de coágulos no sangue ao alterar vias da cascata de coagulação, aumentando o tempo de resposta da coagulação. Eles são prescritos para pacientes que tem alto risco de desenvolver doenças tais como derrame, ataque cardíaco, e trombose (FEDAN, 2020). Embora esses medicamentos tenham sua utilização recomendada para algumas doenças, o seu uso deve ser feito com cautela uma vez que podem induzir reações medicamentosas adversas, as quais incluem

sangramentos pelo nariz e gengiva, hematomas severos, presença de sangue em urina e fezes, e até mesmo o desenvolvimento de osteoporose (ELANGO *et al.*, 2021; SIGNORELLI *et al.*, 2019; VEIRAIHAH; ROUTLEDGE, 2009).

### 2.4.3 Antibióticos

Antibióticos são substâncias antimicrobianas que agem contra infecções causadas por bactérias, sendo elas Gram-positivas (exemplos: *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*) ou Gram-negativas (exemplos: *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*), eliminando-as ou inibindo o seu crescimento (FERNANDES; MARTENS, 2017).

Diversos são os tipos de antibióticos encontrados no mercado farmacêutico e suas formulações, as quais incluem cápsulas, comprimidos, cremes, sprays e injeções. Dentre os grupos de antibióticos existem as penicilinas (penicilina e amoxicilina), cefalosporina (cefalexina), aminoglicosídeos (gentamicina e tobramicina), tetraciclinas (tetraciclina e doxiciclina), macrolídeos (azitromicina e claritromicina) e fluoroquinolonas (ciprofloxacino e levofloxacino) (KHAN, 2018).

## 2.5 Hemostasia

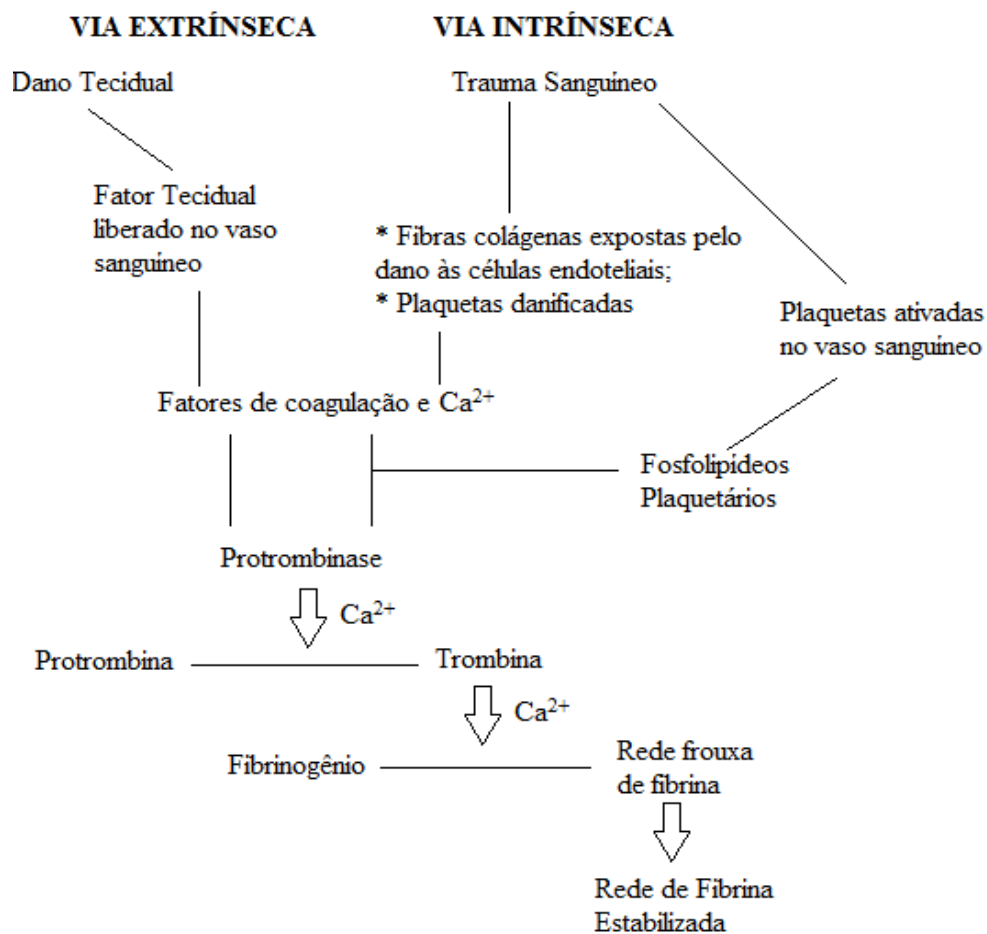
Manter o sangue fluido e circulante dentro de vasos sanguíneos, mesmo quando danificados, é essencial para a vida. Este é o conceito dado para a chamada hemostasia. Ela corresponde a uma sequência de processos que, dentre os quais, três se destacam: vasoconstricção (contração do vaso sanguíneo, diminuindo por alguns minutos ou horas o fluxo de sangue para locais com lesão, evitando a perda excessiva de sangue), formação de um bloqueio temporário ou tampão plaquetário (bloqueio mecânico através da adesão de plaquetas para preencher o dano na parede do vaso lesionado) e a coagulação sanguínea (processo em que o sangue deixa sua forma líquida e torna-se um coágulo gelatinoso) (HALL; GUYTON, 2015; SILVERTHORN, 2017).

A cascata de coagulação é parte efetiva na hemostasia. Contudo, se ativada excessivamente, pode levar à trombose e atingir diversos órgãos tais como o cérebro, coração e pulmões (GEDDINGS; MACKMAN, 2014).

O processo de coagulação pode-se iniciar por duas maneiras (TORTORA; DERRICKSON, 2020). Por uma via extrínseca, que ocorre de forma rápida e é ativada com o dano tecidual. Tal dano libera no sangue a proteína conhecida como fator tecidual (FT) a partir do lado externo dos vasos sanguíneos, que passa por diversas outras reações até ser

convertido em protrombinase, finalizando a via. A via intrínseca é mais complexa e se inicia internamente com algum trauma sanguíneo, mas também termina com a formação da protrombinase. Após a formação dessa proteína plasmática, o processo da coagulação continua através de uma via comum, onde há a conversão de protrombina em trombina que atua sobre moléculas de fibrinogênio gerando redes de fibrina (Figura 2).

**Figura 2.** Exemplificação simplificada do processo de coagulação no corpo humano.



Fonte: Adaptado de Tortora e Derrickson (2020).

As desordens na hemostasia podem ser tanto de causa hereditária (por exemplo, doença de Von Willebrand e Síndrome de Bernard-Soulier), como adquiridas (por exemplo: falha renal com uremia e doenças no fígado). Além disso, alguns medicamentos também podem afetar a função plaquetária, como por exemplo a aspirina, que atua na ciclooxygenase 1 (COX-1), e o Tirofiban (GP IIb/IIIa - atua em receptores de fibrinogênio) (CURNOW; PASALIC; FAVALORO, 2016). Mais recentemente, a trombose foi associada à SARSCoV-2



(COVID-19) ao ser desencadeada por produção exacerbada de fatores inflamatórios e da trombina (COSTA-FILHO *et al.*, 2021; HIPPISEY-COX *et al.*, 2021).

### 2.5.1 Enzimas atuantes na hemostasia

Algumas enzimas (por exemplo as fosfolipases e proteases) têm participação importante em processos da hemostasia, assim como em processos inflamatórios.

As fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) atuam na coagulação, agregação de plaquetas, e também em processos inflamatórios. As PLA<sub>2</sub> participam da hidrólise de fosfolipídios de membrana (fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina), que acarretam na liberação de ácido araquidônico (LESLIE, 2015), o qual serve como substrato para as enzimas ciclooxigenases e lipooxigenases, desencadeando a formação de eicosanóides, os quais controlam por exemplo, o fluxo de sangue, a formação de coágulos e a inflamação (ZAMBELLI *et al.*, 2017).

Com relação às proteases, as serinoproteases atuam na regulação da coagulação sanguínea (BHAT *et al.*, 2016), onde a maioria dos fatores de coagulação são deste grupo de proteases. As metaloproteases, por outro lado, tem participação na lise de trombos, processos de regeneração de tecidos, cicatrização, e interferem na coagulação e agregação plaquetária (KINI; KOH, 2016; LAMASH; DOLMATOV, 2013).

## 3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Dois compostos orgânicos derivados de polihidroquinolinas foram sintetizados utilizando um modelo de síntese multicomponente, sendo eles 4-(4-hidroxi-fenil)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3-ácido carboxílico etil éster e 4-(2-cloro-fenil)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3-ácido carboxílico etil éster. Após a síntese, ambos os compostos foram avaliados para possíveis atividades biológicas *in vitro*, as quais incluíam: efeitos dos compostos sintetizados sobre a hemostasia humana, por meio de ensaios de coagulação/anticoagulação, hemólise e trombólise; potencial anti-inflamatório utilizando fosfolipases A<sub>2</sub> e eritrócitos sanguíneos humanos; potencial modulador sobre enzimas que atuam em processos relacionados à hemostasia, tais como coagulação sanguínea, resposta inflamatória, dissolução de trombos, regeneração e cicatrização de tecidos (fosfolipases A<sub>2</sub>, serinoproteases e metaloproteases); e potencial antimicrobiano das moléculas sintetizadas.

Nos ensaios antimicrobianos ambas as moléculas inibiram completamente a formação de colônias (UFC) da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* quando avaliada com 24 horas de incubação e reduziram significativamente as UFCs de *Staphylococcus aureus*. Em relação aos

efeitos sobre a coagulação de plasma humano citratado, a molécula contendo o átomo de cloro no anel aromático não teve interação com a peçonha mas aumentou o tempo de coagulação quando incubada previamente ao plasma nas doses de 125, 100 e 50 mg. Em contrapartida, a molécula contendo a hidroxila na posição *para* (p-xileno), aumentou o tempo de coagulação do plasma citratado em todas as doses avaliadas e ainda teve interação com a peçonha (aumentou o tempo de coagulação nas doses de 125 e 100 mg). A atividade trombolítica foi similar para ambas as moléculas, porém quando incubadas com a peçonha na menor dose (25 mg) foram observados efeitos de potencialização para a molécula contendo –OH. No teste de inibição de fosfolipases A<sub>2</sub>, a molécula contendo –OH foi efetiva somente na dose de 125 mg, enquanto que a molécula contendo –Cl inibiu a atividade fosfolipásica nas doses de 125, 100 e 50 mg. Nenhuma das moléculas teve atividade citotóxica. Além disso, a molécula com a hidroxila foi efetiva em induzir efeitos protetivos contra a atividade hemolítica em todas as doses testadas. Já a molécula com o átomo de cloro, reduziu a atividade em apenas duas doses (125 e 50 mg).

Com a realização das análises experimentais foi possível observar que ambas as moléculas sintetizadas apresentaram atividades biológicas significantes. Com estes resultados iniciais, novos experimentos objetivando ampla caracterização dessas moléculas poderão ser realizados, a fim de se entender os mecanismos de ação, definir concentrações inibitórias mínimas, prospectar segurança e eficácia de possíveis aplicações e formulações para fármaco e outras informações com vistas a utilização futura dessas moléculas.

## REFERÊNCIAS

- BHAT, S. K. *et al.* Serine proteinases from *Bothrops* snake venom activates PI3K/Akt mediated angiogenesis. **Toxicon**, v. 124, p. 63-72, 2016.
- BINDU, S.; MAZUMDER, S.; BANDYOPADHYAY, U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: a current perspective. **Biochemical Pharmacology**, 114147. 2020. doi:10.1016/j.bcp.2020.114147.
- BOLTJES, A. *et al.* Ugi multicomponent reaction. **Organic syntheses**, v. 94, pp. 54-56. 2017. <https://doi.org/10.15227/orgsyn.094.0054>
- 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(12), p. 1479–1484, 2012.
- BRAVO, H. R. *et al.* Phytotoxicity of indole alkaloids from cereals. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 38(2), p. 123–129, 2010.
- BRINKERHOFF, R. C. *et al.* Evaluation of the antioxidant activities of fatty polyhydroquinolines synthesized by Hantzsch multicomponent reactions. **RSC Advances**, v. 9(43), p. 24688–24698. 2019. doi:10.1039/c9ra04758a
- CHEN, Y. L. *et al.* Synthesis and antibacterial evaluation of certain quinolone derivatives. **Journal of Medicine Chemistry**, v. 44(14), p. 2374-2377, 2001.
- CORDELL, G. A.; QUINN-BEATTIE, M. L.; FARNSWORTH, N. R. The potential of alkaloids in drug discovery. **Phytotherapy Research**, v. 15(3), p. 183-205, 2001.
- COSTA-FILHO, R. C. *et al.* Should COVID-19 be branded to viral thrombotic fever? **Mem Inst Oswaldo Cruz**. Vol. Apr 30;116:e200552. 2021. doi: 10.1590/0074-02760200552.
- CURNOW, J.; PASALIC, L.; FAVALORO, E. J. Why Do Patients Bleed? **Surgery Journal (N Y)**, v. 2(1), p. 29-43, 2016.
- DEWICK, P. M. **Chapter 6 (Alkaloids)**. In, *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. 2. ed. University of Nottingham, UK: [s.n.], p.291-404, 2002.
- DAVARPANA, J.; GHAREMANI, M.; NAJAFI, O. Synthesis of 1,4-dihydropyridine and polyhydroquinoline derivatives via Hantzsch reaction using nicotinic acid as a green and reusable catalyst. **Journal of Molecular Structure**, v. 1177, p. 525-535, ISSN 0022-2860, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.10.002>.
- 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.

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.

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.

FEDAN, J. S. "**anticoagulant**". Encyclopedia Britannica. 2019. Disponível em: <https://www.britannica.com/science/anticoagulant>. Acessado em 12 Agosto, 2021.

FERNANDES, P.; MARTENS, E. Antibiotics in late clinical development. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p. 152-163, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.09.025>.

GEDDINGS, J. E.; MACKMAN, N. New players in haemostasis and thrombosis. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 111(4), p. 570-4, 2014.

GHLICHLOO, I.; GERRIETS, V. **Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs)** [Atualizado 2021 May 12]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547742/>

HALL, J. E.; GUYTON, A. C. **Guyton and Hall: Textbook of medical physiology**. 13th ed. Philadelphia, Pa.: Saunders/Elsevier. 2015.

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

HERAVI, M. M.; ZADSIRJAN, V. Prescribed drugs containing nitrogen heterocycles: an overview. **RSC Adv**. v. 10, p. 44247-44311, 2020.

HANTZSCH, A. "Condensation produkte aus Aldehydammoniak und Ketonartigen Verbindungen". **Chemische Berichte**. v. 14(2), p. 1637–8. 1881. doi:10.1002/cber.18810140214.

HIPPISLEY-COX, J. *et al.* Risk of thrombocytopenia and thromboembolism after covid-19 vaccination and SARS-CoV-2 positive testing: self-controlled case series study. **BMJ**, v. 374, p. 1931, 2021. doi:10.1136/bmj.n1931

HUSSAIN-KHIL, N.; GHORBANI-CHOGHAMARANI, A.; MOHAMMADI, M. A new silver coordination polymer based on 4,6-diamino-2-pyrimidinethiol: synthesis, characterization, and catalytic application in asymmetric Hantzsch synthesis of polyhydroquinolines. **Sci Rep.**, v. 11, p. 15657, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94846-6>

JADHVAR, S. C. *et al.* One-pot synthesis and evaluation of anticancer activity of polyhydroquinoline derivatives catalyzed by [Msim]Cl. **Res Chem Intermed**, v. 43, p. 7211–7221, 2017. doi: 10.1007/s11164-017-3069-2

JASSEM, A. M. *et al.* A catalytic and green method for one-pot synthesis of new Hantzsch 1,4-dihydropyridines. **SN Applied Sciences**, v. 2(3), 2020. doi:10.1007/s42452-020-2165-x

JOHN, S. E.; GULATI, S.; SHANKARAIHAH, N. Recent advances in multi-component reactions and their mechanistic insights: a triennium review. **Org. Chem. Front.**, 2021. <https://doi.org/10.1039/D0QO01480J>

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

KERRU, N. *et al.* A Review on Recent Advances in Nitrogen-Containing Molecules and Their Biological Applications. **Molecules**, v. 25(8), p. 1909, 2020. doi:10.3390/molecules25081909

KHAN, F. Antibiotics Classification and Visual Target Sites for Bacterial Inhibition. **Advances in Pharmacology & Clinical Trials**, v. 3, 2018. 10.23880/APCT-16000137.

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.

KINI, R. M.; KOH, C. Y. Metalloproteases Affecting Blood Coagulation, Fibrinolysis and Platelet Aggregation from Snake Venoms: Definition and Nomenclature of Interaction Sites. **Toxins**, v. 8(10), 284, p. 1-27, 2016.

KITANOSONO, T.; KOBAYASHI, S. Synthetic Organic "Aquachemistry" that Relies on Neither Cosolvents nor Surfactants. **ACS Cent Sci**, v. 7(5), p. 739-747, 2021. doi:10.1021/acscentsci.1c00045

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, p. 536-542, 2008.

LAMASH, N. E.; DOLMATOV, I. Y. Proteases from the regenerating gut of the holothurian *Eupentacta fraudatrix*. **PLoS one**, v. 8(3), p. 1-12, 2013.

LESLIE, C. C. Cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>: physiological function and role in disease. **Journal of lipid research**, v. 56(8), p. 1386-1402, 2015.

MAIER, M. E. Design and synthesis of analogues of natural products. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 13(19), p. 5302–5343, 2015. doi:10.1039/c5ob00169b

MICHAEL, J. P. Quinoline, quinazoline and acridone alkaloids. **Natural Products Reports**, v. 25(1), p. 166-187, 2008.

MICHILES, E.; BOTSARIS, A. S. Medicamentos Sintéticos e Fitoterápicos: Potencialidades de Equivalência. **Revista Fitos**, v. 1(1), p. 36-42, 2005.

NAKHATE, A. V.; INGALE, A. P.; SHINDE, S. V. Cetrimonium Bromide Promoted Efficient Multi-component Protocol for Synthesis of 1-Amidoalkyl-2-naphthols in Aqueous Medium. **Asian J. Chem.**, v. 33(7), p. 1620-1630, 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.

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.

PENG, J. *et al.*. Plant-Derived Alkaloids: The Promising Disease-Modifying Agents for Inflammatory Bowel Disease. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 351, 2019.

PERES, M. F. S. *et al.*. Steroidal and non-steroidal cyclooxygenase-2 inhibitor anti-inflammatory drugs as pre-emptive medication in patients undergoing periodontal surgery. **Braz Dent**, v. 23, n. 6, p. 621-628, 2012.

PILLI, R. O. A.; ASSIS, F. F. Organic Synthesis: New Vistas in the Brazilian Landscape. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 1, 2018.

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.

RINGLEB, P. A. Thrombolytics, anticoagulants, and antiplatelet agents. **Stroke**, v. 37, n. 2, p. 312–313, 2006.

ROBB, C. T. *et al.* Non-steroidal anti-inflammatory drugs, prostaglandins, and COVID-19. **Br J Pharmacol**, v. 177(21), p. 4899-4920, 2020. doi: 10.1111/bph.15206.

ROMA, G. *et al.* 1,8-Naphthyridines IV. 9-substituted N,N-dialkyl-5-(alkylamino or cycloalkylamino) [1,2,4]triazolo[4,3-a][1, 8]naphthyridine-6-carboxamides, new compounds with anti-aggressive and potent anti-inflammatory activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 35(11), p. 1021-1035, 2000.

ROOZIFAR, M.; HAZERI, N.; FAROUGHI, N. H. Application of salicylic acid as an eco-friendly and efficient catalyst for the synthesis of 2,4,6-triaryl pyridine, 2-amino-3-cyanopyridine, and polyhydroquinoline derivatives. **J. Heterocycl. Chem.**, 2021. <https://doi.org/10.1002/jhet.4242>

RUIJTER, E.; ORRU, R. V. Multicomponent reactions - opportunities for the pharmaceutical industry. **Drug Discovery Today: Technology**, v. 10(1), p. 15-20, 2013.

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

SEHOUT, I. *et al.*, A. Solvent-free synthesis of polyhydroquinoline and 1,8-dioxodecahydroacridine derivatives through the Hantzsch reaction catalyzed by a natural organic acid: A green method. **Synthetic Communications**, v. 47:12, p. 1185-1191, 2017. doi: 10.1080/00397911.2017.1316406

SEPAHVAND, M.; BUAZAR, F.; SAYAHI, M. H. Novel marine-based gold nanocatalyst in solvent-free synthesis of polyhydroquinoline derivatives: Green and sustainable protocol. **Appl Organomet Chem.**, v. 34, p. 6000, 2020.

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

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia humana: uma abordagem integrada**. 7 ed. Porto Alegre: Artmed. 2017.

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.

TORTORA, G. J.; DERRICKSON, B. H. **Principles of Anatomy and Physiology**. 16th ed. Wiley. 2020. ISBN: 978-1-119-66268-6

TZITZIKAS, T. Z. **Innovative Multicomponent Reactions and Their Use in Medicinal Chemistry**: University of Groningen; 2017.

UR RASHID, M. *et al.*. The chemistry and pharmacology of alkaloids and allied nitrogen compounds from *Artemisia* species: A review. **Phytother Res.**, v. 33(10), p. 2661-2684, 2019. doi: 10.1002/ptr.6466.

UGI, I. *et al.* "Versuche mit Isonitrilen". **Angew. Chem.**, v. 71 (11), p. 386, 1959.

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

VENKATAPATHY, K. *et al.*. Design, synthesis, molecular docking, and spectral studies of new class of carbazolyl polyhydroquinoline derivatives as promising antibacterial agents with noncytotoxicity towards human mononuclear cells from peripheral blood. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, 2020. doi:10.1002/jhet.3921

VITAKU, E.; SMITH, D. T.; NJARDARSON, J. T. Analysis of the Structural Diversity, Substitution Patterns, and Frequency of Nitrogen Heterocycles among U.S. FDA Approved Pharmaceuticals. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57(24), p. 10257–10274, 2014. doi:10.1021/jm501100b

WEBER, L. The application of multi-component reactions in drug discovery. **Current Medical Chemistry**, v. 9(23), p. 2085-2093, 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.

YE, Z. *et al.* Expedient syntheses of *N*-heterocycles via intermolecular amphoteric diamination of allenes. **Nat Commun**, v. 9, p. 721, 2018. doi.org/10.1038/s41467-018-03085-3

YOUNUS, H. A. *et al.* Multicomponent reactions (MCR) in medicinal chemistry: a patent review (2010-2020). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 31(3), p. 267–289, 2020. doi:10.1080/13543776.2021.1858797

ZAMBELLI, V. O. *et al.* Secreted Phospholipases A<sub>2</sub> from Animal Venoms in Pain and Analgesia. **Toxins**, v. 9(12), 406, p. 1-27, 2017.



## SEGUNDA PARTE

### ARTIGO 1

#### **Enzyme modulation and antimicrobial activity of the polyhydroquinoline derivative 4-(4-hydroxy-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>, Pedro Henrique Souza Cesar<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.

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

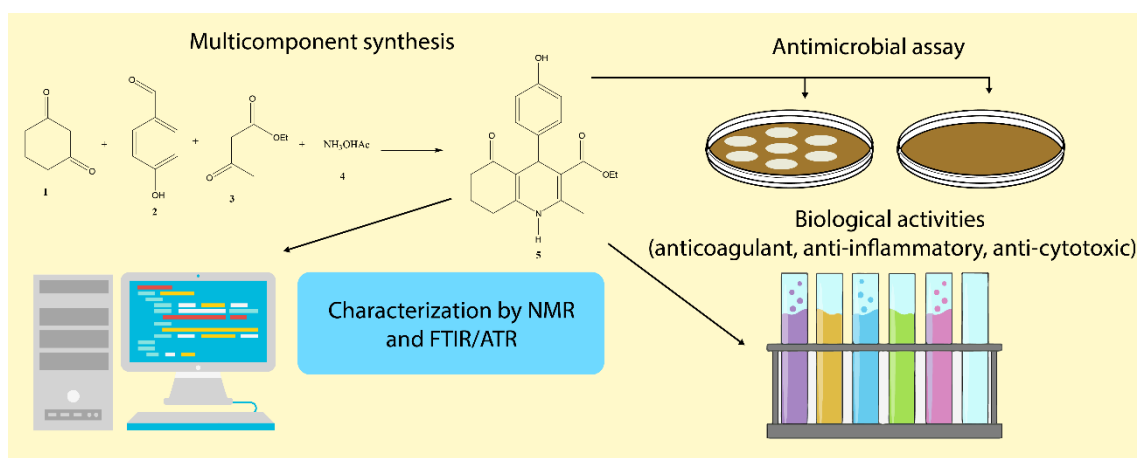
**Corresponding author:** Dr. Marcus Vinicius Cardoso Trento. Department of Chemistry, Biochemistry Laboratory. Universidade Federal de Lavras (UFLA), Campus Universitário, Lavras, MG, Brazil, PO Box 3037, Zip Code 37200-900, Phone no. +55(35)3829-1893. marcusvinicius.ct@gmail.com

## ABSTRACT

N-heterocyclic compounds are widely used in medicine and pharmacology due to their enormous diversity of biological activities (for example: antimicrobial, anticonvulsant, anti-inflammatory, anticancer, anthelmintic, antihistamine, antihypertensive, and antidepressant). Thus, these compounds are relevant for the synthesis of new drugs. The molecule 4-(4-Hydroxy-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester was obtained using a multicomponent reaction. Its biological prospection included modulating action on phospholipases A<sub>2</sub> and proteases, assessment of cytotoxicity and effects on processes associated with hemostasis, and antimicrobial activity. Several doses of the molecule were tested in each test, ranging from 25 to 500 mg. For antimicrobial activity, in the serial dilution test, the molecule exerted significant inhibitions for both *S. aureus* and *P. aeruginosa*. When assessed the effects on the coagulation of citrated human plasma, the molecule previously incubated with *Bothrops moojeni* venom (40 µg) was able to delay plasma coagulation, induced by proteases, in 14 and 13.66 seconds ( $p < 0.05$ ) at doses of 125 and 100 mg, respectively. Furthermore, the synthesized compound previously incubated with plasma, with the subsequent addition of venom, was able to prolong the clotting time in all evaluated doses ( $p < 0.05$ ). *B. moojeni* venom had its thrombolytic activity reduced to 73, 88, and 82% ( $p < 0.05$ ) when incubated with the compound at doses of 125, 100, and 50 mg, respectively. The phospholipase activity induced by the venom was significantly reduced after incubation of the venom with the compound at the highest dose (125 mg). In addition, a protective effect on human erythrocytes was exerted by the compound at all doses evaluated against *B. moojeni* venom (20 µg). Thus, in this manuscript, a relatively simple multicomponent reaction protocol (satisfactory yield, low cost, and ecologically adequate) was presented, in which the resulting molecule presented several biological activities that can be better explored for future applications in the context of human health.

**Keywords:** coagulant activity, anti-inflammatory activity, anti-cytotoxic activity, multicomponent reaction, hemostasis.

## GRAPHICAL ABSTRACT



## 1 INTRODUCTION

When developing new pharmacological substances, organic synthesis is directly linked to molecules and components previously isolated from natural products (ABDEL-RAZEK *et al.*, 2020; SULEIMAN *et al.*, 2020). Alkaloids, found mainly in plants, are organic nitrogen compounds where one or more nitrogen atoms are present (typically primary, secondary, or tertiary amines) (BRAVO *et al.*, 2010). The presence of nitrogen and/or aromatic rings in molecules is evidenced in several active ingredients used in medicine, pharmacology, and agrochemistry (BHAMBHANI; KONDHARE; GIRI, 2021; CORDELL; QUINN-BEATTIE; FARNSWORTH, 2001; MICHAEL, 2008).

Cyclic compounds containing one or more nitrogen atoms, also known as N-heterocyclic compounds, are widely used in medicine and pharmacology due to their diverse biological activities (DUARTE; SANGI; CORRÊA, 2010; JANA; SARKAR; MORRIS, 2020). For example, we can mention the following functions: antimicrobial, anticonvulsant, anti-inflammatory, anticancer, anthelmintic, antihistamine, antihypertensive, and antidepressant (CHOVANCOVA *et al.*, 2020; DUA *et al.*, 2011; NGUYEN; NGUYEN; TRAN, 2021). Thus, using these compounds to synthesize a new drug is extremely important due to their different actions.

However, for the industry, the synthesis still faces problems related to the approval of the new drug (probability of 22,900:1 to be approved) and the increased funding needed (MICHILES; BOTSARIS, 2005). In addition, large amounts of catalysts and a variety of products are often used to obtain a low yield of the desired molecules.

Thus, developing a relatively simple protocol that results in high yield, low cost, and is ecologically appropriate for producing molecules that have biological activities already described, has been a challenge for synthetic organic chemists (WILSON; DANISHEFSKY, 2006). Therefore, multicomponent reaction (MCR) is an excellent option since it is easy to perform, has high atomic efficiency, reduced reaction time, results in less environmental impact, and can be used in the development of new drugs (DEKAMIN *et al.*, 2018; NGUYEN; NGUYEN; TRAN, 2021; WEBER, 2002).

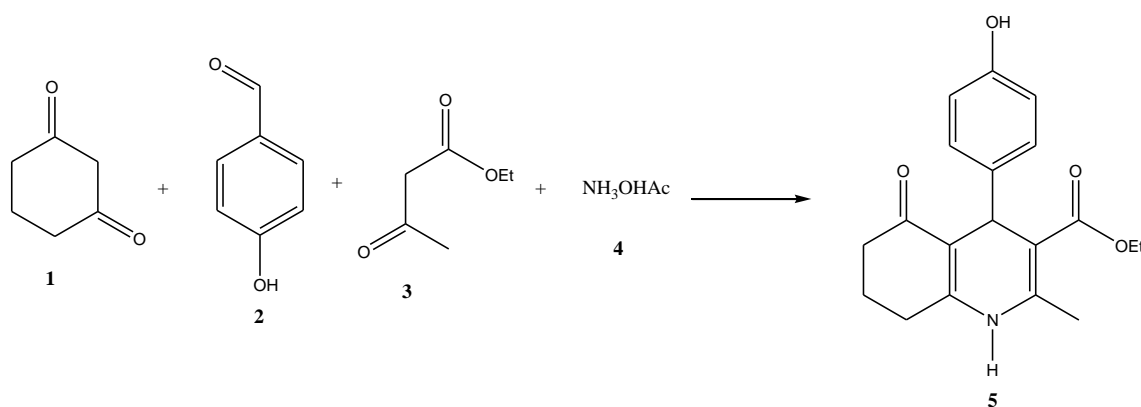
In this manuscript, the molecule 4-(4-hydroxy-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester was obtained using a simple, effective, and reliable multicomponent reaction, without the use of solvents or catalysts. Once synthesized, the biological prospection of the molecule included modulating action on phospholipases A<sub>2</sub> and proteases, evaluation of cytotoxicity, and its effects on processes related to hemostasis and antimicrobial activity.

## 2 MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Organic Synthesis

The multicomponent reaction performed to synthesize the molecule was based on the methodology described by Kumar *et al.* (2008). Catalyst and solvents were not used in the synthesis. The MCR was performed using the following reagents, as demonstrated in Figure 1: 1,3-cyclohexanedione (2 mmol) **1**, 4-hydroxybenzaldehyde (2 mmol) **2**, ethyl acetoacetate (2 mmol) **3**, and ammonium acetate (3 mmol) **4**.

**Figure 1.** Multicomponent reaction used to synthesize the molecule 4-(4-hydroxy-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester.



## 2.2 Characterization by Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

The characterization by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) was performed at Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). A Bruker Avance III – 14.1 Tesla (600.23 MHz for  $^1\text{H}$  frequency) equipment with an Ultrashield Plus® magnet was used to obtain the NMR spectra. 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  $-196^\circ\text{C}$ ). The probe has a Z-Gradient (53G/cm) and an Automatic Tuning and Matching accessory (ATMA).

## 2.3 Attenuated Total Reflection- Fourier transform infrared (FTIR/ATR) spectroscopy

A Varian equipment coupled to a diamond ATR accessory (GladiATR - PIKE Technologies) was used to obtain the attenuated total reflection (ATR) infrared spectra (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) at the Chemical Analysis and Prospection Center (CAPQ), located at the Department of Chemistry/UFLA. The IR absorption spectra were obtained with KBr pellets (2.0 mg of the sample was added into 200.0 mg of KBr).

## 2.4 Test Solutions

Solubility tests were performed to obtain samples partially diluted in phosphate-buffered saline - PBS ( $137\text{ mmol L}^{-1}\text{ NaCl}$ ,  $2.7\text{ mmol L}^{-1}\text{ KCl}$ ,  $10\text{ mmol L}^{-1}\text{ NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $2\text{ mmol L}^{-1}\text{ KH}_2\text{PO}_4$ ) and decrease the possible interference of dimethyl sulfoxide (DMSO), which was used to dissolve the compound. Screening tests were performed with the synthesized compound to identify the doses that could have their pharmacological effects evaluated, without changing the reaction environment. The doses of the controls used in each assay were also previously determined.

Four (4) doses were defined for the evaluation of the modulatory potential on enzymes that act in hemostatic and anti-inflammatory processes: 25, 50, 100, and 125 mg. For the antimicrobial activities, the following doses were used: 100, 125, 250, and 500 mg.

All tests were performed in triplicates.

## 2.5 Evaluation of the Antimicrobial Activity

Susceptibility testing using the agar diffusion method (antibiogram) and pour-plate technique with serial dilution (broth microdilution) were performed to evaluate the antimicrobial activity of the molecule 4-(4-hydroxy-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydro-quinoline-3-carboxylic-acid ethyl ester. Both tests were performed following the guidelines set forth by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018).

### 2.5.1 Obtaining the microorganisms and inoculum

The microorganisms used (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) were obtained from Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil), and gently ceded by the Laboratory of Bacteria staff at the Department of Food Sciences of Universidade Federal de Lavras. The stock cultures were stored in a cell freezing medium (100 mL of distilled water, 15 mL of glycerol, 0.3 g of yeast extract, 0.5 g peptone/bacteriological, and 0.5 g of NaCl). To reactivate the strains, 100  $\mu$ L of the culture was inoculated in tubes containing 10 mL Brain Heart Infusion (BHI) broth at 37°C for 4h under aerobic conditions. The inoculum was standardized by McFarland standards to a cell density of approximately  $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>.

### 2.5.2 Antimicrobial testing

All tests and concentrations were evaluated in triplicate.

In the first technique, an aliquot (standardized at  $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>) containing either the culture of *S. aureus* or *P. aeruginosa* was spread in Petri dishes coated with Trypticase Soy Agar (TSA). Afterwards, to perform the antibiogram, disks were placed into the dishes with the synthesized molecule (4-(4-hydroxy-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydro-quinoline-3-carboxylic-acid ethyl ester) in the doses of 500, 250, 125, and 100 mg. The Petri dishes containing the treatments were incubated at 37 °C for 24h. The antibiotic Chloramphenicol (CLSI, 2018) was used as a positive control (30  $\mu$ g). To evaluate the activity, inhibition halos were measured around the disks.

For the second technique, a solution containing 500 mg of the compound diluted in 1 mL DMSO was used. 500  $\mu$ L of this solution were transferred to a tube containing 500  $\mu$ L of BHI broth, obtaining a final dose of 250 mg (used as the stock solution). The spread plate technique was performed at 0, 24, and 48 hours, with serial dilutions (900  $\mu$ L of distilled

water for each 100  $\mu\text{L}$  of the stock solution) to obtain an adequate number of colonies. *S. aureus* or *P. aeruginosa* in 1000  $\mu\text{L}$  of BHI were used as positive controls (CLSI, 2018).

## 2.6 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).

Five (5) volunteers between 18 and 35 years old were randomly selected following some pre-determined standards, such as not be using prescription medication or have not been under surgical procedures close to the blood collection period. The volunteers were non-smokers that did not work under chemical or biological risk conditions. In addition, all of them signed an Informed Consent Form (ICF).

## 2.7 Effects on the coagulation of citrated human plasma

The coagulation activity was performed according to the methodology described by Mourao *et al.* (1996), which used 200  $\mu\text{L}$  of citrated human plasma stabilized at 37°C. The treatments (compound in the doses of 125, 100, 50, and 25 mg) were applied to the plasma to evaluate their coagulant activity. Time (seconds) was counted until the formation of a rigid clot. *Bothrops moojeni* (40 $\mu\text{g}$ ) was used as positive control. The compound was also incubated with *B. moojeni* to evaluate its possible interactions with proteases that induce coagulation.

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

The thrombolytic activity was evaluated on blood clots formed *in vitro* (CINTRA *et al.*, 2012). 100  $\mu\text{L}$  of freshly collected blood (without anticoagulant) were placed into each well of a 96-well microplate, which remained for 15 minutes in room temperature to obtain the thrombi. Afterwards, the thrombi were incubated with the compound (125, 100, 50, and 25 mg) for 24 hours at 37°C. *Bothrops moojeni* (20  $\mu\text{g}$ ) venom and PBS (30  $\mu\text{L}$ ) were used as positive and negative controls, respectively.

The compound was also evaluate as to its potential in modulate the activity of thrombolytic proteases present in the snake venom. All doses of the compound were incubated for 30 minutes at 37°C with *B. moojeni* venom. The activities were estimated by

measuring the volume of liquid released by each thrombus. The values were converted into percentage and the positive control was considered as 100% of activity.

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

The phospholipase activity was evaluated using an adapted version of the methodology described by Gutiérrez *et al.* (1988). 0.01 mol L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, egg yolk phospholipids (phosphatidylcholine, phosphatidylserine, and phosphatidylethanolamine), 0.005% sodium azide, and 1% bacteriological agar dissolved in PBS were mixed to form a medium (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 anti-inflammatory and enzyme modulating activity of the compound was evaluated using phospholipase A<sub>2</sub> present in *Bothrops moojeni* venom (20µg), which served as a tool to induce the breakdown of phospholipids. Pre-incubation of the venom with the synthesized compound (125, 100, 50, and 25 mg) was performed for 30 minutes at 37°C. The translucent halos, resulting from phospholipase activity (expressed in millimeters), were evaluated after 18 hours in the cell culture chamber at 37°C.

## 2.10 Cytotoxic activity on human erythrocytes

This activity was also evaluated using an adapted version of the methodology described by Gutiérrez *et al.* (1988). However, the phospholipids were replaced by human erythrocytes to form the gel (0.01 mol L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, erythrocytes 1:3 v v<sup>-1</sup> in PBS, 0.005% sodium azide, and 1% bacteriological agar dissolved in PBS - pH 7.2). To obtain the erythrocytes concentrate, 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 compound (125, 100, 50, and 25 mg) were applied into holes made in the gel (~0.5 cm diameter) and evaluated for lysis induction. Then, to verify its anti-cytotoxic potential, the compound was evaluated after pre-incubation with *Bothrops moojeni* venom (20 µg) for 30 minutes at 36 °C. The Petri dishes were kept in a cell culture chamber at 36°C for 18 hours. *B. moojeni* venom was used as a positive control. The formation of a translucent halo around the hole characterizes hemolysis, which was measured (millimeters) with a caliper.



## 2.11 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 SAS (v. 9.0) was used.

## 3 RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 Synthesis and Structural Characterization

The maceration of the reagents led to a yellow solid product, corroborating literature data (KUMAR *et al.*, 2008), which was rinsed with ice-cold distilled water to remove excess unreacted ammonium acetate, and then remained at rest for 24h. For the recrystallization of the product, 20  $\mu$ L of ethanol at 68°C were added to dissolve the product (solid mass), which turned into a viscous liquid, and then filtered using a filter, kitassate, and vacuum pump, generating the hexahydroquinoline crystals.

For the molecule 4-(4-hydroxy-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester, a hydroxyl group is connected at the *para* position in relation to the nitrogen ring. <sup>1</sup>H NMR spectrum shows resonances at  $\delta$ H 4.83 (H4, 1H, *s*), 4.03 (H12, 2H, *q*,  $^3J_{\text{H12-H13}} = 7.0$  Hz), 2.55-1.70 (H7, H8, and H9, 6H, *m*), 2.30 (H1, 3H, *s*), and 1.18 (H13, 3H, *t*,  $^3J_{\text{H13-H12}} = 7.0$  Hz) compatible with what is expected for this class of molecules. In the olefinic and aromatic region, two well separated and defined multiplets, integrating for 4 hydrogen atoms, confirm the presence of a disubstituted aromatic ring with *para* pattern:  $\delta$ H 6.99-6.96 (H15 and H19, 2H, *m*) and 6.61-6.59 (H16 and H18, 2H, *m*) ppm.

In the <sup>13</sup>C NMR spectrum, it was possible to identify a signal at  $\delta$ C 155.7 (C17) ppm, compatible with sp<sup>2</sup> carbon of an aromatic ring connected directly to an oxygen atom (hydroxyl), and a signal at  $\delta$ C 138.9 (C14) ppm according to sp<sup>2</sup> carbon of non-hydrogenated aromatic ring at a *para* position to the oxygenated carbon. Carbons C15 and C19 resonate at  $\delta$ C 128.7 and C16 and C18 at  $\delta$ C 114.9. The other peaks observed also corroborate for the structural characterization:  $\delta$ 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), and 14.6 (C13) ppm.

The IR spectrum for the molecule shows the O-H stretch band of alcohol (phenol) at  $3522\text{ cm}^{-1}$ , which is not widened since it is difficult for these molecules to interact with each other by hydrogen bonding due to steric hindrance. The N-H stretch band of a secondary amine is found at  $3294\text{ cm}^{-1}$ ,  $\text{C}_{\text{sp}2}\text{-H}$  stretch at  $3067\text{ cm}^{-1}$ ,  $\text{C}_{\text{sp}3}\text{-H}$  stretch at  $2954$ , ester  $\text{C}=\text{O}$  stretch at  $1610\text{ cm}^{-1}$ , as this is a weaker bound carbonyl due to resonance, ketone  $\text{C}=\text{O}$  stretch at  $1671\text{ cm}^{-1}$ , aromatic  $\text{C}=\text{C}$  bond stretch at  $1478\text{ cm}^{-1}$  and C-O-C (ester) bond stretch bands at  $1181$  and  $1136\text{ cm}^{-1}$ . The band at  $842\text{ cm}^{-1}$  probably refers to out-of-plane bending of an aromatic ring with *para* substitution pattern.

## 3.2 Biological Activities

### 3.2.1 Antimicrobial evaluation

The reason for selecting the tested strains is due to their importance in human infections and their presence in wounds, which delays the healing process. It was impossible to evaluate the compound in the agar diffusion test as it did not diffuse into the solid medium. However, for the serial dilution technique, the results were statistically significant, showing the antimicrobial action of the compound for both *S. aureus* and *P. aeruginosa*, as shown in Tables 1 and 2.

**Table 1.** Antimicrobial activity of the molecule 4-(4-hydroxy-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydro-quinoline-3-carboxylic-acid ethyl ester and positive control on *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. CV (%): Coefficient of Variation. P-value less than 0.05 is statistically significant and is highlighted in red. \* Data have a normal distribution.

Antimicrobial activity					
Time (h)	(Colony Forming Units, CFU)				
	Control	Compound	CV (%)	P-value	
* 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	

**Table 2.** Antimicrobial activity of the molecule 4-(4-hydroxy-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydro-quinoline-3-carboxylic-acid ethyl ester and positive control on *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. CV (%): Coefficient of Variation. P-value less than 0.05 is statistically significant and is highlighted in red. \* Data have a normal distribution.

Antimicrobial activity					
Time (h)		(Colony Forming Units, CFU)			
		Control	Compound	CV (%)	P-value
*	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

There is no significant difference between the compound and the control for both bacteria at time zero, which was expected since this time elapses immediately after dilution of the bacterial inoculum. However, when the plates containing TSA are incubated for 24h and 48h, a significant result is observed for both *S. aureus* and *P. aeruginosa*. For *S. aureus*, the number of viable cells decreased over 24h and 48h (Table 1), while for *P. aeruginosa*, the 24h treatment time was sufficient to eliminate viable cells. Thus, the compound presented a robust bactericidal action against Gram-negative bacteria, which can be more difficult to be eliminated from host organisms, as stated by Jubeh, Breijyeh, & Karaman (2020).

Jamale *et al.* (2019) also studied polyhydroquinoline derivatives. Said derivatives were potentially significant as antimicrobial and antituberculosis agents, with some of the compounds proving effective against *Mycobacterium tuberculosis*, considered an extremely difficult bacterium in terms of elimination.

Recently Mane *et al.* (2021) carried out antimicrobial tests of various polyhydroquinoline derivatives against Gram-positive (*Bacillus subtilis*) and Gram-negative (*Escherichia coli*) bacterial strains and against filamentous fungi (*Aspergillus niger*) and yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) to determine their minimum inhibitory concentration (MIC).

### 3.2.2 Effects on the coagulation of citrated human plasma

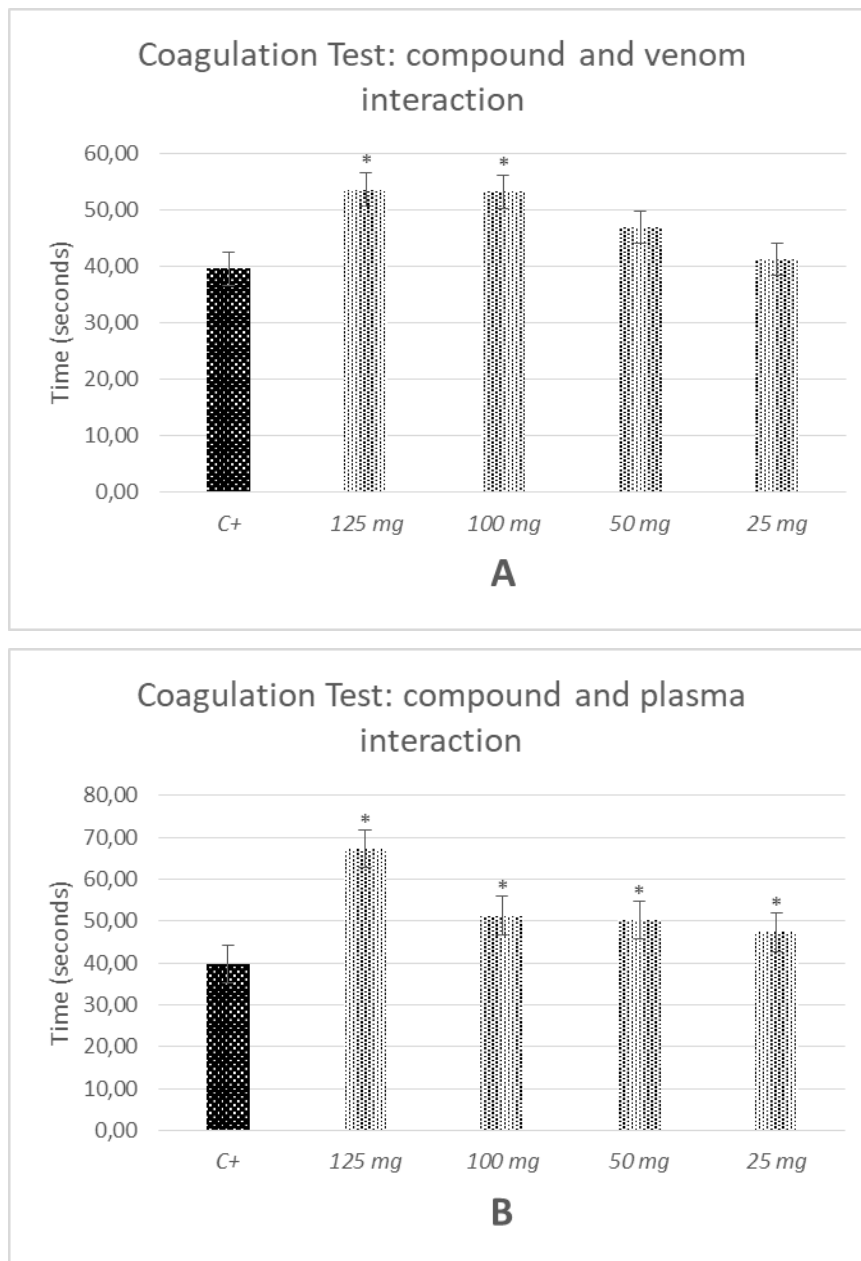
When previously incubated with *Bothrops moojeni* venom (40µg), the compound at doses of 125 and 100 mg was able to reduce the coagulant activity induced by proteases and prolong the plasma clotting time by 14 and 13.66 seconds ( $p < 0.05$ ), respectively (Figure 2A).

However, when the compound is previously incubated with citrated human plasma, followed by the addition of the venom, clotting time increases at all doses tested ( $p < 0.05$ ). Doses of 125, 100, 50, and 25 mg induced increased clotting times of 27.66, 11.66, 10.66, and

7.66 seconds, respectively, compared to the time obtained in the positive control - *B. moojeni* venom (Figure 2B).

Compound 4-(4-hydroxy-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester did not induce coagulation when added directly to plasma (data not shown). However, it was able to interact with factors of the coagulation cascade, inhibiting the action of coagulating enzymes present in the venom. Furthermore, interactions of the molecule with the coagulation-inducing proteases present in the venom can also be suggested when we consider the results of the assay carried out with their previous incubation and subsequent addition of plasma.

**Figure 2.** (A) Effect on the coagulation of citrated human plasma exerted by the synthesized molecule 4-(4-Hydroxy-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester previously incubated with *Bothrops moojeni* venom. (B) Effect on the coagulation of citrated human plasma exerted by the synthesized molecule 4-(4-Hydroxy-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester, previously added to the plasma and only them inducing coagulation with *Bothrops moojeni* venom. Positive control (C+): *Bothrops moojeni* venom (40  $\mu$ g). Samples: compound in the doses of 125, 100, 50, and 25 mg. Data represent the means and standard deviation of triplicates. \*Statistically significant – differs from the positive control ( $p < 0.05$ ).



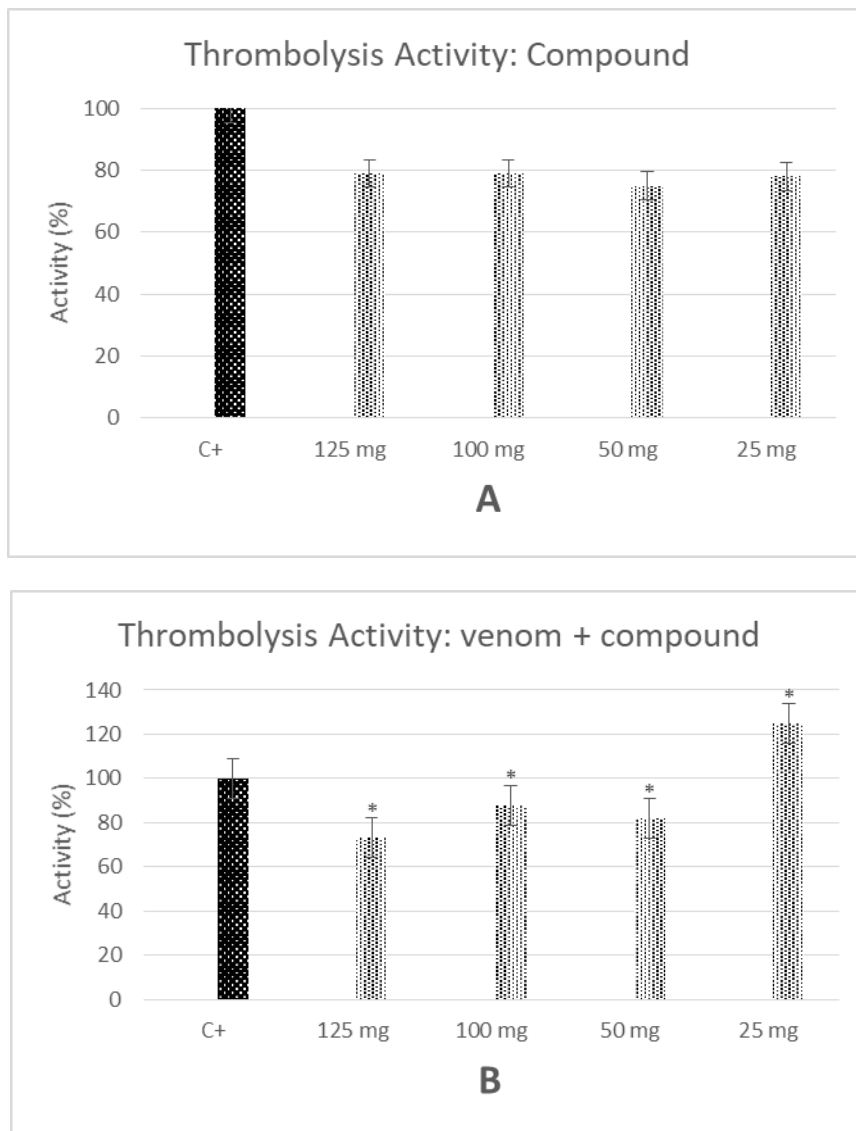
Thrombosis is one of the primary causes of heart attacks and cardiovascular diseases (LICHOTA; SZEWCZYK; GWOZDZINSKI, 2020). In the prevention and/or treatment of this disease and others related to it, the most used drugs are anticoagulants, antiplatelet agents that inhibit the formation of blood clots, and fibrinolytic drugs that dissolve the clot (RINGLEB, 2006). Thus, the interaction potential with cascade factors and thrombin-like proteases can be widely investigated in the search for formulations of new drugs. Future studies that make it possible to understand the mechanisms of action of this compound are highly relevant to enable its clinical use.

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

4-(4-hydroxy-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester did not differ statistically from the positive control (*Bothrops moojeni* - 20 $\mu$ g) at the tested doses. Thus, the synthesized compound exerts thrombolysis effects similar to the venom (Figure 3A).

When incubated with the synthesized compound at doses of 125, 100, and 50 mg, the thrombolytic activity exerted by the venom led to reductions of 73, 88, and 82%, respectively ( $p < 0.05$ ). These results characterize the inhibitory effect of 4-(4-hydroxy-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester on protease-inducing thrombolysis. However, the compound boosts this activity at its lowest concentration (25 mg) (Figure 3B). This result is consistent with the effect shown in the coagulation test since the compound was able to interact with plasma/blood proteins and inhibit the action of coagulation proteases.

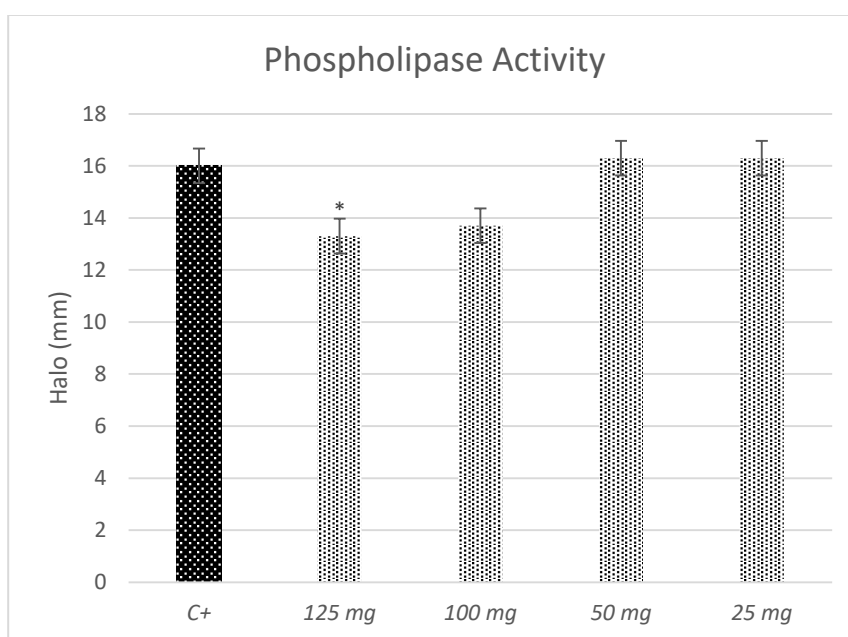
**Figure 3.** (A) Effect on human blood thrombi exerted by the synthesized molecule 4-(4-Hydroxy-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester. (B) Evaluation of the thrombolytic activity induced by *Bothrops moojeni* venom when incubated with the synthesized molecule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



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

The synthesized compound did not induce phospholipase activity under the conditions and doses tested (data not shown). However, when evaluated as to the phospholipase activity induced by *Bothrops moojeni* venom (20 µg), compound 4-(4-Hydroxy-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8- hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester at a dose of 125 mg was able to inhibit phospholipases A<sub>2</sub>, causing a reduction of 2.7 mm ( $p < 0.05$ ) of the halo formed in the positive control (16 mm). A trend towards inhibition of phospholipase activity was observed at a dose of 100 mg, which resulted in a halo of 13.7 mm ( $p = 0.06$ ) (Figure 4).

**Figure 4.** Effect of the compound 4-(4-Hydroxy-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester on the phospholipase A<sub>2</sub> activity induced by *Bothrops moojeni* venom. Positive control (C+): *Bothrops moojeni* venom (20 µg). Samples: compound in the doses 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 ( $p < 0.05$ ).



The breakdown of membrane phospholipids can trigger inflammatory processes in the human body by producing metabolites such as arachidonic acid and lysophospholipids (MEYER *et al.*, 2005). Thus, finding natural or synthetic compounds capable of inhibiting phospholipases' action is of paramount importance in the pharmaceutical sector. The significant inhibitions of PLA<sub>2</sub> activity observed at the highest doses of the compound highlight an anti-inflammatory potential that can be better investigated in future studies.



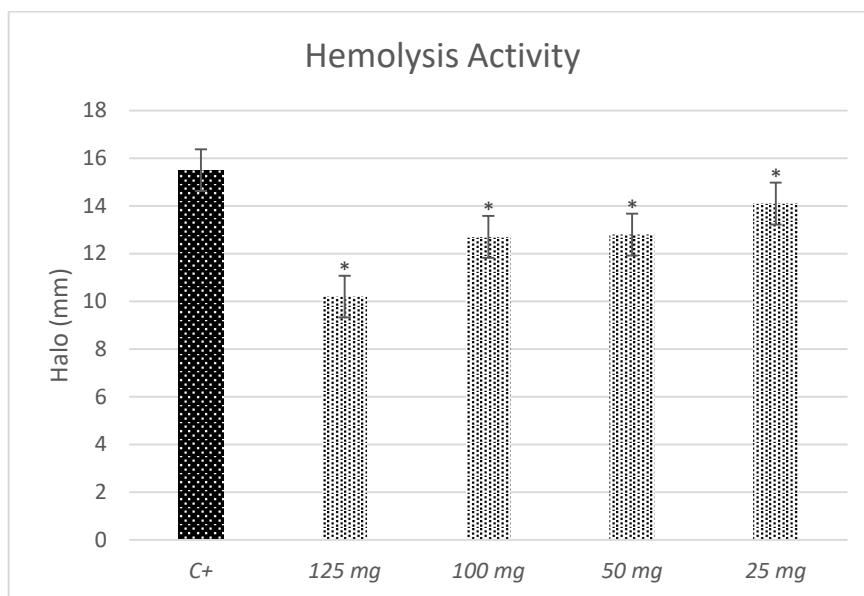
The use of snake venom as a tool for investigating the action of phospholipases A<sub>2</sub> and their possible inhibitors was evaluated in a manuscript published by Sales *et al.* (2017). The work demonstrates the similarity between human and venom phospholipases and uses computational and experimental models to assess the anti-inflammatory activity of vanillic acid. Thus, phospholipase inhibitors, such as the compound evaluated here, can be considered potential anti-inflammatory agents.

### 3.2.5 Cytotoxic activity on human erythrocytes

The synthesized compound was not cytotoxic on human erythrocytes when studied *in vitro*, under the evaluated conditions and doses (data not shown). However, a protective effect exerted by the compound on erythrocyte membranes was observed, reducing cytotoxicity induced by enzymes present in the venom (when previously incubated). The positive control (*Bothrops moojeni* - 20µg) induced 15.5 mm halos and reduced activity exerted by the compound by 5.3, 2.8, 2.7, and 1.4 mm at doses of 125, 100, 50, and 25 mg, respectively ( $p < 0.05$ ) (Figure 5).

The cytotoxic activity of polyhydroquinoline derivatives was evaluated in tests with several cell lines (FAN; SHEN; ZHOU, 2018), and significant inhibition was observed on tumor cells (osteosarcoma) for 3 synthesized derivatives (Methyl 2,7,7-trimethyl-4-(2-cyanophenyl)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylate, Methyl 2,7,7-trimethyl-4-(2-methoxyphenyl)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylate and Methyl 2,7,7-trimethyl-4-(3,4-dimethylphenyl)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylate) with IC<sub>50</sub> ranging between 25 and 45 µM.

**Figure 5.** Effect of the compound 4-(4-Hydroxy-phenyl)-2-methyl-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 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 ( $p < 0.05$ ).



Da Costa Cabrera et al. (2016) reported the antiproliferative effect of several PHQ derivatives on glial cells (glioma). The authors observed a dose-dependent, decreasing effect (concentrations ranged from 5 to 50  $\mu$ M) of PHQs on cell viability. They also described that the activity exerted by the analyzed derivatives was more effective in compounds that contained a hydroxyl group bonded to the aromatic ring. In this paper, the PHQ derivative 4-(4-hydroxy-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester also contains such a group.

#### 4 CONCLUSION

This paper demonstrated the multicomponent synthesis without using solvents and catalysts of 4-(4-Hydroxy-phenyl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethyl ester, according to the principles of green chemistry. The molecule exhibited after the biological screening an antimicrobial and anti-cytotoxic activities and a modulating potential on enzymes that act in hemostatic and inflammatory processes (phospholipases A<sub>2</sub>, and serine and metalloproteases). Further studies should be performed in order to establish the best concentrations and formulations for a possible drug.

## 5 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Universidade Federal de Lavras (UFLA) for their support. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brazil (CAPES) – Finance Code 001.

## 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.

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. Available at: <<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. Available at: <<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. L.; 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. Available at: <<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. Available at: <<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. Available at: <<https://doi.org/10.1007/s11164-020-04365-8>>.

MEYER, M. C. *et al.* Phospholipase A2 Inhibitors as Potential Anti-Inflammatory Agents Classification of Phospholipase A2 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 Potential. **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. Available at: <<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.

**ARTIGO 2****Potencial antimicrobiano e ação sobre hemostasia e inflamação do composto sintético 4-(2-cloro-fenil)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3- ácido carboxílico etil éster**

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

**Autor correspondente:** Dr. Marcus Vinicius Cardoso Trento. 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. [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), as quais possibilitam modificações orgânicas e a síntese de vários compostos farmacologicamente ativos. As MRCs oferecem vantagens notáveis, tais como menor gasto energético, e baixo desperdício e custo de produção, além de se caracterizarem por reações mais limpas (formando pouco ou nenhum subproduto). Com este avanço, tem surgido a síntese de muitos compostos heterocíclicos inspirados em compostos naturais, como por exemplo a síntese de polihidroquinolinas (PHQs). As PHQs têm alto nível biológico e farmacológico, uma vez que possuem diferentes propriedades medicinais (funções neuroprotetora, anti-inflamatória, hepatoprotetora, antibiótica e anticâncer). O derivado hexahidroquinolínico 4-(2-cloro-fenil)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3- ácido carboxílico etil éster foi sintetizado sem o uso de catalisadores ou solventes, conforme critérios da química verde. Ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram utilizadas na caracterização desta molécula. 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 ( $p < 0,05$ ). Foi observado um 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* (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  $A_2$  em comparação ao controle positivo. A incubação da molécula com a peçonha de *B. moojeni* (20 $\mu\text{g}$ ) reduziu a citotoxicidade induzida por proteases. Em relação a atividade antimicrobiana, 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. Desta forma, podemos concluir que a molécula foi sintetizada com êxito, com rendimento satisfatório, e apresentou propriedades biológicas importantes (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, *et al.* 2020; HAJI, 2016; PALLADACYCLES, 2019). MCRs formam 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 sínteses multicomponente sobre as sínteses comuns, tais como: alta eficiência atômica, fácil realização, baixos custos, tempo de reação reduzido e menor impacto ambiental (BRAHMACHARI; DAS, 2012; GULATI; JOHN; SHANKARAIHAH, 2021).

As polihidroquinolinas (PHQs) têm sido retratadas como moléculas bioativas de grande importância e que possuem diferentes propriedades medicinais, como por exemplo, funções neuroprotetora, anti-inflamatória, hepatoprotetora, antibiótica, anticâncer. Elas também podem atuar como anti-agregantes plaquetários, vasodilatadoras e anti-isquêmicas (BETECK *et al.*, 2021; CHEN, *et al.*, 2001; JAMALE *et al.*, 2019; JOSHI; PAWAR, 2013; KUMAR *et al.*, 2010; PAIDEPALA *et al.*, 2014; ROMA *et al.*, 2000).

O melhor método para a síntese de polihidroquinolinas, atualmente, envolve uma reação modificada de Hantzsch (KUMAR *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-cloro-fenil)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3- ácido carboxílico etil éster, sua caracterização e prospecção de funcionalidade biológica (avaliação de seus efeitos *in vitro* em ensaios de coagulação/anticoagulação, hemólise, trombólise, e atividade fosfolipásica e antimicrobiana).

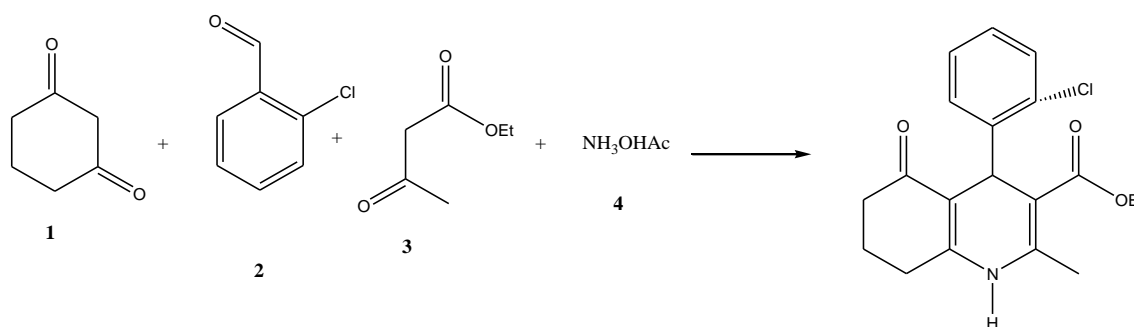


## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Síntese Orgânica

A síntese da molécula 4-(2-cloro-fenil)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3-ácido carboxílico etil éster foi realizada sem a utilização de catalisadores 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 (2 mmol) **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-cloro-fenil)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3-ácido carboxílico etil éster.



### 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  $^1\text{H}$ ) com magneto blindado (Ultrashield Plus®), localizado na 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 de absorção na região do infravermelho com reflectância total atenuada e transformada de Fourier (FTIR-ATR)

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

A análise dos grupos funcionais das moléculas sintetizadas foi realizada por espectroscopia infravermelha com transformada de Fourier - FTIR. Os espectros de absorção de IV foram obtidos com pastilhas de 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 do composto sintetizado, ele foi dissolvido em DMSO (dimetil sulfóxido). Testes de solubilidade foram realizados com o objetivo de obter amostras parcialmente diluídas em solução salina tamponada com fosfato - 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  $\text{mmol L}^{-1}$ ). Desta forma, a possível interferência do DMSO foi reduzida nos ensaios realizados.

Para cada ensaio, foi realizada uma triagem de diferentes doses do composto, 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.

Nos testes para a avaliação do potencial modulador sobre enzimas que atuam em processos hemostáticos e inflamatórios, 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 e 250 mg para o teste de diluição seriada com plaqueamento em superfície.

## 2.5 Avaliação da Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana da molécula 4-(2-cloro-fenil)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3-ácido 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, 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, e cedidos pelo laboratório de Bactérias do Departamento de Ciências dos Alimentos (DCA) – da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

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. O inóculo foi 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). Discos contendo a molécula 4-(2-cloro-fenil)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3-ácido carboxílico etil éster nas doses de 500 mg, 250 mg, 125 mg e 100 mg foram aplicados na placa de Petri. 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 o antibiótico Cloranfenicol na dose de 30 µg (CLSI, 2018).

Para a microdiluição em caldo, uma solução padrão do composto foi preparada na concentração de 500 mg/mL de DMSO. Desta solução, 500 µL foram retirados e adicionados à 500 µL do meio de cultura BHI contendo o inóculo bacteriano, obtendo-se uma dose final de 250 mg. Para realizar a contagem das colônias em placa, diluições sucessivas do meio incubado foram realizadas no momento do plaqueamento. Alíquotas da mistura incubada foram plaqueadas, em placa de Petri contendo TSA, nos tempos: 0 h (momento da adição do composto ao meio), 24 h e 48 horas após a adição do composto. 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. A contagem das

células viáveis foram feitas em meio TSA, de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018).

Ambos os testes e doses 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 eram 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), nem usaram 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  $\mu$ L), estabilizado à temperatura de 37°C, foi utilizado com a adição do composto, em diferentes doses. Leve agitação dos tubos de ensaio foi realizada até a formação de um coágulo rígido, e com consequente medição do tempo de coagulação. 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  $\mu$ g) 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 também foram 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 deixando-os 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. Tampão fosfato-salino - PBS (30  $\mu\text{L}$ ) – foi utilizado como controle negativo e peçonha de *Bothrops moojeni* (20 $\mu\text{g}$ ) como controle positivo. O composto foi 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. As atividades foram avaliadas medindo-se o volume de líquido liberado por cada trombo. Os valores obtidos nas análises foram convertidos para porcentagem e o controle positivo contendo a peçonha *B. moojeni* foi considerado como 100% de atividade trombolítica.

## 2.9 Efeitos sobre a atividade de fosfolipases $A_2$

A atividade fosfolipásica realizada seguiu metodologia descrita por *Gutiérrez et al.* (1988), com algumas adaptações. Foi elaborado um meio contendo  $\text{CaCl}_2$  0,01 mol  $\text{L}^{-1}$ , fosfolipídios de gema de ovo (fosfatidilcolina, fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina), azida de sódio 0,005% (inibe o crescimento de micro-organismos no meio) e ágar bacteriológico 1% dissolvido em PBS (pH 7,4). O meio foi vertido em placas de Petri e, após sua solidificação, os tratamentos foram aplicados em orifícios de tamanho uniforme (~ 0,5 cm de diâmetro). A atividade anti-inflamatória e moduladora enzimática do composto também foi avaliada, utilizando fosfolipases  $A_2$  presentes na peçonha de *Bothrops moojeni* (20 $\mu\text{g}$ ) para indução da quebra dos fosfolipídios. O composto, em diferentes doses, foi previamente incubado com a peçonha por 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Em seguida, os incubados foram aplicados ao gel contendo o substrato da enzima, e as placas permaneceram em câmara de cultivo celular a  $37^\circ\text{C}$  por 18 horas. Em seguida, a avaliação da atividade fosfolipásica pela medida do diâmetro dos halos translúcidos formados ao redor dos orifícios foi realizada.

## 2.10 Atividade citotóxica sobre eritrócitos humanos

Essa atividade foi avaliada pelo uso de meio sólido conforme descrito por *Gutiérrez et al.* (1988). Houve, porém, a substituição dos fosfolipídios por um concentrado de eritrócitos humanos. O sangue utilizado nesta análise foi coletado em tubos contendo heparina e imediatamente centrifugado, descartando-se o sobrenadante e suspendendo as células em tampão PBS. Em seguida, as células foram lavadas novamente por mais 2 vezes, usando volumes aproximados de 10 mL de mesmo tampão e com centrifugações de 1200 g por 10

minutos. Após as centrifugações, o concentrado de eritrócitos obtido foi utilizado na composição do gel. Desta forma, foi realizado um meio ( $\text{CaCl}_2$  0,01 mol  $\text{L}^{-1}$ ; 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 7,4). Após a solidificação do meio em placas de petri, os tratamentos (composto em diferentes doses e peçonha *Bothrops moojeni* -20 $\mu\text{g}$ - 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-cloro-fenil)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3- ácido carboxílico etil éster foi sintetizado 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 catalisadores, atendendo aos padrões da química verde. O rendimento para esta molécula foi de 59%.

Para a caracterização desta molécula foram feitos RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e IV e os resultados demonstram que a molécula foi sintetizada corretamente. É esperada a presença de um átomo de cloro conectado em posição *orto* em relação ao anel nitrogenado. O espectro de RMN de <sup>1</sup>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:  $\delta_H$  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  $^{13}C$  foi possível identificar o sinal em  $\delta_C$  133,2 (C15) ppm, compatível com carbono  $sp^2$  de anel aromático, conectado diretamente à um átomo de cloro. Além deste, foi observado o sinal em  $\delta_C$  143,7 (C14) ppm que corresponde ao carbono  $sp^2$  de anel aromático não hydrogenado vizinho ao carbono clorado. Os carbonos C16, C17, C18 e C19 têm ressonância, respectivamente, em  $\delta_C$  132,1, 129,6, 126,2 e 127,2. Os demais picos observados, também corroboram para a caracterização estrutural:  $\delta_C$  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).

No espectro de infravermelho (IV) pôde ser observado uma banda de estiramento N-H de amina secundária em  $3294\text{ cm}^{-1}$ , estiramento  $C_{sp^2}\text{-H}$  em  $3068\text{ cm}^{-1}$ , estiramento de  $C_{sp^3}\text{-H}$  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 Ensaio antimicrobianos

O teste de difusão não apresentou resultados e se mostrou inadequado para a avaliação da molécula devido a sua dificuldade em difundir no ágar. Entretanto, a molécula apresentou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, quando avaliada pela técnica de diluição seriada. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 1 e 2.

**Tabela 1.** Efeito do composto 4-(2-cloro-fenil)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3- ácido carboxílico etil éster e do controle sobre a viabilidade e multiplicação de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. CV (%): Coeficiente de Variação. P-valor menor que 0,05 = estatisticamente significativo (destacado em vermelho). \* Dados normalizados.

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

**Tabela 2.** Efeito do composto 4-(2-cloro-fenil)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3- ácido carboxílico etil éster e do controle sobre a viabilidade e multiplicação de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. CV (%): Coeficiente de Variação. P-valor menor que 0,05 = estatisticamente significativo (destacado em vermelho). \* Dados normalizados.

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

Não houve ação bactericida do composto no tempo zero, uma vez que este corresponde ao momento de contato imediato do composto com as bactérias. Entretanto, atividade antimicrobiana estatisticamente significativa é observada tanto para *S. aureus* quanto para *P. aeruginosa* nas placas em que foram semeados os incubados nos tempos de 24h e 48h. Para *S. aureus* observa-se uma diminuição do número de células viáveis em 24h e em 48h (Tabela 1). Não foram detectadas células viáveis de *P. aeruginosa* já a partir do tempo de 24h de tratamento, mostrando que o composto tem ação microbicida. Devido a diferença da composição da parede celular de bactérias, aquelas ditas Gram negativas, como é o caso da *P. aeruginosa*, são mais difíceis de eliminar do organismo hospedeiro (JUBEH; BREIJYEH; KARAMAN, 2020). Sendo assim, esta molécula sintetizada é 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 disso, eles buscam 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, tanto para bactérias como para fungos, demonstrando o potencial destes compostos para a continuidade dos estudos e possível desenvolvimento de novos fármacos.

Kalaria, Satasia, e Raval (2014) avaliaram a ação de derivados polihidroquinolínicos incorporados com imidazopirazol contra bactérias, fungos e protozoários. Os autores observaram principalmente atividade antifúngica, antibacteriana (*M. tuberculosis* H37Rv) e antimalária. Todos os compostos testados também foram capazes de inibir de forma significativa o crescimento de cepas Gram positivas (*Bacillus subtilis* e *Clostridium tetani*) e Gram negativas (*Salmonella typhi* e *Escherichia coli*) em comparação com o controle positivo, ampicilina.

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. Tais observações corroboram também o presente trabalho, o qual houve a utilização do reagente o 2-clorobenzaldeído.

Essa modificação, levando em consideração estudos de nível clínico, como absorção pelo trato gastrointestinal, poderia gerar diferenças entre os dois reagentes, uma vez que cadeias carbônicas aumentam a lipossolubilidade do produto (CHEN *et al.*, 2020) e afetam a absorção em nível de membrana.

### 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).

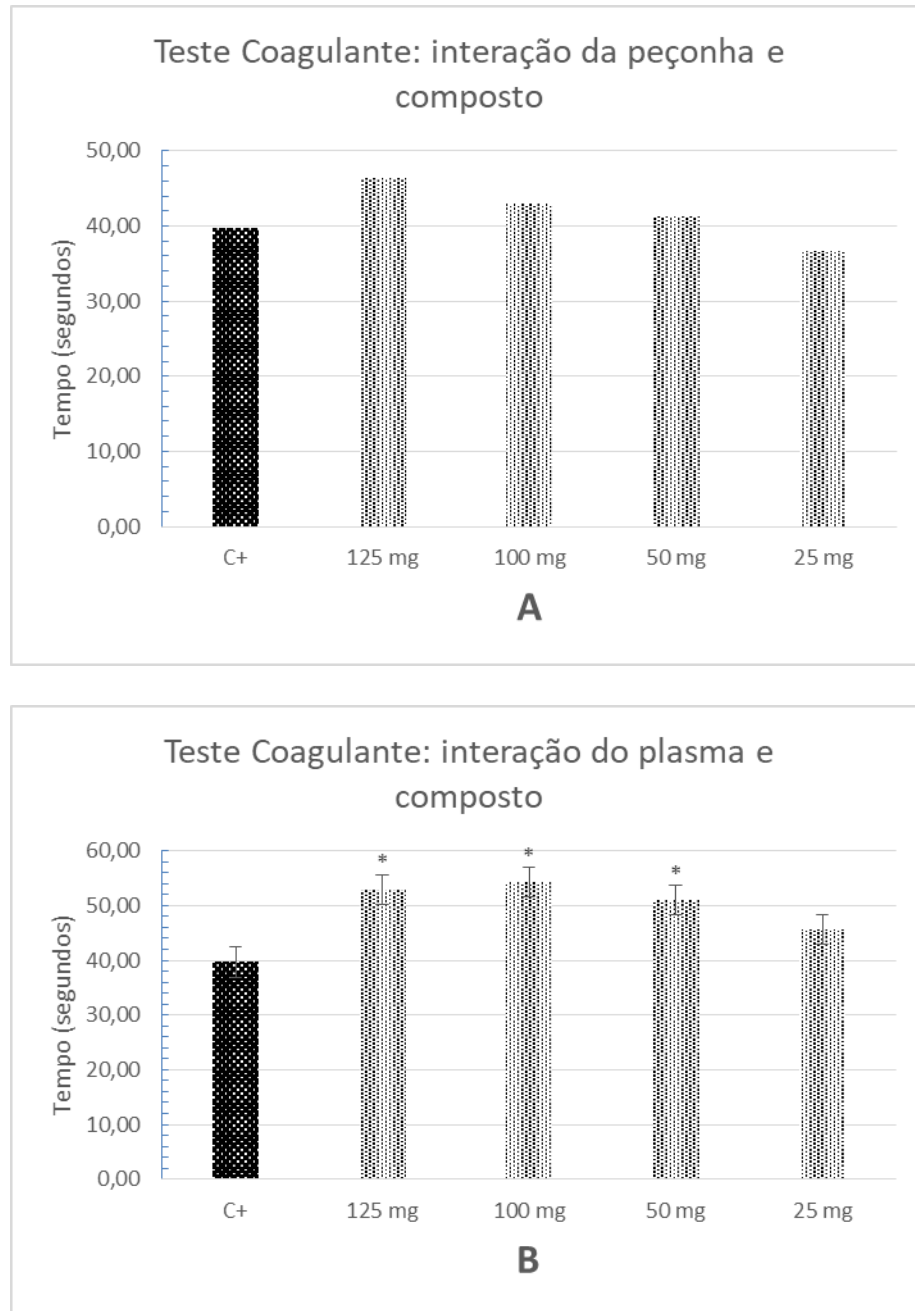
No entanto, quando a molécula é incubada previamente com o plasma humano e em seguida é aplicada a peçonha de *B. moojeni* para induzir a atividade coagulante, observa-se um aumento no tempo de coagulação para as doses de 125, 100 e 50 mg ( $p < 0,05$ ). O controle positivo induziu coagulação em aproximadamente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

Dessa forma, é importante salientar que o composto não apresenta atividade coagulante, ou seja, não induz a formação de coágulo. Porém, ele interfere de forma significativa na ação de proteases coagulantes sobre fatores da cascata de coagulação, prolongando o tempo para a formação do coágulo. 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 isquemia cerebral. Tais distúrbios são caracterizados pela formação de coágulos sanguíneos. Anticoagulantes como heparina ou varfarina e, mais recentemente, inibidores diretos de trombina (visam a formação de fibrina), atuam principalmente em condições que envolvem coágulos venosos em trombose profunda e embolia pulmonar. Eles também são usados em pessoas com fibrilação atrial ou isquemia transitória com intuito de prevenir derrames isquêmicos (ADCOCK; GOSSELIN, 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.

**Figura 2.** (A) Efeitos sobre a coagulação de plasma humano citratado da molécula sintetizada 4-(2-cloro-fenil)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3- ácido carboxílico etil éster, 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-cloro-fenil)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3- ácido carboxílico etil éster, 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 ( $p < 0,05$ ).



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 comprovaram a atividade de forma significativa. Em comparação com o trabalho atual, a molécula embora obtida por meio de síntese orgânica, é baseada em alcalóides de origem natural.

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

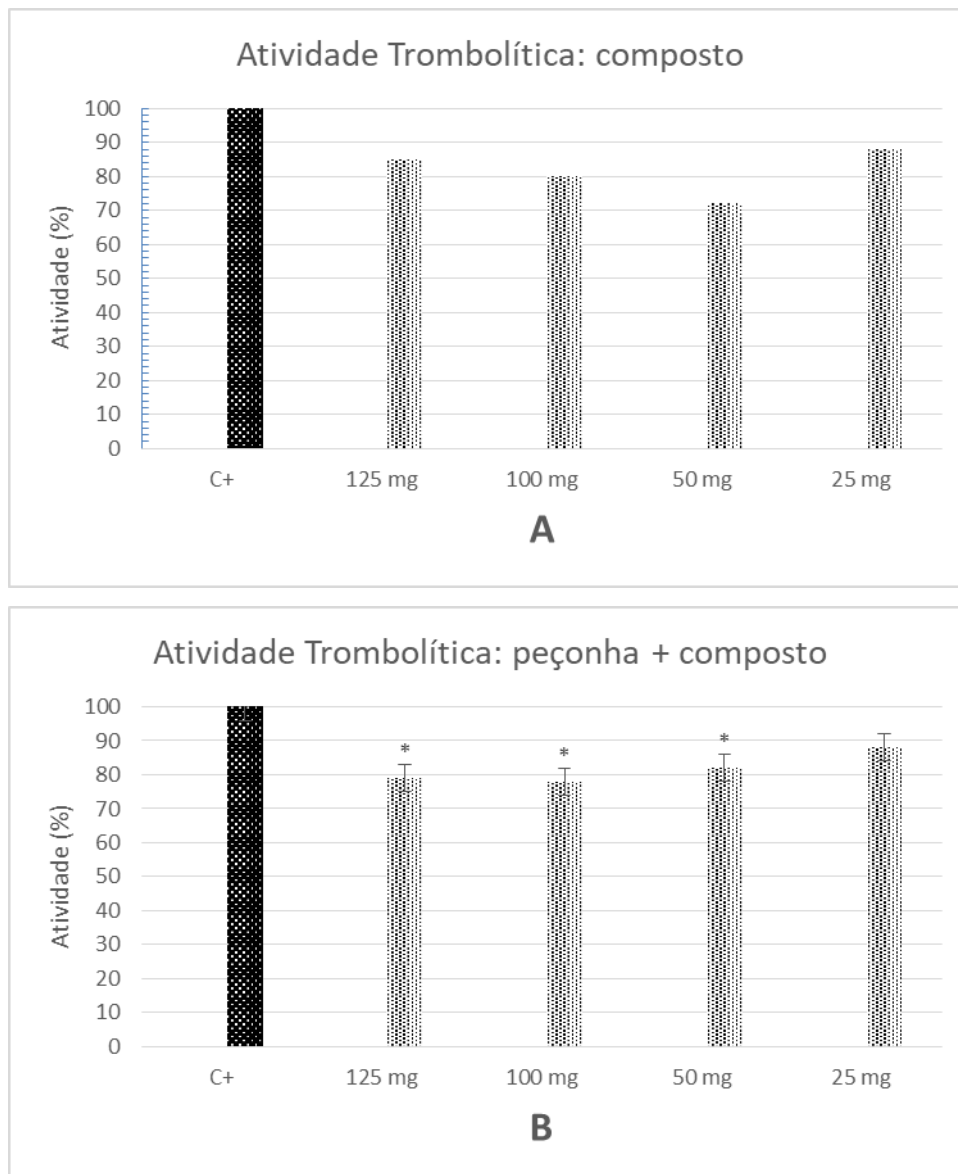
A molécula sintetizada, nas doses avaliadas, não apresentou diferenças estatísticas significantes quando comparada ao controle positivo (*Bothrops moojeni* - 20 $\mu$ g) ( $p < 0,05$ ). Entretanto, ao considerarmos uma tendência estatística ( $p < 0,10$ ), na dose de 50 mg observa-se uma atividade reduzida (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, e sabe-se que a formação de trombos endógenos nesses vasos é uma das principais causas de morte na atualidade. Desta forma, 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 sua ação trombolítica. 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, enoxaparina e compósitos à base de ácido poliacrílico. Assim, tais compostos foram caracterizados como altamente trombolíticos.

**Figura 3.** (A) Atividade sobre trombos sanguíneos humanos exercida pela molécula sintetizada 4-(2-cloro-fenil)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3- ácido carboxílico etil éster. (B) Avaliação da atividade trombolítica induzida por peçonha de *Bothrops moojeni* (20µg) após incubação com a molécula sintetizada 4-(2-cloro-fenil)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3- ácido carboxílico etil éster. Controle positivo (C+): *Bothrops moojeni* (20 µg) = 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 significativo – difere do controle positivo ( $p < 0,05$ ).



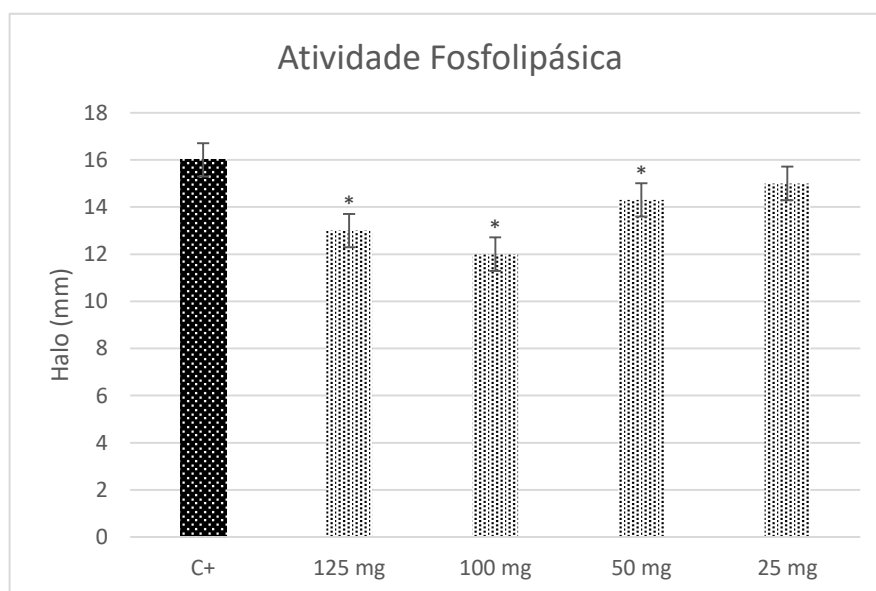
Dessa forma, pode-se inferir com base nos resultados apresentados no presente trabalho, que o composto sintetizado possui características trombolíticas promissoras. Além

disso, existe ainda um efeito protetor sobre os substratos de origem humana contra enzimas presentes na peçonha (por exemplo: 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 que 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-cloro-fenil)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3- ácido carboxílico etil éster 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 que atuam liberando lisofosfolipídios e ácidos graxos livres por meio da hidrólise dos glicerofosfolipídios de membrana na posição sn-2. Isto causa desestabilização da membrana celular, permitindo o influxo descontrolado de cálcio e sódio e 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 (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 de 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*, o qual 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.

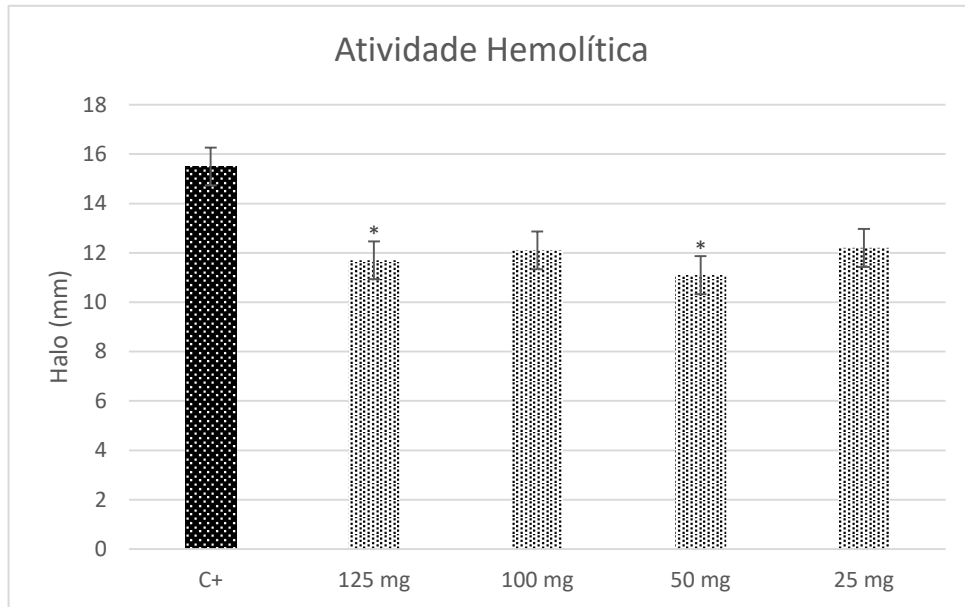
Moreira *et al.* (2020), estudando extratos alcalóides provenientes do mel contra a ação inflamatória provocada pelo óxido nítrico (NO) produzido por células de defesa, demonstraram que estes extratos reduziram os níveis de NO em 30% na concentração mais alta testada. Tais dados corroboram o presente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

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

A molécula sintetizada não teve efeito citotóxico sobre eritrócitos humanos, nas doses avaliadas (dados não mostrados).

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* - 20µg), 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-cloro-fenil)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3- ácido 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 25 mg, previamente incubado com a peçonha. Dados representam a média e o desvio padrão de triplicatas. \*Estatisticamente significativa – 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 outras células, o que as tornam suficientes para serem considerados um modelo representativo das demais membranas (COLINA *et al.*, 2019b). Com o objetivo de determinar o papel protetor do ácido cafeico (ácido fenólico) na lise de eritrócitos humanos provocada pelo ácido hipocloroso (HClO), um conhecido e potente oxidante natural, Colina *et al.* (2019a) 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. A redução foi de até 45% da hemólise na maior concentração testada, comprovando assim a ação protetora sobre membranas e a atividade anti-citotóxica. Os mesmos autores relataram que o ácido cafeico não induziu hemólise quando colocado em contato com as hemácias sem a presença do indutor, o que corrobora os resultados para o composto avaliado no presente trabalho.



A diosmina é um exemplo de molécula glicosídica natural de flavona encontrada em diversas frutas cítricas. Ela é uma substância conhecida que age sobre as veias do sistema circulatório, diminuindo a dificuldade de circulação do sangue e melhorando o tônus venoso. Na microcirculação esse composto normaliza a permeabilidade e reforça a resistência dos vasos capilares, diminuindo o edema de origem venosa. Porém, apesar do seu amplo potencial terapêutico, a diosmina é caracterizada por uma baixa solubilidade em água e na maioria dos solventes orgânicos, tendo uma baixa disponibilidade sistêmica e 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. Como pode ser observado nos resultados apresentados, a molécula 4-(2-cloro-fenil)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3- ácido carboxílico etil éster possui efeitos protetivos, 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.

#### **4 CONCLUSÃO**

O derivado de polihidroquinolina 4-(2-cloro-fenil)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3- ácido carboxílico etil éster foi sintetizado dentro dos padrões da química verde, não utilizando solventes ou catalisadores. A avaliação *in vitro* 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 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.

#### **5 AGRADECIMENTOS**

Os autores gostariam de agradecer o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), além da Universidade Federal de Lavras (UFLA) pelo apoio prestado. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

## REFERÊNCIAS

- 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]<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>>.

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, W. *et al.* **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. Enzymatic labelling of snake venom phospholipase A 2 toxins. **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-inflammatory 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.

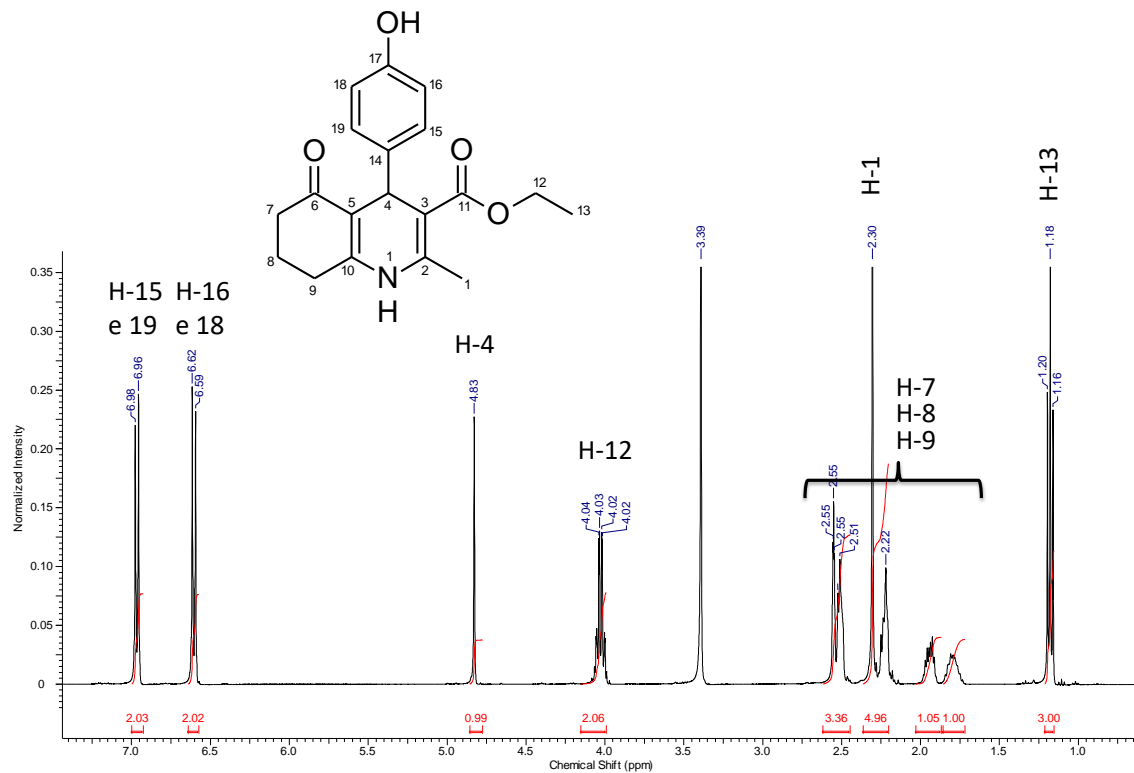
PAIDEPALA, H. *et al.* Catalyst-free efficient synthesis of polyhydroquinolines using polyethylene glycol as a solvent and evaluation of their cytotoxicity. **Medicinal Chemistry Research**, v. 23, n. 2, p. 1031–1036, 2014.

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

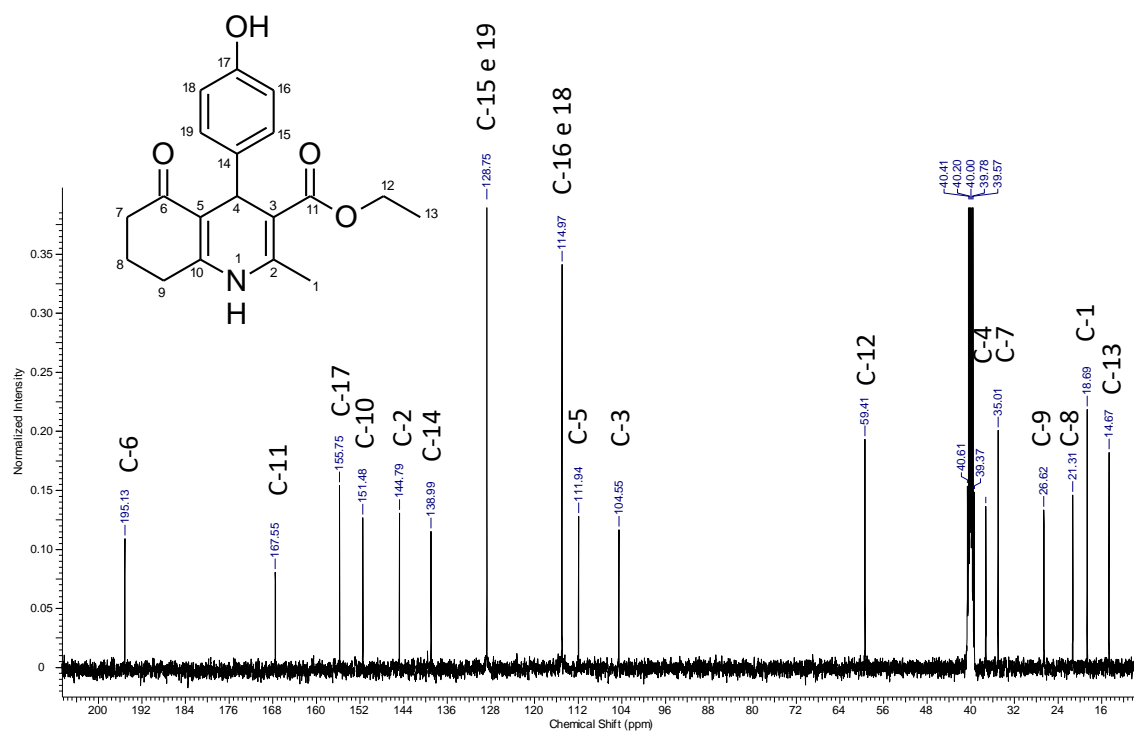
- PRECIADO, L. *et al.* Characterization of the most promising fraction of *Swietenia macrophylla* active against myotoxic phospholipases A2: Identification of catechin as one of the active compounds. **Vitae**, v. 23, n. 2, p. 124–133, 2016.
- REDDY, C. S.; RAGHU, M. Facile ZrCl<sub>4</sub> promoted 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>>.

## APÊNDICE A - ESPECTROS DE RMN E IV

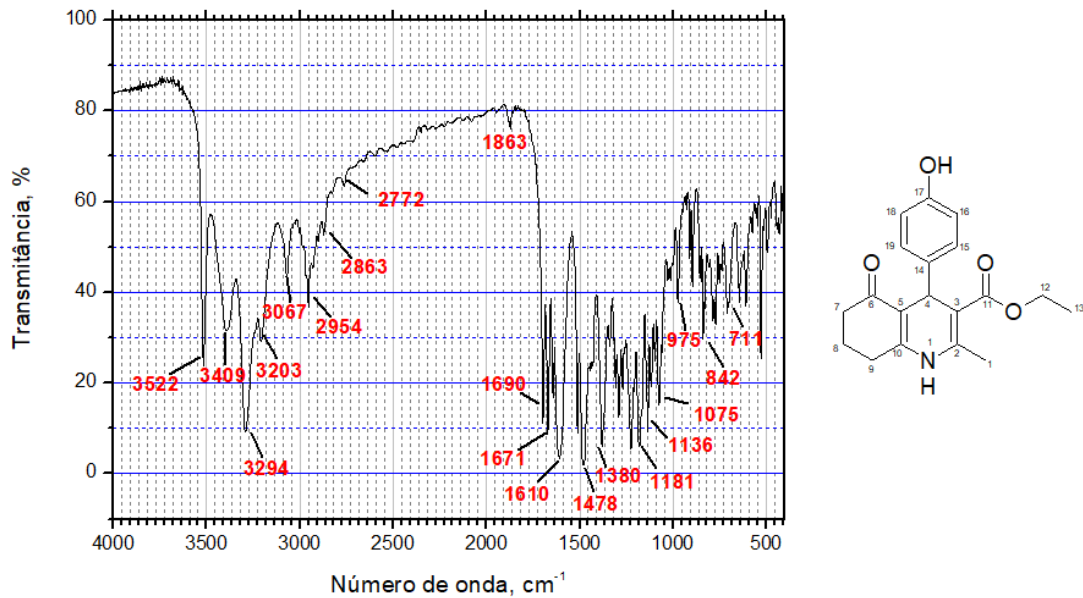
**FIGURA A1** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz) de 4-(4-Hidroxi-fenil)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3-ácido carboxílico etil éster.  $\text{CDCl}_3-d_7$ .



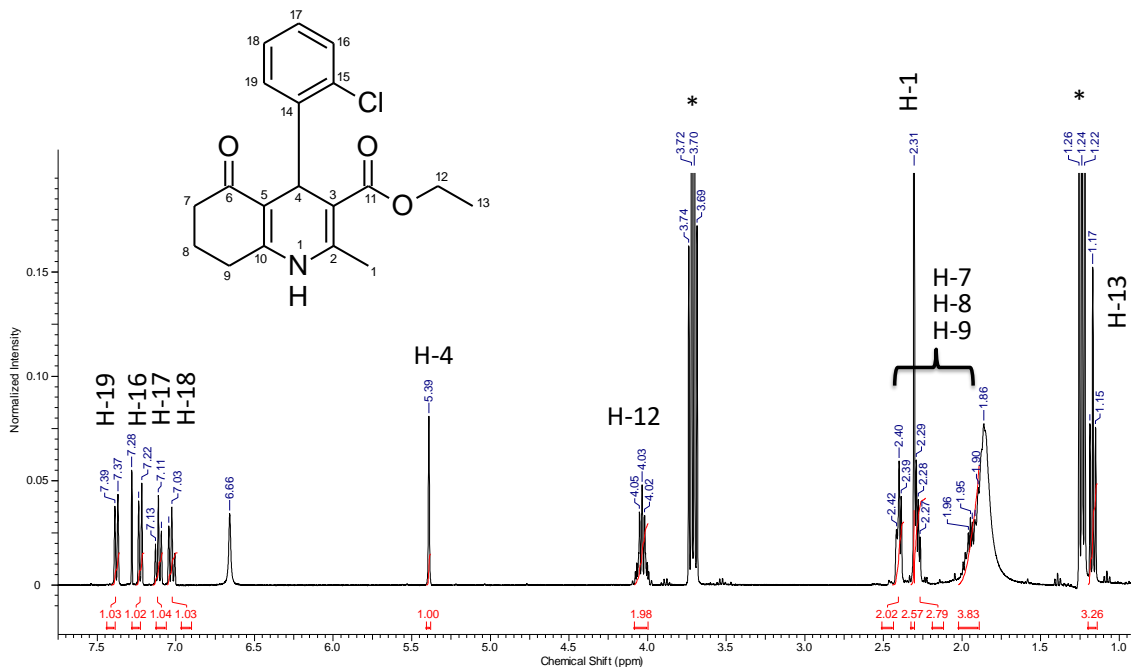
**FIGURA A2** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de 4-(4-Hidroxi-fenil)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3-ácido carboxílico etil éster.  $\text{CDCl}_3-d_7$ .



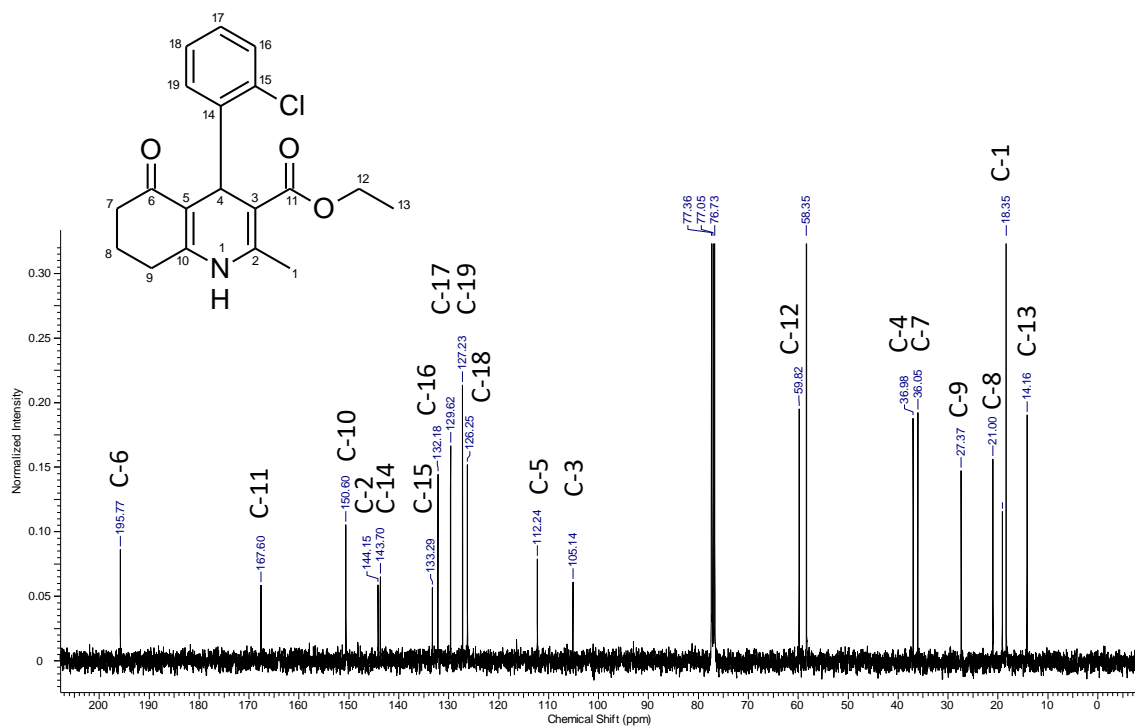
**FIGURA A3** – Espectro de IV de 4-(4-Hidroxi-fenil)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3-ácido carboxílico etil éster.



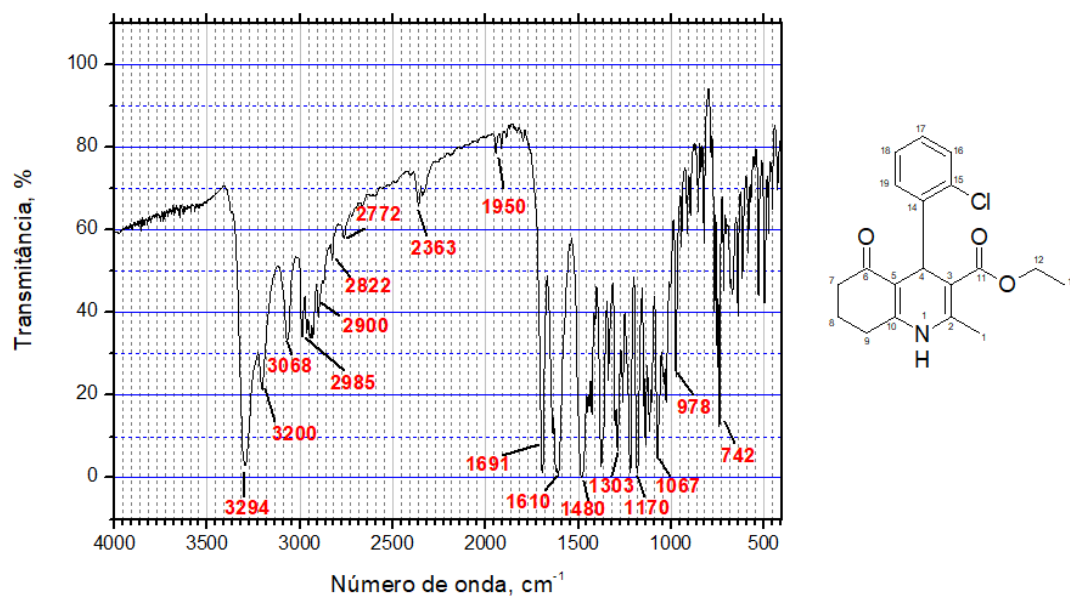
**FIGURA A4** – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (600 MHz) de 4-(2-cloro-fenil)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3-ácido carboxílico etil éster. CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub>. \* - Contaminação da amostra com etanol da lavagem dos tubos de RMN ou do processo de recristalização.



**FIGURA A5** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de 4-(2-cloro-fenil)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3-ácido carboxílico etil éster.  $\text{CDCl}_3-d_1$ .



**FIGURA A6** – Espectro de IV de 4-(2-cloro-fenil)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3-ácido carboxílico etil éster.





**APÊNDICE B – ARTIGO 3****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  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ - 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 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 concentrations 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  $\mu\text{L}$ ) 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 $\mu\text{g}$  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  $\mu\text{L}$  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 $\mu\text{g}$ ) venom for 30 minutes at 37°C to assess their activity on thrombolytic proteases. 30  $\mu\text{L}$  of phosphate-buffered saline (PBS) was used as the negative control, which corresponds to the same volume as the treatments. *Bothrops moojeni* (20 $\mu\text{g}$ ) 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 (20µg), 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).

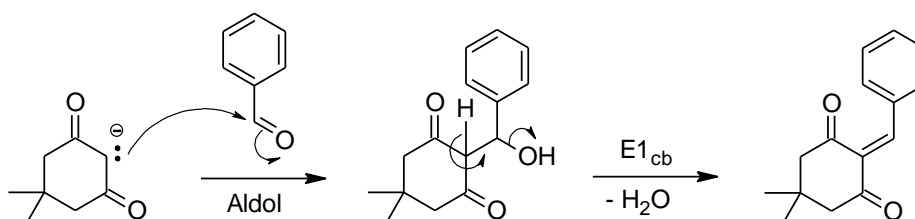
### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 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 (2 mmol), 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.

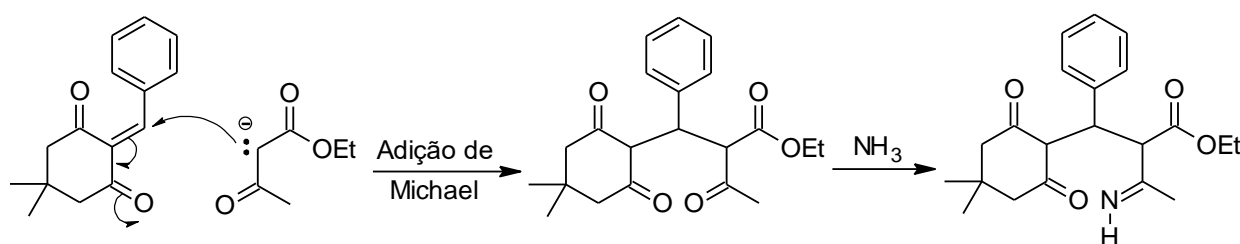


**Figure 1.** Aldol condensation between dimedone and benzaldehyde.



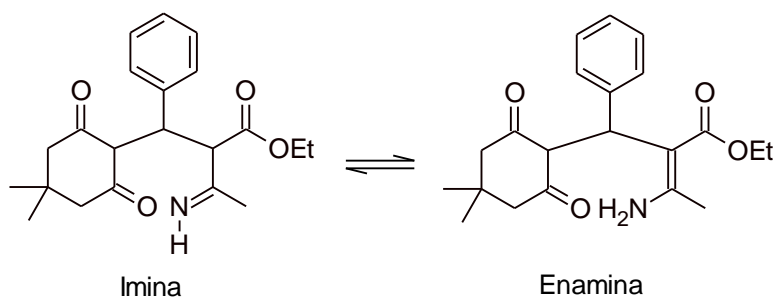
Since the electrons of the double bond can perform resonance with the carbonyl groups, the  $\beta$ -carbon gets a positive charge density and becomes an electrophilic center. Another enolate ion, formed from ethyl acetoacetate, reacts with the compound previously formed by a Michael addition. After 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.



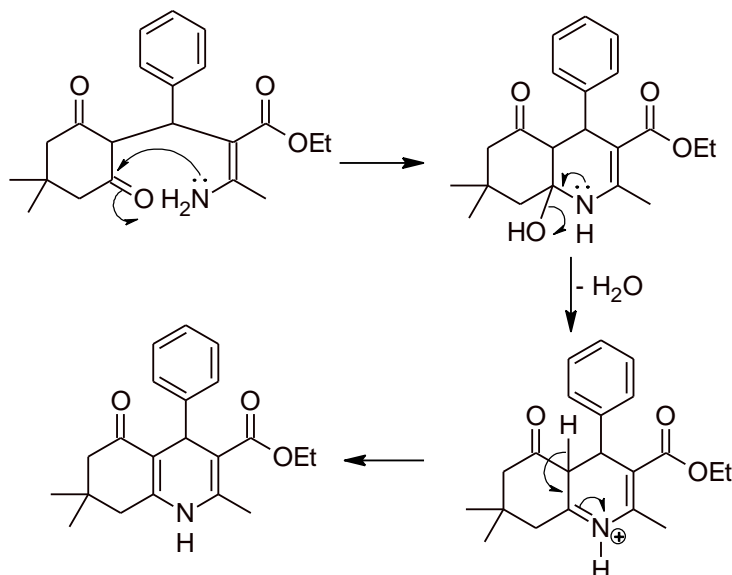
**Figure 2.** Michael addition between ethyl acetoacetate and the product of the aldol condensation, followed by imine formation.

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.

<sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>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 <sup>1</sup>H-NMR spectrum shows resonances in  $\delta_H$  5.38 (H4, 1H, s), 4.04 (H12, 2H, q,  $^3J_{H12-H13} = 7.0$  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					
(Colony Forming Units, CFU)					
Time (h)	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.

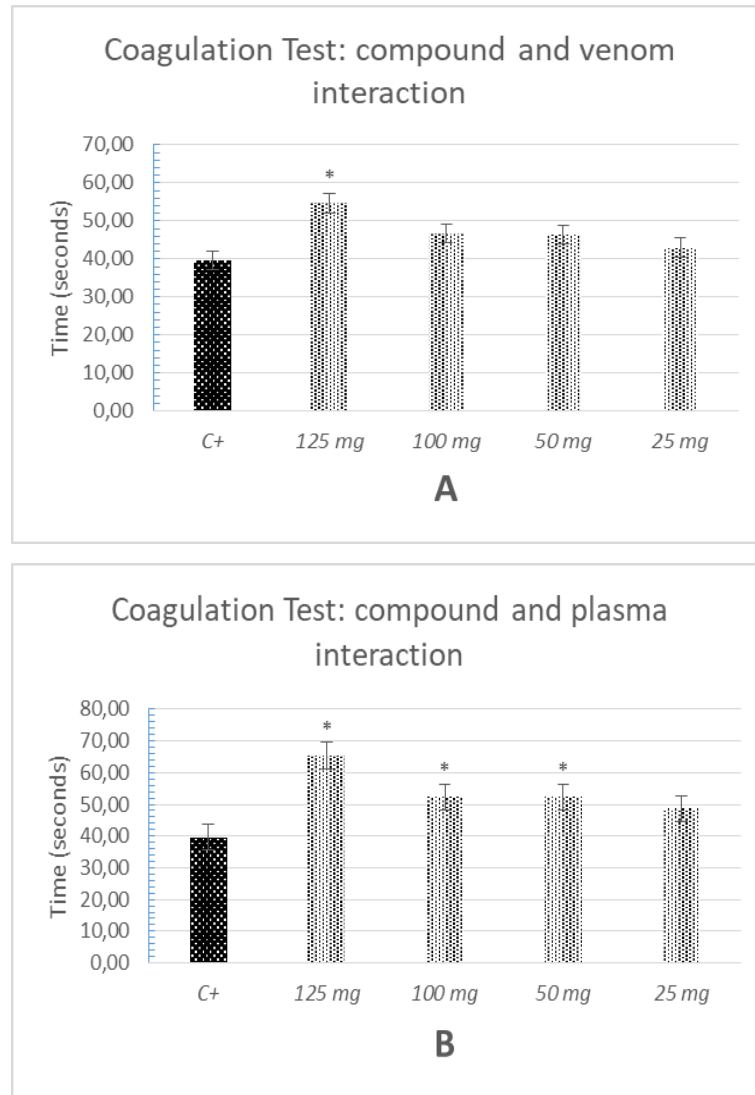
The synthesized molecule proves to be more efficient against Gram-negative bacteria, which are more challenging to treat (JUBEH; BREIJYEH; KARAMAN, 2020). Thus, it is essential to study the class of polyhydroquinolines and their various biological activities.

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 (40µg), 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  $\mu$ g). 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  $\mu$ g). 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).

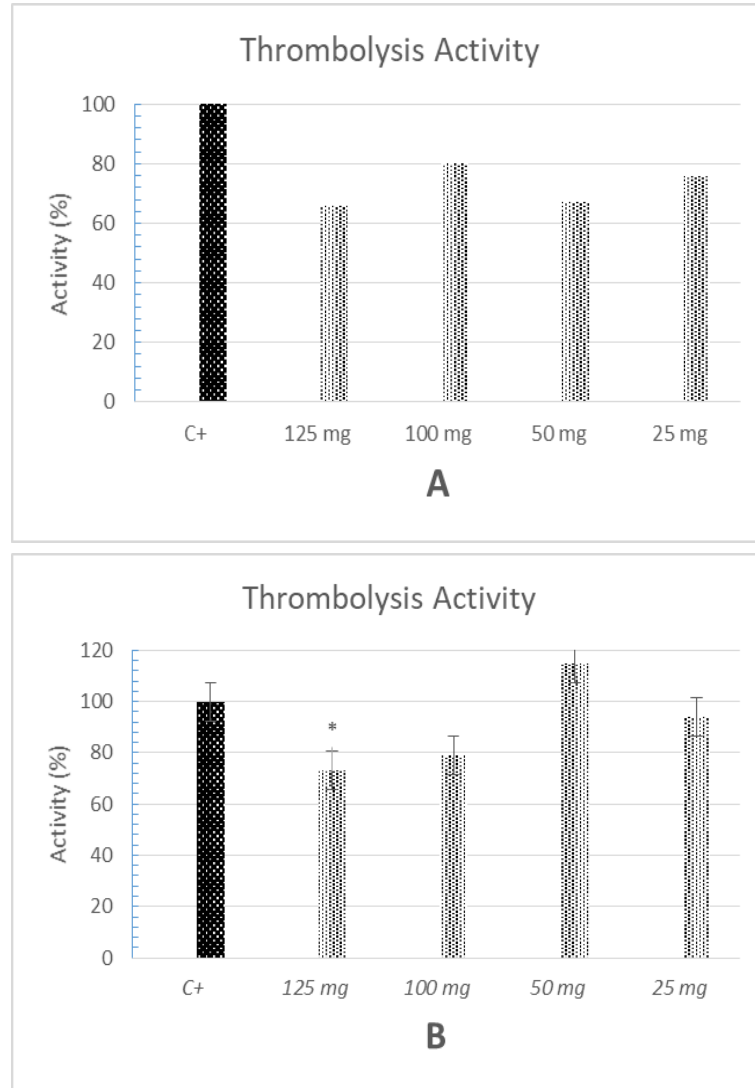
Anticoagulants are used for prophylaxis (preventive healthcare) and treatment of thromboembolic disorders, such as deep vein thrombosis (DVT), pulmonary and systemic embolism, and cerebral ischemia. These disorders are characterized by the formation of blood clots in the vasculature. Anticoagulants that 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).

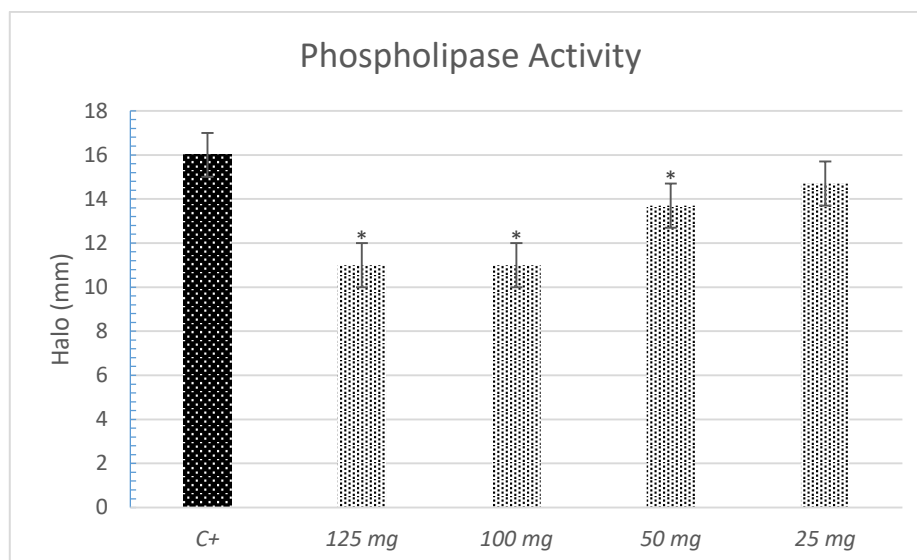
Silva *et al.* (2018) tested the thrombolytic activity of the fibrinolytic enzyme purified from *Chlorella vulgaris*. They found an estimated lysis rate of 25.6% after 90 minutes of reaction, while the negative and positive controls showed 3.5% and 30%, respectively. Drozdov *et al.* (2020) investigated 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.

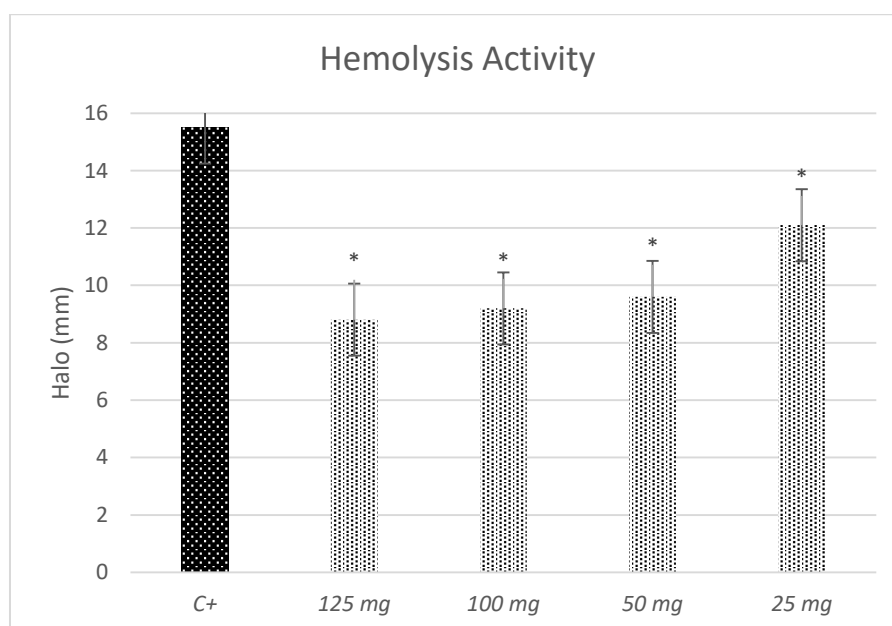
Kashid *et al.* (2020) tested some compounds derived from 2,5-disubstituted-1,3,4-oxadiazole, which contains a heterocyclic ring structure. The anti-inflammatory activity screening showed promising results compared to diclofenac sodium, used as a positive control.

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  $\mu\text{M}$ ) 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 $\mu\text{g}$ ) 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 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).

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 µM 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 *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.* 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. **Toxicol**, v. 60, n. 5, p. 943–953, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicol.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>>.

**APÊNDICE C – ARTIGO 4****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](mailto: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 concentrações que variavam de 25 a 500 mg/mL. 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.

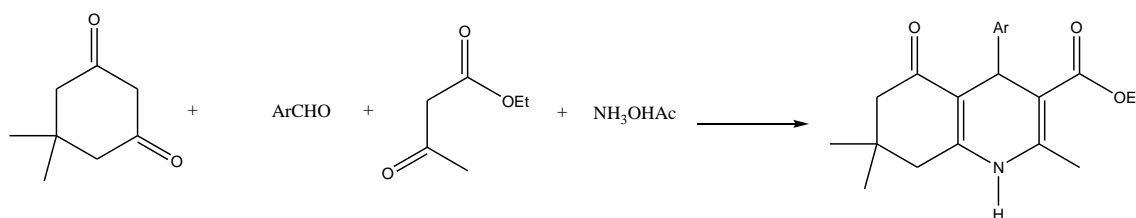
**Palavras chave:** Síntese Multicomponente, Química Verde, polihidroquinolinas, anti-citotóxico, trombolítico, anti-coagulante, anti-inflamatório.

## INTRODUÇÃO

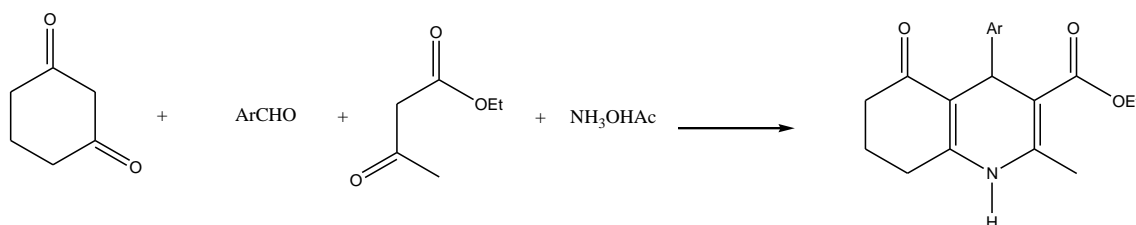
As reações multicomponentes (MCRs) permitem a síntese de diversas moléculas em uma única etapa e ficaram conhecidas como uma ferramenta eficiente e poderosa para obtenção de moléculas orgânicas complexas, além de ser uma maneira rápida, sem produção de intermediários reacionais (DEKAMIN *et al.*, 2018;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

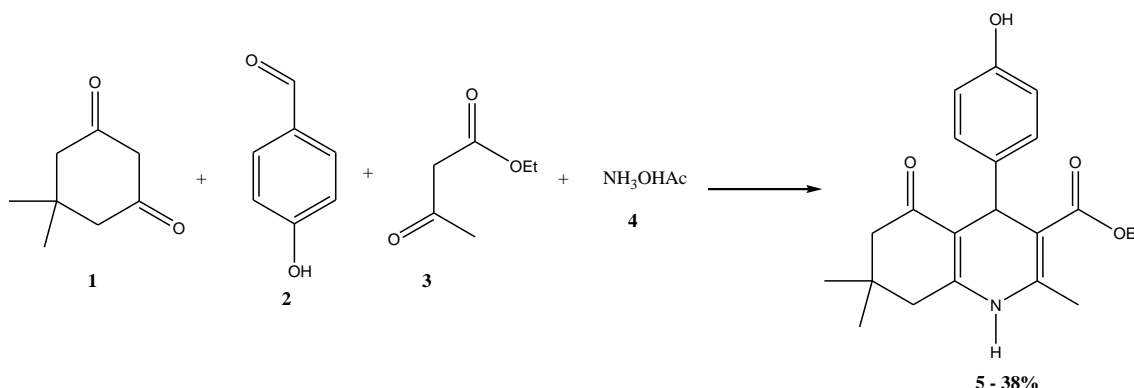
O objetivo do presente trabalho foi obter um derivado de polihidroquinolina através de MRCs, sem a utilização de catalisadores, nem tão pouco de solventes, à temperatura ambiente, com um rendimento satisfatório, por meio de um procedimento que seja

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 (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 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 tubos de 1,5 mL, 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  $\mu$ L), 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  $\mu$ g) 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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{g}$ ) PBS (30  $\mu\text{L}$ ), 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* (20 $\mu\text{g}$ ) 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  $\text{CaCl}_2$  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 7,4). 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* (20 $\mu\text{g}$ ) 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 7,4), 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  $860\text{ cm}^{-1}$  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 se mostrou 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-hexahidro-quinolina-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-hexahidro-quinolina-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 polihidroquinolinos incorporados com imidazopirazol e demonstraram ação antibacteriana, antifúngica, contra *Mycobacterium 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**

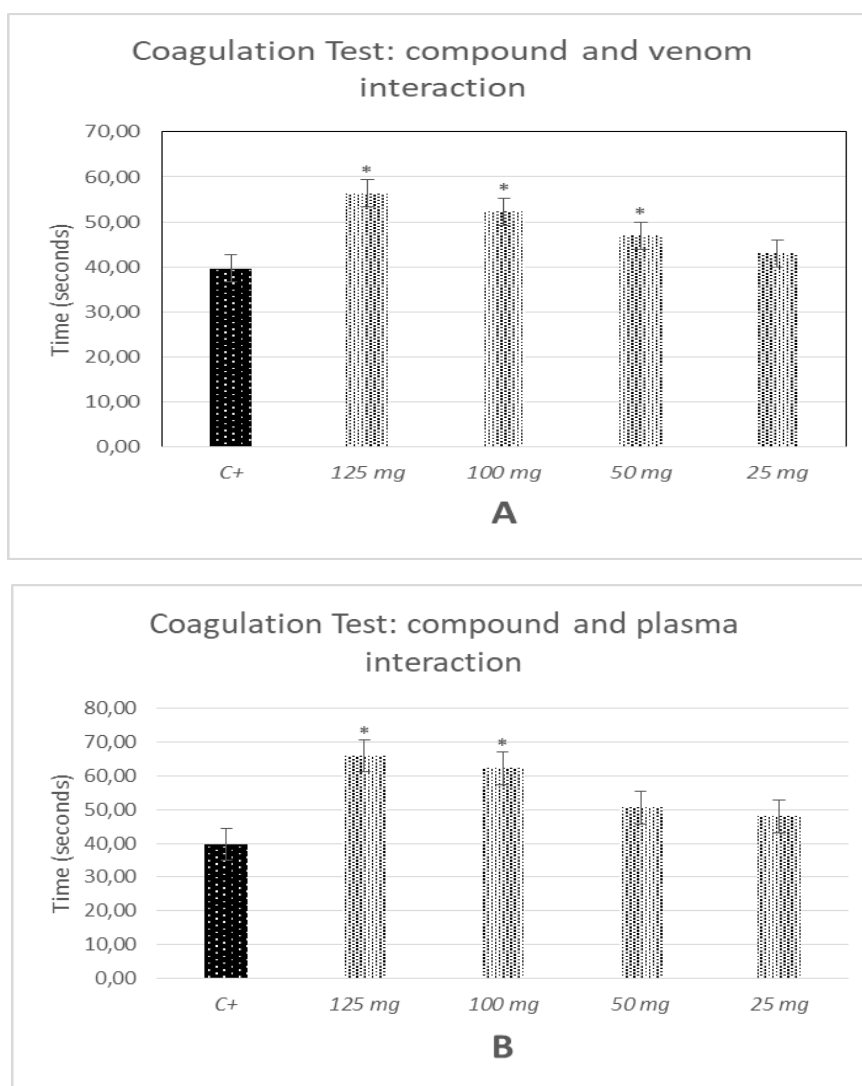
A molécula isoladamente não induziu coagulação ao plasma humano citratado (dados não mostrados). Entretanto, quando incubada previamente com a peçonha de *Bothrops moojeni* (40µg), a molécula sintetizada foi capaz de prolongar o tempo de coagulação do

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* 40 $\mu$ g), 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, 2020), 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 e 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.

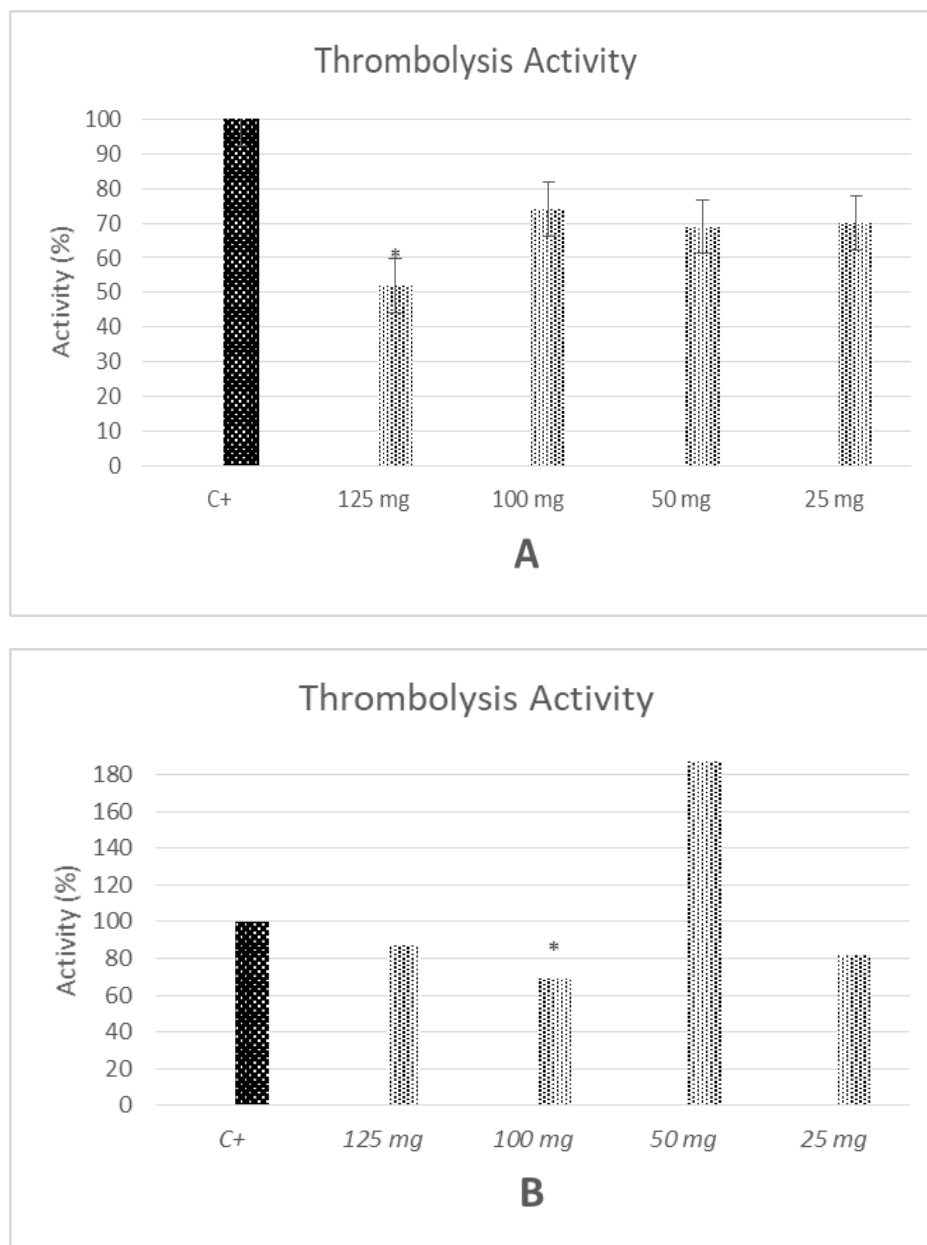


**Figura 3.** (A) Efeitos da molécula sintetizada 4-(4-hidroxifenil)-2,7,7-trimetil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-acido carboxílico etil éster sobre a coagulação de plasma humano citratado induzida por peçonha de *Bothrops moojeni*. Controle positivo (C+): peçonha de *Bothrops moojeni* (40 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 significante – 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-ácido 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.

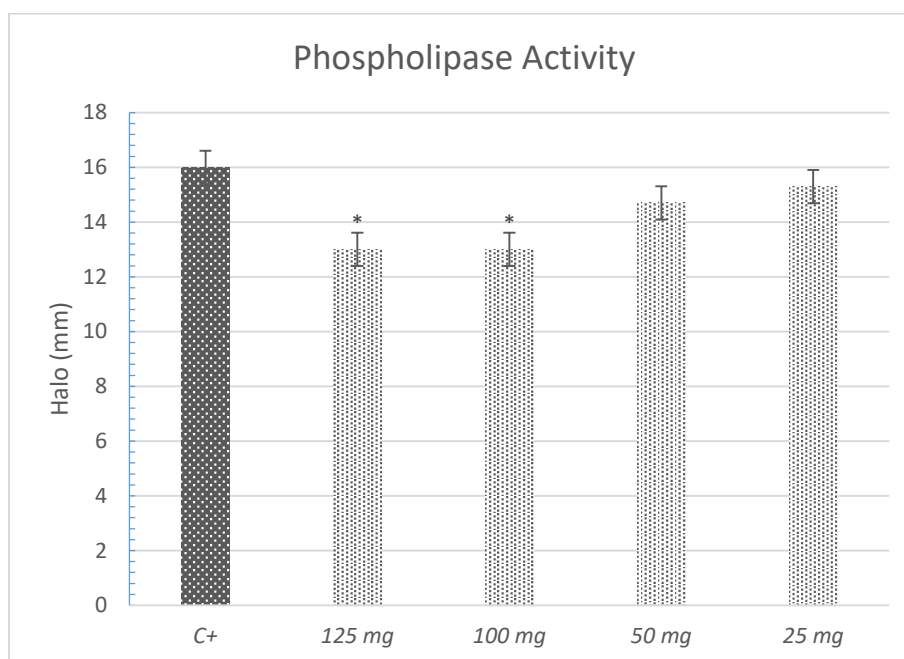
Essa mesma molécula, quando testada sobre a atividade trombolítica induzida por proteases da peçonha de *Bothrops moojeni* (20 $\mu$ g), apresentou resultados diferentes. Apenas a dose de 100 mg foi estatisticamente diferente do controle positivo ( $p < 0,05$ ), reduzindo o efeito da peçonha para 69% (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. (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. \*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 significante – difere do controle positivo ( $p < 0,05$ ).

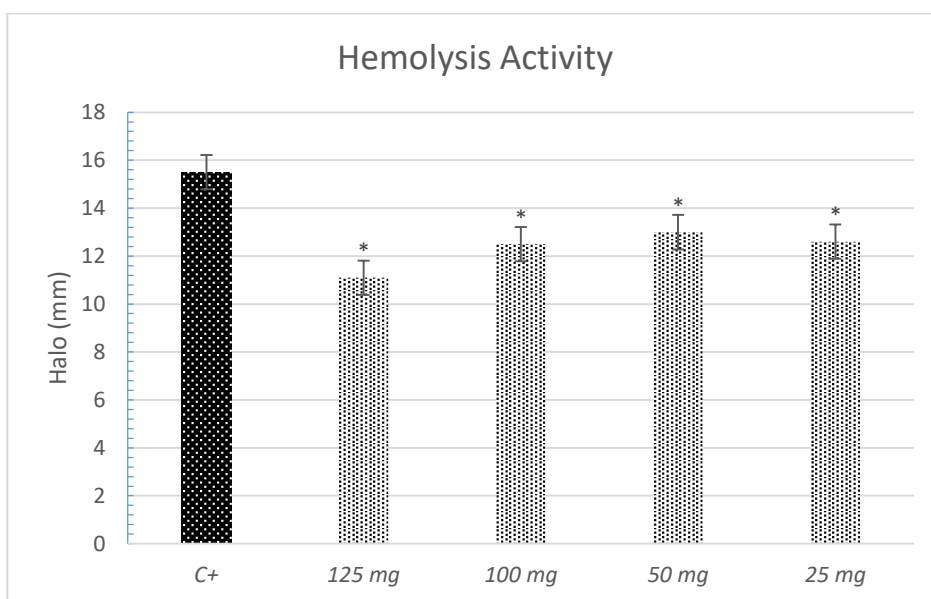
Sintetizar moléculas baseadas em compostos presentes na natureza que já possuem suas atividades descritas é importante no desenvolvimento de possíveis novos fármacos. Na natureza existem diversos compostos, que assim como o deste trabalho, possuem a presença de nitrogênio (e.g., alcaloides) e apresentam 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 significante – 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 catalisadores, 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.

## REFERÊNCIAS

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 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 Inflammatory Response. **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.