



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS



MARIZA SEVERINA DE LIMA SILVA

**OBTENÇÃO, SEMISSÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA
DA BIFLORINA E DOS TRÊS NOVOS DERIVADOS N-ACILIDRAZONAS**

Recife

2019

MARIZA SEVERINA DE LIMA SILVA

**OBTENÇÃO, SEMISSÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA
DA BIFLORINA E DOS TRÊS NOVOS DERIVADOS N-ACILIDRAZONAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e medicamentos

Orientador: Prof. Dr. Alexandre José da Silva Góes

Recife

2019

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária

Bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4-1790

A586o Silva, Mariza Severina de Lima.
Obtenção, semissíntese, caracterização e avaliação biológica da biflorina e dos três novos derivados *N*-acilidrazonas/ Mariza Severina de Lima Silva. – 2019.
141 f.: il.; tab.

Orientador: Alexandre José da Silva Góes.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2019.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Síntese. 2. Compostos Orgânicos. 3. Citocinas. 4. Antimicrobiano. I. Góes, Alexandre José da Silva (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2019-097)

MARIZA SEVERINA DE LIMA SILVA

**OBTENÇÃO, SEMISSÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA
DA BIFLORINA E DOS TRÊS NOVOS DERIVADOS N-ACILIDRAZONAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Universidade Federal de
Pernambuco, para a obtenção do Título de
Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 28/02/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alexandre José da Silva Góes (Orientador/Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof. Dr. Mário Luiz Araújo de Almeida Vasconcellos (Examinador externo)
Universidade Federal da Paraíba– UFPB

Prof. Dr. Thiago Mendonça de Aquino (Examinador externo)
Universidade Federal de Alagoas – UFAL

Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva (Examinadora interna)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Dedico esse trabalho, principalmente à minha mãe (*in memoriam*) por ser meu maior exemplo de vida.

AGRADECIMENTOS

Poder chegar até aqui é um privilégio e devo imensamente a pessoas que, de alguma forma, contribuíram para que eu concluísse esse trabalho. Portanto, primeiramente agradeço ao meu Deus pela vida e oportunidades concedidas, sem Ele não teria conseguido!

Ao meu orientador Prof. Alexandre Góes pelo acolhimento em seu laboratório, pela grande contribuição em despertar o meu interesse pela ciência, pelos ensinamentos, pela orientação constante e pelo apoio incondicional.

Ao professor Antônio José Alvespor se dispor a buscar e registrar meu material para trabalho, muito obrigada.

À professora Cristiane Moutinho por disponibilizar o seu tempo para realização do experimento que foi de grande contribuição para meu trabalho.

À professora Gláucia Manoella e sua aluna Amanda Mariapor terem realizado os testes antimicrobianos.

À Professora Teresinha Gonçalves e sua aluna Carolpor realizarem os testes de citotoxicidade.

Ao professor Thiago Aquinopor contribuir com as análises espectroscópicas.

Agradeço a minha tiaCecília Borba por sempre me incentivar a não desistir, desde a seleção para o mestrado até a finalização do mesmo.

À minha prima Edna Borba, por seu apoio incessante e compreensão em todos os momentos.

As minhas primas Severina e Milena Guedes, pelo apoio de sempre, desde o vestibular até a conclusão deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Aos meus pastores Luís Carlos e Elisângela, que são como pais em minha vida e me ensinam a ser uma pessoa melhor a cada dia. Obrigada pelo amor doado nos momentos que mais precisei.

À minha amiga, irmã e líder Érika Silva que não cansou de me incentivar e o mais importante, não cessou suas orações por mim. Meu muito obrigada.

À Judite minha eterna professora que nunca desistiu de mim e foi meu maior suporte quando mais precisei, muito obrigada.

A Leonardo Moreira por ser tão presente em cada passo dado e incentivo constante.

À minha família paterna pela atenção e compreensão por minha ausência, mas que em todo tempo me deram apoio.

Aos meus amigos do LASSINT, Jefferson Albuquerque, Laís Dantas e Kaio Freitas, pelos momentos de alegria e ajuda durante a realização deste trabalho.

Aos meus queridos amigos que em todo o tempo foram essenciais, Ewellin Silva, Moana Santiago, George Luiz, Rizoaldo Barbosa, Adriana Araújo, Adriana Maria.

À FACEPE pelo suporte financeiro.

“Devemos acreditar que temos vocação para alguma coisa,
e que essa coisa deve, a qualquer custo ser alcançada” (CURIE, 1975).

RESUMO

Nos últimos anos, houve um aumento no interesse em fitoquímicos com potencial efeito anti-inflamatório, uma vez que são vistos como agentes terapêuticos promissores devido ao seu impacto sobre os estados de saúde humana e prevenção de doenças. Devido a ampla diversidade estrutural e funcional as quinonas são as pioneiras nos trabalhos acadêmicos e por isso tem despertado grande interesse na comunidade científica, tanto na pesquisa voltada para o interesse farmacológico quanto para a síntese de novas substâncias com seus efeitos biológicos. Na busca por novos compostos ativos o presente trabalho visa o estudo do efeito imunomodulador da biflorina em esplenócitos de camundongos Balb/c, a otimização da obtenção desse composto por um novo método de extração e purificação simultânea, a realização de semissínteses de novos derivados hidrazonas a partir da biflorina, assim como a atividades antimicrobianas e citotóxicas desses compostos. Para a obtenção da biflorina pura, foi aplicado nesse trabalho um novo método de extração e purificação simultânea (utilizando o aparelho Góes), com um sistema hexano/acetato de etila (8:2) como eluente, fornecendo 0,6 % de rendimento. Foram realizadas semissínteses de três novas *N*- acilidrazonas através de reações a partir da biflorina com diferentes acilidrazinas, fornecendo rendimento entre 57-65%. Os resultados indicaram que o novo método extrativo apresentou o maior rendimento em comparação com os relatados na literatura para a biflorina. As reações empregadas para a obtenção dos derivados *N*-acilidrazonas forneceram facilmente os produtos em rendimentos significativos. Os compostos **1a-c** foram caracterizados por espectroscopia de RMN ¹H e RMN ¹³C, espectroscopia de infravermelho (IV) e espectrometria de massas de alta resolução. Nos ensaios biológicos foi avaliada a imunomodulação da biflorina e de seus derivados a atividade antimicrobiana e citotóxica. A avaliação do efeito imunomodulador da biflorina frente a esplenócitos de camundongos Balb/c, mostrou que a biflorina foi capaz de estimular estas células em 48 h de incubação a uma concentração de 6 µg/mL, a produzir citocinas, tais como: TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-6 e IL-17. Os testes de susceptibilidade antimicrobiana por meio do método de difusão em ágar revelaram que o derivado **1b** foi o que apresentou melhor atividade inibitória, com uma CMI 15,62 µg/mL para *S. aureus*02 padrão e 31,25 µg/mL para *S. aureus* 709 resistente. Os ensaios de citotoxicidade (MTT) demonstraram que nenhum dos três derivados (**1a-c**) exibiram citotoxicidade em

concentrações inibitórias promissoras ($IC_{50} < 10 \mu M$), frente as linhagens de células testadas.

Palavras-chave: Síntese. Compostos orgânicos. Citocinas. Antimicrobiano.

ABSTRACT

In recent years there has been an increase in interest in phytochemicals with potential anti-inflammatory effects as they are promising therapeutic agents because of their impact on human health conditions and disease prevention. Due to the wide structural and functional diversity quinones are the pioneers in academic work and therefore have aroused great interest in the scientific community, both in the research focused on the pharmacological interest and in the synthesis of new substances and their biological effects. In the search for new active compounds the present work aims the study of the immunomodulatory effect of biflorin in splenocytes of Balb/c, the optimization of obtaining this compound by a new simultaneous extraction and purification method, the realization of semi-syntheses of new hydrazone derivatives, as well as the antimicrobial and cytotoxic activity of these new compounds. To obtain pure biflorin, a new method of simultaneous extraction and purification was applied in this work (using the Góes apparatus), with a hexane / ethyl acetate system (8:2) as eluent, yielding 0.6% yield. We performed semisynthesis from biflorin and three new *N*-acylhydrazones (**1a-c**) were obtained by reactions with different acylhydrazines, yielding yield between 57-65%. The results indicated that the new extractive method had the highest yield compared to those reported in the literature for biflorin. The reactions employed to obtain the *N*-acylhydrazone derivatives readily provided the products in significant yields. Compounds **1a-c** were characterized by ¹H NMR and ¹³C NMR spectroscopy, infrared (IR) spectroscopy and high-resolution mass spectrometry. In the biological assays the immunomodulation of biflorin and its derivatives was evaluated for antimicrobial and cytotoxic activity. Evaluation of the immunomodulatory effect of biflorin on Balb / c splenocytes showed that biflorin was able to stimulate these cells in 48 h of incubation at a concentration of 6 µg / ml, producing cytokines such as: TNF-α, IFN-γ, IL-2, IL-6 e IL-17. Antimicrobial susceptibility testing by means of the agar diffusion method revealed that derivative **1b** showed the best inhibitory activity, with a MIC of 15.62 µg / mL for standard *S. aureus* 02 and 31.25 µg / mL for *S. aureus* 709 resistant. Cytotoxicity assays (MTT) demonstrated that none of the three derivatives (**1a-c**) exhibited cytotoxicity at promising inhibitory concentrations (IC₅₀ <10 µM) against the tested cell lines.

Keywords: Synthesis.Organic compounds.Cytokines.Antimicrobial.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	<i>Capraria biflora</i> L. (Fonte: Prof. Alexandre Góes)	28
Quadro 1 -	Triagem fitoquímica de extratos hidroalcoólicos das principais partes da <i>C. biflora</i> (AQUINO, 2003)	29
Figura 2 -	Estrutura química dos compostos extraídos do caule da <i>C. biflora</i> (SOUZA <i>et al.</i> ,2012.)	30
Figura 3 -	Estrutura química da biflorina 1 , isolada da raiz da <i>C. biflora</i> L.....	31
Figura 4 -	Ligação de hidrogênio intramolecular formando anel de seis membros dos derivados 4a , b e 5a (SOUZA <i>et al.</i> ,2016)	37
Figura 5 -	Fármacos contendo núcleos imidazólicos	42
Figura 6 -	Estrutura química do fluconazol	43
Figura 7 -	Estruturas químicas dos dois primeiros compostos contendo porção NAH (destacada em vermelho), aprovados para uso clínico. Nitrofurazona 16 e nitrofurantoína 17	45
Figura 8 -	Componentes necessários para a realização do novo método de extração e purificação simultânea.....	55
Figura 9 -	Aparelho Góes. Divisão do corpo da coluna	56
Quadro 2 -	Espécies de bactérias e fungos utilizados nos ensaios de atividade antimicrobiana para os compostos sintetizados	68
Figura 10 -	Triagem fitoquímica da <i>Capraria biflora</i>	71
Figura 11 -	Processo de extração e purificação simultânea da biflorina. (a) gel de sílica. (b) serragem das raízes da <i>C. biflora</i> . (c) Aparelho Góes. (d) Frações coletadas. (e) CCD Hexano/acetato de etila 8:2 (Rf = 0.39). (f) Biflorina pura.....	72
Figura 12 -	Nucleófilos usados na síntese dos derivados <i>N</i> -acilidrazonas 1a-c , a partir da biflorina	72

Figura 13 -	Estrutura química dos derivados hidrazonas. A região de adição nucleofílica, está destacada em vermelho.....	73
Quadro 3 -	Dados reacionais gerais dos derivados <i>N</i> -acilidrazonas 1a-c	75
Figura 14 -	Estrutura química da biflorina, com os carbonos numerados e os respectivos deslocamentos químicos (δ).....	79
Figura 15 -	Espectro ampliado de RMN ^1H da biflorina. Sinais referentes aos hidrogênios 14,15 e 17.....	78
Figura 16 -	Espectro ampliado de RMN ^1H da biflorina. Sinais referentes aos hidrogênios 10, 11 e 16	79
Figura 17 -	Espectro ampliado de RMN ^1H da biflorina. Sinais referentes aos hidrogênios 2,4,5 e 12	79
Figura 18 -	Estrutura química da biflorina, com os carbonos numerados e os respectivos deslocamentos químicos (δ)	80
Figura 19 -	Espectro geral de RMN ^{13}C da biflorina.....	80
Figura 20 -	Espectro de RMN ^{13}C da biflorina.....	81
Figura 21 -	Espectro de RMN ^{13}C da biflorina. Em azul, encontram-se os carbonos presentes na estrutura da biflorina	81
Figura 22 -	Espectro de RMN ^{13}C da biflorina. Em azul, encontram-se os carbonos presentes na estrutura da biflorina	82
Figura 23 -	Espectro de RMN ^{13}C da biflorina	82
Figura 24 -	Espectro de RMN ^{13}C da biflorina	83
Figura 25 -	Espectro de infravermelho da biflorina	83
Figura 26 -	Espectro de massas de alta definição da biflorina	84
Figura 27 -	Estrutura química da biflorina e do derivado 1c , com seus respectivos deslocamentos químicos dos hidrogênios característicos. Em verde, encontram-se os hidrogênios característicos do anel piridina, confirmando a condensação da hidrazida nicotínica.....	85
Figura 28 -	Espectro de RMN ^1H do derivado 1c . Os hidrogênios característicos do anel piridina estão destacados em azul.....	87

Figura 29 -	Estrutura química da biflorina e do derivado 1c , com seus respectivos carbonos e deslocamentos químicos	81
Figura 30 -	Espectro de RMN ¹³ C do derivado 1c com seus carbonos característicos	88
Figura 31 -	Espectro de infravermelho do derivado 1b	91
Figura 32 -	Espectro de infravermelho do derivado 1c	92
Figura 33 -	Espectro total de massas de alta resolução isolado do derivado 1c ...	92
Figura 34 -	Espectro de massas de alta resolução do derivado 1c . [M+H] ⁺ isolado..	93
Figura 35 -	Avaliação da citotoxicidade promovida pela biflorina em esplenócitos de Balb/c em 24 h de cultura. A dose de segurança para usar a biflorina é <12,5 µM.....	94
Figura 36 -	Avaliação da proliferação celular com a biflorina a 6 µg/mL, durante 24 e 48h de incubação.....	94
Figura 37 -	Estudo do efeito imunoestimulador promovido pela biflorina (6 µM) em culturas de esplenócitos de camundongos Balb/c. A biflorina estimulou maior produção de TNF-α (A), IFN-β (B), IL-2 (C), IL-6 (E) e IL-17 (F). Valores similares entre células tratadas com controle e biflorina foram observados para a produção de IL-4 (D).....	95
Figura 38 -	Efeito citotóxico da biflorina e dos derivados 1a-c sobre a linhagem L929 após 72h de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média ± desvio padrão de três experimentos independente em triplicata, analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. *** p< 0,001 em relação ao controle. Ctl: Controle	96
Figura 39 -	Efeito citotóxico da biflorina e dos derivados 1a-c sobre a linhagem NCI-H292após 72h de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média ± desvio padrão de três experimentos independente em triplicata, analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. *** p< 0,001 em relação ao controle. Ctl: Controle	97

Figura 40 -	Efeito citotóxico da biflorina e dos derivados 1a-c , sobre a linhagem P815 após 72h de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média ± desvio padrão de três experimentos independente em triplicata, analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. *** p< 0,001 em relação ao controle. Ctl: Controle.	98
Figura 41 -	Efeito citotóxico da biflorina e dos derivados 1a-c sobre a linhagem HL-60 após 72h de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média ± desvio padrão de três experimentos independente em triplicata, analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. ** p< 0,01 em relação ao controle. Ctl: Controle.....	98
Figura 42 -	Efeito citotóxico da biflorina e dos derivados 1a-c sobre a linhagem MCF-7 após 72h de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média ± desvio padrão de três experimentos independente em triplicata, analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. Ctl: Controle	99
Figura 43 -	Estrutura química do derivado com potencial antibacteriano, tanto para a cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> padrão (02) quanto para a resistente (709)	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores do CMI da biflorina 1 e dos derivados hidrazonas 4a, b e oximas 5a-c em $\mu\text{g} / \text{mL}$ (SOUZA <i>et al.</i> , 2016)	38
Tabela 2 -	Susceptibilidade bacteriana e fungicida da biflorina e suas respectivas CMI (LIMA <i>et al.</i> , 1958)	39
Tabela 3 -	Avaliação da atividade da biflorina frente a fungos dermatófitos, analisando a formação de halos em diferentes concentrações (LYRA JR <i>et al.</i> , 1999)	40
Tabela 4 -	Principais células efetoras e moléculas solúveis da imunidade inata e adaptativa (CRUVINEL <i>et al.</i> , 2010)	47
Tabela 5 -	Dados espectrométricos de RMN ^1H da biflorina e do derivado 1c . Em vermelho está destacado os prótons (H) que apareceram após a realização da semissíntese	86
Tabela 6 -	Dados espectrométricos de RMN ^{13}C da biflorina e do derivado 1c . Em vermelho está destacado os carbonos que apareceram após a realização da semissíntese	89
Tabela 7 -	Bandas de absorção referentes à manutenção do esqueleto da biflorina.....	90
Tabela 8 -	Bandas de absorção referentes à condensação da porção acilidrazina.....	91
Tabela 9 -	Efeito citotóxico dos compostos em estudo sobre linhagens cancerígenas e não cancerígena após 72h de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média \pm desvio padrão em micromolar (μM) de três experimentos independente em triplicata, analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.....	100
Tabela 10 -	Avaliação da atividade antimicrobiana da biflorina e dos derivados <i>N</i> -acilidrazonas (1a-c)	101

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 -	Formação de espécies reativas de oxigênio (EROS)	33
Esquema 2 -	Síntese dos derivados 4 e 5 com modificação na carbonila C-7 (em vermelho) da biflorina 1 . (SOUZA <i>et al.</i> , 2016)	35
Esquema 3 -	Síntese e obtenção de derivados hidrazonas 4 a,b (SOUZA <i>et al.</i> , 2016).....	36
Esquema 4 -	Síntese e obtenção de derivados oximas 5a-c (SOUZA <i>et al.</i> ,2016)	36
Esquema 5 -	Reação para a obtenção de <i>N</i> -acilidrazonas. (THOTA <i>et al.</i> , 2018)	44
Esquema 6 -	Rota sintética para obtenção da isoniazida, fármaco utilizado para o tratamento da tuberculose. Porção <i>N</i> -acilidrazida destacada em vermelho	45
Esquema 7 -	Resumo do Plano de trabalho. Obtenção do composto 5-metil-1H-imidazol-4-carbohidrazida 21 e dos derivados hidrazonas 1a-c a partir da biflorina 1	57
Esquema 8 -	Síntese do composto 5-metil-1H-imidazol-4-carbohidrazida 21 a partir do etil (5-metil-1H-imidazol-4-carboxilato) 20	58
Esquema 9 -	Síntese do derivado 5-metil-1H-imidazol-4-ácido carboxílico [6,9-dimetil-3-(4-metil-pent-3-enil)-8-oxo-8H-benzo[de]cromeno-7-ilideno]-hidrazida, 1a	60
Esquema 10 -	Síntese do derivado ácido isonicotínico [6,9-dimetil-3-(4-metil-pentil)-8-oxo-8H-benzo [de] cromeno-7-ilideno]-hidrazida	62
Esquema 11 -	Síntese do derivado 1c ácido nicotínico [6,9-dimetil-3-(4-metil-pent-3-enil) -8-oxo-8H-benzo[de]cromeno-7-ilideno]-hidrazida	64
Esquema 12 -	Síntese dos derivados <i>N</i> -acilidrazonas 1a-c , a partir da biflorina 1 ...	73

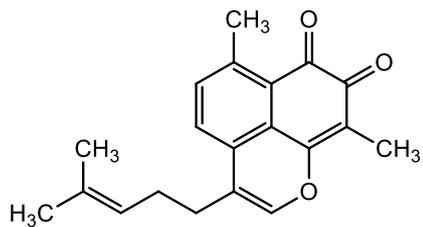
Esquema 13 - Rotas sintéticas utilizadas no estudo de obtenção do derivado 1c	74
Esquema 14 - Mecanismo de reação proposto para a obtenção dos derivados 1a-c	76
Esquema 15 - Estrutura de ressonância apresentada pela biflorina	76
Esquema 16 - Estrutura química da biflorina e da β -lapachona. Sistema de ressonância destacado nas duas 1,2-naftoquinona, em vermelho ...	77

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

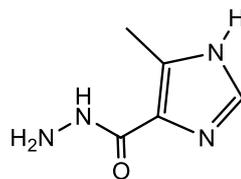
μL	Microlitro
APTS	Ácido <i>p</i> -toluenossulfônico
br s	Simpleto largo
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDCl_3	Clorofórmio Deuterado
cm^{-1}	Frequência de absorção
CMI	Concentração Mínima Inibitória
Ctl	Controle
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
DMSO	Dimetilsulfóxido
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
EtOH	Etanol
FNT	Fator de necrose tumoral
FTCβ	Fator transformador de crescimento
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
Hz	Hertz
IFN	Interferon
IL	Interleucina
INH	Isoniazida
IV	Infravermelho
LC₅₀	Concentração molar de uma substância que produz 50 % morte
m	multiplete
M⁺	Íon molecular
m/z	massa/carga
MHz	Megahertz

MS	Espectrometria de Massas
NAH	<i>N</i> -acilidrazonas
NKT	Natural killer T
PF	Ponto de Fusão
PM	Peso molecular
ppm	Partes por milhão
q	Quarteto
Rf	Fator de retenção
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear protônica
s	Simpleto
SBF	Soro fetal bovino
t	Tripleto
TAR	Terapia antirretroviral
Th	T auxiliares
Th1	pró-inflamatórias
Th2	anti-inflamatórias
TMS	tetrametilsilano
tt	triplo tripleto
UV	ultravioleta
λ	Comprimento de onda

LISTA DOS COMPOSTOS OBTIDOS

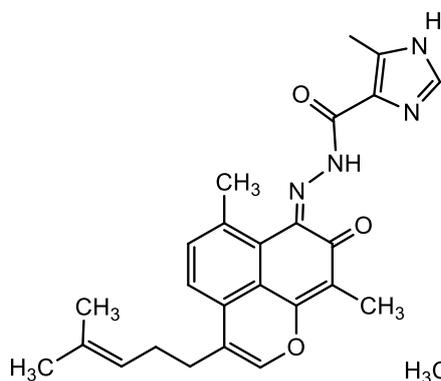


Biflorina

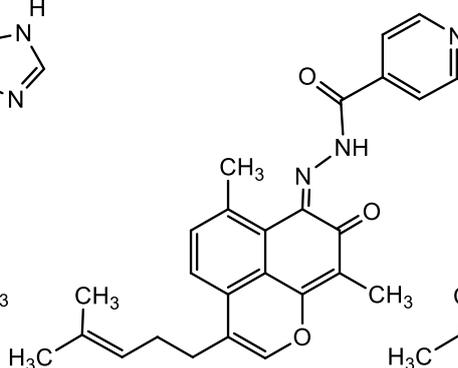


5-metil-1H-imidazol-4-carbohidrazida

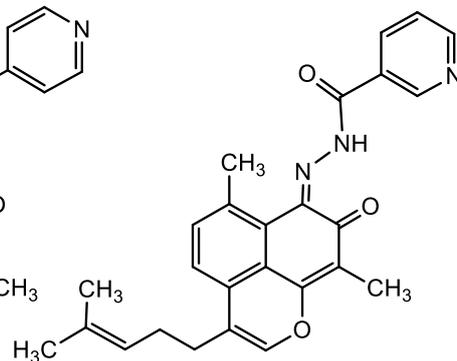
1



1a



1b



1c

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	OBJETIVOS	27
2.1	GERAL	27
2.2	ESPECÍFICO.....	27
3	REFERENCIAL TEÓRICO	28
3.1	<i>Capraria biflora</i> L.	28
3.2	BIFLORINA	30
3.2.1	Características química	30
3.2.2	Métodos de obtenção	33
3.2.3	Estudo químico da biflorina e a síntese de novos derivados	34
3.2.4	Propriedades biológicas da biflorina	38
3.3	ATIVIDADES BIOLÓGICAS ASSOCIADAS AOS NÚCLEOS BIOATIVOS	42
3.3.1	Compostos contendo núcleos imidazólicos	42
3.3.2	Compostos contendo grupos <i>N</i>-acilidrazonas	43
3.4	SISTEMA IMUNOLÓGICO E IMUNOMODULADORES	46
3.4.1	Citocinas	48
3.4.1.1	Interleucina (IL-2)	49
3.4.1.2	Interleucina (IL-4)	49
3.4.1.3	Interleucina (IL-6)	50
3.4.1.4	Interleucina (IL-17)	50
4	MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1	MATERIAIS	51
4.1.1	Reagentes e solventes	51
4.1.2	Equipamentos (Ensaio químicos)	52
4.1.2.1	Pontos de fusão.....	52
4.1.2.2	Cromatografias	52
4.1.2.3	Espectroscopia de Infravermelho (IV).....	52
4.1.2.4	Espectrometria de Massas (MS).....	52
4.1.2.5	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	52
4.1.3	Ensaio biológicos	53
4.1.3.1	Atividade citotóxica	53

4.1.3.2	Atividade antimicrobiana	53
4.1.3.3	Atividade imunomoduladora	53
4.1.3.3.1	<i>Animais</i>	53
4.1.3.3.2	<i>Medição da produção de citocinas em culturas de esplenócitos</i>	53
4.1.3.3.3	<i>Análise estatística</i>	54
4.2	MÉTODOS	54
4.2.1	Metodologia extrativa	54
4.2.1.1	Material vegetal	54
4.2.1.2	Novo método de extração e purificação simultânea	55
4.2.2	Metodologia sintética	57
4.2.2.1	Plano de trabalho	57
4.2.2.2	Obtenção do composto 5-metil-1H-imidazol-4-carbohidrazida	58
4.2.2.3	Síntese do derivado 1a: 5-metil-1H-imidazol-4-ácido carboxílico [6,9-dimetil-3-(4-metil-pent-3-enil) -8-oxo-8H-benzo[de]cromeno-7-ilideno] -hidrazida.....	59
4.2.2.4	Síntese do derivado 1b: Ácido isonicotínico [6,9-dimetil-3-(4-metil-pentil) -8-oxo-8H-benzo [de] cromeno-7-ilideno] -hidrazida	62
4.2.2.5	Síntese do derivado 1c: ácido nicotínico [6,9-dimetil-3-(4-metil-pent-3-enil) -8-oxo-8H-benzo[de]cromeno-7-ilideno] -hidrazida	64
4.2.3	Metodologia Biológica	66
4.2.3.1	Avaliação da atividade Imunomoduladora	66
4.2.3.1.1	<i>Preparação dos esplenócitos</i>	66
4.2.3.1.2	<i>Análise da viabilidade celular</i>	67
4.2.3.1.3	<i>Ensaio de proliferação usando coloração CFSE</i>	67
4.2.3.2	Avaliação da atividade citotóxica	68
4.2.3.2.1	<i>MTT</i>	68
4.2.3.2.2	<i>Análise dos resultados</i>	68
4.2.3.2.3	<i>Avaliação da atividade antimicrobiana</i>	68
4.2.3.2.4	<i>Preparo do inóculo</i>	69

4.2.3.2.5	<i>Determinação da atividade antimicrobiana</i>	69
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	70
5.1	ISOLAMENTO DA BIFLORINA	70
5.2	ENSAIOS DE SÍNTESE DOS DERIVADOS N-ACILIDRAZONAS (1a-c)	72
5.3	MECANISMO DE REAÇÃO PROPOSTO PARA A FORMAÇÃO DOS COMPOSTOS 1a-c	75
5.4	CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS	77
5.4.1	Caracterização da biflorina	77
5.4.2	Caracterização dos derivados (1a-c)	84
5.4.2.1	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear ¹ H (RMN ¹ H)	84
5.4.2.2	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear ¹³ C (RMN ¹³ C)	87
5.4.2.3	Espectroscopia de Infravermelho (IV)	90
5.4.2.4	Espectrometria de Massa (MS)	92
5.5	ENSAIOS BIOLÓGICOS	93
5.5.1	Efeito imunomodulador	93
5.5.2	Atividade citotóxica (MTT)	96
5.5.3	Atividade antimicrobiana	100
6	CONCLUSÃO	103
	REFERÊNCIAS	105
	APÊNDICE A- ESPECTROS DOS DERIVADOS 1a-c	113
	APÊNDICE B- ARTIGO DA DISSERTAÇÃO (PUBLICADO)	123
	ANEXO A- CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UFPE	138
	ANEXO B- FICHA DE INDICAÇÃO BOTÂNICA	139
	ANEXO C -PALESTRA E COMUNICAÇÃO ORAL	140
	ANEXO D- PARTICIPAÇÃO EM ARTIGO (ACEITO PARA PUBLICAÇÃO)	141

1 INTRODUÇÃO

As plantas são fontes importantes de substâncias bioativas com estruturas químicas diversificadas e com diferentes atividades biológicas, o que as tornam indispensáveis na pesquisa científica, principalmente como novos protótipos para o desenvolvimento de fármacos (LARA *et al.*, 2018). As quinonas, como as benzoquinonas, antraquinonas e naftoquinonas, destacam-se nos últimos anos como uma ampla classe de metabólitos secundários por apresentarem variadas propriedades biológicas e farmacológicas tais como moluscidas, leishmanicidas, anti-inflamatórias, antifúngicas, tripanocidas, antiprotozoárias e inibidoras da enzima transcriptase reversa do vírus HIV-1 (FERREIRA *et al.*, 2010; EL-NAJJAR *et al.*, 2011). As Quinonas extraídas de vegetais, especialmente as naftoquinonas, são as pioneiras nos trabalhos acadêmicos e por isso tem despertado grande interesse na comunidade científica, tanto na pesquisa voltada para o interesse farmacológico quanto para a síntese de novas substâncias e de seus efeitos biológicos.

A biflorina (6,9-dimetil-3-(4-metilpent-3-en-1-il) benzo[de]chromeno-7,8-diona) CAS number 5957-32-4;99671-97-3 é uma naftoquinona encontrada nas raízes da *Capraria biflora*, pertencente à família Scrophulariaceae. Esta espécie é um arbusto de pequeno porte e que possui distribuição cosmopolita, tendo sua origem nas Antilhas e distribuiu-se no Norte e Sul da América (SOUZA *et al.*, 2012). Os principais estados brasileiros onde encontra-se a *C. biflora* são: Goiás, Minas Gerais, na faixa litorânea entre o Piauí e o Espírito Santo e também em Pernambuco, especificamente nas regiões da Ilha de Itamaracá (LYRA JR *et al.*, 2007). É vulgarmente conhecida como: chá da terra, chá de goteira, chá das antilhas, chá de lima, chá de marajó, chá de balsamina, chá do México, chá de Martinica, chá de pé de calça, chá do rio, chá da América, chá do Maranhão, chá bravo e por fim, chá de preto (FONSECA *et al.*, 2006). Na medicina popular, é comumente utilizada no tratamento de dores, febre, gripe, vômitos, hemorroidas, reumatismo e diversas enfermidades, por possuir grande potencial anti-inflamatório, antibiótico e analgésico (VASCONCELLOS *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2012).

Vale salientar que, há muitos estudos sobre a atividade antitumoral da biflorina, porém não se tem dados sobre sua ativação imunológica, o que dificulta discussões

sobre os possíveis mecanismos de interação, neste caso, entre a biflorina e as células imunológicas. A busca de novos agentes com potenciais efeitos na modulação de respostas imunológicas, tem sido de grande interesse para o tratamento de diversas patologias, principalmente como substâncias capazes de atuar em terapias tais como :antitumorais, antivirais e imunológicas (CHACON; SCHUTSKY; POWELL, 2016 e DAVIS; BALLAS, 2017).

Nos últimos anos, houve um aumento no interesse em fitoquímicos com potenciaisefeitosanti-inflamatórios, uma vez que são vistos como agentes terapêuticos promissores devido ao seu impacto sobre os estados de saúde humana e prevenção de doenças. Devido a ampla diversidade estrutural e funcional, muitos compostos de origem natural tem sido alvo de pesquisas, tanto no desenvolvimento de novas estratégias de obtenção visando maiores rendimentos e consequentemente lucros mais rápidos, quanto no desenvolvimento do planejamento e síntese de novos compostos potencialmente ativos (SANGI *et al.*, 2016 e HUBERT *et al.*, 2017).

Diante do exposto, devido às amplas atividades que as naftoquinonas apresentam, o presente trabalho visa o estudo do efeito imunomodulador da biflorina, a otimização da obtenção desse composto por um novo método de extração e purificação simultânea, a realização de semissínteses de novos derivados hidrazonas, assim como as atividades antimicrobianas e citotóxicas desses novos compostos.

2 OBJETIVOS

Em virtude do grande interesse farmacológico da biflorina e de seus derivados, a seguir descreveremos os objetivos que compõem este trabalho.

2.1 GERAL

O presente trabalho visa a obtenção da biflorina através de um novo método, o estudo do efeito imunomodulador da biflorina e a semissíntese de três novos derivados *N*-acilidrazonas com potencial efeito antimicrobiano e citotóxico.

2.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Isolar a biflorina através do novo método de extração e purificação simultânea;
- ✓ Avaliar o efeito imunomodulador da biflorina em esplenócitos de camundongos BALB/c.
- ✓ Realizar a semissíntese de três novos compostos *N*-acilidrazonas;
- ✓ Caracterizar estruturalmente os compostos obtidos por meio de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN ^1H), Ressonância Magnética Nuclear de carbono treze (RMN ^{13}C), espectroscopia de absorção no infravermelho (IV) e determinar o peso molecular através de espectrometria de massa (MS);
- ✓ Avaliar a atividade antimicrobiana e citotóxica dos três novos derivados *N*-acilidrazonas;

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 *Capraria biflora* L.

A espécie da planta taxonomicamente denominada *Capraria biflora* L (Figura 1), pertence à família Schrophulariaceae do grupo das angiospermas (MATOS, 1988; AQUINO, 2003). Esta espécie é um arbusto de pequeno porte, podendo medir até 150 cm de altura e que possui distribuição cosmopolita (do grego kosmopolítes, em que *cosmos* significa “mundo” e *polítes* “cidadão”), tendo sua origem nas Antilhas e distribuindo-se no Norte e Sul da América (SOUZA *et al.*, 2012; AQUINO, 2003).



Figura 1 - *Capraria biflora* L. (Fonte: Prof. Alexandre Góes).

A *C. biflora* é comumente encontrada em diversas regiões do continente americano, em países como Peru, Guiana Francesa, Trinidad e Tobago, México, Curaçao, Guatemala e Bahamas, Estados Unidos e México, a espécie também pode ser encontrada na Ásia, em países como Índia e China (CORRÊA, 1931). Os principais estados brasileiros onde se encontra a *C. biflora* são: Goiás, Minas Gerais, na faixa litorânea entre o Piauí e o Espírito Santo e também em Pernambuco, especificamente nas regiões da Ilha de Itamaracá (LYRA JR *et al.*, 2007; AQUINO, 2003).

O cultivo desta espécie é bastante comum em áreas de climas tropicais e regiões costeiras. Como se trata de uma planta invasora é encontrada em terrenos baldios (LYRA JR *et al.*, 2007). É vulgarmente conhecida no Brasil como chá da terra, chá de goteira, chá das antilhas, chá de lima, chá de marajó, chá de balsamina, chá do México, chá de martinica, chá de pé de calça, chá do rio, chá da América, chá do Maranhão, chá bravo e por fim, chá de preto (FONSECA *et al.*, 2006). Na medicina popular, é comumente utilizada no tratamento de dores, febre, gripe, vômitos, hemorroidas, reumatismo e diversas enfermidades, por possuir grande potencial anti-inflamatório, antibiótico e analgésico (VASCONCELLOS *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2012).

Foi realizada uma triagem fitoquímica das soluções hidroalcoólicas dos extratos das partes principais da planta, como as folhas, o caule e as raízes, na intenção de identificar, quais constituintes químicos estão presentes nestes extratos (AQUINO *et al.*, 2006). O resultado dessa triagem pode ser observado na Quadro abaixo.

Quadro 1 - Triagem fitoquímica de extratos hidroalcoólicos das principais partes da *C. bilifora* (AQUINO, 2003).

Classes fitoquímicas	Raízes	Caules	Folhas
Alcalóides			
Mono, Sesqui e Diterpenos	✓	✓	✓
Triterpenóides e esteroides	✓	✓	✓
Saponinas			
Açúcares e poliois	✓	✓	✓
Iridóides			
Flavonóides	✓	✓	✓
Fenilpropanoglicosídeos	✓	✓	✓
Leucoantocianidinas e proantocianidinas condensadas	✓		

Contudo, estudos fitoquímicos recentes mostram uma proposta estrutural para um iridóide clorado (Figura 2), já identificado na espécie *Myoporum bontioides* e foi isolado pela primeira vez do caule da espécie da planta em questão. Do caule desta

espécie, extraído previamente com etanol e submetido à cromatografia, o precipitado encontrado em algumas frações forneceu a substância D-manitol, que é um carboidrato natural e o iridóide miopoclorina, representados na Figura 2 (SOUZA *et al.*, 2012).

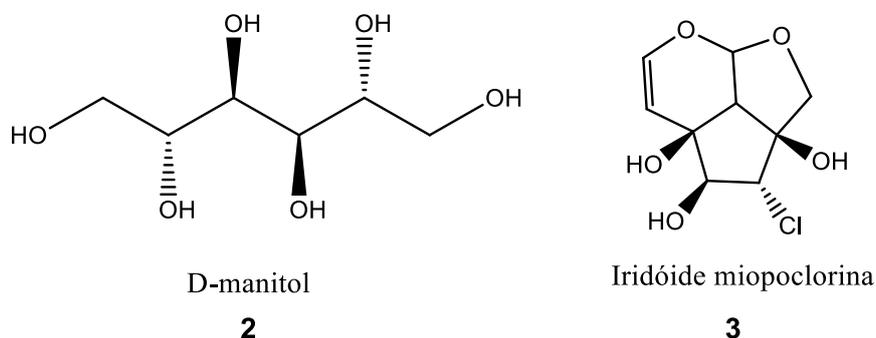


Figura 2 - Estrutura química dos compostos extraídos do caule da *C. biflora* (SOUZA *et al.*, 2012.).

Desde a década de 50, os estudos evidenciavam a importância farmacológica da *C. biflora*, quando o pesquisador do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, Dr. Oswaldo Gonçalves de Lima, isolou pela primeira vez de suas raízes, um composto de cor violeta, com atividade biológica expressiva contra bactérias Gram-positivas, álcool-ácido resistentes e fungos, ao qual foi denominada biflorina (LIMA *et al.*, 1953).

3.2 BIFLORINA

3.2.1 Características químicas

A biflorina denominada pela IUPAC, 6,9-dimetil-3-(4-metil-3-pentenil) nafta[1,8-bc] -piran-7,8-diona e com registro CAS: 5957-32-4;99671-97-3 é uma 1,2-naftoquinona encontrada nas raízes da *Capraria biflora* (Figura 3). As primeiras investigações, principalmente químicas da biflorina possibilitaram considerar que a substância pura se apresentava na forma de cristais aciculares, com reflexos metálicos e coloração violeta (LIMA, 1954). Ensaio físico-químico, revelou que seu ponto de fusão é de 159 °C e no teste de solubilidade verificou-se que a biflorina é solúvel em metanol, benzeno, etanol, propanol, butanol, dietilenoglicol, acetona, acetato de amila, ácido acético, éter de petróleo, hexano, tolueno, fenilalanina e éter etílico. Porém, a

biflorina é pouco solúvel em etilenoglicol, bicarbonato de sódio 5%, glicerina, hidróxido de sódio 5% e em água, assim como quase insolúvel em ácido clorídrico (HCl) (AQUINO *et al.*, 2006).

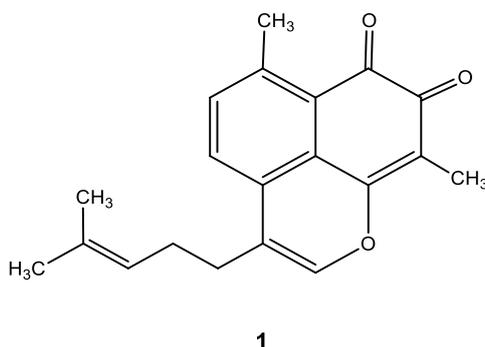


Figura 3 - Estrutura química da biflorina¹, isolada da raiz da *C. biflora* L.

A despeito de sua baixa solubilidade em água, o que dificulta sua manipulação e difusão em meio biológico, a biflorina possui características farmacológicas interessantes, principalmente por ser uma quinona, que é a classe de substâncias com variadas propriedades biológicas já relatadas na literatura, entre elas microbicidas, tripanossomicidas, viruscidas, antitumorais e inibidoras de sistemas celulares reparadores (SILVA *et al.*, 2003).

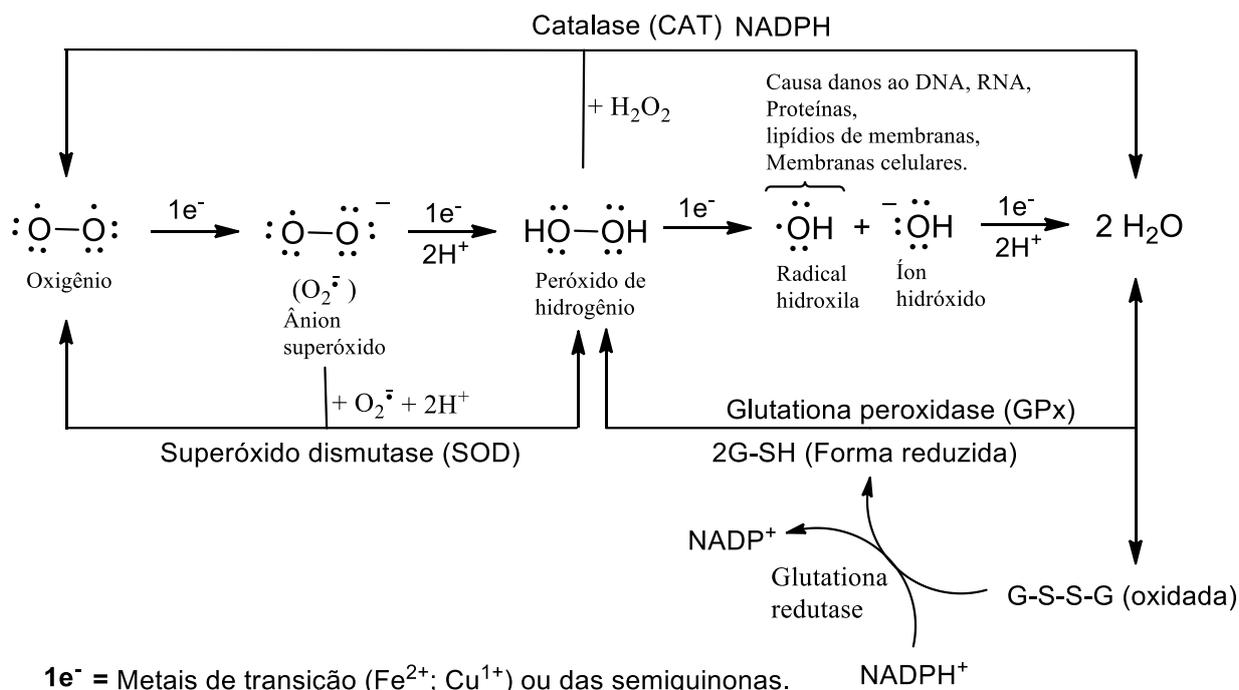
Em relação a sua estrutura molecular, as naftoquinonas estão relacionadas com o naftaleno. Em seu anel quinonoídico, há a presença de duas carbonila nas posições *para* (1,4-) ou *orto* (1,2-) em relação ao anel aromático, formando um sistema conjugado. Esses compostos são altamente reativos e apresentam variadas colorações (KUMAGAI *et al.*, 2012; SOUSA, LOPES, ANDRADE, 2016). Devido às propriedades estruturais dessas moléculas, suas atividades biológicas têm sido relacionadas a estimulação do estresse oxidativo e alquilação dos nucleófilos celulares (CAVALCANTI *et al.*, 2011; SOUSA, LOPES, ANDRADE, 2016).

As quinonas são espécies químicas neutras e sofrem reações de protonação com dificuldade, e apresentam duas propriedades químicas importantes, são oxidantes e também eletrofílicas. É sabido que essas propriedades, tanto oxidantes quanto eletrofílicas, conferem a participação dessas moléculas em reações do ciclo redox e reações de Michael, respectivamente (SOUSA, LOPES, ANDRADE, 2016).

Nas reações do ciclo redox (Esquema 1), pode ser iniciado através da redução envolvendo um ou dois elétrons, resultando na formação de semiquinonas e hidroquinonas, respectivamente. As semiquinonas, podem ser tóxicas ou passar por um ciclo redox reagindo com oxigênio molecular formando ânion radical superóxido e regenerando a quinona que estará disponível para nova redução. Esse ciclo resulta em estresse oxidativo devido ao consumo de equivalentes redutores celulares e da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), tais como os ânions radicais superóxidos ($O_2^{\cdot-}$), radicais hidroxila (OH^{\cdot}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que geralmente lesionam membranas, proteínas e DNA e como consequência estimulam a apoptose, assim como a carcinogênese (CASTRO; EMERY; DA SILVA JR., 2013; SOUZA; LOPES; ANDRADE., 2016; SILVA *et al.*, 2003).

Quando a espécie semiquinona ($Q^{\cdot-}$) é formada, esta reduz o oxigênio molecular ao ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que é transformado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), na presença da enzima superóxido redutase (SOD). Vale destacar que o substrato quinonoídico é reduzido a espécie semiquinona por ação enzimática, catalisada pelas flavinas NADPH citocromo P-450 redutase, NADPH citocromo b5 redutase ou NADPH ubiquinona oxidoreductase. Os radicais hidroxilas (OH^{\cdot}), podem ser gerados no interior da célula por dois tipos de reações, a reação de Fenton (FENTON; JACKSON, 1899) e a de Harber-Weiss (SILVA *et al.*, 2003), ao qual ocorre por catálise com metais de transição ou com peróxido de hidrogênio, respectivamente. Vale salientar que mesmo o H_2O_2 não sendo um radical livre, é considerado uma espécie química bastante reativa, sendo capaz de participar na oxidação de algumas biomoléculas. Por fim, tanto o radical hidroxila quanto o peróxido de hidrogênio, são as principais substâncias responsáveis pelo estresse oxidativo celular (SILVA *et al.*, 2003; BARREIROS, DAVID, 2006).

Nas reações de Michael, as quinonas interagem com nucleófilos, resultando na formação de hidroquinonas tio ésteres. Neste caso, essas interações são associadas com a desintoxicação e excreção, capaz de resultar em toxicidade por inibição de grupos tiois em enzimas e alteração do balanço tiol na célula, interferindo assim no processo regulatório celular (SOUZA; LOPES; ANDRADE., 2016; ALMEIDA, 2017). Porém, ainda é difícil mensurar quais dos dois mecanismos, à reação de adição nucleofílica de Michael ou ciclo redox, determinam a atuação química das quinonas, sabendo que ambos os mecanismos são relevantes.



Esquema 1 - Formação de espécies reativas de oxigênio (EROS).

3.2.2 Métodos de obtenção

Frequentemente, os materiais para investigações de propriedades biológicas, especialmente os de origem vegetal, são submetidos ao processo de extração seguido de purificação, no intuito de separar os compostos químicos específicos, para a avaliação de suas propriedades biológicas. Contudo, os primeiros estudos realizados com a *Capraria biflorainiciou-se* quandoo extrato foi submetido a testes e observou-se que, o mesmo foi ativo contra micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos. Diante desses resultados iniciais, Lima e colaboradores em 1952, isolaram um composto ativo de coloração violeta, que denominaram biflorina, ao qual apresentou propriedade antibacteriana e antifúngica.

Inicialmente, foi realizado o isolamento da biflorina através de extrações em acetona, lavagens e tratamentos com solventes por meio de cromatografia de contracorrente (método partição CRAIG), aplicando metanol/água (85: 15) como a fase estacionária, e éter de petróleo / clorofórmio (80:20) como a fase móvel (LIMA e NAVARRO, 1962). Para obter a biflorina pura em maior rendimento, os autores modificaram este método onde a extração de acetona seca por cromatografia em coluna foi parcialmente inativada pela água, começando com benzeno puro e depois

com acetona, produzindo um rendimento de 0,2% (LIMA *et al.*, 1958). Anos depois, a fim de economizar tempo, solventes e melhorar o rendimento da biflorina, com possibilidade industrial, Lima e colaboradores, desenvolveram outra metodologia onde as raízes secas e finamente trituradas foram extraídas com éter etílico a uma temperatura de 50°C em um aparelho de Soxhlet. A extração obtida foi agitada num funil de separação com solução de hidróxido de sódio a 0,5% várias vezes e recristalizada a partir de acetona e água resultando num rendimento de 0,4% de biflorina pura (LIMA e NAVARRO, 1962).

Em 2003, a biflorina foi extraída e isolada utilizando 450 g de serragem de raízes de biflora de *C. biflora*. Como solvente de extração, foi utilizado clorofórmio para obter 4,6 g do extrato bruto ao qual foi submetido à coluna cromatográfica de sílica gel usando gradientes de 0 a 100% de misturas de acetato de etila e éter de petróleo, e obtiveram 100 mg de produto puro, com um rendimento equivalente a 0,022% (FONSECA *et al.*, 2003).

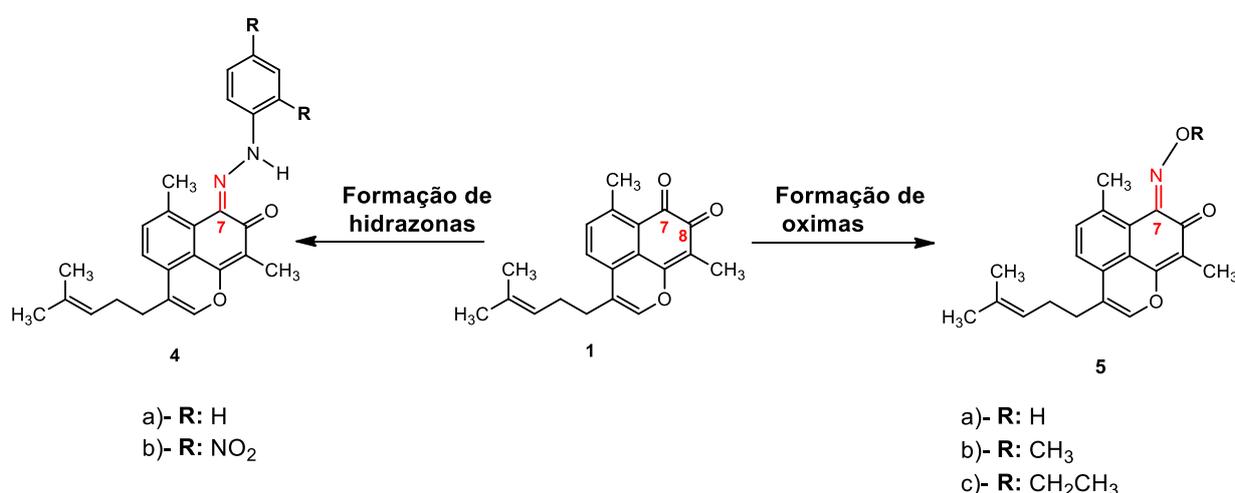
Em estudos posteriores, Vasconcellos e colaboradores utilizaram 6 kg de serragem da raiz da *C. biflora* em éter de petróleo por dois dias, para isolar a biflorina. Após a evaporação de todos os solventes sob pressão reduzida, foram obtidos 2 g de cristais violetas brutos. Depois de ser submetido a cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando misturas de eluentes, éter de petróleo / acetato de etila, originou 1,5 g de produto puro com um rendimento global de 0,025% (VASCONCELLOS *et al.*, 2007). Nota-se que, na maioria das estratégias de obtenção da biflorina, houve um baixo rendimento ao ser isolada, impulsionando a otimização através de novos métodos eficientes.

3.2.3 Estudo químico da biflorina e a síntese de novos derivados

O planejamento e o desenvolvimento de novos fármacos englobam inovação, descoberta, síntese ou modificação molecular, extração, isolamento, identificação de substâncias bioativas, assim como suas respectivas relações entre estrutura-atividade (PANCOTE, 2009). Contudo, há vários métodos eficientes para otimizar a potência e o perfil farmacológico de substâncias, contribuindo para um planejamento e síntese, cada vez mais eficaz, tornando moléculas mais ativas, com biodisponibilidade

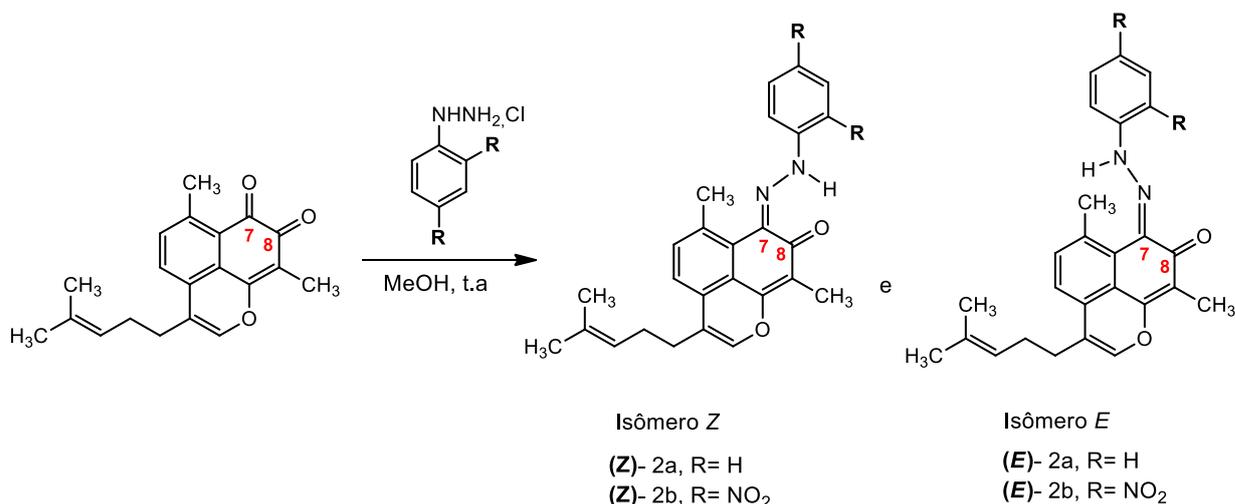
satisfatória, diminuição ou ausência de toxicidade dentre outros parâmetros a serem analisados para seu emprego terapêutico. Esses métodos consistem na síntese de análogos, isômeros ou outros procedimentos de modificação molecular, sendo estes a hibridação molecular, a simplificação molecular, a latenciação, a alteração de sistemas anelares entre outros (WERMUTH, 2003).

Visando a obtenção de novos compostos derivados da biflorina, Souza e colaboradores (2016) realizaram estudos químicos e avaliação das atividades antimicrobianas e citotóxicas, que essas moléculas poderiam apresentar. A síntese foi realizada com nucleófilos diferentes da classe das hidrazinas e hidroxilaminas (Esquema 2).



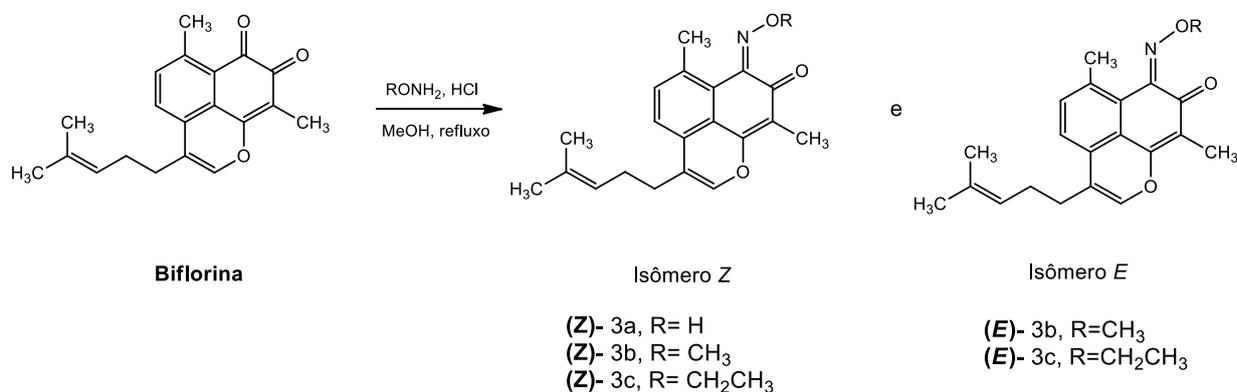
Esquema 2 - Síntese dos derivados **4e 5** com modificação na carbonila C-7 (em vermelho) da biflorina **1**. (SOUZA *et al.*, 2016).

Inicialmente foi realizada a síntese da biflorina com arilidrazina (Esquema 3). A reação da biflorina com cloridrato de fenilidrazina resultou em um rendimento de 42% para o derivado hidrazona **4a**. Ao utilizar 2,4-dinitrofenilidrazina obteve-se 63% de rendimento para **4b**, observando um maior rendimento. Nota-se que a biflorina possui em sua estrutura química duas carbonilas C-7 e C-8, viabilizando o ataque nucleofílico dos derivados hidrazinas. No entanto, apenas os compostos hidrazonas **4** foram formados, corroborando para que a adição nucleofílica tenha ocorrido no grupo carbonila mais eletrofílico, sendo este o C-7 (SOUZA *et al.*, 2016).



Esquema 3 - Síntese e obtenção de derivados hidrazonas 4a, b (SOUZA *et al.*, 2016).

É sabido que este tipo de reação é provável de se obter mistura de diastereoisômeros (*Z*) e (*E*). Porém, no RMN ¹H dos derivados hidrazonas 4a,b foi possível determinar a configuração e concluir que apenas o (*Z*) é formado, devido a uma ligação de hidrogênio intramolecular formando então um anel de seis membros. Posteriormente, foi realizada a reação da biflorina com cloridratos de aminas substituídas, levando a formação de derivados oximas 5, apresentando bons rendimentos 51-63% (Esquema 4).



Esquema 4 - Síntese e obtenção de derivados oximas 5a-c (SOUZA *et al.*, 2016).

Nesta reação, também foi possível obter a mistura de diastereoisômeros (*Z*) e (*E*), e que foi estabelecido à formação apenas a estrutura de configuração (*Z*). Desse modo, tanto a reação dos derivados hidrazonas como as dos derivados oximas, foi

possível identificar suas estruturas formadas através do RMN de ^1H e seus possíveis sinais (Figura 4).

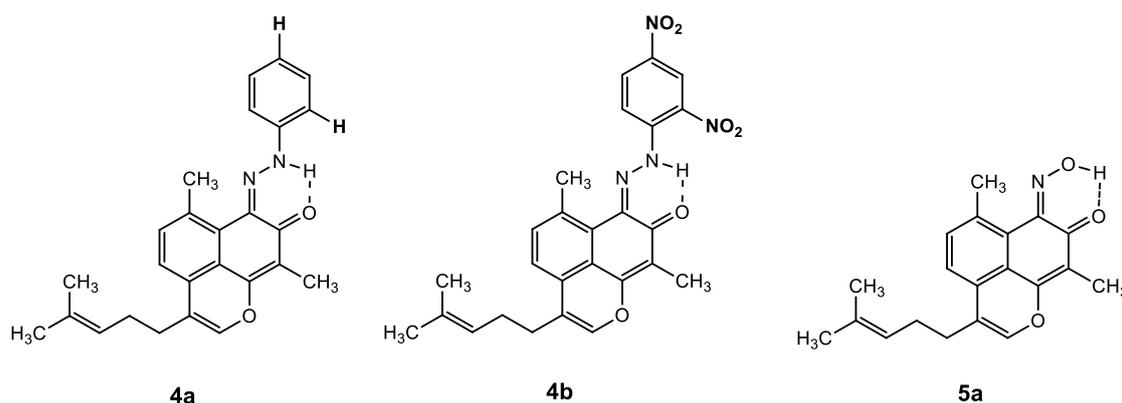


Figura 4-Ligação de hidrogênio intramolecular formando anel de seis membros dos derivados **4a**, **b** e **5a** (SOUZA *et al.*, 2016).

Nesse mesmo trabalho, os derivados obtidos e a biflorina foram submetidos a teste para atividade antibacteriana frente a seis cepas de bactérias, representados na Tabela 1. Os derivados hidrazonas foram susceptíveis a todas as cepas bacterianas, apresentando bom resultado para a hidrazona **4a**, frente à *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) com uma concentração mínima inibitória (CMI) de 256 $\mu\text{g/mL}$ equivalente ao valor de Amicacina (Ami). Além disso, esses derivados apresentaram valores de CMI superior ao da biflorina, uma vez que foi usada como padrão. Os derivados oximas, também foram testados para atividade antibacteriana e assim como os derivados hidrazonas apresentaram melhores resultados para todas as cepas bacterianas, onde os valores de CMI foram semelhantes ou até melhores que os da biflorina e os antibióticos usados como controle positivo, onde o metiloxima **5b** e etiloxima **5c** apresentaram valores de CMI 32 $\mu\text{g/mL}$ e 16 $\mu\text{g/mL}$ contra *Enterococcus faecalis* (ATCC 4083), respectivamente e para *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) ambos apresentaram CMI de 32 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 1 - Valores da CMI da biflorina **1** e dos derivados hidrazonas **4a**, **b** e oximas **5a-cem** $\mu\text{g} / \text{mL}$ (SOUZA *et al.*, 2016).

Cepas bacterianas	1	4a	4b	5a	5b	5c	Ami	Neo	Gen
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 4083)	32	512	512	256	32	16	256	128	32
<i>Proteus vulgaris</i> (ATCC 13315)	16	≥ 1024	512	512	64	512	512	512	64
<i>Escherichia coli</i> (27)	256	≥ 1024	≥ 1024	512	128	128	128	128	512
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 10536)	128	≥ 1024	512	≥ 1024	≥ 1024	512	512	512	128
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	64	256	512	256	32	32	256	32	32
<i>Staphylococcus aureus</i> (358)	128	≥ 1024	512	≥ 1024	64	64	256	32	8

Todavia, foi avaliado também a atividade citotóxica desses derivados frente a linhagens de células de câncer humano tais como: SF-295 (glioblastoma), OVCAR-8 (câncer de mama) e HCT-116 (côlon), ao qual os resultados obtidos demonstraram que esses derivados não apresentaram atividade. Contudo, Souza e colaboradores (2016) sugerem que modificação na carbonila causa inativação da substância frente a células cancerígenas, em contrapartida, essas alterações estruturais na biflorina viabilizam um aumento no potencial antibacteriano.

3.2.4 Propriedades Biológicas da biflorina

A biflorina é reconhecida como um promissor antibiótico, devido as suas propriedades biológicas, inclusive desde seu isolamento pela primeira vez das raízes da *C. biflora*. Alguns anos depois de sua descoberta, foram realizados ensaios antimicrobianos com bactérias Gram-positivas e negativas, assim como leveduras e foi analisado a CMI que esta substância apresentava (LIMA *et al.*, 1958). Na Tabela 2, pode ser observado as cepas testadas e suas respectivas CMI.

Tabela 2 - Susceptibilidade bacteriana e fungicida da biflorina e suas respectivas CMI (LIMA *et al.*, 1958).

Microorganismos	CMI ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Bacillus subtilis</i> 9	0,3
<i>Bacillus subtilis</i> 27	0,1
<i>Bacillus anthracis</i>	0,2
<i>Bacillus cereus</i>	0,2-0,40
<i>Bacillus mycoides</i>	0,09
<i>Sarcina lutea</i>	0,2
<i>Micrococcus pyogenes var. aureus</i>	0,8-10
<i>Streptococcus hemolyticus</i>	>100
<i>Escherichia coli</i> R	0,4
<i>Brucella suis</i>	0,8
<i>Brucella melitensis</i>	>10
<i>Brucella abortus</i>	50-70
<i>Candida albicans</i> 50	50-70
<i>Candida albicans</i> IHM	50-70
<i>Candida tropicalis</i>	70-100
<i>Candida pseudotropicalis</i>	100
<i>Candida krusei</i>	100
<i>Candida parakrusei</i>	70-100
<i>Candida stellatoidea</i>	70-100
<i>Candida sp.</i> ME-51	0-100
<i>Cryptococcus neoformans</i> ENCB	1.0-1,5

Outro ensaio biológico realizado com a biflorina, foi o de avaliar sua ação frente a fungos dermatófitos, investigando a formação de halos em diferentes concentrações (LYRA JR *et al.*, 1999) (Tabela 3). Portanto, além de apresentar essas atividades relatadas desde seu isolamento, esta molécula apresenta diversas propriedades biológicas significativas que serão descritas no decorrer desta seção.

Tabela 3 - Avaliação da atividade da biflorina frente a fungos dermatófitos, investigando a formação de halos em diferentes concentrações (LYRA JR *et al.*, 1999).

Microorganismos	Halos de inibição			
	1 µg/mL	5 µg/mL	10 µg/mL	50 µg/mL
<i>Epidermophyton floccosum</i>	09mm	12 mm	15 mm	16 mm
<i>Microsporum canis</i>	14 mm	15 mm	18 mm	20 mm
<i>Trichophyton gypseum</i>	00 mm	00 mm	00 mm	00 mm
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	14 mm	15 mm	17 mm	18 mm
<i>Trichophyton rubrum</i>	09 mm	10 mm	11 mm	13 mm
<i>Trichophyton schoenlyni</i>	16 mm	20 mm	22 mm	25 mm
<i>Trichophyton SP</i>	13 mm	15 mm	16 mm	17 mm
<i>Trichophyton tonsurans</i>	10 mm	10 mm	12 mm	15 mm

Estudos realizados com a biflorina na avaliação da atividade antitumoral, assim como quimioterápicos, esta substância mostrou-se inibidora do crescimento de cinco linhagens de células tumorais, de dose dependentes analisadas através de MTT (VASCONCELLOS *et al.*, 2004). As linhagens utilizadas foram CEM (leucemia linfoblástica aguda) e HL-60 (leucemia humana), B-16 (melanoma de rato), HCT-8 (câncer de cólon humano) e MCF-7 (câncer de mama humano), ao qual a biflorina apresentou atividade relevante frente a todas as linhagens testadas (VASCONCELLOS *et al.*, 2004).

Neste mesmo estudo, também foi observado que a biflorina não teve potencial inibitório no crescimento de embriões de ouriços do mar e nem induziu a apoptose em eritrócitos de ratos, mesmo em concentrações relativamente altas (100 µg/mL), ao contrário de outras substâncias, que em concentrações mínimas causaram efeitos negativos no desenvolvimento dos ovos (VASCONCELLOS *et al.*, 2004).

Como citado anteriormente, a biflorina possui diversas atividades biológicas e que essas dependem da origem celular. Contudo, em células leucêmicas HL60, a biflorina teve capacidade de induzir a diferenciação celular e nas células de melanoma B16F10 inibiu a colonização de célula tumoral no pulmão, apresentando-se como potente anti-metastático, além de aumentar a sobrevivência dos animais (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2010). Para um composto ser considerado alvo de novos estudos como um fármaco antineoplásico, por exemplo, este deve apresentar valores de IC₅₀

inferior a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ou 1 μM (PESSOA *et al.*, 2000). Dessa forma, a biflorina não apresenta potencial mutagênico, o que faz dela uma molécula eficaz e segura para pesquisas com interesse terapêutico, sendo considerada uma molécula promissora, como agente antitumoral.

In vivo, a biflorina também apresenta atividade anticâncer, ao qual foi avaliada frente a dois modelos de tumores, o sarcoma 180 e tumor de Ehrlich, que apresentou atividade inibitória frente aos respectivos tumores. No entanto, comparada à ação do 5-Fluoracil (5-FU) esse resultado é considerado de baixa potência. Ademais, associando a biflorina ao 5-FU, comprovaram o poder imunoadjuvante da biflorina com maiores taxas de inibição (VASCONCELLOS *et al.*, 2007).

Montenegro e colaboradores, avaliaram o papel da biflorina na expressão das proteínas N-caderina e AKT, em células de melanoma humano invasivo, MDA-MB-435, expostas a concentrações da biflorina. Neste trabalho, sugerem a biflorina como anticancerígeno e um novo protótipo para o desenho de medicamentos, uma vez que, essa substância não inibiu a adesão de células MDA-MB-435 nos variados substratos testados, além de bloquear a invasão das células, regulando negativamente a N-caderina, ao qual é um fator diretamente relacionado com a invasividade tumoral interfere na via de sinalização da PI3K/Akt, sendo esta uma via primordial para o processo de metástase (MONTENEGRO *et al.*, 2013; CARVALHO, 2011).

O efeito inibitório da biflorina frente a células de melanoma nos testes *in vitro* em comparação com a doxorrubicina, apresentou atividade inibitória frente a várias linhagens de melanoma em concentrações que variaram de 1,5 a 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Esses resultados demonstraram atividade inferior à da doxorrubicina em concentração de 0,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$, porém bastante significativa. Nos testes *in vivo*, houve expressiva redução do volume do tumor nos animais avaliados com a biflorina, (VASCONCELLOS *et al.*, 2011).

Um outro estudo, também avaliou a ação da biflorina contra três linhagens de melanoma humano estabelecidas, que demonstram a parte molecular do câncer em termos de alterações genéticas e mutações, como os genes TP53, NRAS e BRAF. Os resultados demonstraram que a biflorina reduz a viabilidade das linhagens de células de melanoma por interações de DNA, causando rupturas nas fitas duplas e simples, inibindo a progressão do ciclo celular, a replicação e o reparo e conseqüentemente, promovendo a apoptose (RALPH *et al.*, 2016).

3.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS ASSOCIADAS AOS NÚCLEOS BIOATIVOS

3.3.1 Compostos contendo núcleos imidazólicos

Os núcleos imidazólicos são amplamente estudados por apresentarem atividades biológicas interessantes, inclusive algumas destas moléculas são fármacos atualmente usados na terapêutica antifúngica (miconazol **6**, cetoconazol **7**), anti-neoplásica (mercaptopurina **8**), anti-helmíntica (mebendazol **9**, tiabendazol **10**), anti-protozoária (metronidazol **11**, benznidazol **12**) e anti-hipertensivo (losartan **13**) (Figura 5).

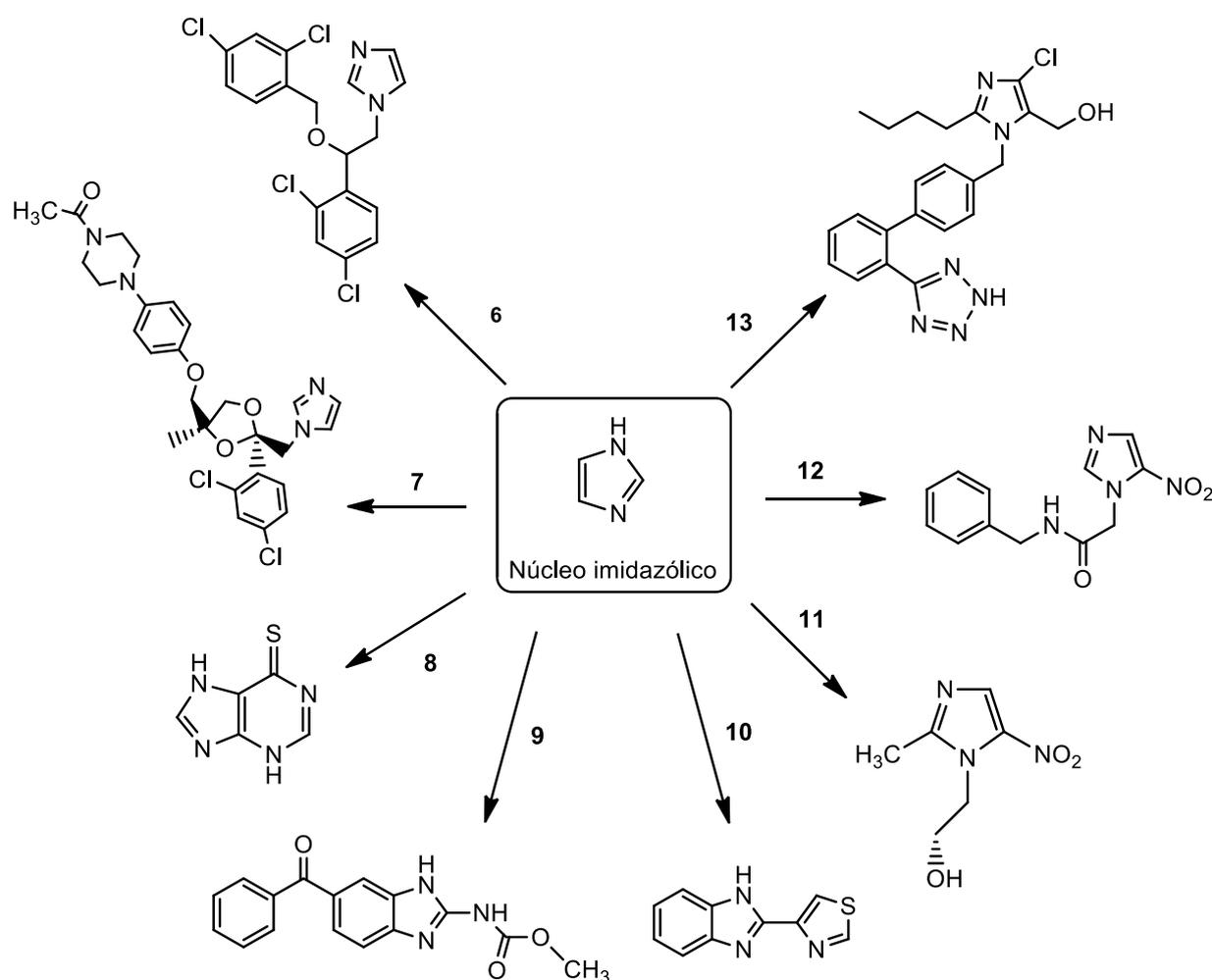


Figura 5 - Fármacos contendo núcleos imidazólicos.

Na terapêutica antifúngica os azólicos são considerados agentes fungistáticos sintéticos com amplo espectro de atividade, principalmente por conterem núcleos imidazol ou triazol (VIEIRA & SANTOS, 2017). Desde 1970, essa classe de composto

é utilizada como fármacos de primeira escolha (FRANÇA *et al.*, 2014), ao qual atuam inibindo a enzima fúngica, a lanosina-14 α -desmetilase, que é responsável por converter lanosterol em ergosterol, afetando a fluidez da membrana e das enzimas ligadas a ela (CHUDZIK *et al.*, 2015).

Comumente, os derivados contendo porções imidazólicas são utilizados como compostos de primeira escolha, principalmente nas infecções fúngicas, tanto por serem bem tolerados, quanto oferecem vantagens, dentre elas a ação seletiva, ao qual refere-se a inibição da enzima crucial na biossíntese do ergosterol, alanosina-14 α -desmetilase, que compõe a membrana dos fungos (PEREIRA, 2007).

No caso das infecções mais invasivas, o fluconazol (Figura 6) é o mais utilizado, sendo a primeira opção nos casos de meningite fúngica, visto que, este antifúngico triazólico alcança altas concentrações de líquido cefalorraquidiano, assim como também no humor vítreo, saliva, unhas, peles e tecido vaginal (RANG, DALE & RITTER, 2011; CHUDZIK *et al.*, 2015).

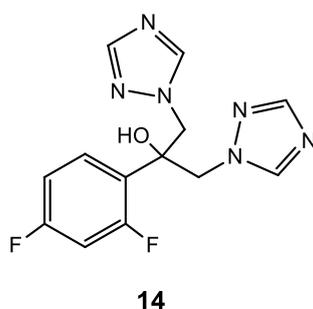
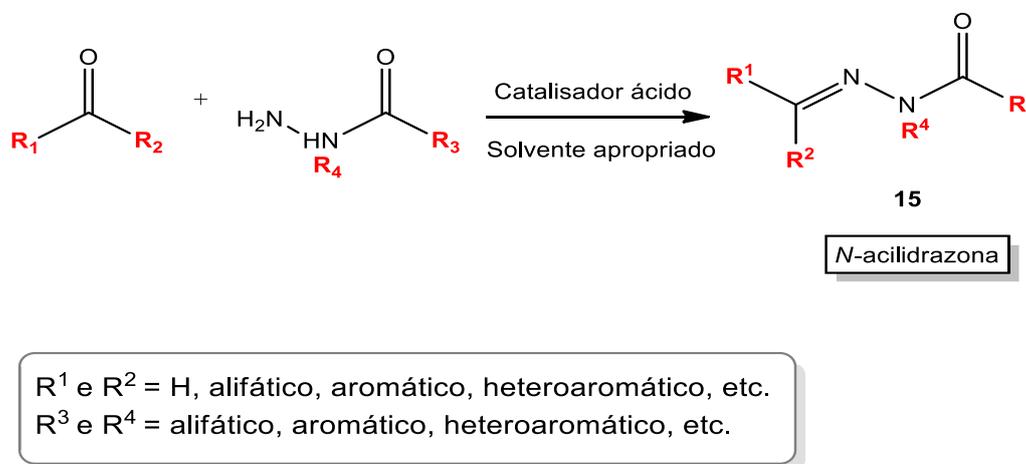


Figura 6 - Estrutura química do fluconazol.

3.3.2 Compostos contendo núcleos *N*-acilidrazidas

Relatos na literatura identificam compostos contendo porção *N*-acilidrazonas como agentes antimicrobianos, anti-inflamatórios, analgésicos, antifúngicos, tuberculostático, antiviral, anticancerígeno, antiplaquetário, antimalárico, anticonvulsivante, cardioprotetor, anti-helmíntico, antiprotozoário, antitripanossoma, antiesquistossomose (BARREIRO, *et al* 2002). O núcleo *N*-acilidrazona (NAH) (**15**) é o grupo funcional mais amplamente utilizado na química medicinal, tanto por atuarem

em vários alvos moleculares (FRAGA & BARREIRO, 2006; SUDO, ZAPATA-SUDO & BARREIRO, 2001; COSTA et al., 2010; DO AMARAL et al., 2014; KMMERLE et al., 2012) quanto a facilidade de serem obtidas (THOTA et al., 2018). A síntese para a produção de NAH, geralmente baseia-se por uma reação de condensação entre funções orgânicas, como aldeídos ou cetonas com hidrazidas (Esquema 5).



Esquema 5 - Reação para a obtenção de *N*-acilidrazonas. (THOTA *et al.*, 2018).

Diante das diversas funções que esses compostos exercem, foram relatados na literatura, incluindo: reatividade com nucleófilos biológicos e de bioensaios como tióis e aminas, fotorreatividade com qualquer funcionalidade protéica, quelação de metais que podem interferir com proteínas, ciclo redox, dentre outras (SENGER, *et al.*, 2016; BAEL & NISSINK, 2017).

Na última década, diversos estudos foram realizados e publicados a respeito da química desse núcleo bioativo, principalmente na química medicinal e conseqüentemente a importância para o desenvolvimento de novos protótipos candidatos a fármacos. Poucos NAHs foram aprovados para uso clínico, inclusive as semicarbazonas derivadas do 2-nitrofurano (nitrofurazona) e nitrofurantoína, foram os dois primeiros compostos a serem utilizados, ambos aprovados no combate a infecções bacterianas, sendo a nitrofurazona **16** como antibacteriano tópico e a nitrofurantoína **17** (Figura 7), como agente antibacteriano oral para o tratamento de infecções no trato geniturinário (GUAY, 2001).

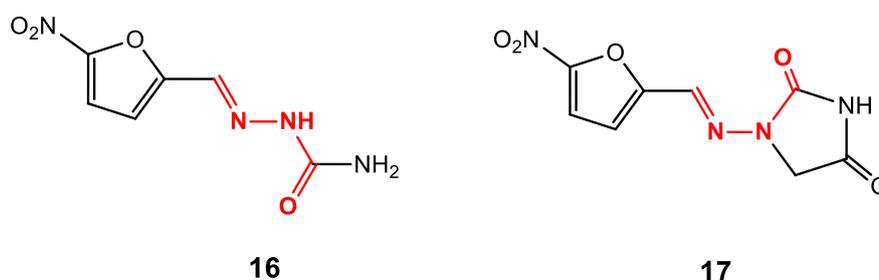
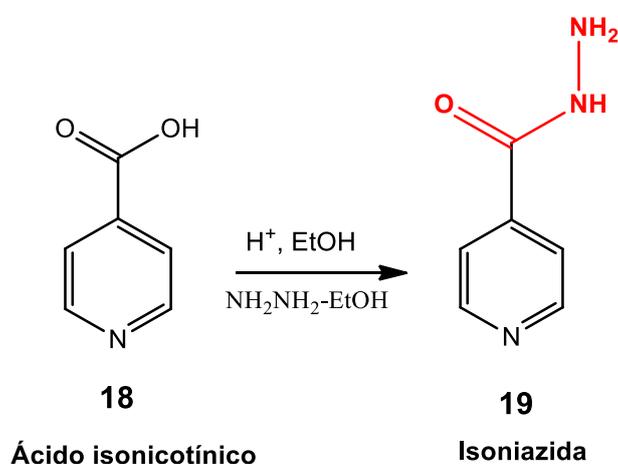


Figura 7 - Estruturas químicas dos dois primeiros compostos contendo porção NAH (destacada em vermelho), aprovados para uso clínico. Nitrofurazona **16** e nitrofurantoína **17**.

Um outro fármaco, comercialmente utilizado e que possui em sua estrutura, a porção *N*-acilidrazida é a isoniazida (INH) (Esquema 6). Sinteticamente, é derivada do ácido isonicotínico, com ação inibidora da síntese do ácido micólico, componente importante da parede celular da micobactéria (SARICH *et al.*, 1995).



Esquema 6 -Reação para obtenção da isoniazida, fármaco utilizado para o tratamento da tuberculose. Porção *N*-acilidrazida destacada em vermelho.

Contudo, a isoniazida é um dos fármacos quimicamente sintetizados mais importantes para o tratamento de qualquer tipo de tuberculose, apresentando eficácia contra *Micobacterium tuberculosis*, não atuando, no entanto, em outras bactérias.

3.4 SISTEMA IMUNOLÓGICO E IMUNOMODULADORES

O sistema imunológico está diretamente relacionado à saúde humana, e é constituído por uma rede emaranhada de órgãos, células e moléculas, sendo destinado a manter a homeostase do organismo, combatendo as agressões, em geral, pois agem controlando ou prevenindo as invasões infecciosas (CRUVINEL *et al.*, 2010). No entanto, trata-se de um sistema de defesa complexo e ao mesmo tempo sofisticado, que é capaz de diferenciar e identificar os elementos que compõem o organismo em sua normalidade (NUNES-PINHEIRO *et al.*, 2003).

A desordem da resposta imune está estritamente associada a vários distúrbios inflamatórios, incluindo infecções crônicas e agudas. Contudo, no processo inflamatório, as células do sistema imunológico, como macrófagos, neutrófilos e linfócitos, são capazes de liberar mediadores químicos como: espécies reativas de oxigênio (EROS) e citocinas pró-inflamatórias, dentre outros (ORHAN *et al.*, 2016). Em resposta aos estímulos provocados, mecanismos de defesas são desencadeados, no intuito de conferir ao organismo proteção, através da imunidade inata e adaptativa (ABBAS *et al.*, 2015). Na imunidade inata (conhecida também como natural ou nativa), há uma resposta rápida aos estímulos, ativando mecanismos de defesas, que podem ser barreiras físicas, químicas, físico-químicas, células citotóxicas (células NK-*natural killer*), anticorpos, citocinas, além de linfócitos T e B (NUNES-PINHEIRO *et al.*, 2003) que estão presentes em todos os indivíduos, independente do contato inicial com os imunógenos (MEDZHITOV&JANEWAY, 2000 e CRUVINEL *et al.*, 2010). Portanto, os principais mecanismos da imunidade inata são a liberação de mediadores inflamatórios, a síntese de proteínas de fase aguda como citocinas e quimiocinas, dentre outras (CRUVINEL *et al.*, 2010).

Em contrapartida, a imunidade adaptativa (denominada como específica ou adquirida) necessita que as células especializadas sejam ativadas, neste caso os linfócitos, ao qual produzirá moléculas solúveis. Portanto, a imunidade adaptativa, apresenta-se como o tipo de resposta à infecção quando exposta a agentes infecciosos, ou seja, são estimuladas a partir do momento em que se reconhece o agente causador da infecção para então, reagir em defesa (ABBAS *et al.*, 2015; CRUVINEL *et al.*, 2010). Além disso, suas principais características são: a especificidade e disparidade de reconhecimento ao identificar as diferentes substâncias, a memória de responder aos poucos a exposição repetida aos mesmos

micro-organismos, especialização de respostas, assim como, a tolerância a constituintes do próprio organismo (ABBAS *et al.*, 2015; CRUVINEL *et al.*, 2010). Entretanto, é sabido que os mecanismos da imunidade inata e adquirida corroboram sinergicamente no intuito de manter a integridade e resistência do organismo (MARQUES *et al.*, 2015). Na Tabela 4, estão relacionados os principais componentes da imunidade inata e adquirida.

Tabela 4 - Principais células efectoras e moléculas solúveis da imunidade inata e adaptativa (CRUVINEL *et al.*, 2010).

Componente	Imunidade inata	Imunidade Adquirida
Células	Fagócitos (células dendríticas, macrófagos e neutrófilos) Células <i>natural killer</i> (NK) Mastócitos, basófilos e eosinófilos	Linfócitos T, B e NK/T Células dendríticas ou apresentadoras de antígenos (APCs)
Moléculas solúveis	Complemento Proteínas de fase aguda Citocinas Quimiocinas	Anticorpos Citocinas Quimiocinas

A modulação do sistema imunológico é caracterizada por qualquer mudança na resposta imune, envolvendo fatores como a indução, expressão, amplificação ou inibição de qualquer parte ou fase do processo da resposta imunológica (ALAMGIR&UDDIN *et al.*,2010). Todavia, a modulação com um dos objetivos, sendo este na prevenção e tratamento de várias doenças, vem sendo estudados há muitos anos, inclusive pesquisadores tem unido esforços a investigações de novas entidades/drogas imunomoduladoras, especialmente de origem vegetal (MARQUES *et al.*, 2015; ALAMGIR&UDDIN *et al.*,2010).

Os agentes imunomoduladores são capazes de remodelar a resposta imunológica do organismo, podendo apresentar-se como imunoestimulantes ou imunossupressores, aumentando o mecanismo de defesa do hospedeiro ou diminuindo-o, respectivamente. Entretanto, esses adjuvantes imunológicos são eficazes na restauração das condições das respostas imunológicas normais e em

circunstâncias, onde o indivíduo apresenta sistema imunológico com baixa resistência aos antígenos, como também estimulando o organismo à defesa quando suscetíveis a invasões infecciosas, sendo estas por diversos fatores (DUTTA, 2002; ARCHANA *et al.*, 2011). Essa imunomodulação pode alterar o sistema imunológico de um indivíduo, uma vez que atua interferindo na síntese, regulação e efeitos finais das citocinas, usando-se inibidores específicos ou genéricos de citocinas inflamatórias ou usando e estimulando a síntese de citocinas anti-inflamatórias, por exemplo (MAKARE *et al.*, 2001 e GUEDES *et al.*, 2004).

3.4.1 Citocinas

As citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, e são importantes reguladores da resposta imunológica, que modulam mecanismos fisiopatológicos que estabelecem a evolução de determinadas doenças (GUEDES *et al.*, 2004 e OLIVEIRA *et al.*, 2011). As citocinas são denominadas de pleiotrópicas, ou seja, diferentes tipos de células podem secretar a mesma citocina e uma única citocina pode ter ação em variados tipos de células (ZHANG e AN, 2007), indicando que ações semelhantes podem ser desenvolvidas por citocinas diferentes. Todavia as citocinas influenciam na atividade, diferenciação, proliferação e a sobrevivência da célula imunológica. No entanto, regulam a produção e a atividade de outras citocinas que podem interferir na resposta imunológica, sendo estas pró-inflamatórias causando um aumento, ou anti-inflamatória, neste caso, diminuindo (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

As citocinas são produzidas por muitas células, mas as principais predominantes são as células T auxiliares (Th) e os macrófagos. Sobretudo, as citocinas podem ter ações pró- (Th1) e anti-inflamatórias (Th2) (SOMMER e WHITE, 2010). As pró-inflamatórias são produzidas pelos macrófagos ativados e estão envolvidas na regulação positiva de reações inflamatórias (ZHANG e AN, 2007). Dentre as consideradas pró-inflamatórias, têm-se as interleucinas (IL) 1, 2, 6, 7 e FNT (fator de necrose tumoral) e as anti-inflamatórias são IL-4, IL-10, IL-13 e FNT β (fator transformador de crescimento β) (SOMMER e WHITE, 2010). De modo geral, as citocinas são mediadores necessários para conduzir a resposta inflamatória aos locais de infecção, favorecendo a cicatrização apropriada da ferida. Como não é possível classificar as citocinas quanto à célula de origem ou quanto à função biológica, elas foram agrupadas em interleucinas (IL), fatores de necrose tumoral (FNT), interferons

(IFN) e fatores de crescimento mesenquimal (ZHANG e AN, 2007; SOMMER e WHITE, 2010).

3.4.1.1 Interleucina- 2 (IL-2)

A IL-2 é uma glicoproteína produzida principalmente por células-T-CD4 e em menor quantidade por células-T-CD8+, que age na estimulação do crescimento e na proliferação de linfócitos-T e células-B. Também induz a produção de outras citocinas, como, por exemplo, IFN γ e FNT β , resultando na ativação de monócitos e neutrófilos (ZHANG e AN, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2011). Todavia, fica visível que a IL-2 coadjuva, tanto gerando quanto propagando, respostas imunológicas específicas ao antígeno (SOMMER e WHITE, 2010). Esta citocina tem sido amplamente estudada em terapias oncológicas, imunodeficiência e rejeição de transplantes (ZHANG e AN, 2007).

Um fator importante a ser mencionado, é que há possíveis efeitos benéficos da IL-2, durante a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), visto que, o HIV acomete o sistema imunológico, particularmente as células CD4, destruindo-o, e tornando-o suscetível a infecções oportunistas (GRIMWADE e SWINGLER, 2003). A IL-2, portanto, em combinação com a terapia antirretroviral (TAR) aumenta a contagem de células CD4 em adultos HIV positivos (NACHEGA *et al.*, 2011).

3.4.1.2 Interleucina- 4 (IL-4)

A IL-4 possui propriedades anti-inflamatórias e é produzida por linfócitos-T-CD4, mastócitos, eosinófilos e basófilos (GADANI *et al.*, 2012). Esta glicoproteína, induz a diferenciação de linfócitos-B para produzir IgG e IgE, que são imunoglobulinas importantes nas respostas alérgicas e anti-helmínticas (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Ademais, atua sobre macrófagos ativados, reduzindo os efeitos das citocinas IL-1, FNT α , IL-6 e IL-8, e inibindo a produção de radicais livres de oxigênio (SOMMER e WHITE, 2010; CURFS, MEIS e HOOBKAMP-KORSTANJE, 1997). A IL-4 tem potencial terapêutico em muitas situações clínicas, como, por exemplo, em psoríase, osteoartrite, linfoma, asma (KURTZ *et al.*, 2007; O'BYRNE, 2006 e REN *et al.*, 2009), assim como na regulação da imunidade cerebral, com efeitos mensuráveis na aprendizagem / memória espacial e neurogênese, e com implicações para distúrbios neurológicos (GADANI *et al.*, 2012).

3.4.1.3 Interleucina- 6 (IL-6)

A IL-6 é secretada por muitos tipos de células, como macrófagos, monócitos, eosinófilos, hepatócitos e células da glia, sendo que, o FNT α e IL-1, são conhecidos como potentes indutores (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Contudo, aIL-6 é um potente mediador pró-inflamatório com papel importante, tanto na inflamação aguda e crônica, quanto em múltiplos efeitos, como em muitos tipos de células imunes e não-imunes, bem como na diferenciação de células Th17 (LEECH *et al.*, 2012, HUNTER; JONES, 2015 e KIMURA; KISHIMOTO, 2010). Além disso, é importante nas respostas inflamatórias e na defesa contra infecções causadas por micro-organismos extracelulares (MIOSSEC; KOLLS, 2012 e MISIAK *et al.*, 2017).

3.4.1.4 Interleucina- 17 (IL-17)

A IL-17 é uma citocina com potencial efeito em induzir a inflamação, causando infiltração celular, assim como evitando processos autoimunes (KORN *et al.*, 2009; PARK. *et al.*,2005). Esta citocina é secretada por diversos subgrupos de células T, como células NKT (em inglês: Natural killer T), além de eosinófilos e neutrófilos, sendo estas em resposta ao estímulo da resposta imune inata (LIU *et al.*, 2007; LOCKHART *et al.*,2006).

O importante papel desta interleucina tem a ver com a proteção contra infecção por micro-organismos extracelulares, principalmente em ambiente de mucosa e também é capaz de induzir células mielóides e mesenquimais a produzir outras citocinas pró-inflamatórias, além de ativar mecanismos de apoptose em células potencialmente infectadas (KORN *et al.*, 2009; PARK. *et al.*,2005). Contudo Todas estas evidências mostram o papel de IL-17 em intermediar imunidade inata e adaptativa.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

A seguir será descrito os materiais utilizados nos ensaios químicos e biológicos dos novos derivados *N*-acilidrazonas, assim como da biflorina.

4.1.1 Reagentes e Solventes

Todos os reagentes foram obtidos comercialmente, e os solventes previamente destilados para a utilização.

Acetato de etila	VETEC
Acetona	CINÉTICA
Ácido clorídrico	MERCK
Clorofórmio	MERCK
Diclorometano	CINÉTICA
Dimetilsulfóxido	REAGEN
Etanol	CINÉTICA
Éter etílico	VETEC
Hexano	CINÉTICA
Metanol	CINÉTICA
Sulfato de sódio anidro	VETEC
Ácido isonicotínico hidrazida	SIGMA-ALDRICH
Hidrazida nicotínica	SIGMA-ALDRICH
1-etil-5-metil-1H-imidazol-4-carboxilato	ALDRICH CHEMICAL COMPANY, Inc

4.1.2 Equipamentos (Ensaio químicos)

Para a obtenção dos derivados *N*- acidrazonas, utilizamos: balança analítica modelo E. METTER, capela de fluxo laminar, placa de aquecimento com agitador magnético – FANEM, centrífuga PCL séries, rotaevaporador modelo 802 – FISATON, estufa – FANEM e aparelho Góes.

4.1.2.1 Pontos de fusão

Os pontos de fusão foram medidos em um fusiômetro Fisatom ® modelo 431 da série 1511035.

4.1.2.2 Cromatografias

As cromatografias em camada delgada (CCD), ocorreram em cromatofolhas Al de sílica gel Merck 60 F₂₅₄ de 0,25 mm de espessura. E as colunas cromatográficas foram preparadas sob pressão utilizando sílica gel 60 Merck 230-400 Mesh (Flash). A visualização durante a CCD foi auxiliada pela luz ultravioleta (UV) (254 nm).

4.1.2.3 Infravermelho (IV)

O espectrômetro de infravermelho (IV) utilizado foi o aparelho PerkinElmer ® (Spectrum 400) com dispositivo de reflectância atenuada.

4.1.2.4 Espectrometria de massas (MS)

Os espectros de massa de ESI de alta resolução foram medidos num espectrômetro de massa Bruker microTOF.

4.1.2.5 Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN ¹H e RMN ¹³C foram gerados no espectrômetro Bruker Avance III de 600 MHz. As amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterados (CDCl₃). Os espectros foram obtidos com os deslocamentos químicos expressos ppm dispondo do tetrametilsilano (TMS) como padrão interno no caso dos RMN ¹H. As constantes de acoplamento (*J*) foram medidas em hertz e os picos são apresentados como s (simpleto), d (duplete), t (tripleto), q (quarteto), br s (simpleto largo), dd (duplo duplete), tt (triplo tripleto), m (multiplete).

4.1.3 Ensaios biológicos

4.1.3.1 Atividade Citotóxica

Para o ensaio de MTT foram utilizadas placas de 96 poços, micropipetador multicanal e de 1 mL, solução salina de PBS, tripsina, meio RPMI acrescido de penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) suplementado com 10 % de soro bovino fetal (SBF), MTT à 5 mg/mL, câmara de Neubauer, corante azul de Tripán e DMSO.

4.1.3.2 Atividade antimicrobiana

Foram utilizadas placas de petri contendo 20 mL de meio de cultura sólido Mueller Hinton ágar (MH) para as bactérias e Mueller Hinton agar + 2% de glicose e azul de metileno para a levedura e micropipetador multicanal de 1 mL.

4.1.3.3 Atividade imunomoduladora

4.1.3.3.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas Balb/c, com idade de seis a oito semanas, e mantidos nas instalações de animais do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA, localizado na Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. Os animais foram mantidos em gaiolas, alimentados com acesso livre a uma dieta padrão (Labina / Purina, Campinas, Brasil) e água. Foram submetidos a fotoperíodos de 12 horas claro/12 horas escuro e mantidos em condições ideais de temperatura (20 a 22 ° C). O estudo foi realizado a partir de normas éticas para pesquisa em modelos animais, de acordo com o Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco (protocolo número 0048/2016).

4.1.3.3.2 Medição da produção de citocinas em culturas de esplenócitos

Os sobrenadantes de culturas tratadas ou não com biflorina (6 µg / mL) por 24 h foram coletados para quantificação de citocinas utilizando o kit de citocinas CIT (Cytometric Bead Array) Th1 / Th2 (Becton Dickinson Biosciences, EUA) para detecção simultânea de interleucinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17), fator-alfa de necrose tumoral (TNF-α) e interferon-gama (IFN-γ). Os ensaios foram realizados de

acordo com as instruções do fabricante e os dados foram adquiridos em uma plataforma FACSCalibur. Seis curvas individuais de citocinas padrão (0-5000 pg / mL) foram realizadas em cada ensaio. A faixa de detecção foi definida como 3000 pg / mL - 5000 pg / mL. As células foram analisadas usando a plataforma FACSCalibur de acordo com as instruções do fabricante.

4.1.3.3 *Análise estatística*

Os dados foram analisados por meio de testes não paramétricos. Para detectar as diferenças entre os grupos, utilizou o teste de Wilcoxon. O teste t de Student foi utilizado para analisar os resultados do ensaio de viabilidade celular. Todos os resultados foram expressos como média \pm DP e um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4.2 MÉTODOS

A seguir será descrito o novo método de extração e purificação simultânea da biflorina, a metodologia sintética dos novos derivados hidrazonas, assim como os ensaios biológicos.

4.2.1 Metodologia extrativa

4.2.1.1 Material vegetal

O material botânico da espécie *Capraria biflora*, especificamente das raízes, foi coletada em maio de 2017, em uma área localizada em Itamaracá (Pernambuco/Brasil: coordenadas 7 ° 44'43.8 "S 34 ° 49'32.1" W). A exsicata foi depositada no herbário do Instituto Agrônomo de Pernambuco-IPA, e registrada no número 91544. Para o processo de extração e purificação simultânea da *C. biflora*, o arbusto foi coletado e as raízes, onde se encontra a biflorina, foram separadas e postas para secar ao ar. Após a secagem foram pulverizadas, até formar finas partículas, obtendo-se então, a serragem.

4.2.1.2 Novo método de extração e purificação simultânea

Visando a obtenção da biflorina com o melhor rendimento, foi utilizado neste trabalho um novo método de extração, o método Góes, utilizando o aparelho Góes registrado sob o número de patente BR 10 2017 021 0995, denominado de extração e purificação simultânea. Para a realização do processo Góes é necessário um aparelho, o aparelho Góes, um condensador, um balão de fundo redondo, uma manta aquecedora, tubos de ensaio para coleta das amostras, tubo capilar para preparação de placas cromatográficas (CCD), cuba cromatográfica de vidro, placas de cromatografias as quais podem ser de sílica, alumina dentre outras de acordo com a polaridade da substância (Figura 8).

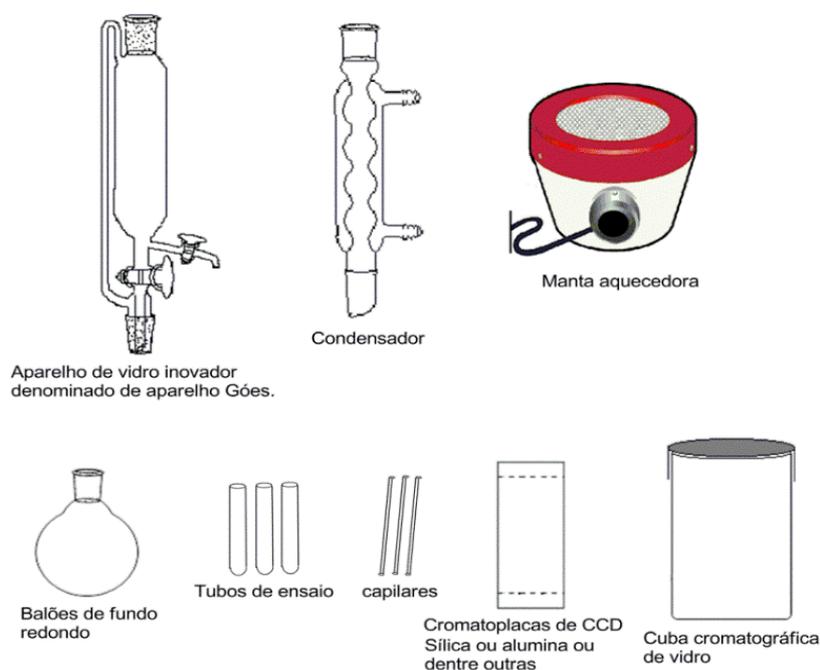


Figura 8 - Componentes necessários para a realização do novo método de extração e purificação simultânea.

Antes de iniciar o processo de extração e purificação simultânea, é importante determinar o solvente ou o sistema de solventes a serem utilizados. É sabido que, o eluente ideal é aquele que apresenta um fator de retenção (R_f) entre 0,3 e 0,45. Desse modo, para este processo utiliza-se um aparelho de vidro denominado aparelho Góes (Figura 9), onde no interior da coluna preenche-se por uma substância

adequada (1), a depender do material a ser analisado, podendo ser sílica em gel (SiO_2), alumina (Al_2O_3) dentre outras. Na parte superior, do aparelho é adicionado o material a ser investigado, podendo ser serragem de qualquer parte da planta (raiz, caule, folha) secas em pó (2). Na terceira parte do corpo do aparelho, será alimentado pelo eluente ideal encontrado (3), através do balão de fundo redondo sob aquecimento. Este processo de extração e purificação simultânea permite a obtenção da substância desejada com rendimento maior, tempo de execução menor, e economia de solventes, visto que, o espaço da coluna dedicado a receber o sistema eluente, corresponde a um terço ou mais de todo o corpo dessa vidraria, permitindo então, receber uma maior quantidade do eluente antes da substituição de cada balão contendo as amostras, economizando assim solventes no processo.

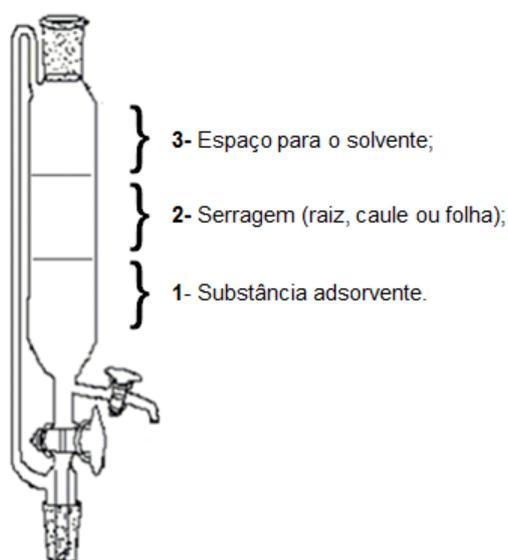


Figura 9 - Aparelho Góes. Divisão do corpo da coluna.

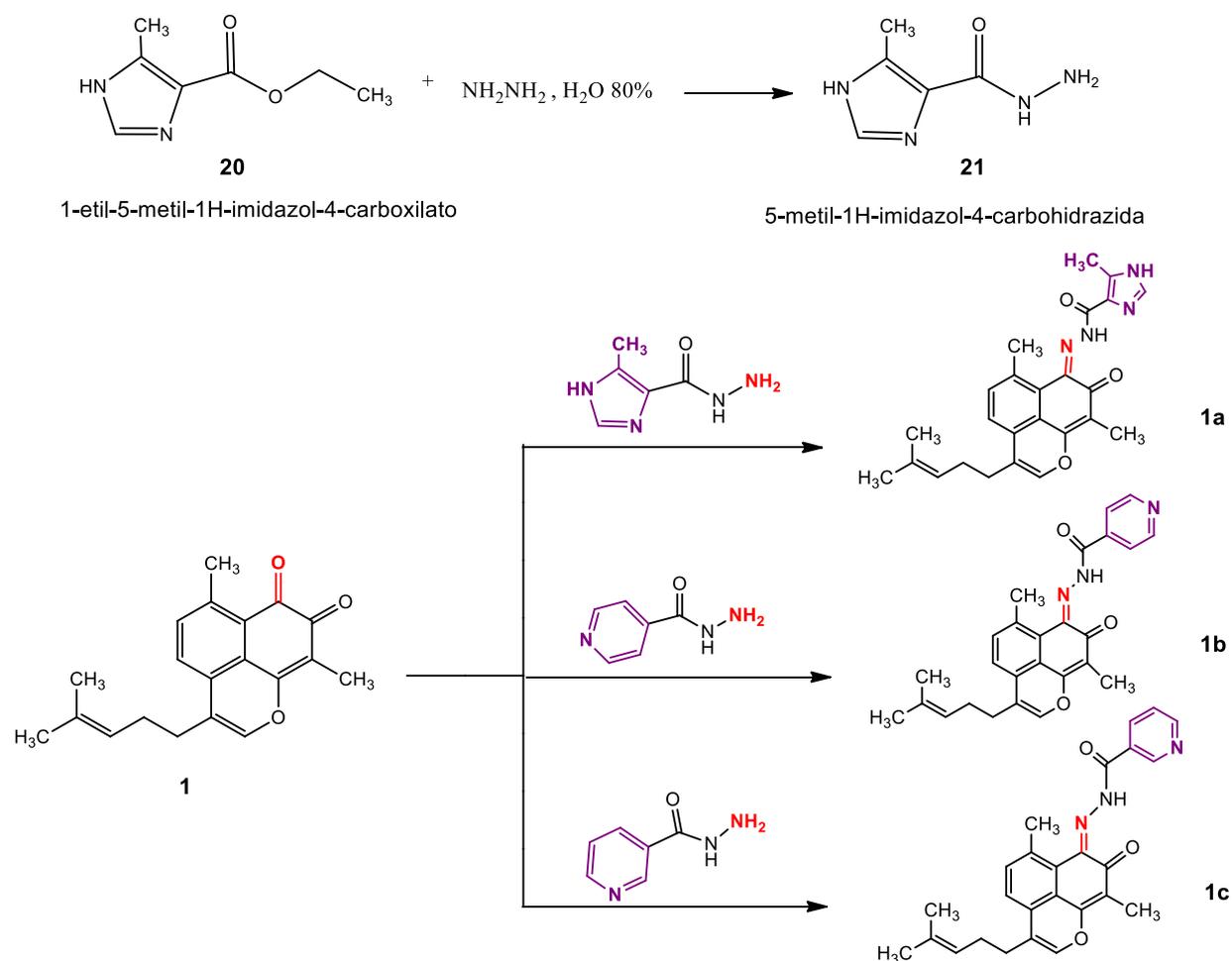
Portanto, para a obter a biflorina pura o sistema deve passar por aquecimento numa temperatura de aproximadamente 65°C , suficiente para alimentar a coluna durante 6 horas. No interior do corpo da coluna, foi preenchido em parte por 30,0 g de sílica em gel como adsorvente apropriado e logo em seguida adicionado 20,0 g de serragem das raízes da *C. biflora*. Inicialmente, foi vertida uma quantidade de 150 mL do sistema eluente hexano/acetato de etila 8:2 (v/v), para isolamento do composto desejado. Foram coletadas 4 frações, com volumes médio de 10 mL. As frações de 2

e 4 foram reunidas após comparadas em cromatografia em camada delgada (CCD), obtendo-se um composto puro de cor violeta, a biflorina (126,6 mg; 0,6%).

4.2.2 Metodologia sintética

4.2.2.1 Plano de trabalho

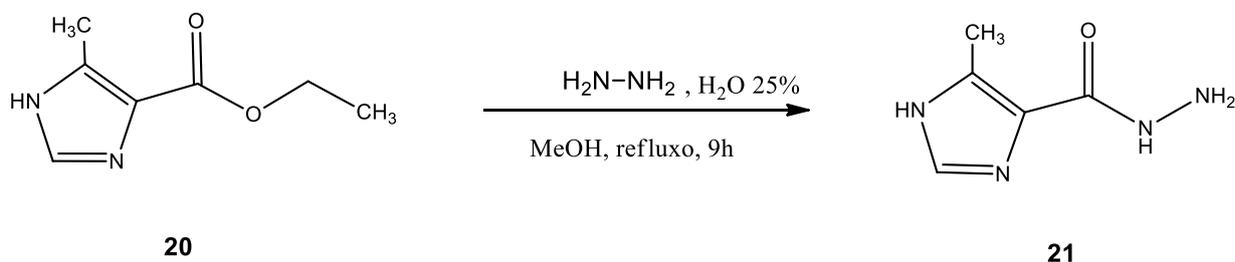
A elaboração do plano de trabalho para a síntese dos derivados hidrazonas **1a-c**, consiste na preparação do composto 5-metil-1H-imidazol-4-carboxihidrazida (**21**) e a realização dos ensaios de sínteses da biflorina **1** com as hidrazidas, conforme representado no Esquema 7.



Esquema7 - Resumo do Plano de trabalho. Obtenção do composto 5-metil-1H-imidazol-4-carbohidrazida**21** e dos derivados hidrazonas **1a-c** a partir da biflorina **1**.

4.2.2.2 Obtenção do composto 5-metil-1H-imidazol-4-carbohidrazida

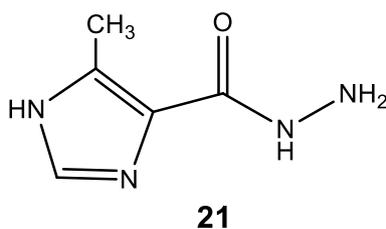
O composto 5-metil-1H-imidazol-4-carbohidrazida **21** foi obtido por adaptação da metodologia descrita por LIESEN e colaboradores (2010), representado no Esquema 8.



Esquema 8 - Síntese do composto 5-metil-1H-imidazol-4-carbohidrazida **21** a partir do etil (5-metil-1H-imidazol-4-carboxilato) **20**.

Modo operatório:

Em um balão de fundo redondo com capacidade de 100mL foram adicionados 1-etil-5-metil-1H-imidazol-4-carboxilato (1 g / 6,4864 mmoles), e 3 mL de metanol (MeOH). Sob agitação à temperatura ambiente, a hidrazina hidrato 25% (5,5 mL/ 5,0 eq) foi adicionada a mistura reacional e mantida agitada sob refluxo, durante 9 horas. A reação foi monitorada por CCD até seu término, em um sistema diclorometano/ MeOH (9:1), apresentando um Rf igual a 0,34. Notou-se que após 1 hora e 5 min de reação, a mistura estava totalmente solúvel. Após o término da reação, a mistura reacional foi filtrada a vácuo, lavada com hexano e o sólido resultante, seco em estufa (37°C) fornecendo o composto **21** para a síntese do derivado **1a**, com 58,6 % de rendimento.



5-metil-1H-imidazol-4-carbohidrazida

➤ Dados reacionais

- Cristal bege;
- Rendimento: 59 %

➤ Dados físico-químicos e espectrofotométricos

- **PM:** 140 g/mol
- **PF:** 215-217 °C
- **Rf:** 0,34 (Diclorometano/metanol 9:1)

➤ Solubilidade

- **Solúvel:** Etanol;

Clorofórmio (CHCl₃)

Acetona- Parcialmente solúvel

MeOH- Parcialmente solúvel

Diclorometano (CH₂Cl₂) -Parcialmente solúvel

- **Insolúvel:**

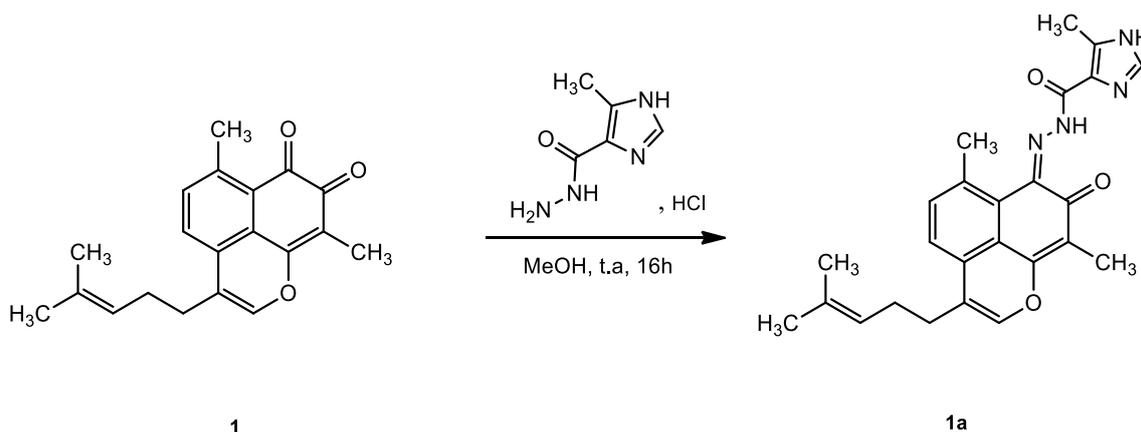
n-Hexano

Acetato de etila

Éter etílico

4.2.2.3 Síntese do derivado 1a: 5-metil-1H-imidazol-4-ácido carboxílico [6,9-dimetil-3-(4-metil-pent-3-enil) -8-oxo-8H-benzo[de]cromeno-7-ilideno]-hidrazida

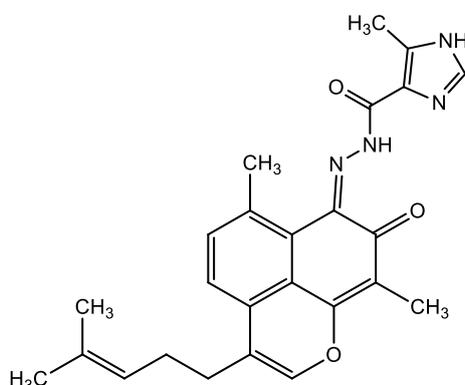
O composto foi obtido, conforme representado no Esquema 9.



Esquema 9 - Síntese do derivado 5-metil-1H-imidazol-4-ácido carboxílico [6,9-dimetil-3-(4-metil-pent-3-enil) -8-oxo-8H-benzo[de]cromeno-7-ilideno] -hydrazida, **1a**.

Modo operatório:

Em um balão de fundo redondo com capacidade de 125 mL, foram adicionados a biflorina (94 mg / 0,3040 mmoles) e 5-metil-1H-imidazol-4-carbohidrazida (1,6 eq / 68 mg / 0,2199 mmoles), solubilizados em 3,0 mL de MeOH, e agitados a temperatura ambiente. Foi preparado uma solução de 0,5 mL de MeOH e adicionado uma gota de HCl e adicionados a mistura reacional (pH: 2), ao qual foi mantida agitada sob temperatura ambiente e monitorada por CCD durante 16h. O produto foi rotaevaporado a securo e purificado por cromatografia *flash* em sílica gel utilizando como eluente hexano/acetato de etila 60:40, com rendimento de 65%.



5-metil-1H-imidazol-4-ácido carboxílico [6,9-dimetil-3-(4-metil-pent-3-enil)-8-oxo-8H-benzo[de]cromeno-7-ilideno]-hydrazida.

➤ Dados reacionais

- Cristal alaranjado;
- Rendimento:65%

➤ Dados físico-químicos e espectrofotométricos

- **PM:** 431,14 g/mol
- **PF:** 130-131 °C
- **Rf:** 0,39 (Hexano/acetato de etila 5:5)
- **RMN¹H (600 MHz, ppm, C3D6O):** $\delta = 7,53$ (d, 1H, $J = 7,9$, H-4), 7,35 (d, 1H, $J = 8,0$, H-5), 2,54 (t, 2H, $J = 7,1$, H-10), 5,18 (tt, $J = 1,3$ e 7,1, H-12), 1,59 (s, 1H, H-14), 1,73 (s, 1H, H-15), 2,91 (br s, 1H, H-16), 2,07 (s, 1H, H-17), 2,97 (s, 1H, H-22).
- **RMN¹³C (150 MHz, ppm, C3D6O):** $\delta = 136,79$ (C-4), 121,80 (C-5), 181,34 (C-8), 112,54 (C-9), 27,69 (C-10), 122,99 (C-12), 133,49 (C-13), 18,07 (C-14), 25,93 (C-15), 27,13 (C-16), 7,60 (C-17), 12,12 (C-22).

➤ Solubilidade

- **Solúvel:**

Clorofórmio (CHCl₃)

Éter etílico- Parcialmente solúvel

Diclorometano- Parcialmente solúvel

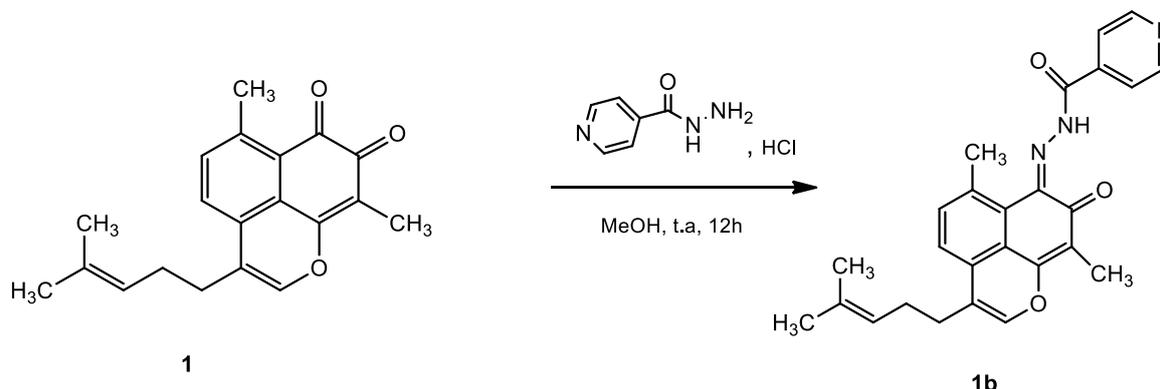
MeOH- Parcialmente solúvel à quente

- **Insolúvel:**

n-Hexano

Acetato de etila

4.2.2.4 Síntese do derivado 1b: Ácido isonicotínico [6,9-dimetil-3-(4-metil-pentil) -8-oxo-8H-benzo [de] cromeno-7-ilideno] -hidrazida.

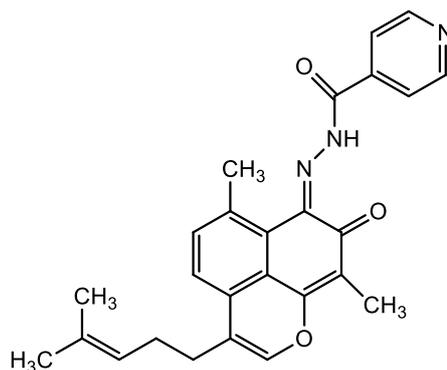


O composto foi obtido, conforme representado no Esquema 10.

Esquema 10 - Síntese do derivado ácido isonicotínico [6,9-dimetil-3-(4-metil-pentil) -8-oxo-8H-benzo [de] cromeno-7-ilideno] -hidrazida.

Modo operatório:

Em um balão de fundo redondo com capacidade de 125 mL, foram adicionados a biflorina (53,6 mg / 0,1733 mmoles) e ácido isonicotínico hidrazida (1,5 eq / 35,6 mg), solubilizados em 3,0 mL de MeOH, e agitados a temperatura ambiente. Foi preparado uma solução de 0,5 mL de MeOH e adicionado uma gota de HCl e adicionados a mistura reacional (pH: 2), ao qual foi mantida agitada sob temperatura ambiente e monitorada por CCD durante 12h. O produto foi rotaevaporado a securo e purificado por cromatografia *flash* em sílica gel utilizando como eluente hexano/acetato de etila 70:30, com rendimento de 60%.



Ácido isonicotínico [6,9-dimetil-3-(4-metil-pentil) -8-oxo-8H-benzo[de]cromeno-7-ilideno]-hidrazida

➤ Dados reacionais

- Cristal marron;
- Rendimento:60%

➤ Dados físico-químicos e espectrofotométricos

- **PM:** 428,28 g/mol
- **PF:** 169-170 °C
- **Rf:** 0,43 (Hexano/acetato de etila 7:3)
- **IVTF:(v cm⁻¹, ATR):** 2817,11; 1647,36; 1600,41; 1568,47; 1504,50; 1467,35.
- **RMN¹H (600 MHz, ppm, C₃D₆O):** δ =1,59 (s, 1H, H-14), 1,72 (s, 1H, H-15), 2,06 (s, 1H, H-17), 2,32 (q, 2H, J = 7.4, H-11), 2,56 (t, 2H, J = 7,4, H-10), 2,86 (br s, 3H, H-16), 5,18 (tt, 1H, J = 1.3 e 7,0, H-12), 7,13 (s, 1H, H-2), 7,41 (d, 1H, J = 8,0, H-5), 7,56 (d, 1H, J = 8,0, H-4), 8,07 (br s, 2H, H-20/20'), 8,93 (br s, 2H, H-21/21').
- **RMN¹³C (150 MHz, ppm, C₃D₆O):** δ =7,47 (C-17), 18,06 (C-14), 25,90 (C-15), 26,92 (C-16), 27,14 (C-11), 27,65 (C-10), 112,36 (C-9), 117,74 (C-3), 120,76 (C-6), 122,55 (C-5), 122,82 (C-12), 122,93 (C-20/20'), 129,06 (C-3a), 129,22 (C-6a), 133,65 (C-13), 137,35 (C-4), 140,15 (C-2), 140,98 (C-9b), 163,97 (C-9a), 181,62 (C-8).

➤ Solubilidade

- **Solúvel:**

Clorofórmio (CHCl₃)

Metanol (MeOH) – Parcialmente solúvelà quente

Éter etílico- Parcialmente solúvel

Diclorometano-Parcialmente solúvel

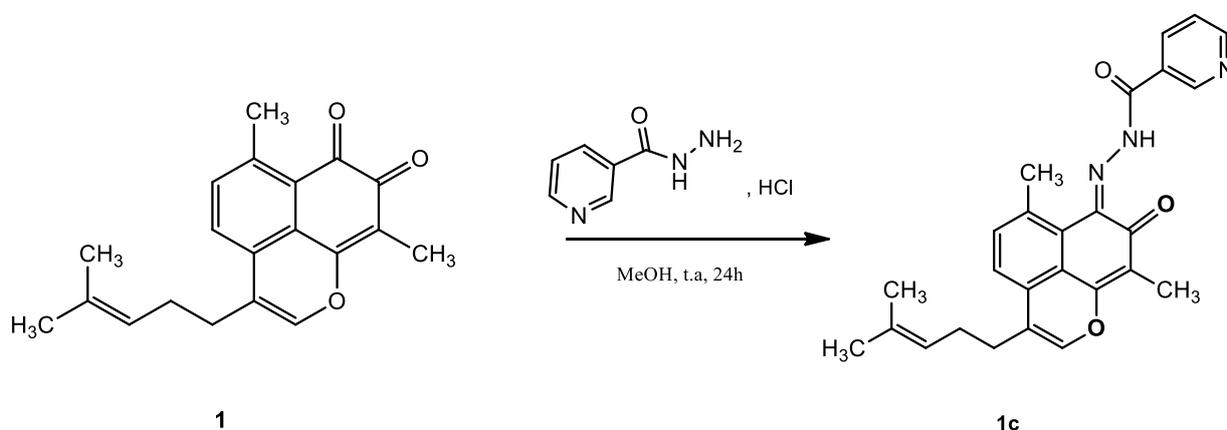
- **Insolúvel:**

n-Hexano

Acetato de etila

4.2.2.5 Síntese do derivado 1c: ácido nicotínico [6,9-dimetil-3-(4-metil-pent-3-enil) - 8-oxo-8H-benzo[de]cromeno-7-ilideno]-hidrazida

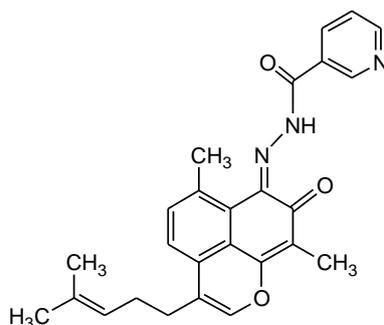
O composto foi obtido, conforme representado no Esquema 11.



Esquema 11 - Síntese do derivado 1c ácido nicotínico [6,9-dimetil-3-(4-metil-pent-3-enil) -8-oxo-8H-benzo[de]cromeno-7-ilideno] -hidrazida.

Modo operatório:

Em um balão de fundo redondo com capacidade de 125 mL, foram adicionados a biflorina (42,5 mg / 0,1374 mmoles) e hidrazida nicotínica (1,5 eq / 28,2 mg), solubilizados em 3,0 mL de MeOH, e agitados a temperatura ambiente. Foi preparado uma solução de 0,5 mL de MeOH e adicionado uma gota de HCl e adicionados a mistura reacional (pH: 2), ao qual foi mantida agitada sob temperatura ambiente e monitorada por CCD durante 10h. O produto foi rotaevaporado a securo e purificado por cromatografia *flash* em sílica gel utilizando como eluente hexano/acetato de etila 70:30, com rendimento de 57%.



Ácido nicotínico [6,9-dimetil-3-(4-metil-pent-3-enil) -8-oxo-8H benzo[de]cromeno-7-ilideno]-hidrazida

➤ Dados reacionais

- Cristal avermelhado;
- Rendimento: 57 %

➤ Dados físico-químicos e espectrofotométricos

- **PM:** 428,28 g/mol
- **PF:** 140-143 °C
- **Rf:** 0,43 (Hexano/acetato de etila 7:3)
- **IVTF:(v cm⁻¹, ATR):** 2917,38; 1644,91; 1603,22; 1585,17; 1469,31; 1423,50.
- **RMN¹H (600 MHz, CDCl₃):** δ = 1,60 (s, 3H, H-14), 1,74 (s, 3H, H-15), 2,07 (s, 3H, H-17), 2,33 (q, 2H, J = 7,5, H-11), 2,56 (t, 2H, J = 7,5, H-10), 2,86 (br s, 3H, H-16), 5,19 (t, 1H, J = 6,9, H-12), 7,10 (s, 1H, H-2), 7,39 (d, 1H, J = 8,1, H-5), 7,55 (d, 1H, J = 8,1, H-4), 7,59 (dd, 1H, J = 5,0 and 7,9, H-22), 8,45 (d, 1H, J = 7,9, H-21), 8,86 (dd, 1H, J = 1,5 e 5,0, H-23), 9,34 (s, 1H, H-19).
- **RMN¹³C(150 MHz, CDCl₃):** δ = 7,47 (C-17), 18,06 (C-14), 25,91 (C-15), 26,98 (C-16), 27,10 (C-11), 27,64 (C-10), 112,28 (C-9), 117,58 (C-3), 120,70 (C-6), 122,24 (C-5), 122,86 (C-12), 124,49 (C-22), 129,05 (C-3a), 129,16 (C-6a), 129,53 (C-20), 133,59 (C-13), 137,19 (C-4), 137,19 (C-21), 137,29 (C-

7), 140,03 (C-2), 140,68 (C-9b) 148,17 (C-19), 151,37 (C-23), 161,82 (C-9a), 162,82 (C-18), 181,59 (C-8).

➤ Solubilidade

• **Solúvel:**

Clorofórmio (CHCl₃) - à frio

Metanol (MeOH) – Parcialmente solúvel à quente

Éter etílico ((C₂H₅)₂O) -Parcialmente solúvel

Diclorometano- Parcialmente solúvel

• **Insolúvel:**

n-Hexano

Acetato de etila

4.2.3 Metodologia Biológica

4.2.3.1 Avaliação da atividade imunomoduladora

Nesta seção será apresentada a metodologia para a atividade imunomoduladora da biflorina.

4.2.3.1.1 Preparação dos esplenócitos

Esse procedimento foi realizado de acordo com um protocolo anterior (MELO *et al.*, 2011). Após a eutanásia dos animais com cloridrato de xilazina a 2% e cloridrato de cetamina a 10% seguida de deslocamento cervical, o baço de cada camundongo foi removido assepticamente e colocado em um tubo Falcon contendo RPMI 1640 com soro fetal bovino (meio completo). Em um fluxo vertical, cada baço foi transferido para uma placa de Petri onde eles estavam encharcados. As suspensões de células obtidas de cada baço foram transferidas para tubos Falcon contendo aproximadamente 10 mL de meio incompleto. Os homogenatos do baço foram cobertos sobre uma camada Ficoll-PaqueTM PLUS, com a densidade ajustada para

1,076 g/ml e centrifugados a 1000 g à temperatura ambiente durante 25 min. A camada de células de interface contendo células imunes foi recuperada por pipeta Pasteur, lavada duas vezes em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e centrifugada duas vezes a 500g por 10 min. As células foram contadas numa câmara de Neubauer e a viabilidade celular foi determinada pelo método exclusivo do azul de tripano. As células foram usadas apenas quando a viabilidade era > 98%.

4.2.3.1.2 Análise da viabilidade celular

Esplenócitos foram tratados com 3-50 µg / mL de biflorina por 24 h de incubação, assim como as células não tratadas, foram centrifugados a 450 x g a 22 ° C por 10 min. Após descartar o sobrenadante, 1 mL de PBS 1X foi adicionado ao precipitado e após ressuspensão, as células foram novamente centrifugadas (450 xg, 22°C, 10 min). O sedimento foi ressuspensado em 300 µl de tampão de ligação, transferido para um tubo de citômetro marcado e conjugado com Anexina V com Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) (1: 500) e Iodeto de Propídio (PI, 20 µg / mL⁻¹). A citometria de fluxo foi realizada em uma plataforma FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, EUA) e os resultados foram analisados utilizando o software CellQuest Pro (BD Biosciences).

4.2.3.1.3 Ensaio de proliferação usando coloração CFSE

O mesmo protocolo para obtenção de esplenócitos foi utilizado para o ensaio de proliferação. Depois de adquirir os esplenócitos, a solução celular foi centrifugada a 300 x g à temperatura ambiente durante 5 min com PBS 1X contendo SFB 5% (pH 7,2) estéril. A solução celular foi então ajustada para 10⁷ cels / mL e recebeu 5 mmol.L⁻¹ do éster N-succinimidil do diacetato de 5 (6) -carboxifluoresceína (CFSE). As células foram incubadas durante 10 min a 28 ° C no escuro e depois centrifugadas duas vezes a 300 x g / 5 min com PBS 1X estéril. Células coradas foram cultivadas por 24 h com 6 µg / mL de biflorina ou apenas com meio de cultura (controle negativo). Após o tempo de cultura, as células foram centrifugadas (300 x g / 5 min) e analisadas numa plataforma FACSCalibur (Becton Dickinson Biosciences) acoplada a um software Cell Quest Pro (Becton Dickinson).

4.2.3.2 Avaliação da atividade citotóxica

4.2.3.2.1 MTT

O ensaio de MTT (brometo de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazólio) consiste em um ensaio colorimétrico que avalia a atividade citotóxica ou proliferativa de diversos compostos. O MTT é um sal solúvel em água, que é convertido em cristais de formazan, com coloração púrpura, após a clivagem do anel tetrazólio mediado por desidrogenases mitocondriais e citoplasmáticas. Após a solubilização dos cristais de formazan e medição da densidade óptica pelo espectrofotômetro ($\lambda = 560$ nm) é possível avaliar a viabilidade celular, onde a intensidade do produto colorido formado após a solubilização do formazan será diretamente proporcional ao número de células viáveis presentes na amostra (FAHEINA-MARTINS, 2009).

4.2.3.2.2 Análise dos resultados

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software GraphPad versão 5.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA). Utilizou-se Análise de Variância ANOVA seguido do pós- teste Bonferroni, sendo considerando uma diferença significativa quando $p < 0,05$. Os testes foram feitos em triplicada e repetidos 3 vezes.

4.2.3.2.3 Avaliação antimicrobiana

As espécies de bactérias e fungo utilizadas nos ensaios antimicrobianos foram obtidas a partir das coleções do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco e micoteca URM. Os microorganismos testados estão listados no quadro abaixo (Quadro 2).

Quadro 2 – Espécies de bactérias e fungos utilizados nos ensaios de atividade antimicrobiana para os compostos sintetizados.

Bactérias Gram-positivas (G+)	<i>Staphylococcus aureus</i> (UFPEDA 02) <i>Staphylococcus aureus</i> (UFPEDA 709) <i>Staphylococcus epidermidis</i> (UFPEDA 58)
Bactéria Gram-negativa (G-)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFPEDA 416)
Fungo leveduriforme (FL)	<i>Candida albicans</i> (UFPEDA 1007)

4.2.3.2.4 Preparo do inóculo

A partir de uma cultura de micro-organismos cultivada durante 24 h, foi preparada uma suspensão, utilizando inicialmente a escala 0,5 de McFarland e a calibração em espectrofotômetro a 625 nm para as bactérias e 530 nm para a levedura, obtendo-se uma faixa entre 0,08 e 0,13 de densidade ótica correspondente a concentração de células de aproximadamente $1,5 \times 10^8$. Em seguida foi realizada uma diluição desta para a obtenção da concentração de $1,5 \times 10^6$, ao qual foi utilizada no plaqueamento.

4.2.3.2.5 Determinação da atividade antimicrobiana

Os ensaios foram realizados por meio do método de difusão em ágar pela técnica de poços modificado de Grove e Randall, 1955. Foram utilizadas placas de petri contendo 20 mL de meio de cultura sólido Mueller Hinton ágar (MH) para as bactérias e Mueller Hinton ágar + 2% de glicose e azul de metileno para a levedura. Em seguida com o auxílio de um cilindro foram perfurados blocos de 6 mm de diâmetro no meio de cultura, os blocos foram então removidos e em cada poço foi depositado 50 µg/mL de ágar para compor a base. Após a solidificação do meio, o inóculo foi espalhado com o auxílio de um swab sobre toda a superfície da placa, em seguida foi adicionado em cada poço 30 µg/mL da substância teste em diferentes concentrações. As placas foram incubadas a 37° C durante 24 horas para as bactérias e 48 horas para a levedura. Após este período foi analisada a formação de halos de inibição e foi determinada como concentração mínima inibitória a menor concentração da substância com capacidade de formar halo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 ISOLAMENTO DA BIFLORINA

Tendo em vista a importância de compostos bioativos na pesquisa científica, principalmente como agentes terapêuticos, especialmente os de origem vegetal, a busca por novas estratégias para a obtenção destes, é de extrema importância, visto que, estas moléculas geralmente são isoladas em baixas quantidades e muitas vezes, devido a sua complexidade estrutural não é facilitada por métodos sintéticos mais rápidos (SANGI, 2016). Portanto, se faz necessário o desenvolvimento de métodos que sejam mais rápidos e rendam mais, tanto na quantidade isolada quanto na economia de materiais e solventes a serem utilizados.

Em relação a todos os métodos descritos na literatura para a obtenção da biflorina, estes apresentam algumas desvantagens comparados ao novo método desenvolvido neste trabalho. De modo geral, os métodos para isolamento da biflorina apresentam a necessidade de uma grande quantidade de solventes e de material para o processo e um elevado tempo de execução, resultando em rendimentos baixos.

Portanto, no intuito de melhorar, principalmente o rendimento da biflorina, aplicamos um novo método de extração e purificação simultânea (GÓES, 2018). Inicialmente realizamos uma triagem fitoquímica da *C. biflora*, no intuito de investigar se em outra parte da planta (folhas e caule) e em qual região da raiz, havia a presença abundante da biflorina (Figura 10). Dessa forma, em cada Erlenmeyer foram adicionados 10g de cada estrutura da planta (folha, caule e raiz) e vertidos aproximadamente 80mL de éter etílico. A escolha deste solvente baseou-se na ótima solubilidade da biflorina. Após algumas horas, realizamos a CCD e verificamos que apenas na região mais espessa da raiz havia a presença da biflorina, comparada então, à referência desta substância pura. Após a confirmação da presença da biflorina, separamos a parte espessa da raiz e deixamos secar ao ar e por fim, trituramos em partículas extremamente finas, ao qual foi submetida ao processo de extração e purificação simultânea (Figura 11).

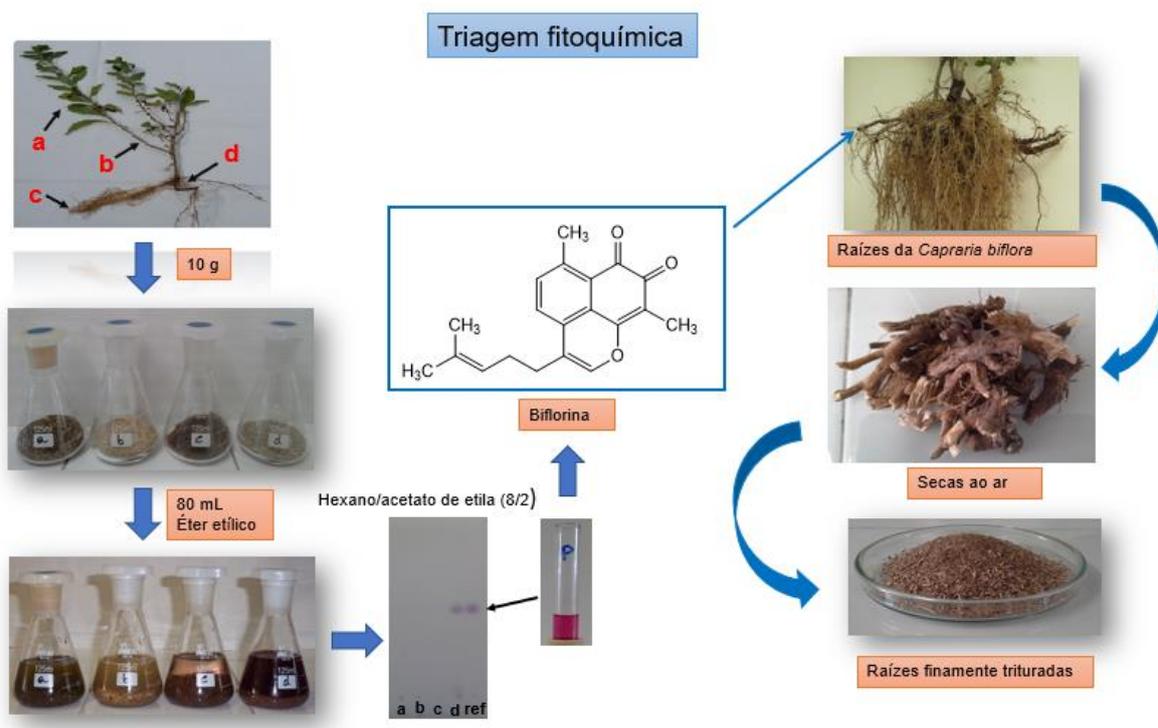


Figura 10 - Triagem fitoquímica da *Capraria biflora*.

O novo método de extração e purificação simultânea desenvolvido neste trabalho, consiste na passagem do sistema de solvente através da serragem da raiz da *C. biflora*, e a medida que o extrato foi surgindo, houve a separação do produto através da coluna de sílica, retida na parte inferior do aparelho Góes. Os resultados demonstraram que esse processo (Figura 11) mostrou-se mais eficiente e com excelente rendimento quando comparado aos métodos descritos na literatura. Durante 5 horas e utilizando 20 g de serragem, 25 g de gel de sílica e 150 mL de eluente, obtivemos 126,6 mg do composto puro, com rendimento de 0,6%. Vale salientar que, neste processo também é possível aumentar a quantidade de serragem e manter as mesmas quantidades de eluente e sílica, além de ter aplicabilidade industrial. Tanto quanto sabemos, este é o maior rendimento obtido em comparação com os relatados na literatura para a biflorina.

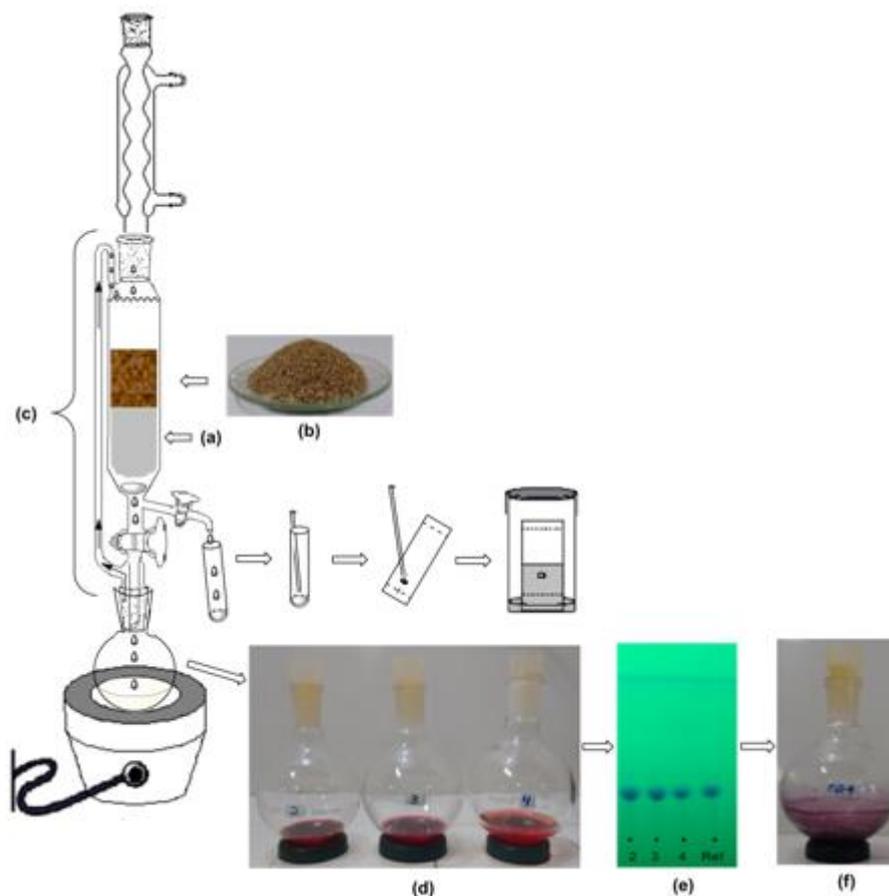


Figura 11 - Processo de extração e purificação simultânea da biflorina. (a) gel de sílica. (b) serragem das raízes da *C. biflora*. (c) Aparelho Góes. (d) Frações coletadas. (e) CCD Hexano/acetato de etila 8:2 (R_f = 0.39). (f) Biflorina pura (SILVA *et al.*,2019).

5.2 ENSAIOS DE SÍNTESE DOS DERIVADOS *N*-ACILIDRAZONAS (1A-C)

A síntese dos derivados *N*-acilidrazonas a partir da biflorina (**1a-c**), ocorreu utilizando três nucleófilos diferentes, das classes das acilidrazinas, através de uma reação de condensação (Figura 12).

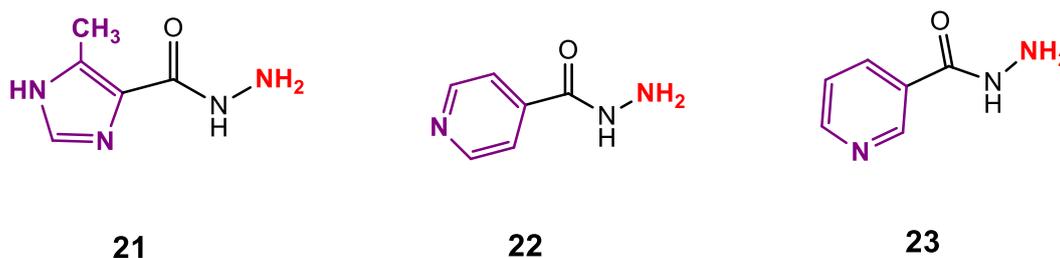
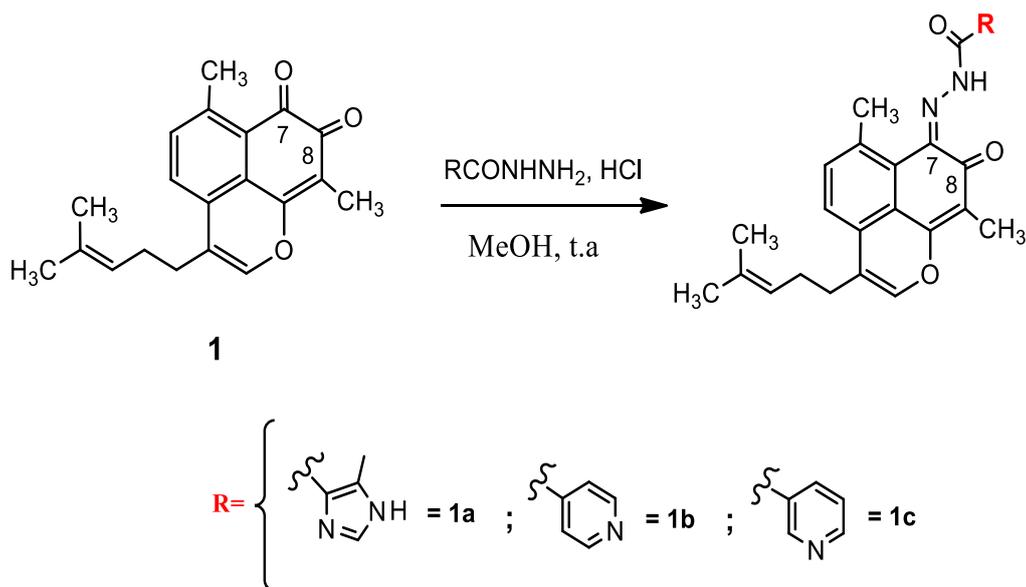


Figura 12 - Nucleófilos usados na síntese dos derivados *N*-acilidrazonas **1a-c**, a partir da biflorina.

Para a obtenção dos derivados *N*-acilidrazonas, foi realizada a síntese da biflorina com acilidrazinas (Esquema 12). A reação da biflorina com a hidrazida nicotínica, resultou em um rendimento de 57% para o derivado *N*-acilidrazona **1c** e ao utilizar a isoniazida, obtivemos 60% de rendimento para o **1b**, e por fim ao adicionar o 5-metil-1H-imidazol-4-carbohidrazida obteve-se 65% de rendimento para o derivado **1a**, apresentando o maior rendimento desta série.



Esquema 12 - Síntese dos derivados *N*-acilidrazonas **1a-c**, a partir da biflorina **1**.

É sabido que, a biflorina possui em sua estrutura química duas carbonilas a C-7 e C-8, sendo estas, a região de ataque nucleofílico dos derivados hidrazidas (SOUZA *et al.*,2016). Diante dos resultados, nota-se que a adição nucleofílica ocorreu na carbonila C-7, por ser a região mais eletrofílica da molécula, dando origem aos novos derivados hidrazonas (Figura 13).

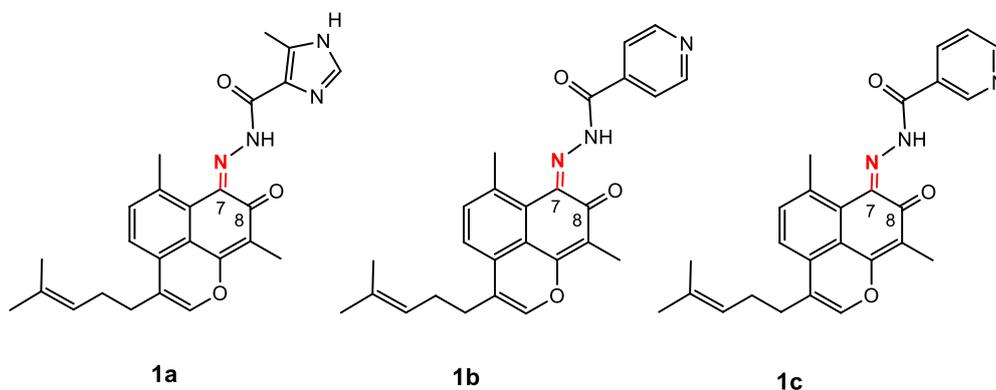
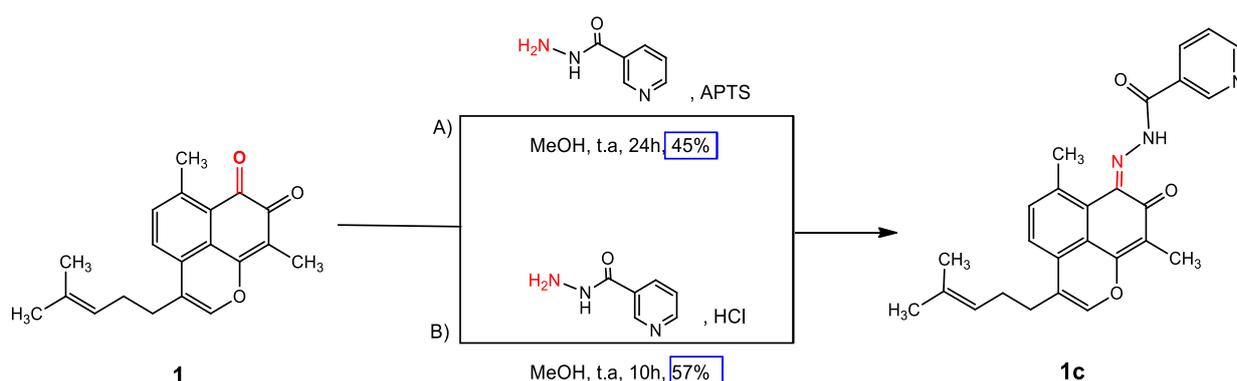


Figura 13 - Estrutura química dos derivados hidrazonas. A região de adição nucleofílica, está destacada em vermelho.

O primeiro ensaio de síntese a ser realizado foi para a obtenção do derivado **1c**. Duas condições reacionais (A e B) foram testadas: A) Por tratamento da biflorina com hidrazida nicotínica, usando ácido *p*-toluenossulfônico (APTS) como catalisador em presença de metanol à temperatura ambiente e B) Por tratamento da biflorina com hidrazida nicotínica, usando ácido clorídrico concentrado (HCl) como catalisador em presença de metanol à temperatura ambiente. As condições reacionais empregadas estão ilustradas no Esquema 13.



Esquema 13 – Condições reacionais testadas no estudo de obtenção do derivado **1c**.

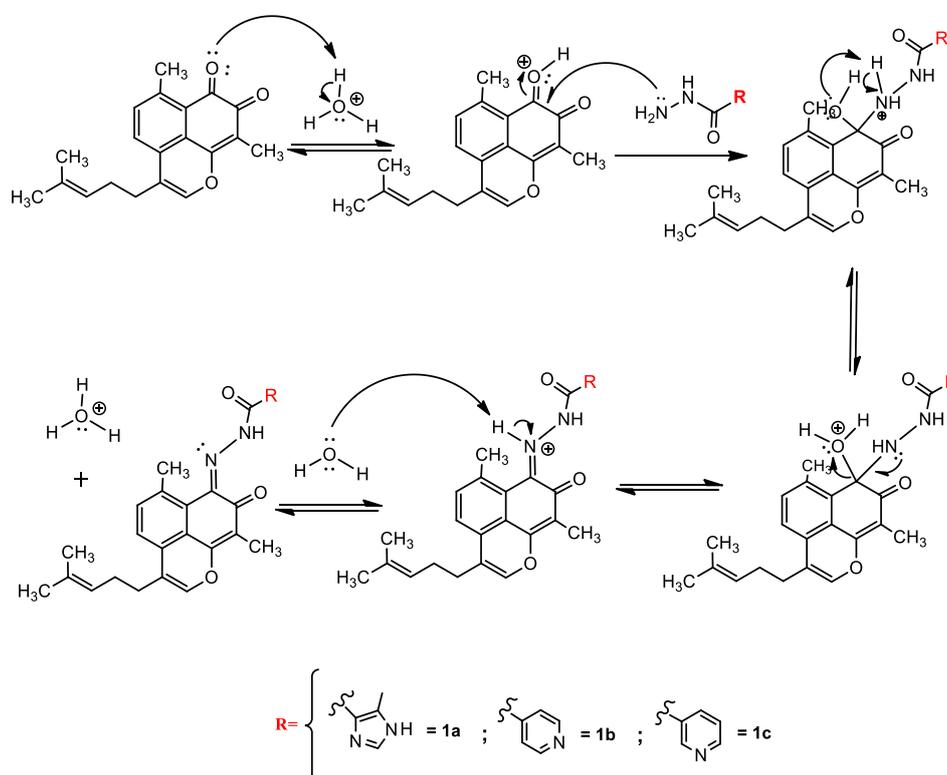
Inicialmente nós utilizamos a condição reacional A), mas obtivemos o derivado **1c** com rendimento de 45 % após 24 horas. No intuito de aumentar o rendimento da reação, testamos a condição reacional B), alterando o catalisador, de APTS para HCl. A aplicação da metodologia B) forneceu o derivado **1c** com um rendimento de 57 % após 10 horas. Em função de sua eficiência sintética, a condição B foi escolhida como padrão para a obtenção dos compostos **1a-c** (Quadro 3). Diante do exposto, constatamos que todas as reações, apresentaram rendimentos significativos, tendo em vista que foram metodologias simples de obtenção.

Quadro 3 - Dados reacionais gerais dos derivados *N*-acilidrazonas **1a-c**.

Derivados	Reagentes (com a biflorina)	Temperatura °C	Tempo reacional	Cor dos cristais	Rendimento %
1a	5-metil-1H-imidazol-4-carbohidrazida (MeOH, HCl)	Ambiente	16h		65%
1b	Isoniazida (MeOH,HCl)	Ambiente	12h		60%
1c	Hidrazida nicotínica (MeOH, HCl)	Ambiente	24h		57%

5.3 MECANISMO DE REAÇÃO PROPOSTO PARA A FORMAÇÃO DOS COMPOSTOS 1a-c.

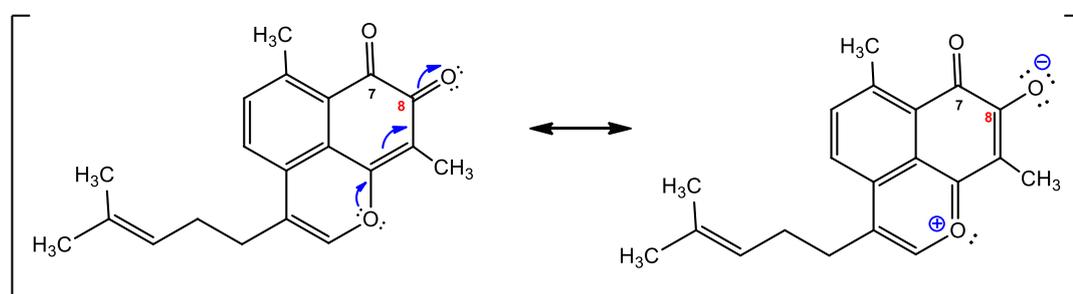
Anteriormente, foi apresentado na Figura 12 os nucleófilos utilizados para a obtenção dos derivados hidrazonas. Vale salientar que, o 5-metil-1H-imidazol-4-carbohidrazida foi obtido por adaptação à metodologia sintética realizada por Liesen e colaboradores, e os demais, obtidos comercialmente. O Esquema 14 representa o mecanismo proposto, de forma independente, para todos os derivados.



Esquema 14 - Mecanismo de reação proposto para a obtenção dos derivados **1a-c**.

O mecanismo de reação para formação dos derivados *N*-acilidrazonas (**1a-c**), inicia-se com a protonação do oxigênio da carbonila C-7, produzindo um íon oxônio. Posteriormente, ocorre um ataque nucleofílico do par de elétrons do nitrogênio primário hidrazínico da acilidrazina ao carbono C-7, formando um intermediário hemiaminal *N*-protonado. Em seguida o par de elétrons da hidroxila captura o próton, formando uma molécula de água, ao qual sua saída (desidratação), resultará na formação do grupo imina (C=N) após a remoção de um próton.

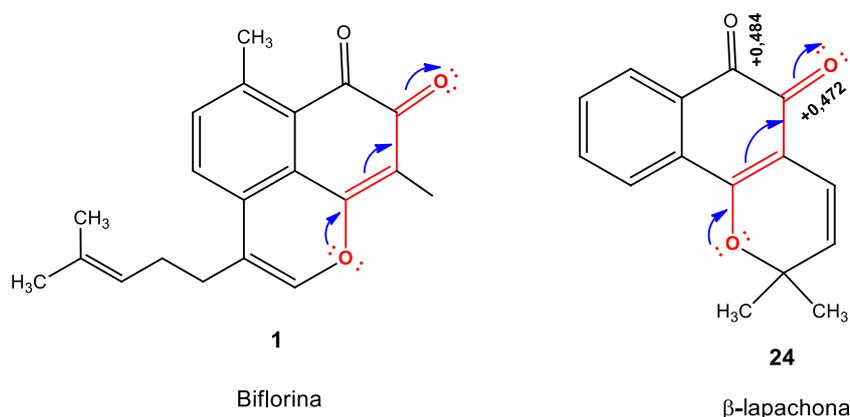
Como mencionado anteriormente, o carbono da carbonila C-7 da biflorina é mais eletrofílico ou mais parcialmente positivo do que o da carbonila C-8, o que justifica o ataque nucleofílico da acilidrazina nessa carbonila. A maior afinidade nucleofílica da carbonila C-7 frente as acilidrazinas estudadas, deve-se ao efeito de ressonância demonstrado pela biflorina (Esquema 15). Supondo que, apareça uma carga formal positiva no carbono da carbonila C-8, esta é neutralizada pelos elétrons π da dupla ligação conjugada, formando uma segunda carga positiva no oxigênio do heterociclo, gerando um íon oxônio, conferindo estabilidade a esta parte da molécula. No contrário, se uma carga positiva for gerada no carbono C-7, não poderá ser estabilizada por ressonância, mesmo que esteja próxima do anel aromático, visto que, um anel aromático é muito estável para perder a aromaticidade, e neste caso estabilizar o carbono da carbonila.



Esquema 15 - Estrutura de ressonância apresentada pela biflorina.

Um outro fator contribuinte para esse caso, é que estudos realizados com a β -lapachona, que também é uma 1,2-naftoquinona e que apresenta esse sistema de

ressonância (Esquema 16), demonstraram que a mesma, possui seletividade por esta carbonila mais eletrofílica (FERREIRA *et al.*, 2010).



Esquema 16 - Estrutura química da biflorina e da β-lapachona. Sistema de ressonância destacado nas duas 1,2-naftoquinona, em vermelho.

Ferreira e colaboradores, através de cálculos de parâmetros estruturais, notaram que havia uma planaridade entre os anéis A e B da β-lapachona. Contudo, os valores de densidade de cargas nas carbonilas foram calculados (Esquema 16), e que apesar da diferença de carga ser pequena, ainda assim, corroboraram com os experimentos observados (FERREIRA *et al.*, 2010), favorecendo então, a explicação da preferência dos nucleófilos por esta parte da molécula, ou seja, a região mais eletrofílica.

5.4 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS

As análises espectrométricas da biflorina e seus derivados (**1a–1c**) serão discutidos nas seções a seguir.

5.4.1 Caracterização da biflorina

Os diferentes prótons da biflorina são expressos em ppm, referente aos seus deslocamentos químicos (δ) em relação ao padrão tetrametilsilano (TMS). No espectro de RMN ^1H , encontramos dois simpletos que condiz aos hidrogênios dos grupos metilas (H-14) e (H-15), com deslocamento químico de 1,60e 1,74 ppm, respectivamente. Outros dois simpletos referentes aos hidrogênios de grupos metilas,

encontram-se em 2,01 ppm para o H-17 e 2,74 ppm para o H-16. O hidrogênio metilênico (H-11), aparece com deslocamento químico em 2,28 ppm e apresenta-se em um quarteto sendo $J^{\beta} = 7,2$ Hz. O H-10, apresenta-se como um tripleto com deslocamento químico de 2,53 ppm, $J^{\beta} = 7,2$. E o H-12 aparece em um simpleto com deslocamento químico de 5,18 ppm. Em 7,10 ppm notamos um simpleto do hidrogênio H-2 e os dois hidrogênios aromáticos, H-5 e H-4 apresentam-se como dois dupletos, ambos com $J^{\beta} = 8,1$ Hz, e com deslocamentos químicos de 7,42 e 7,54 ppm, respectivamente. A estrutura química da biflorina encontra-se com seus hidrogênios numerados e seus respectivos deslocamentos químicos, apresentados na Figura 14. Os espectros detalhados podem ser observados nas Figuras 15 a 17.

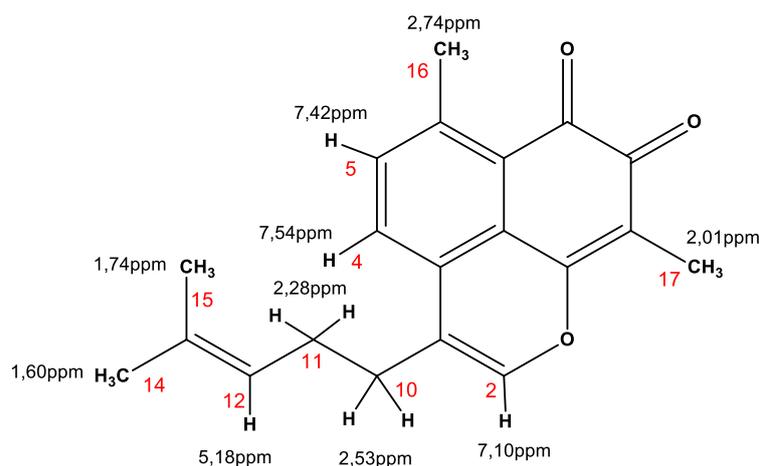


Figura 14 - Estrutura química da biflorina, com os carbonos numerados e os respectivos deslocamentos químicos (δ).

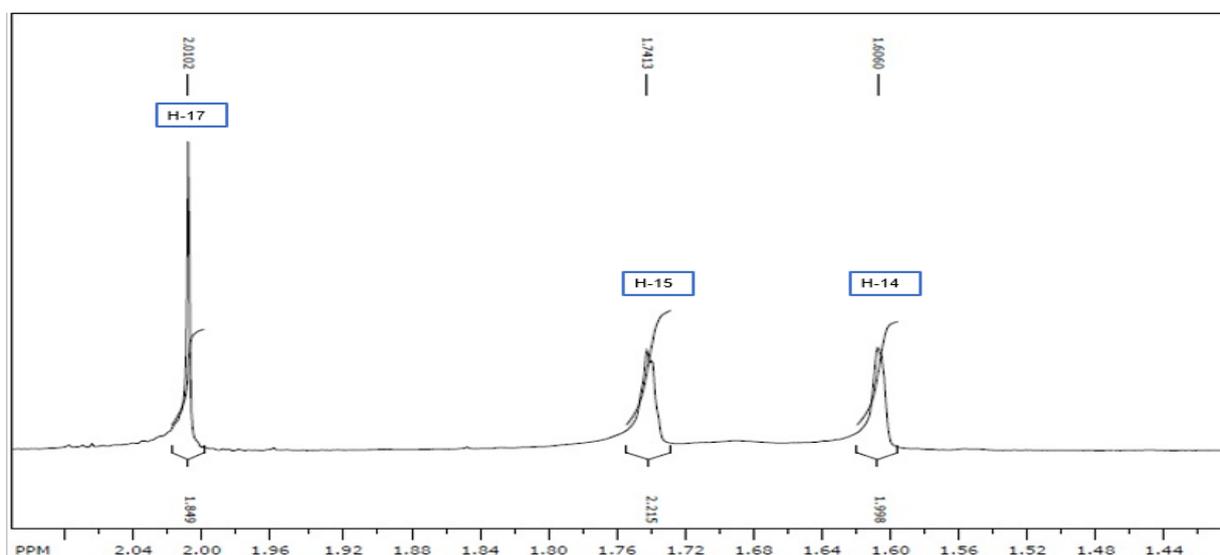


Figura 15 - Espectro ampliado de RMN ^1H da biflorina. Sinais referentes aos hidrogênios 14,15 e 17.

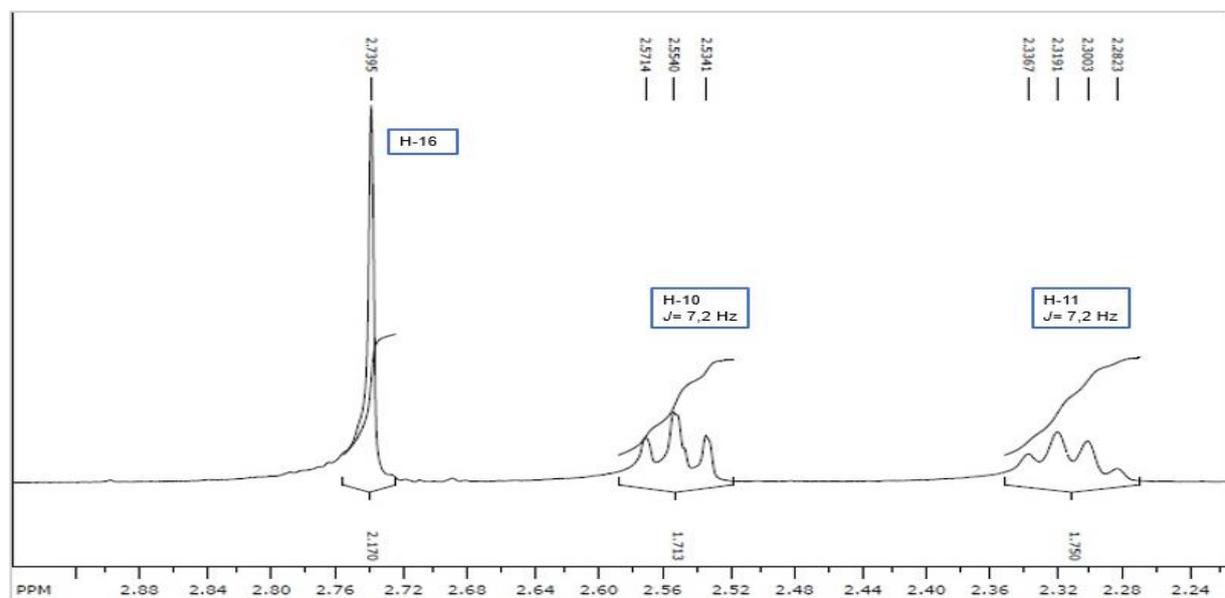


Figura 16 - Espectro ampliado de RMN ^1H da biflorina. Sinais referentes aos hidrogênios 10, 11 e 16.

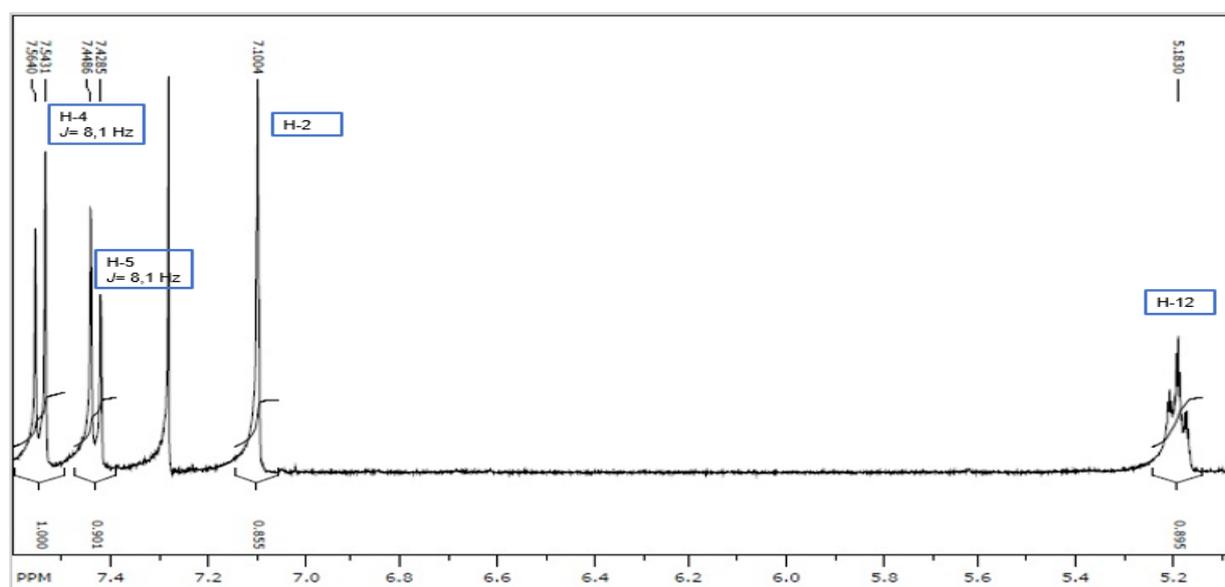


Figura 17 - Espectro ampliado de RMN ^1H da biflorina. Sinais referentes aos hidrogênios 2,4,5 e 12.

Analisando os espectros de RMN ^{13}C , os carbonos secundários (C-11 e 10) encontram-se em um deslocamento químico de 27,5 e 27,4 ppm, respectivamente. O (C-12) encontra-se no deslocamento químico de 124,3 ppm e o carbono terciário (C-

Figura 19 - Espectro geral de RMN ^{13}C da biflorina.

Nas Figuras 20 a 24, encontram-se os carbonos característicos da biflorina, identificados no espectro, pela cor azul.

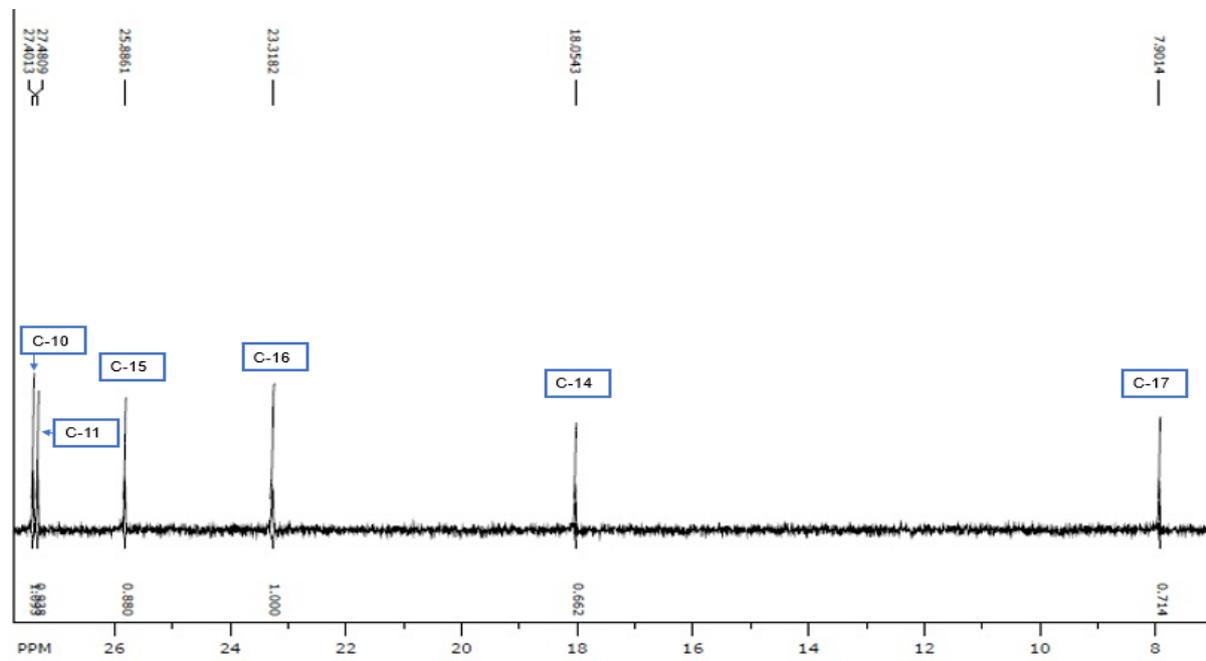


Figura 20 - Espectro de RMN ^{13}C da biflorina.

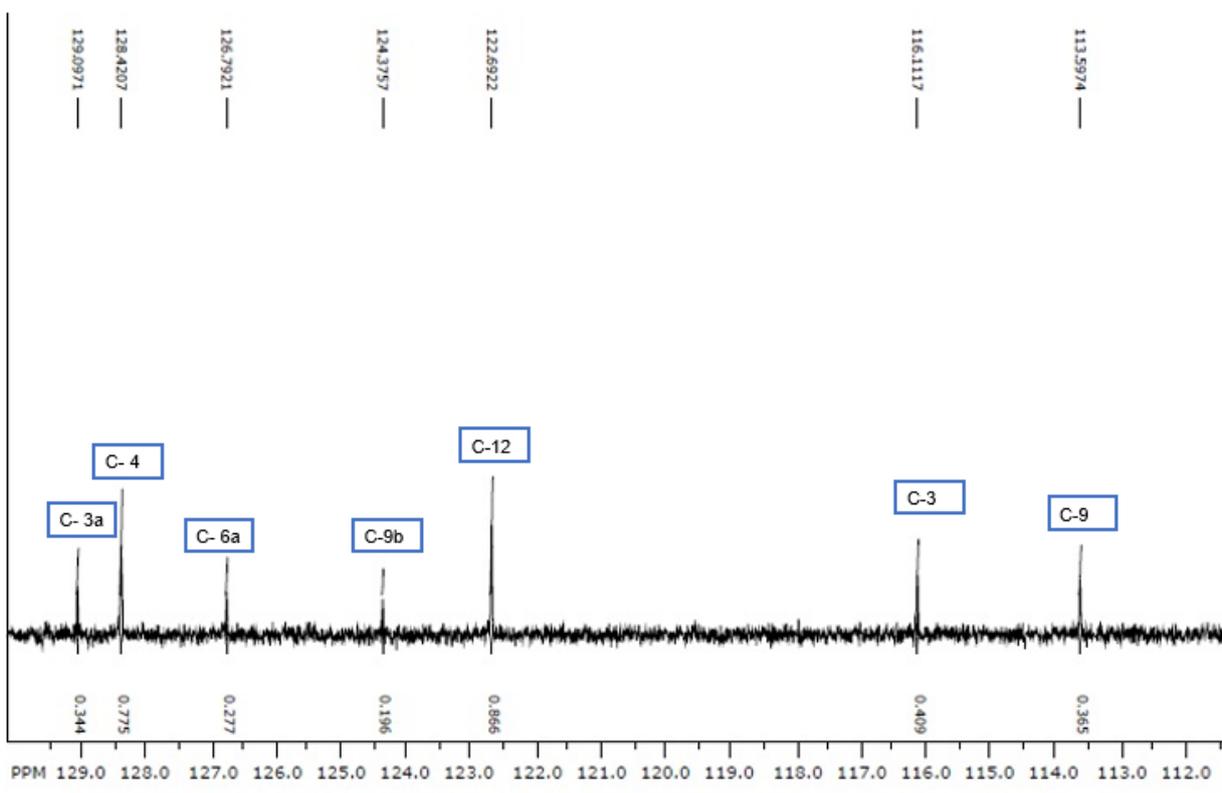


Figura 21 - Espectro de RMN ^{13}C da biflorina. Em azul, encontram-se os carbonos presentes na estrutura da biflorina.

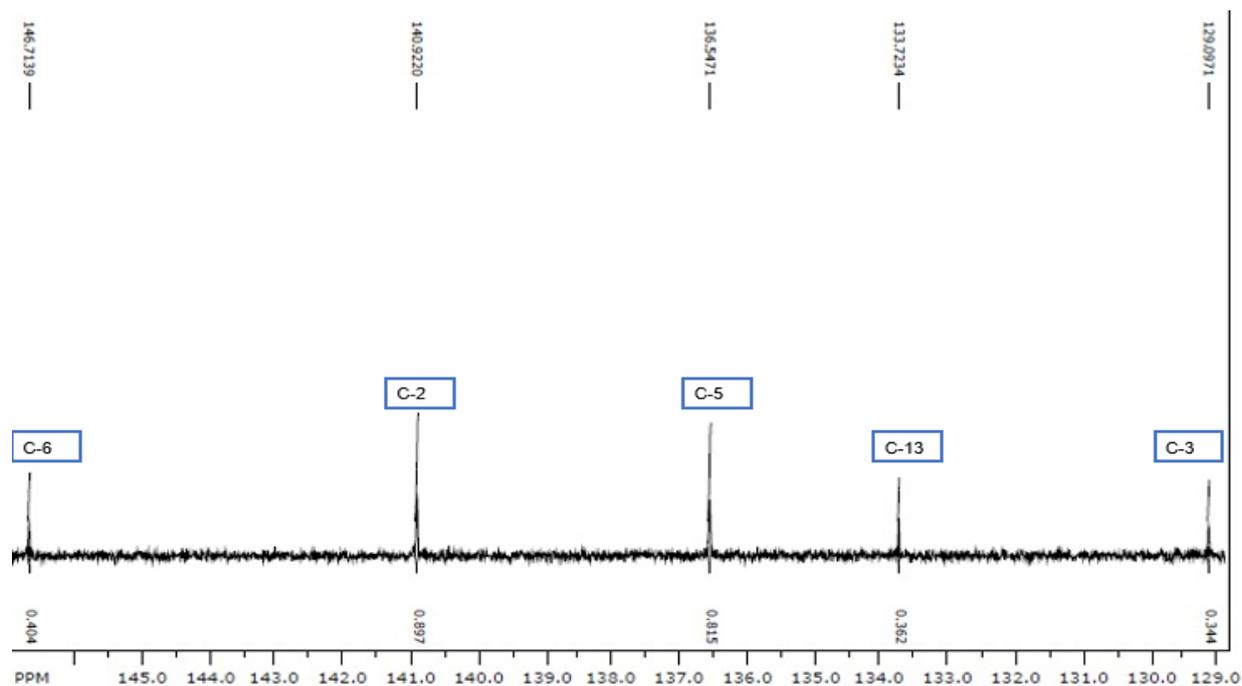


Figura 22 - Espectro de RMN ^{13}C da biflorina. Em azul, encontram-se os carbonos presentes na estrutura da biflorina.

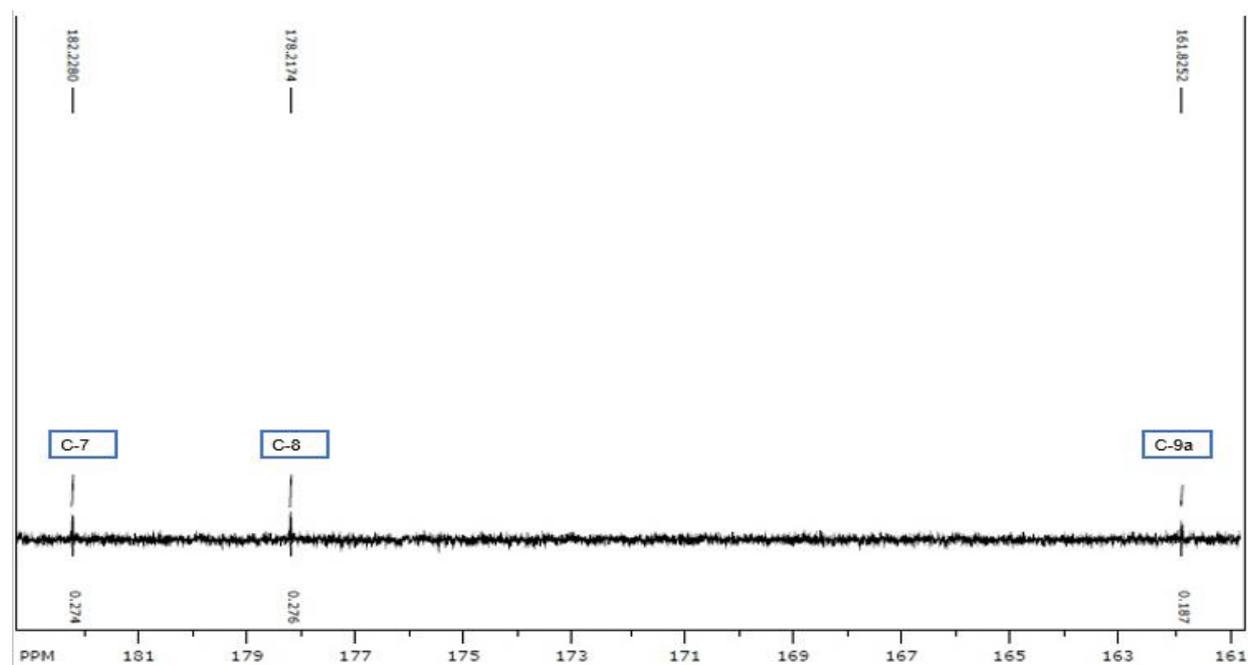


Figura 23 - Espectro de RMN ^{13}C da biflorina.

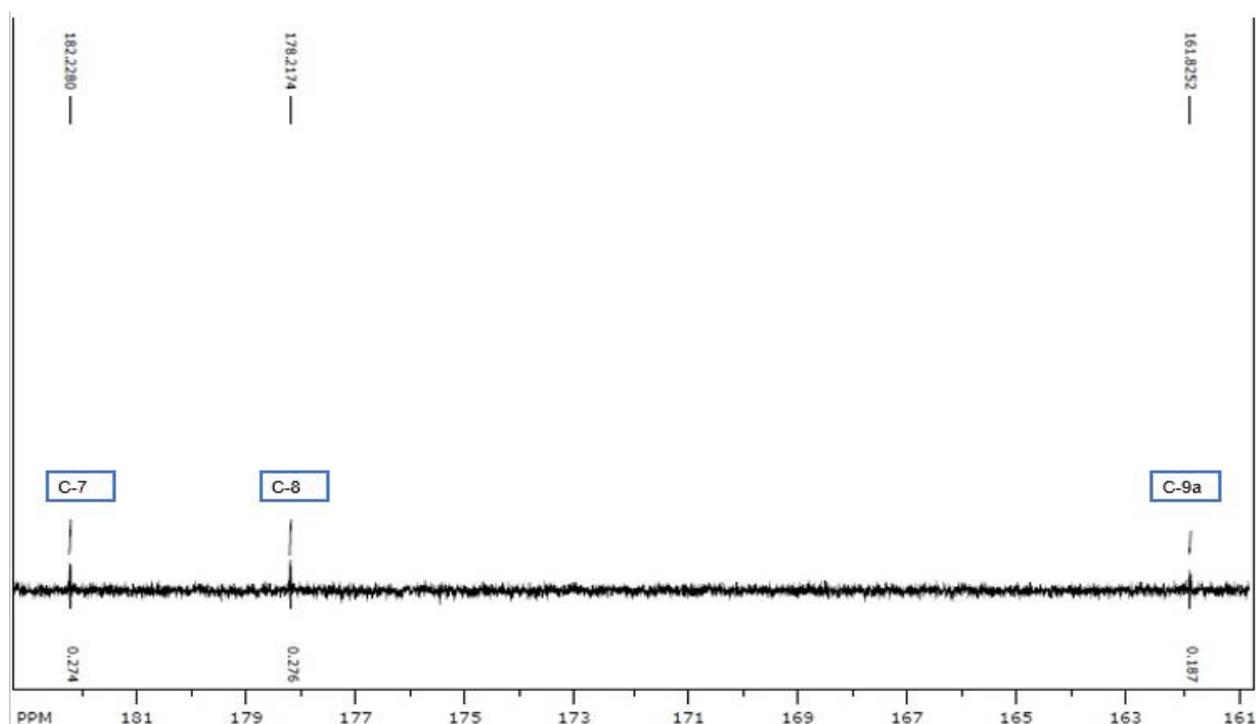


Figura 24 - Espectro de RMN ^{13}C da biflorina.

Analisando o espectro de infravermelho da biflorina (Figura 25), constatamos absorções correspondentes à deformação axial assimétrica de C-H em 2917cm^{-1} . Duas bandas de alta intensidade em 1686cm^{-1} e 1644cm^{-1} foram observadas e relacionadas às vibrações de deformação axial de C=O. Também notamos um estiramento que ocorre em 1603cm^{-1} de C=C do alqueno e a absorção em 1584 e 1572cm^{-1} foi atribuída à vibração de deformação axial de C=C do anel aromático. As bandas em 1468cm^{-1} e 1423cm^{-1} foram atribuídas às vibrações de deformação axial assimétrica e simétrica de C-O respectivamente.

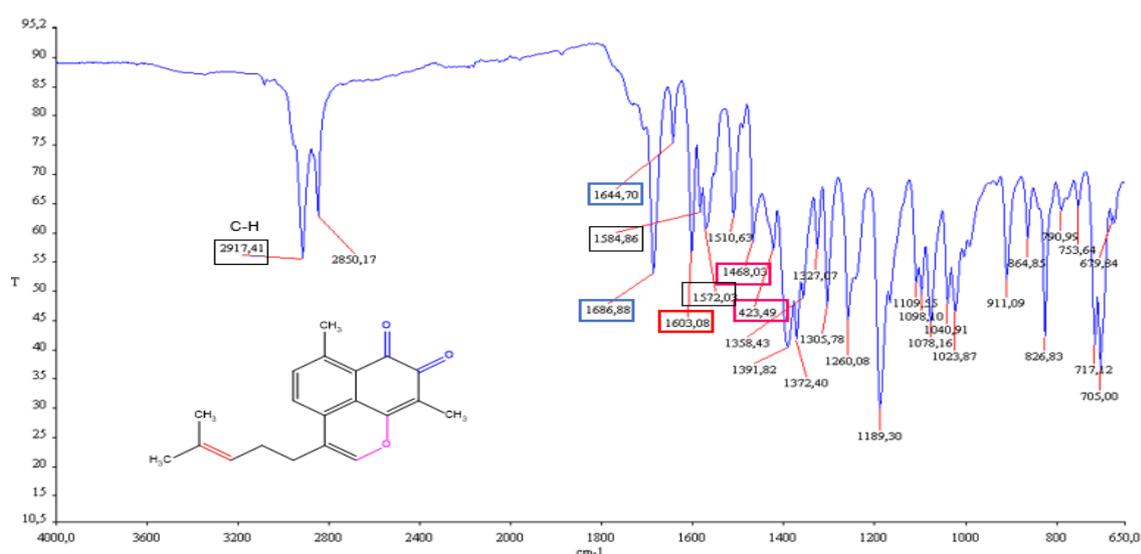


Figura 25 - Espectro de infravermelho da biflorina.

Por fim, realizamos a análise do espectro de massas de alta resolução da biflorina. A fórmula molecular da biflorina é $C_{20}H_{20}O_3$ e o valor calculado foi de 309,1485 e o experimental foi de $m/z= 309,1473$ (Figura 26).

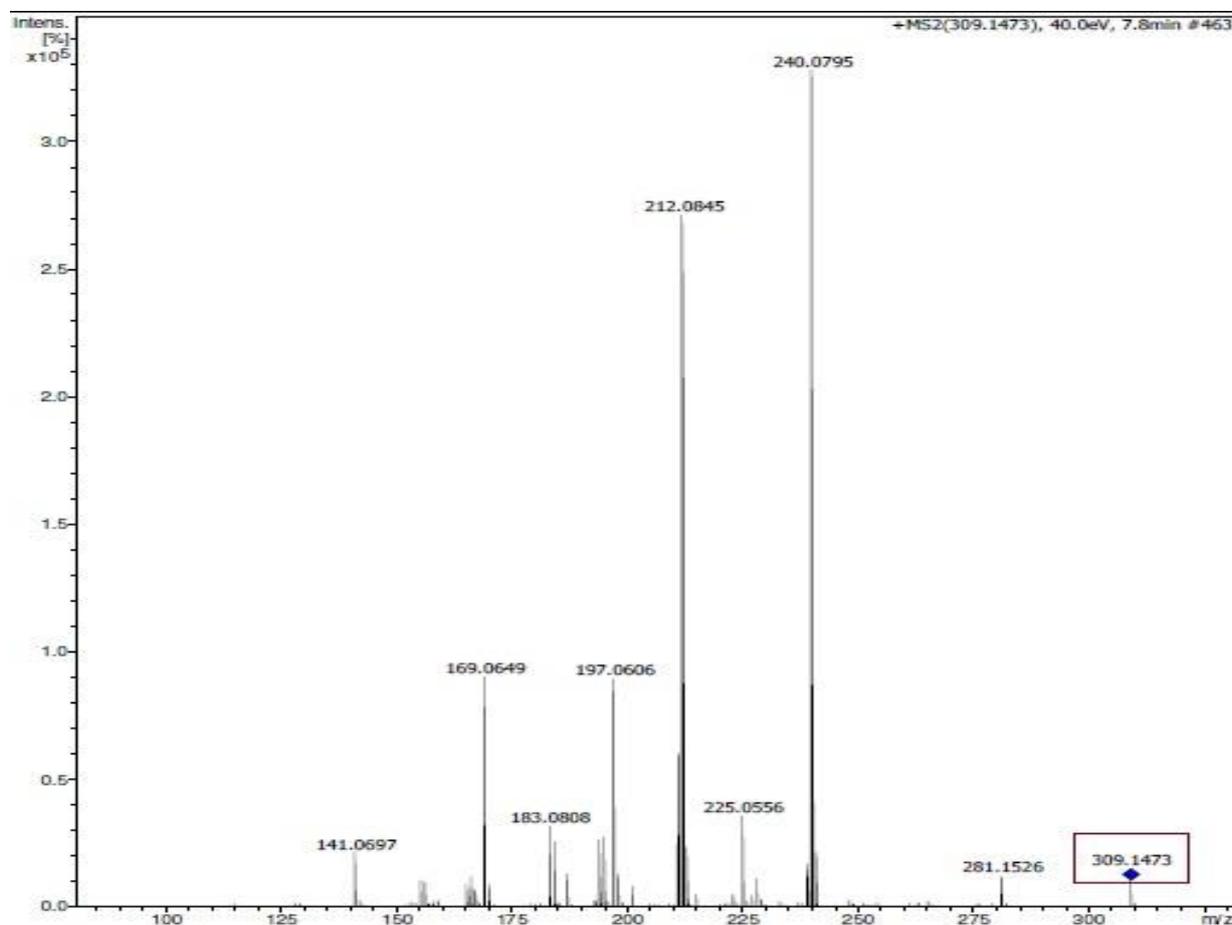


Figura 26 - Espectro de massas de alta definição da biflorina.

Analisando todos os espectros realizados, notamos que os dados corroboram com os descritos na literatura (LEMOS *et al.*, 2007e SOUZA *et al.*, 2012).

5.4.2 Caracterização dos derivados (1a-c)

5.4.2.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear 1H (RMN 1H)

Os espectros de RMN, tanto de ^{13}C quanto de 1H dos três derivados, foram comparados com o da biflorina, tanto o realizado neste trabalho, quanto com os

descritos na literatura para sua caracterização (LEMOS *et al.*, 2007e SOUZA *et al.*, 2012). Diante disso selecionamos um dos derivados, o **1c**, para detalharmos os resultados espectrométricos realizados e os espectros dos demais derivados (**1a** e **1b**), encontram-se no anexo A, tendo em vista que os derivados possuem regiões específicas entre si.

Após análise, observamos que o espectro de RMN ^1H do derivado **1c** é similar com o espectro do protótipo, a biflorina, que pode ser analisado na Figura 27 e os valores resumidos e comparados na Tabela 5.

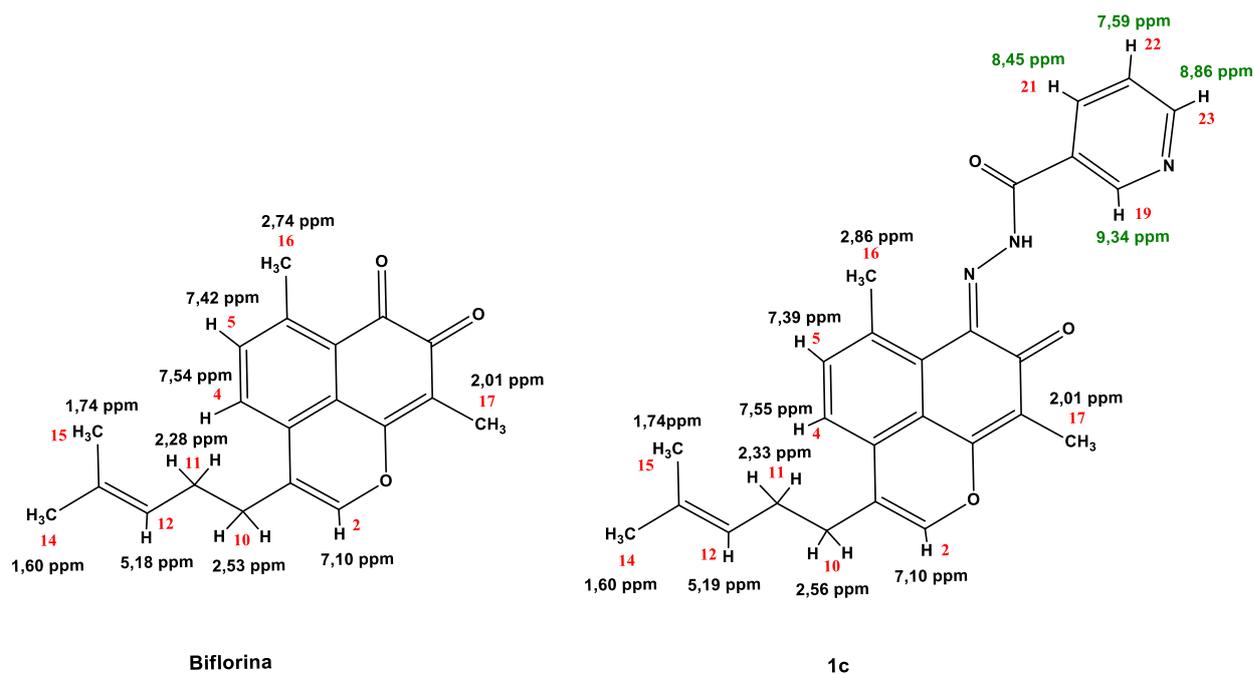


Figura 27 - Estrutura química da biflorina e do derivado **1c**, com seus respectivos deslocamentos químicos dos hidrogênios característicos. Em verde, encontram-se os hidrogênios característicos do anel piridina, confirmando a condensação da hidrazida nicotínica.

Tabela 5 - Dados espectrométricos de RMN ^1H da biflorina e do derivado **1c**. Em vermelho está destacado os prótons (H) que apareceram após a realização da semissíntese.

Hidrogênios	Compostos	
	Biflorina (δ_{H} -multiplicidade, J em Hz)	1c (δ_{H} -multiplicidade, J em Hz)
H-2	7,1 (s, 1H)	7,1 (s, 1H)
H-4	7,54 (d, 1H, $J = 8,1$)	7,55 (d, 1H, $J = 8,1$)
H-5	7,42 (d, 1H, $J = 8,1$)	7,39 (d, 1H, $J = 8,1$)
H-10	2,53 (t, 2H, $J = 7,2$)	2,56 (t, 2H, $J = 7,5$)
H-11	2,28 (q, 2H, $J = 7,2$)	2,33 (q, 2H, $J = 7,5$)
H-12	5,18 1H	5,19 (t, 1H, $J = 6,9$)
H-14	1,60 (s, 1H)	1,60 (s, 1H)
H-15	1,74 (s, 1H)	1,74 (s, 1H)
H-16	2,74 (s, 1H)	2,86 (br s, 1H)
H-17	2,01 (s, 1H)	2,07 (s, 1H)
H-19	-----	9,34 (s, 1H)
H-21	-----	8,45 (d, 1H, $J = 7,9$)
H-22	-----	7,59 (dd, 1H, $J = 5,0$ e $7,9$)
H-23	-----	8,86 (dd, 1H, $J = 1,5$ e $5,0$)

Tendo em vista esses resultados, podemos observar através do espectro de RMN ^1H (Figura 28) do derivado **1c** a presença de novos sinais característicos, como um simpleto $\delta = 9,34$ ppm referente ao H-19. O H-21 aparece como um duplete $J = 7,9$ Hz. Já o H-22 aparece como um duplo duplete com $J = 5,0$ e $7,9$ Hz em um deslocamento químico de $7,59$ ppm e o H-23 também aparece como duplo duplete com $J = 1,5$ e $7,9$ Hz com $\delta = 8,86$ ppm. Vale salientar que esses hidrogênios característicos são referentes ao anel piridina, presente na hidrazida nicotínica, ao qual foi condensada a biflorina.

Ao analisarmos o espectro de RMN ^{13}C , notamos que todos os picos referentes ao esqueleto da biflorina, encontram-se presente no espectro do derivado **1c**, como pode ser observado na Tabela 7. No entanto, novos sinais são perceptíveis ao comparar os espectros. Identificamos o aparecimento do sinal em 137,29 ppm referente ao carbono do grupo imina formado e o desaparecimento do sinal da C-7 da biflorina, confirmando então a formação da respectiva acilidrazona. Um outro sinal identificado foi do carbono da amida, pertencente a acilidrazida condensada, ao qual apareceu em 162,82 ppm. E por fim, os carbonos do anel piridina encontram-se em δ = 148,17 (C-19), 129,53 (C-20), 137,29 (C-21), 124,49 (C-22) e o C-23 em 151,37 ppm (Figura 30).

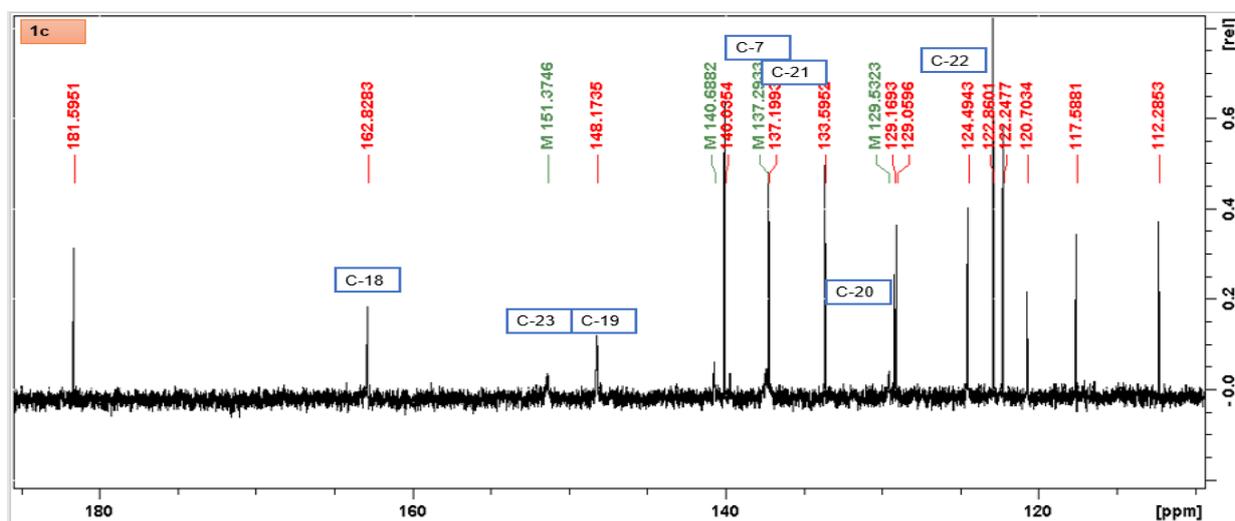


Figura 30 – Espectro de RMN ^{13}C do derivado **1c** com seus carbonos característicos.

Na Tabela 6 encontram-se os valores resumidos e comparados, tanto da biflorina quanto do derivado **1c**.

Tabela 6 - Dados espectrométricos de RMN ^{13}C da biflorina e do derivado **1c**. Em vermelho está destacado os carbonos que apareceram após a realização da semissíntese.

Carbonos	Compostos	
	Biflorina (δ_{C})	1c (δ_{C})
C-2	140,92	140,03
C-3	129,09	129,05
C-3a	116,11	117,58
C-4	128,42	129,16
C-5	136,54	137,19
C-6	126,79	120,70
C-6a	146,71	129,16
C-7	182,22	137,29
C-8	178,21	181,59
C-9	113,59	112,28
C-9a	161,82	161,82
C-9b	124,32	124,49
C-10	27,40	27,10
C-11	27,48	27,64
C-12	122,69	122,86
C-13	133,72	133,69
C-14	18,05	18,06
C-15	25,88	25,91
C-16	23,31	26,98
C-17	7,90	7,27
C-18	-----	162,82
C-19	-----	148,17
C-20	-----	129,53
C-21	-----	137,29
C-22	-----	124,49
C-23	-----	151,37

5.4.2.3 Espectroscopia de Infravermelho (IV)

Os três derivados apresentaram as principais bandas de absorção em regiões similares, que comprovava permanência do esqueleto da biflorina (Tabela 7) e a condensação das acilidrazinas (Tabela 8).

Tabela 7 - Bandas de absorção referentes à manutenção do esqueleto da biflorina.

Composto	Bandas de Absorção (cm ⁻¹)					
	CH-Ar	C=O (Cetona)	C=C (Alqueno)	C=C (Ar)	C-O-C (Assim.)	C-O-C (Simétrica)
Biflorina	2920,54	1644,92 1682,56	1624,37	1596,17	1475,87	1437,87
1b	2917,11	1647,36	1600,41	1568,47	1504,50	1467,35
1c	2917,38	1644,91	1603,22	1585,17	1469,31	1423,50

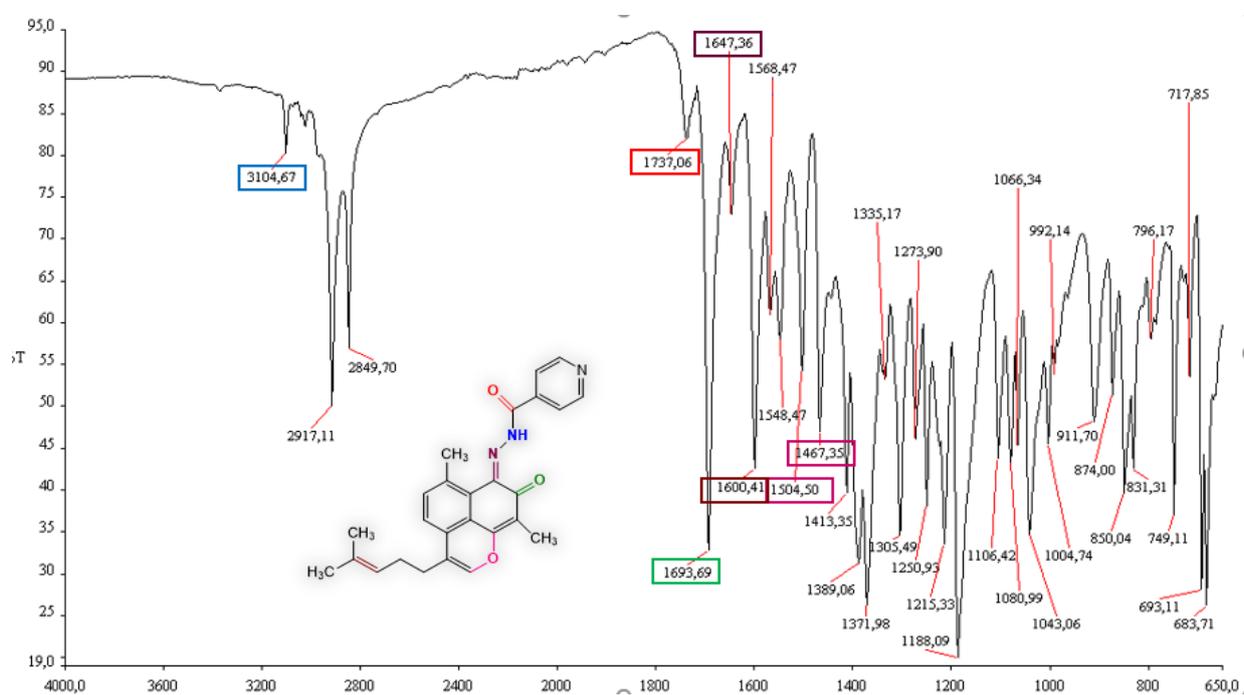
Nesta tabela podemos observar a manutenção do esqueleto da biflorina, através de bandas de absorção específica como da estrutura aromática, que é confirmada pela presença da banda na região 1568,47 cm⁻¹ para o derivado **1b**, e 1585,17cm⁻¹ para o **1c**, referente à ligação C=C aromática, já a ligação C=C de alqueno, encontramos numa banda de absorção de aproximadamente 1600cm⁻¹, para todos os derivados. A porção heterocíclica é observada na presença de bandas de deformação assimétrica de C-O-C, em 1504,50 cm⁻¹ e de 1469,31cm⁻¹, para os derivados **1b** e **1c**, respectivamente, e deformação simétrica nas regiões de 1400 cm⁻¹.

A análise do infravermelho confirma a condensação das acilidrazinas na carbonila C-7 e conseqüentemente a formação da imina (C=N), principalmente pela diminuição da intensidade em relação a banda da carbonila cetônica, assim como o aparecimento das bandas 3104,57 cm⁻¹ e 1737,06 cm⁻¹, que são referentes as ligações N-H e C=O de amidas, respectivamente (Tabela 8).

Tabela 8 - Bandas de absorção referentes à condensação da porção acilidrazina.

Compostos	Bandas de Absorção (cm ⁻¹)		
	N-H	C=O (Amida)	C=N
Biflorina			
1b	3104,67	1737,06	1647,36
1c	3088,62	1735,88	1644,91

Os espectros de infravermelho abaixo, mostram as bandas de absorção de cada grupo funcional, que compõem a estrutura química dos derivados **1b** (Figura 31) e **1c** (Figura 32).

**Figura 31** - Espectro de infravermelho do derivado **1b**.

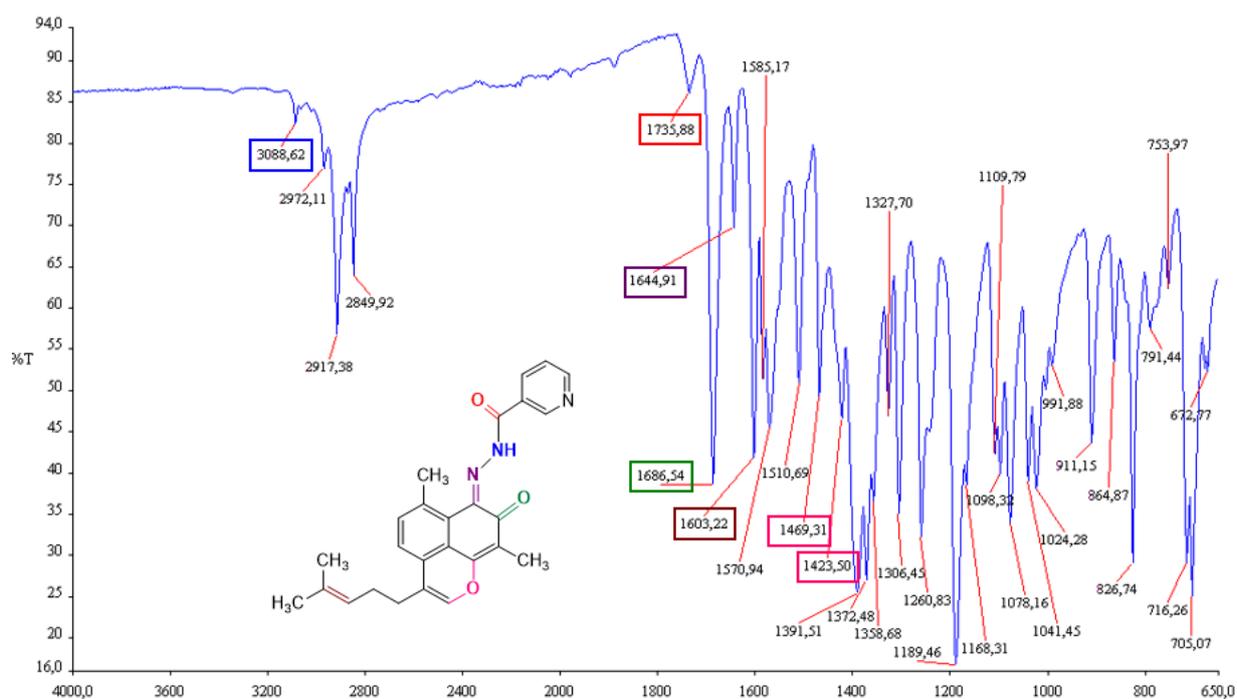


Figura 32 - Espectro de infravermelho do derivado **1c**.

5.4.2.4 Espectrometria de Massa (MS)

A espectrometria de massas (MS), por sua vez, determina a razão massa carga (m/z) de uma molécula e, portanto, é possível inferir sobre o tamanho dos compostos químicos. Dessa forma, abaixo segue o espectro de massa de alta resolução do derivado **1c** (Figura 33 e 34) e dos demais encontram-se em anexo A. Obtivemos o valor calculado $[M+H]^+ = 428,1896$ e encontramos $m/z = 428,1974$, com fórmula molecular $C_{26}H_{25}N_3O_3$.

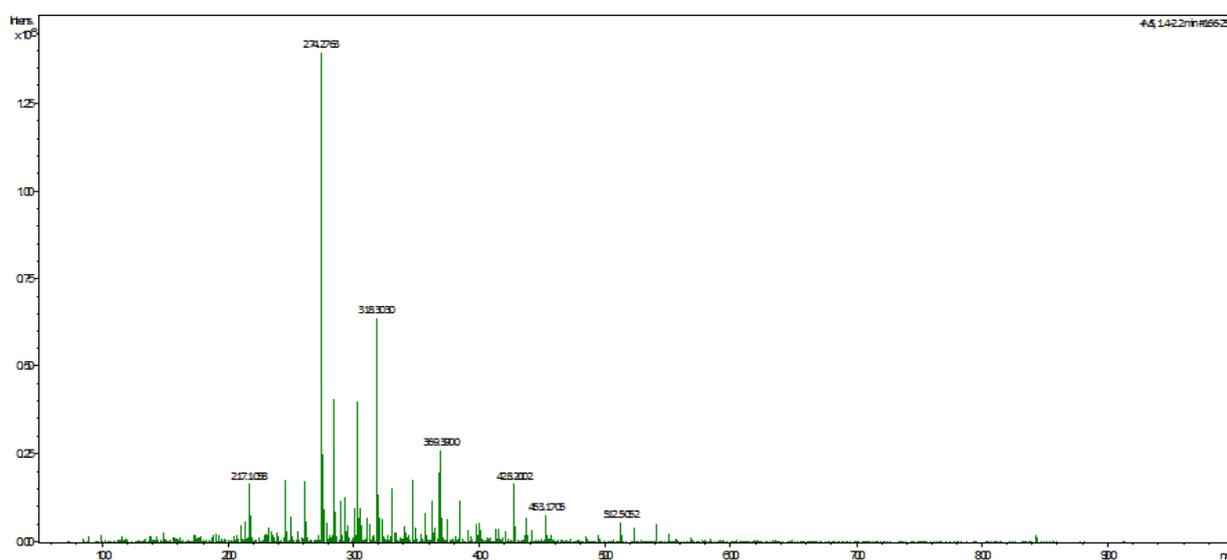
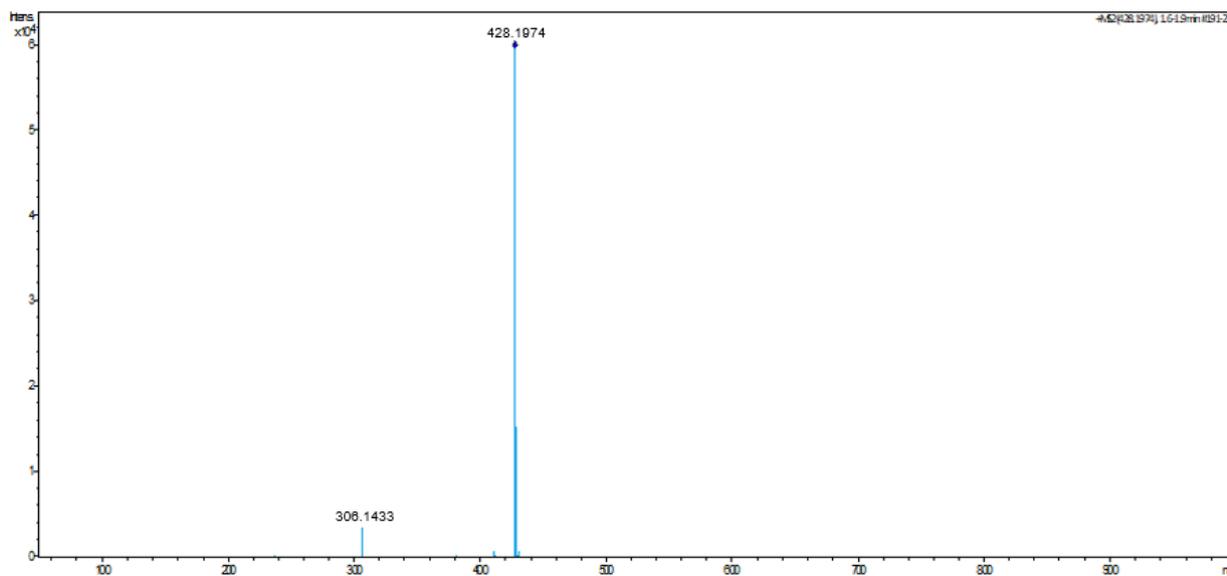


Figura 33 - Espectro total de massas de alta resolução do derivado **1c**.**Figura 34** - Espectro de massas de alta resolução isolado do derivado **1c**.

5.5 ENSAIOS BIOLÓGICOS

Nesta seção, serão discutidos todos os resultados das atividades biológicas realizadas neste trabalho.

5.5.1 Efeito imunomodulador

Os ensaios de imunoestimulação realizados neste trabalho teve como objetivo, principalmente, investigar a proliferação celular e a produção de citocinas. É sabido que a biflorina é um potente agente farmacológico que apresenta atividades biológicas interessantes. Diante disso, investigamos o perfil imunoestimulador deste composto, frente a esplenócitos de BALB/c. Inicialmente, realizamos o teste de citotoxicidade, no intuito de investigar se poderíamos usar a biflorina frente a esta linhagem de célula e em que concentração. Os resultados demonstraram que a biflorina pode ser usada numa dose de segurança em concentrações inferiores a 12,5 µg/mL em culturas de esplenócitos por 24 h (Figura 35). Diante desse resultado, escolhemos a concentração de 6 µg/mL para avaliarmos a imunoestimulação promovida pela biflorina.

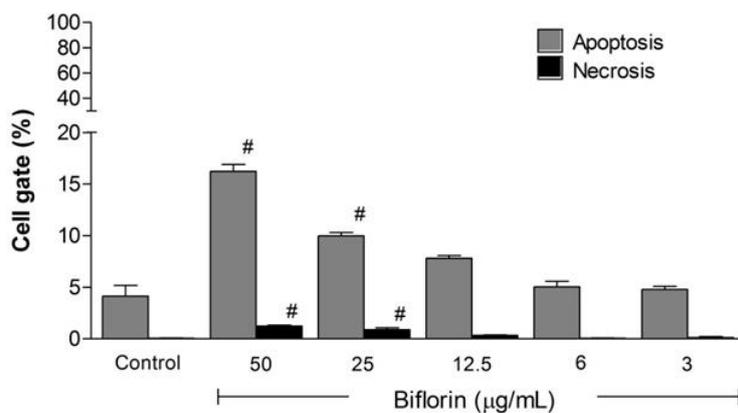


Figura 35 - Avaliação da citotoxicidade promovida pela biflorina em esplenócitos de Balb/c em 24 h de cultura. A dose de segurança para usar a biflorina é <12,5 µg/mL (SILVA *et al.*, 2019).

Em seguida realizamos a investigação da proliferação celular e os resultados demonstram que a biflorina foi capaz de estimular os esplenócitos de BALB/c em 48h de incubação numa concentração de 6 µg/mL (Figura 36).

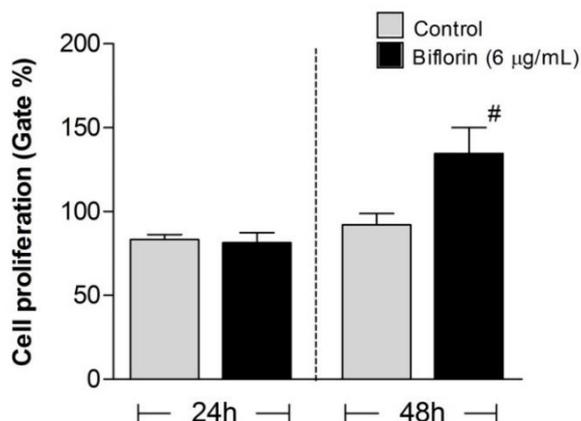


Figura 36 - Investigação da proliferação celular utilizando a biflorina a 6 µg/mL, durante 24 e 48h de incubação.

E por fim, submetemos estas células frente a biflorina no intuito de averiguar a imunoestimulação deste composto. Diante dos resultados, foi possível observar que a biflorina estimulou a produção de citocinas tais como: TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-6 e IL-17 (Figura 37), apresentando um perfil imunológico à resposta Th1, sendo um composto promissor para futuros ensaios antitumorais e antivirais.

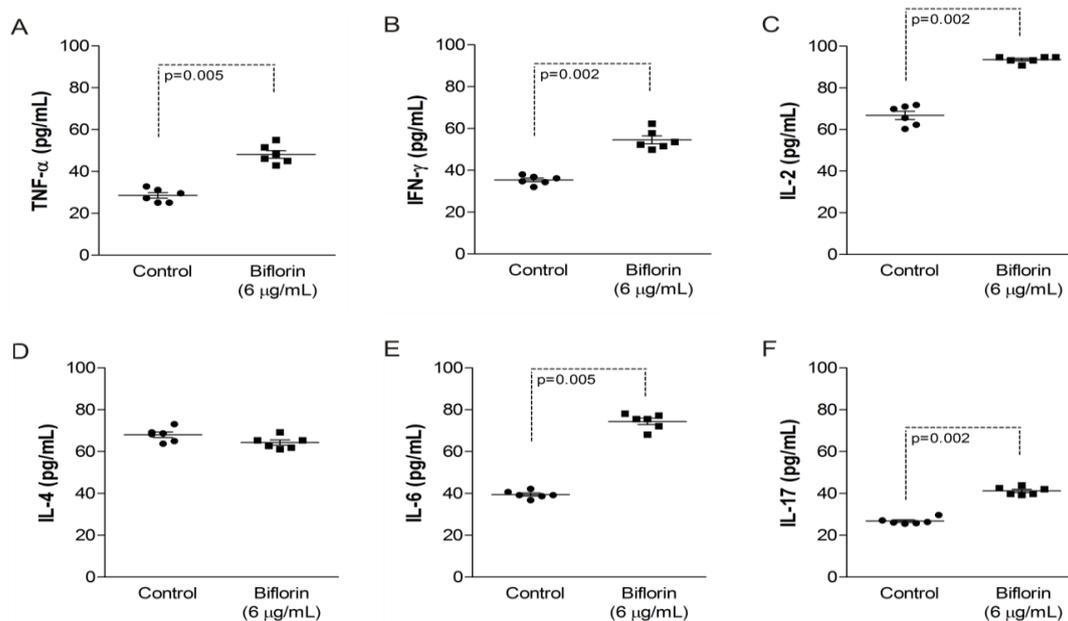


Figura 37 –Avaliação do efeito imunoestimulador promovido pela biflorina (6 $\mu\text{g/mL}$) em culturas de esplenócitos de BALB/C. A biflorina estimulou maior produção de TNF- α (A), IFN- γ (B), IL-2 (C), IL-6 (E) e IL-17 (F). Valores similares entre células tratadas com controle e biflorina foram observados para a produção de IL-4 (D) (SILVA *et al.*, 2019).

Como citado anteriormente, a biflorina induziu ao perfil imunológico Th1, sendo esta uma resposta significativa para atividade antitumoral e antiviral, corroborando com os estudos realizados por Vasconcellos e colaboradores (2007), onde este composto aumentou a eficácia do fluoracil (5-FU), causando alterações morfológicas nos baços dos camundongos, assim como reduzindo a taxa de proliferação tumoral (VASCONCELLOS *et al.*, 2007). Diante das citocinas secretadas por indução da biflorina, tanto o IFN- γ quanto a IL-2, apresentam função crucial na rejeição tumoral e inibição de infecções virais. Também é possível inferir que a IL-2, possui papel de instigar a transcrição de vários genes pró-inflamatórios, como a síntese de óxido nítrico sintase (iNOS) e ciclooxigenase-2 (COX-2) (TANAKA, NARAZAKI e KISHIMOTO, 2012; VILA-DE-SOL, PUNZÓN e FRESNO, 2008). Outra citocina produzida, foi a IL-6, ao qual estudos revelam que esta citocina é crucial nas doenças inflamatórias, crônicas e auto-imunes, assim como na diferenciação de células Th17 (HUNTER e JONES, 2015; LEECH *et al.*, 2012) e também na defesa contra infecções

causadas por microrganismos extracelulares (MIOSSEC e KOLLS, 2012; MISIAK *et al.*, 2017).

Vale salientar que as naftoquinonas também possuem efeitos imunomoduladores interessantes. Uma das naftoquinonas estudadas foi a β -lapachona, ao qual apresentou resultados similares ao realizado neste trabalho. A β -lapachona demonstrou que controla a indução, como a doóxido nítrico sintase (iNOS) e o fator de necrose tumoral (TNF) (TZENG *et al.*, 2003), que podem ser aplicados a terapia anti-inflamatórias (CHOI *et al.*, 2012 e TSENG *et al.*, 2013), assim como, em desordens neuro-inflamatórias (LEE *et al.*, 2015), devido a sua função da modulação de citocinas com perfis tanto Th1 quanto Th2. Diante dos resultados encontrados, notamos que a biflorina apresenta-se como uma molécula promissora pois induziu ao perfil imunológico Th1, e por isso consideramos um composto relevante para futuros ensaios antitumorais e antivirais.

5.5.2 Atividade citotóxica (MTT)

Foi avaliado a citotoxicidade dos compostos em estudo frente a diversas linhagens de células, tendo como controle (ctl) o fármaco doxorrubicina. Inicialmente foi realizado o efeito citotóxico dos compostos frente a linhagem de célula de fibroblasto L929. Estes resultados de seletividade, podem ser observados na Figura 38.

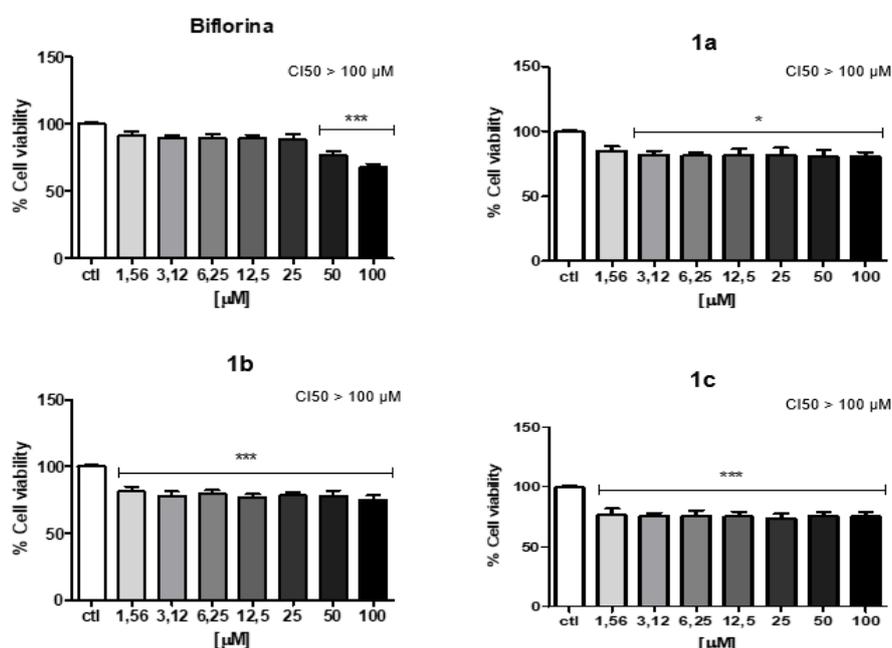


Figura 38 - Efeito citotóxico da biflorina e dos derivados **1a-c** sobre a linhagem L929 após 72h de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média \pm desvio padrão de três experimentos independente em triplicata, analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. *** $p < 0,001$ em relação ao controle. Ctl: Controle.

Após a seletividade dos compostos para as células normais, foram realizados ensaios de citotoxicidade em linhagens tumorais. Inicialmente foi realizado o ensaio de MTT com a linhagem NCI-H292 (carcinoma pulmonar mucoepidermoide). Os resultados podem ser observados na Figura 39.

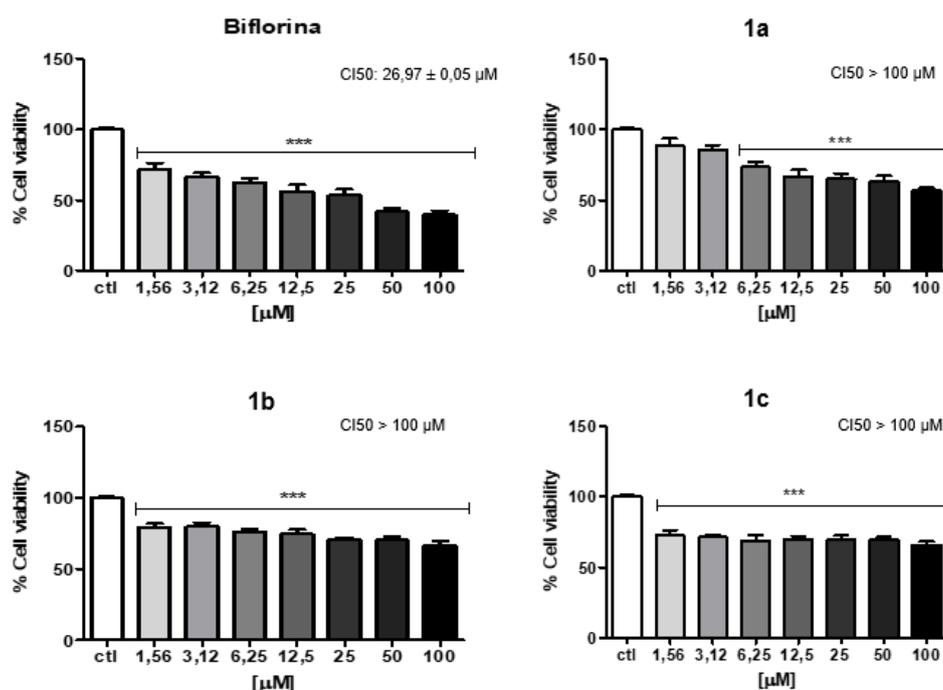


Figura 39 - Efeito citotóxico da biflorina e dos derivados **1a-c** sobre a linhagem NCI-H292 após 72h de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média \pm desvio padrão de três experimentos independente em triplicata, analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. *** $p < 0,001$ em relação ao controle. Ctl: Controle.

Em seguida foi realizado a citotoxicidade em células de mastocitomas murinos, linhagem P815. O resultado pode ser observado na Figura 40.

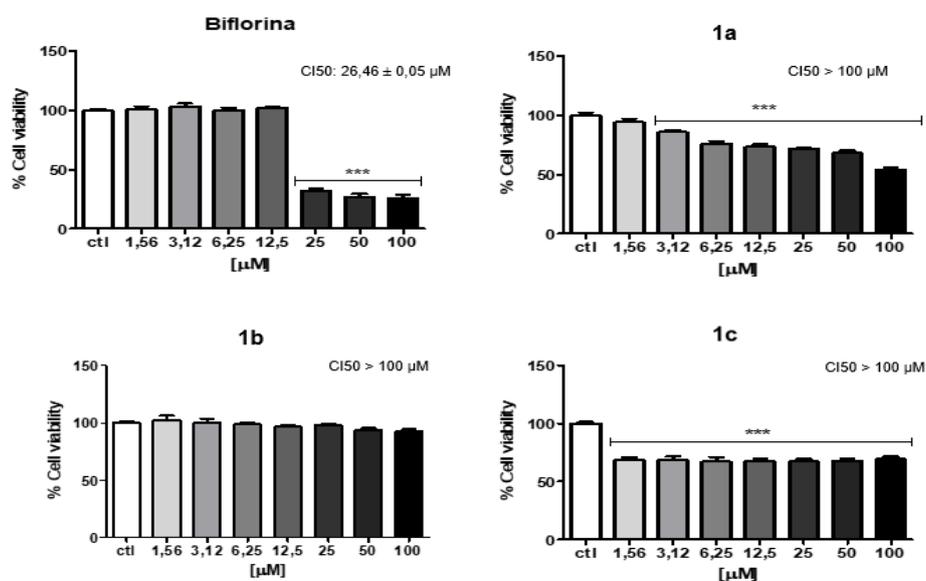


Figura 40 - Efeito citotóxico da biflorina e dos derivados **1a-c**, sobre a linhagem P815 após 72h de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média \pm desvio padrão de três experimentos independente em triplicata, analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. *** $p < 0,001$ em relação ao controle. Ctl: Controle.

Em seguida foi realizado a citotoxicidade em células de leucemia promielocítica aguda, linhagem HL-60. O resultado pode ser observado na Figura 41.

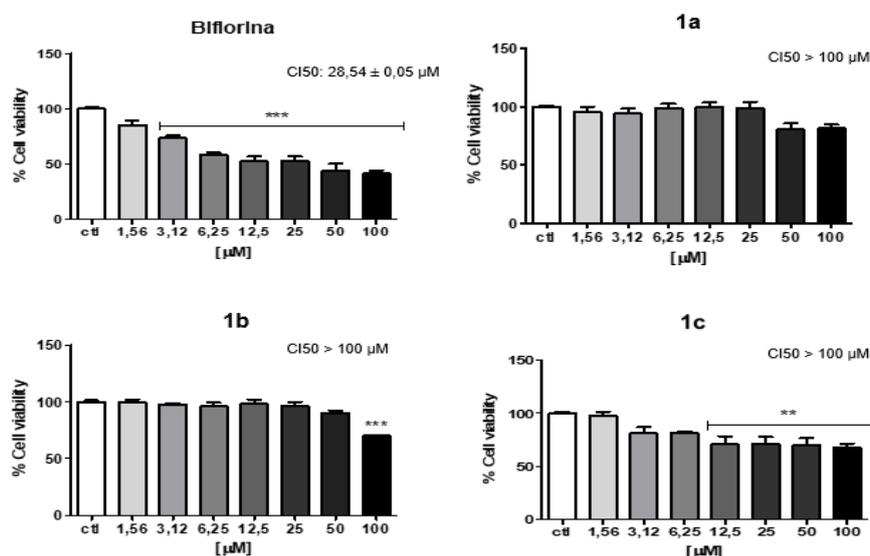


Figura 41 - Efeito citotóxico da biflorina e dos derivados **1a-c** sobre a linhagem HL-60 após 72h de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média \pm desvio padrão de três experimentos independente em triplicata, analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. ** $p < 0,01$ em relação ao controle. Ctl: Controle.

Por fim, foi realizado a citotoxicidade em células de carcinoma de mama, linhagem MCF-7. O resultado pode ser observado na Figura 42.

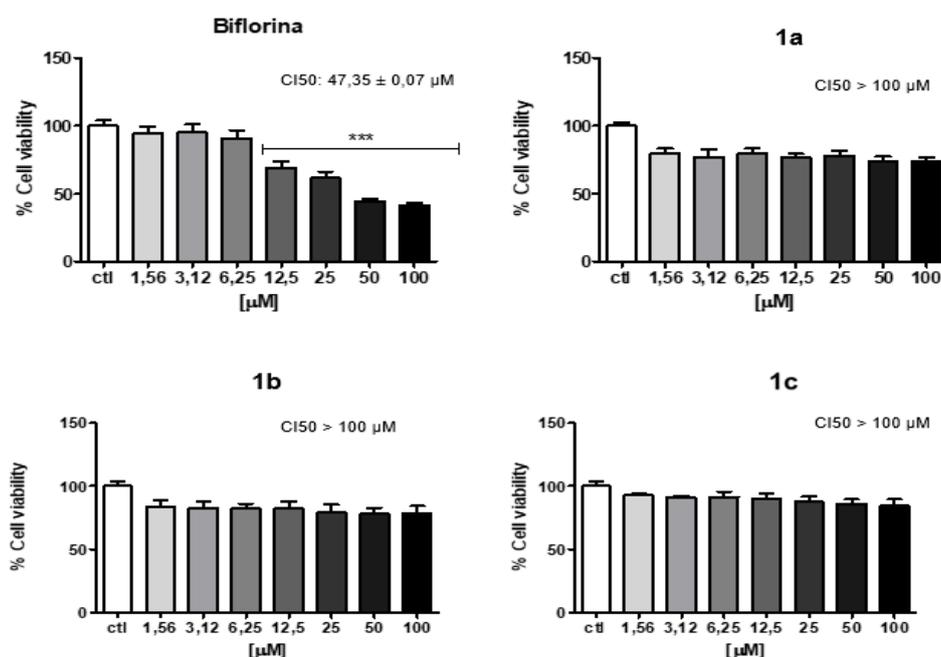


Figura 42 - Efeito citotóxico da biflorina e dos derivados **1a-c** sobre a linhagem MCF-7 após 72h de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média \pm desvio padrão de três experimentos independente em triplicata, analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. Ctl: Controle.

A tabela a seguir, resume todos os resultados anteriormente apresentados (Tabela 9).

Tabela 9 - Efeito citotóxico dos compostos em estudo sobre linhagens cancerígenas e não cancerígena após 72h de tratamento, avaliado pelo ensaio do MTT. Os dados correspondem à média \pm desvio padrão em micromolar (μM) de três experimentos independente em triplicata, analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni.

Compostos	Células (Valores de CI50 μM)				
	L929	NCI-H292	P815	HL-60	MCF-7
Biflorina	CI50 > 100	26,97 \pm 0,05	26,46 \pm 0,05	28,54 \pm 0,05	47,35 \pm 0,07
1a	CI50 > 100	CI50 > 100	CI50 > 100	CI50 > 100	CI50 > 100
1b	CI50 > 100	CI50 > 100	CI50 > 100	CI50 > 100	CI50 > 100
1c	CI50 > 100	CI50 > 100	CI50 > 100	CI50 > 100	CI50 > 100
Doxorrubicina	2,486 \pm 0,04	0,04 \pm 0,001	--	0,28 \pm 0,04	14,71 \pm 0,05

Diante dos resultados expressos neste trabalho, notamos que nenhum dos derivados *N*-acilidrazonas planejados apresentaram atividade citotóxica para as linhagens de células testadas. No entanto, observa-se que a biflorina não é citotóxica quando comparada a doxorrubicina frente a linhagem de célula L929, ao qual a doxorrubicina apresentou CI50 2,486 μM e a biflorina CI50 > 100 μM . Porém, para as linhagens tumorais a biflorina apresentou-se com atividade citotóxica significativa. Um outro dado importante a ser mencionado, é que a biflorina é dependente de concentração, ou seja, quanto mais aumenta-se a concentração, mais torna-se citotóxica. Contudo, estes resultados reforçam que, modificação na carbonila C-7 da biflorina diminuem a sua atividade citotóxica (SOUZA *et al.*, 2016).

5.5.3 Atividade antimicrobiana

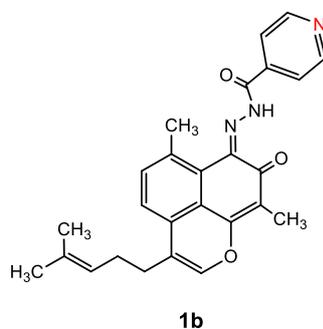
Os resultados de susceptibilidade bacteriana e fúngica, após 24 e 48 horas de incubação, respectivamente, dos compostos **1a-c**, foi realizado por meio do método de difusão em ágar pela técnica de poços modificados (GROVE; RANDALL, 1955), em concentração de 10 mg/mL. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas. A concentração para cada derivado testado variou de 15,62 $\mu\text{g/mL}$ a 500 $\mu\text{g/mL}$. O CMI é definido como a menor concentração de cada derivado que inibe o crescimento

bacteriano visível (OLIVEIRA, 2001). Utilizou-se como controle positivo neste estudo os seguintes fármacos: gentamicina e anfotericina b para bactérias e fungos, respectivamente e os resultados podem ser observados na Tabela 10.

Tabela 10 -Avaliação da atividade antimicrobiana da biflorina e dos derivados *N*-acilidrazonas (**1a-c**).

Microorganismos	CMI ($\mu\text{g/mL}$)					
	1	1a	1b	1c	Gentamicina	Anfotericina b
<i>Staphylococcus aureus</i> UFPEDA 02	0,975	> 500	15,62	> 500	≤ 4	-----
<i>Staphylococcus aureus</i> UFPEDA 709	0,48	-----	31,25	-----	≤ 4	-----
<i>Staphylococcus epidermidis</i> UFPEDA 58	0,975	> 500	> 500	> 500	≤ 4	-----
<i>Pseudomonas aeruginosas</i> UFPEDA416	> 500	> 500	> 500	> 500	≤ 4	-----
<i>Candida albicans</i> UFPEDA 1007	> 500	> 500	> 500	> 500	-----	≤ 1

Os derivados **1a** e **1c** não apresentaram atividades frente aos microorganismos testados, onde a concentração mínima inibitória (CMI) foi $>500\mu\text{g/mL}$. Porém, o derivado **1b** mostrou-se expressivo frente a cepa padrão de *Staphylococcus aureus* 02, apresentando uma CMI $>15,62\mu\text{g/mL}$. Diante deste resultado, decidimos avaliar a atividade do derivado **1b** frente a cepa resistente de *S. aureus* 709, e obtivemos uma CMI $>31,25\mu\text{g/mL}$ (Figura 43).



<i>Staphylococcus aureus</i> 02	<i>Staphylococcus aureus</i> 709
CMI > 15,62 $\mu\text{g/mL}$	CMI > 31,25 $\mu\text{g/mL}$

Figura 43- Estrutura química do derivado com potencial antibacteriano, tanto para a cepa de *Staphylococcus aureus* padrão (02) quanto para a resistente (709).

Todavia, nota-se que a biflorina apresenta-se como mais potente frente a estes microrganismos, além de apresentar atividade contra o *Staphylococcus epidermidis*. Estes resultados, tanto do derivado **1b** quanto da biflorina, são bastante relevantes, visto que esta é a espécie de maior interesse médico, principalmente em ambiente nosocomial, por estar frequentemente, relacionado a diversas infecções em seres humanos e tornou-se uma endemia nos ambientes hospitalares (SANTOS *et al.*, 2007).

6 CONCLUSÃO

Abiflorina foi extraída e purificada a partir da serragem das raízes da *Capraria biflora*, através do método de extração e purificação simultânea utilizando o aparelho Góes, ao qual foi aplicado neste trabalho. Observamos que, este método demonstrou rendimento significativo de 0,6%, inclusive maior do que os descritos na literatura. Para a síntese dos novos derivados *N*-acilidrazonas a partir da biflorina (**1a-c**), observamos que utilizando HCl concentrado ao invés de APTS, obtivemos maior resultado tanto no rendimento, quanto no tempo de reação, ao qual foram aplicado a todos os derivados estudados neste trabalho, indicando um aumento reacional que variou de 57 a 65%. A caracterização dos compostos sintetizados foi comprovada por meio da espectroscopia de RMN ¹H e RMN ¹³C, espectroscopia de infravermelho e espectrometria de massas de alta resolução.

A avaliação do efeito imunomodulador da biflorina frente a esplenócitos de BALB/c, mostrou que a biflorina não foi citotóxica frente a estas células e foi capaz de estimulá-las em 48 h de incubação a uma concentração de 6 µg/mL, promovendo a produção de citocinas, tais como: TNF-α, IFN-γ, IL-2, IL-6 e IL-17. Diante desses resultados, a biflorina apresenta-se como uma molécula promissora pois induziu ao perfil imunológico Th1, e por isso consideramos um composto relevante para futuros ensaios antitumorais e antivirais.

Os ensaios de citotoxicidade (MTT) demonstraram que nenhum dos três derivados (**1a-c**) exibiram citotoxicidade em concentrações inibitórias promissoras (IC₅₀ < 10 µM). No entanto, observa-se que a biflorina não é citotóxica para a linhagem de célula L929 (fibroblastos murino) quando comparada com a doxorrubicina. Contudo, os derivados, corroborando com dados na literatura, em que a modificação na carbonila C-7 da biflorina, diminui seu efeito citotóxico. Os testes de susceptibilidade antimicrobiana revelaram que o derivado **1b** foi o que apresentou melhor atividade antibacteriana, com uma CIM > 15,62 µg/mL. Por isso testamos o derivado **1b** frente a cepa resistente de *S. aureus* 709, e obtivemos uma CMI com valor equivalente a 31,25 µg/mL. Portanto, concluímos que modificações estruturais na C-7 da biflorina diminuem sua atividade citotóxica. Todavia, mesmo a biflorina sendo mais potente que seus derivados frente a cepas bacterianas é indispensável os

estudos de síntese com esse composto, visando potencializar esta substância promissora.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imun.cel. e mol.** 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

ALAMGIR, M. & UDDIN, S. J. Recent advances on the ethnomedicinal plants as immunomodulatory agentes. **Ethnomedicine: A Sour. of Complem. Therap.** 227-244. 2010.

ALMEIDA R. G. **Adições de Michael assimétricas na obtenção de naftoquinonas com potencial antitumoral.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, 2017.

AMARAL D. N., CAVALCANTI B. C., BEZERRA D.P., FERREIRA P. M. P., CASTRO R. P., SABINO J. R., MACHADO C. M. L., CHAMMAS R., PESSOA C., SANT'ANNA C. M. R., BARREIRO E. J., LIMA L. M. Docking, Synthesis and Antiproliferative Activity of NAcylhydrazone Derivatives Designed as Combretastatin A4 Analogues. **PLoS ONE.** 9(3): e85380; 2014.

AQUINO T. M., LIMA C. S. A., ALBUQUERQUE U. P., AMORIM E. L.C. *Capraria biflora* L. (Scrophulariaceae): uma Revisão. **Acta Farm. Bonaerense.**25(3): 460-7; 2006.

AQUINO, T. M. **“Caracterização Farmacognóstica de Capraria biflora L. e Estudo Biológico e Físico-químico de seus Metabólitos Secundários”.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

BAELL J. B., NISSINK J. W. M. Seven Year Itch. Pan-Assay Interference Compounds (PAINS) in 2017 - utility and limitations. **ACS Chem. Biol.** 04 Dec 2017.

BARREIRO E.J. et al. A química medicinal de n-acilidrazonas: novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, antiinflamatórios e anti-trombóticos. **Quim. Nov.,** Vol. 25, No. 1, 129-148, 2002.

BARREIROS A.L.B.S., DAVID J.M. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova,** Vol. 29, No. 1, 113-123, 2006.

CARVALHO, A. A. **Estudo do Potencial Antimetastásico da Biflorina.** 120 f. Tese (doutorado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

CAVALCANTI, B. C. et al. Preclinical genotoxicology of nor- β -lapachone in human cultured lymphocytes and chinese hamster lung fibroblasts. **Chem. Res. Toxic.** v. 19;24, n. 9, p. 1560-1574, 2011.

CHACON, J. A, SCHUTSKY., POWELL D.J. The impact of chemotherapy, radiation and epigenetic modifiers in cancer cell expression of immune inhibitory and stimulatory molecules and anti-tumor efficacy. **Whit. T, ed. Vaccines.** 4(4) 43; 2016.

CHUDZIK B., KOSELSKI M., CZURYŁO A., TRE K., BACZ., GAGOS M. A new look at the antibiotic amphotericin B effect on *Candida albicans* plasma membrane permeability and cell viability functions. **Eur Biophys J.** 44:77–90; 2015.

CORRÊA, M. P.; Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das exóticas cultivadas vol. 2, 1ª. Ed., Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, 1984.

COSTA D. G., DA SILVA J. S., KÜMMERLE A. E., SUDO R. T., LANDGRAF S. S., CARUSO-NEVES C., FRAGA C. A.M., BARREIRO E. J. L., ZAPATA-SUDO G. LASSBio-294, A Compound With Inotropic and Lusitropic Activity, **Decreases Cardiac.**

COSTA-LOTUFO, L.V.; MONTENEGRO, R.C.; ALVES, A.P.N.N., MADEIRA, S.V.F.; PESSOA, C.; MORAES, M.E.A.; MORAES, M.O. “A contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal Ceará”, **Rev. Virtual Quim.** 2 (1), 47-58. 30 de agosto de 2010.

CRUVINEL, W. M.; JÚNIOR, D. M.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; DE SOUZA, A. W. S.; DA SILVA N. P.; ANDRADE, L. E. C. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rev Bras Reumatol.** 50(4): 434-61; 2010.

CURIE M. New York, **New American Library**, 1975.

CURFS J. H. A. J., MEIS J. F. G. M., HOOGKAMP-KORSTANJE J. A. A. A Primer on Cytokines: Sources, Receptors, Effects, and Inducers. **Clin. Microb. Revie.** p. 742–780, Vol. 10, No. 4; 1997.

DAVIS, B.P., BALLAS, Z.K. Biologic Response Modifiers: Indications, implications and insights. **J. of Aller. and Clin. Immunol.** 2017.

DE CASTRO, S. L.; EMERY, F. S.; DA SILVA Jr, E. N. Synthesis of quinoidal molecules: Strategies towards bioactive compounds with an emphasis on lapachones. **Europ. Jour. of Medic. Chemis.** v. 69, p. 678-700, 22 de setembro de 2013.

DUTTA, R. C. Peptide immunomodulators versus infection; an analysis. **Immun. Letters.** 83: 153/161. 2002.

EL-NAJJAR N., GALI-MUHTASIB H., KETOLA R. A., VUORELA P., URTTI A., VUORELA H. The chemical and biological activities of quinones: overview and implications in analytical detection. **Phytochem Rev.** 0:353–370; 2011.

FENTON, H. J. H.; JACKSON, H.; J. A reação de Fenton original envolve a oxidação de α -hidroxi éster com H_2O_2 $FeCl_2$. **Chem. Soc.** 1899.

FERREIRA S. B., GONZAGA D.T., SANTOS W. C., ARAUJO K. G. L., FERREIRA V. F. α -Lapachona: Sua importância em química medicinal e modificações estruturais. **Rev. Virt. Quim.** 2: 140-160. 2010.

FONSECA A. M., PESSOA O. D. L., LEMOS T. L. G., NASCIMENTO R. F. J. **Essent. Oil Res.** 18, 157; 2006.

FONSECA, A.M., PESSOA, O.D.L., SILVEIRA, E.R., MONTE, F.J.Q., BRAZ-FILHO, R., LEMOS, T.L.G. Spectral assignments and reference data. **Mag. Res. Chem.** 41 1038-1040; 2003.

FRAGA C. A.M., BARREIRO E. J. Medicinal Chemistry of N-Acylhydrazones: New Lead-Compounds of Analgesic, Antiinflammatory and Antithrombotic Drugs. **Current Medic. Chem.** 13, 167-198; 2006.

FRANÇA, R. R. F.; CARVALHO, A. S.; BRANCO, F. S. C; PINTO, A. C.; BOECHAT, N. Inibidores Potentes da Enzima Esterol 14 α -desmetilase Contra *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Virtual Quim.** 6 (5), 1483-1516; 2014.

GADANI S. P., CRONK J. C., NORRIS G. T., KIPNIS J. IL-4 in the Brain: A Cytokine to Remember. **J Immunol.**189:4213-4219; 2012.

GÓES A. J. Inventor; depositante. **Produto e processo para extração e purificação simultânea de substâncias de origem vegetal, sintética ou microbiana.** BR, patente 1020170210995. INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial; RPI-2479; 2018.

GRIMWADE K, SWINGLER G. Cotrimoxazole prophylaxis for opportunistic infections in children with HIV infection. **The Coch. Database of System.Rev.**, 2003.

GROVE, D. C.; RANDALL, W. A. Assay Methods of Antibiotic: a Laboratory Manual, Medical Encyclopedia: New York, 1955.

GUAY D. R. An Update on the Role of Nitrofurans in the Management of Urinary Tract Infections. **Drugs.** 61 (3): 353-364; 2001.

GUEDES J. C., BENDICHO M. T., LEMAIRE D. Citocinas e imunomodulação: novos avanços no tratamento das pancreatites. **R. Ci. méd. biol.**, Salvador, v. 3, n. 2, p. 242-251, jul./dez. 2004.

HUBERT J., NUZILLARD J-M., RENAULT J-H. Dereplication strategies in natural product research: How many tools and methodologies behind the same concept? **Phytochem Rev.**16:55–95; 2017.

HUNTER, C.A.; JONES, S.A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. **Nat. Immunol.**16 448-457; 2015.

KIMURA, A.; KISHIMOTO T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. **Eur. J. Immunol.** 40 1830–1835; 2010.

KORN, T., BETTELLI, E., OUKKA, M., KUCHROO, V.K. IL-17 and Th17 Cells. **Annual Revi. of Immun.**27, 485–517, 2009.

KUMAGAI, Y. et al. The chemical biology of naphthoquinones and its environmental implications. **Annual Rev. Pharm. and Toxic.** v. 52, p. 221-247, fevereiro de 2012.

KUMMERLE A. E., SCHMITT M., CARDOZO S. V. S., LUGNIER C., VILLA P., LOPES A. B., ROMEIRO N. C., JUSTINIANO H., MARTINS M. A., FRAGA C. A. M., BOURGUIGNON J.-J., BARREIRO E. J. Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of N-Acylhydrazones and Novel Conformationally Constrained Compounds as Selective and Potent Orally Active Phosphodiesterase-4 Inhibitors. **J. Med. Chem.** 55, 7525–7545; 2012.

KURTZ D. M., Tschetter LK, Allred JB et al. – Subcutaneous interleukin-4 (IL-4) for relapsed and resistant non-Hodgkin lymphoma: a phase II trial in the North Central Cancer Treatment Group, NCCTG 91-78-51. **Leuk Lymphoma**, 2007;48:1290-1298.

LARA L. S., MOREIRA C. S., CALVET C. M., LECHUGA G., SOUZA R. S., BOURGUIGNON S. C., FERREIRA V. F., ROCHA D., PEREIRA M. C. S. Efficacy of 2-Hydroxy-3-Phenylsulfanylmethyl-[1,4]-Naphthoquinone derivatives against different *Trypanosoma cruzi* discrete type units: identification of a promising hit compound. **Eur. Jour. of Medic. Chemistry.** 144, 572-581; 2018.

LEECH, M.D., BARR, T.O., TURNER, D.G., BROWN, S., O'CONNOR, R.A., GRAY, D., MELLANBY, R.J., ANDERTON, S.M. Cutting edge: IL-6-Dependent autoimmune disease: Dendritic cells as a sufficient, but transient, source. **The J. of Immunol.** 880-885; 2012.

LEMOES, T. L. G., MONTEY, F. J. Q., SANTOS, A. K.L., FONSECA, A.M., SANTOS, H.S., OLIVEIRA, M.F., COSTA, S. M.O., PESSOA, O.D.I., BRAZ-FILHO, R. 2007. Quinones from plants of northeastern Brazil: structural diversity, chemical transformations, NMR data and biological activities. **Nat. Prod. Res.** 21(6), 529–550.

LIESEN A.P., AQUINO T. M., CARVALHO C. S., LIMA V. T., ARAÚJO J. M., LIMA J. G., FARIA A. R., MELO E. J.T., ALVES A. J. B, ALVES E. W., ALVES A. Q., GÓES A. J. S. Synthesis and evaluation of anti-Toxoplasma gondii and antimicrobial activities of thiosemicarbazides, 4-thiazolidinones and 1,3,4-thiadiazoles. **Europ. Jour. of Medic. Chem.** 45: 3685- 3691, 2010.

LIMA G. O., D'ALBUQUERQUE I. L.; LOUREIRO P., CARMONA C. L., BERNARD M. Z. Novas observações sobre a biflorina, antibiótico isolado da *Capraria biflora* L. **Rev. Quím. Industrial.** v. 249, p. 28-30, 1954.

LIMA, O.G., D'ALBUQUERQUE, I. L., O.G., NAVARRO, M.C.P. Novo método de extração e purificação de biflorina com possibilidade Industrial. **Rev. do Inst. de Antib.** Vol. 4 n (1/2);1962.

LIMA, O.G., D'ALBUQUERQUE, I.L., LOUREIRO, P., 1953. Biflorina, novo antibiótico isolado da *Capraria biflora* (*Scrophulariaceae*). **Rev. de Quím. Ind.** (249) |1|-3.

LIMA, O.G., D'ALBUQUERQUE, I.L., LOUREIRO, P., CARMONA, C.L., BENARD, Z. Biflorina, novo antibiótico isolado da *Capraria biflora* (Scrophulariaceae). **Rev. de Quím. Indus.** n 249; 1958.

LIU S. J., TSAI J.P., SHEN C.R., SHER Y.P., HSIEH C.L., YEH Y.C., CHOU A.H., CHANG S.R., HSIAO K. N., YU F. W., CHEN H. W. Induction of a distinct CD8 Tnc17 subset by transforming growth factor and interleukin-6. **J. of Leuk. te Biol.**, 82(2), 354–360, 2007.

LOCKHART, E., GREEN, A. M., FLYNN, J. L. IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during Mycobacterium tuberculosis infection. **J. of Immun.**, 177 (7), 4662–4669, 2006.

LYRA Jr D. P., LIRA A. A. M., AQUINO T. M., SOARES L. A. L., SANTANA D. P. Development and Validation of a Chromatographic Method for the Determination of Biflorin obtained from *Capraria biflora* Roots. **Lat. Am. J. Pharm.** 26 (1): 125-9; 2007.

LYRA JR., D. P. **Isolamento, Atividade Antifúngica e Validação do Método de Doseamento da 3-prenil-6,9 dimetil 7,8 dioxoquinona – Biflorin.** 109 f. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1999.

MAKARE, N.; BODHANKAR, S.; RANGARI, V. Immunomodulatory activity of alcoholic extract of *Mangifera indica* L. in mice. **J. of Ethno.**, v. 78, p. 133-137, 2001.

MARQUES, G. S.; SILVA C. C. A. R.; VILELA, W. T.; FIGUEIRÊDO, C. B. M.; SILVA, A.C. A. F.; DA SILVA, R. M. F.; NETO, P. J. R. Plantas medicinais como alternativa terapêutica para aumento da resistência imunológica. **Rev Ciênc Farm Bás. Apl.** 36(1):27-33.2015.

MATOS, FJA. Plantas Medicinais. **Universidade Aberta**, p. 2. 1988.

MEDZHITOV, R. & JANEWAY, C. Innate immunity. **The New Eng. J. of Medic.** Vol. 343 N. 5. 2000.

MELO, C. M. L., MELO, H., CORREIA, M. T. S., COELHO, L. C. B. B., SILVA, M. B., PEREIRA, V. R. A. Mitogenic response and cytokine production induced by cramoll 1,4 lectin in splenocytes of inoculated mice. **Scan J. of Immunol.** 73(2), 112-21. 2011.

MIOSSEC, P.; KOLLS, J.K. Targeting IL-17 and Th17 cells in chronic inflammation, Drug Discov. **Nat. Rev.** 11 763-776; 2012.

MISIAK A.; WILK, M.M; RAVERDEAU, M.; MILLS, K.H.G. IL-17–producing innate and pathogen-specific tissue resident memory gd T cells expand in the lungs of *Bordetella pertussis*–infected mice. **J. Immunol.** 198 363-374; 2017.

MONTENEGRO R. C., VASCONCELLOS M. C., BARBOSA G. S., BURBANO R. M.R., SOUZA L. G.S., LEMOS T. L.G., COSTA-LOTUFO L. V., MORAES M. O. A novel o-naphtoquinone inhibits N-cadherin expression and blocks melanoma cell invasion via AKT signaling. **Toxic. in Vitro.** 27: 2076–2083; 2013.

NACHEGA J. B., MUGAVERO M. J., ZEIER M., VITÓRIA M., JOEL., GALLANT. Treatment simplification in HIV-infected adults as a strategy to prevent toxicity, improve adherence, quality of life and decrease healthcare costs. **Patie. Prefer. and Adher.** 5 357–367; 2011.

NUNES-PINHEIRO, D. C. S.; LEITE, A. K. R. M.; FARIAS, V. M.; BRAGA, L. T.; LOPES, C. A. P. Atividade imunomoduladora das plantas medicinais: perspectivas em medicina veterinária. **Ciê. Ani.**13(1): 23-32, 2003.

O'BYRNEP. M. Cytokines or Their Antagonists for the Treatment of Asthma. **CHEST.**130:244–250; 2006.

OLIVEIRA C. M. B., Sakata R. K., TSA, Issy A. M., Gerola L. R., Salomão R. Citocinas e Dor. **Rev Bras Anesthesiol.** 61(2): 255-265; 2011.

OLIVEIRA, C.G.T.; MIRANDA, F.F.; FERREIRA, V.F.; FREITAS, C.C.; CARBALLIDO, J.M.; CORRÊA, L.C.D. - Synthesis And Antimicrobial Evaluation Of 3-Hydrazino-Naphthoquinones As Analogs Of Lapachol. **J. Braz. Chem. Soc. Bras.**, 12, 339-345, 2001.

OLIVEIRA, G.A.; OKADA; GENTA, R.S.; MAMIZUKA, E.M.; Avaliação Da Tolerância A Vancomicina Em 365 Cepas Hospitalares De *Staphylococcus Aureus* Resistentes A Oxacilina. **J. Bras. Patol.**, 37; 239-246, 2001a.

ORHAN, L. E.; MESAİK, M. A.; JABEEN, A.; KAN, Y. Immunomodulatory properties of various natural compounds and essential oils through modulation of human cellular immune response. **Ind. Crops and Prod.** 81: 117–122. 2016.

PANCOTE C. G. **Planejamento, síntese e avaliação biológica de derivados pirrólicos com potencial atividade anti-inflamatória.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

PARK, H., et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. **Nat. Immun.** 6 (11), 1133–1141. (2005).

PEREIRA D. G. Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. **Quim. Nova**, Vol. 30, No. 1, 171-177, 2007.

PESSOA C., SILVEIRA E. R., LEMOS T. G. L., WETMORERINE CHEMISTRY (SCHEUR P. J., ED.). SPRINGER PUBL., BER- L. A., MORAES M. O., and Leyva A. Antiproliflin, pp. 61D92. erative effects of compounds derived from plants of northeast Brazil. **Phytother. Res.** 14, 187D191 (2000).

RALPH A.C.L., CALCAGNO D.Q., SOUZA L.G.S., LEMOS T.L.G., MONTENEGRO R.C., SMITH M.A.C. VASCONCELLOS M.C. Biflorin induces cytotoxicity by DNA interaction in genetically different human melanoma cell lines. **Toxicol. in vitro.** 34 237-245; 2016.

RANG HP, DALE MM, RITTER JM, GARDNER P. In: *Fármacos Antifúngicos. Farmacologia*. Elsevier, 7ª ed. 2011.

REN X., LI J., ZHOU X., LUO X., HUANG N., WANG Y., CHEN X., WEI Y. Recombinant Murine Interleukin 4 Protein Therapy for Psoriasis in a Transgenic VEGF Mouse Model. *Dermatology*. 219:232–238; 2009.

SANGI, D.P. estratégias de síntese na descoberta de fármacos: o emprego da síntese orientada pela diversidade estrutural. *Quim nova*. Vol. 39, No. 8, 995-1006, 2016.

SANTOS, A.L.; SANTOS, D.O.; FREITAS, C.C.; FERREIRA, B.L.A.; AFONSO, I.F.; RODRIGUES, C.R.; CASTRO, H.C. - Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. *J. Bras. de Medic. e Pat. Lab.*, 43, 413-423, 2007.

SARICH TC, ZHOU T, ADAMS SP, BAIN AI, WALL RA, WRIGHT JM. A model of isoniazid-induced hepatotoxicity in rabbits. *J Pharm. Tox. Meth.* V.34, N.2, P.109-116, 1995.

SENGER M. R., FRAGA C. A.M., DANTAS R. F., SILVA JR F. P. Filtering promiscuous compounds in early drug discovery: is it a good idea? *Drug Discovery Today*. Vol 21, N. 6, June; 2016.

SILVA M. N., FERREIRA V. F., SOUZA M. C. B. V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na *□*-lapachona e derivados. *Quim. Nova*. Vol. 26, No. 3, 407-416, 2003.

SOMMER C, WHITE F - Cytokines, Chemokines, and Pain, em: Beaulieu P, Lussier D, Porreca F et al. – *Pharm. of Pain*. 1st Ed, Seattle, IASP Press; 279-302, 2010.

SOUZA L. G. S., ALMEIDA M. C. S., LEMOS T. L. G., RIBEIRO P. R. V., BRITO E. S., SILVA V. L. M., SILVA A. M. S., BRAZ-FILHO R., COSTA J. G. M., RODRIGUES F. F. G., BARRETO F. S., MORAES M. O. Synthesis, antibacterial and cytotoxic activities of new biflorin-based hydrazones and oximes. *Bioor. & Medic. Chem. Lett.* 26: 435–439; 2016.

SOUZA L. G. S., ALMEIDA M. C. S., MONTE F. J. Q., SANTIAGO G. M. P., FILHO R. B., LEMOS T. L. G. Constituintes químicos de *Capraria biflora* (Scrophulariaceae) e atividade larvicida de seu óleo essencial. *Quim. Nova*. Vol. 35, No. 11, S1-S8, 2012.

SOUZA, E. T.; LOPES, W. A.; DE ANDRADE, J. B. Fontes, formação, reatividade e determinação de quinonas na atmosfera. *Quím. Nova*. v. 32, n. 4, p. 486-495, fevereiro de 2016.

SUDO R.T., ZAPATA-SUDO G., BARREIRO E.J. The new compound, LASSBio 294, increases the contractility of intact and saponin-skinned cardiac muscle from Wistar rats. *Brit. J. of Pharm.* 134, 603 ± 613; 2001.

THOTA S., RODRIGUES D. A., PINHEIRO P. S. M., LIMA L. M., FRAGA C. A.M., BARREIRO E. J. N-Acylhydrazones as drugs. **Bioor. & Medic. Chem. Let.** 28: 2797–2806; 2018.

VASCONCELLOS M. C., BEZERRA, D.P., FONSECA, A.M., PEREIRA M.R.P., LEMOS T.L.G., PESSOA, O.D.L., PESSOA C., MORAES, M.O., ALVES A.P.N.N., COSTA-LOTUFO L. V. Antitumor activity of biflorin, an o-naftoquinone isolated from *Capraria biflora*. **Biol. Pharm. Bull.** 30 (8) 1416-1421; 2007.

VASCONCELLOS M. C., MONTENEGRO R. C., MILITÃO G. C. G., FONSECA A. M., PESSOA O. D. L., LEMOS T. L. G., PESSOA C., MORAES M. O. COSTA-LOTUFO L. V. Bioactivity of biflorin, a typical *O*-naphthoquinone isolated from *Capraria biflora*. **L.Z.Natuforsch.** 60c, 394-398; 2004.

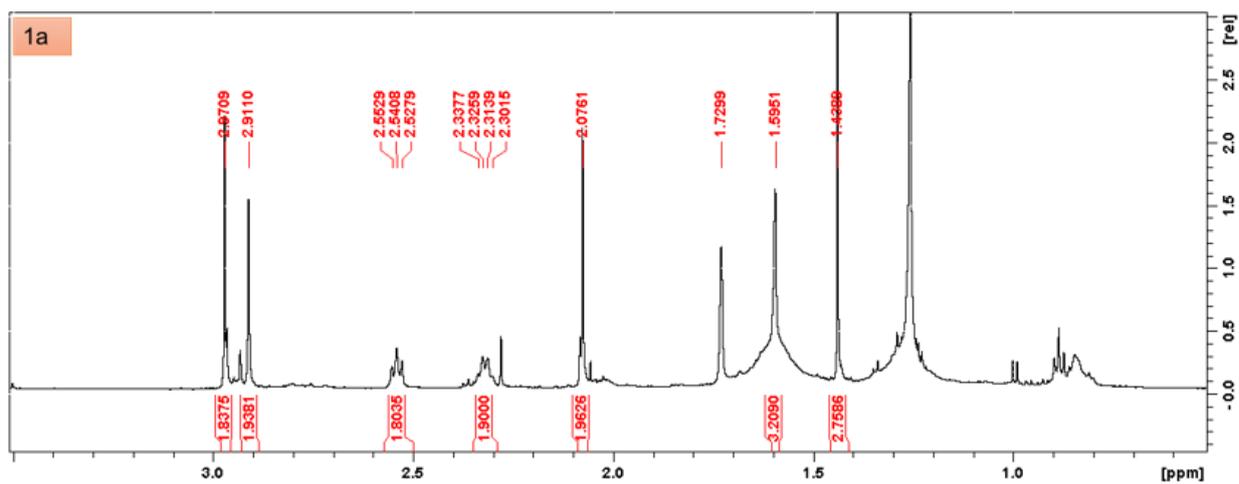
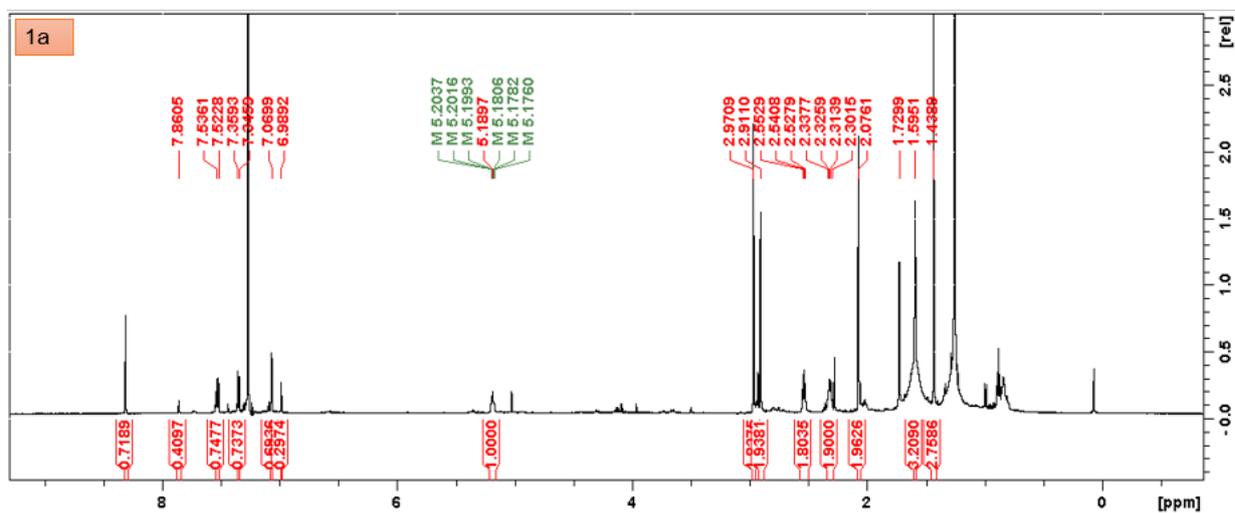
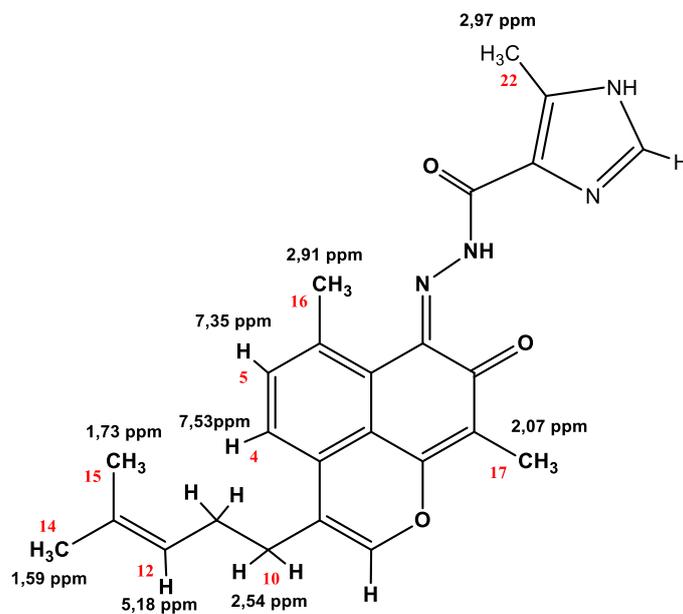
VASCONCELLOS, M. C.; BEZERRA, D. P.; FONSECA, A. M.; ARAUJO, A. J.; PESSOA, C.; LEMOS, T. L. G.; LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; MONTENEGRO, R. C. The in-vitro and in-vivo inhibitory activity of biflorin in melanoma. **Melanoma Research.** v. 21, p. 106-114, 2011.

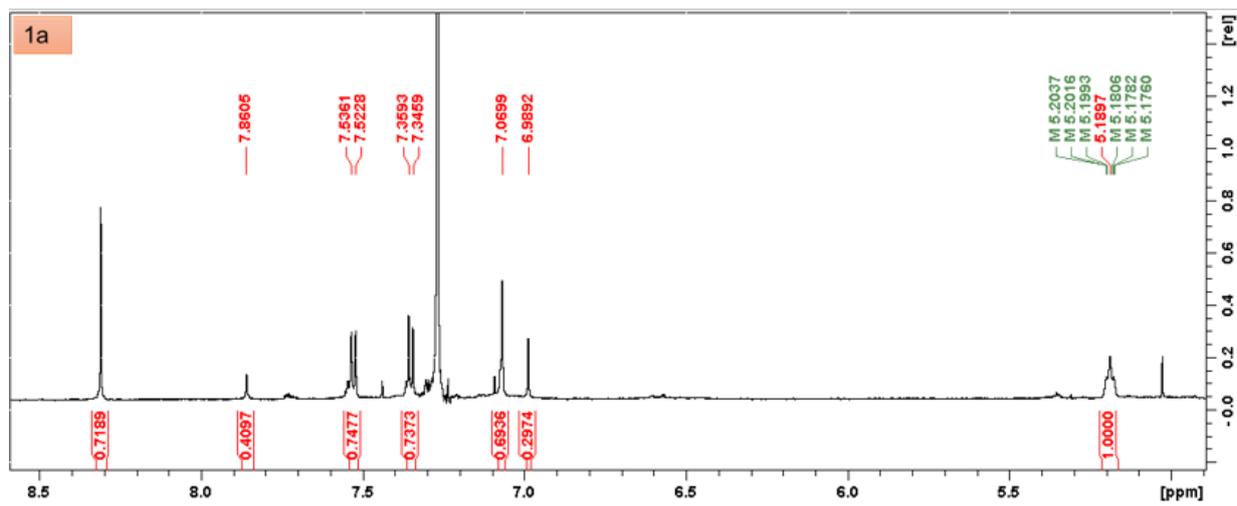
VIEIRA A. J.H., SANTOS J. I. Mechanisms of resistance of *Candida albicans* to the antifungals fluconazole, amphotericin B and caspofungin. **RBAC.**49(3):235-9 235; 2017.

ZHANG J-M., AN J. Cytokines, Inflammation and Pain. **Int Anesthesiol Clin.** 45(2): 27–37; 2007.

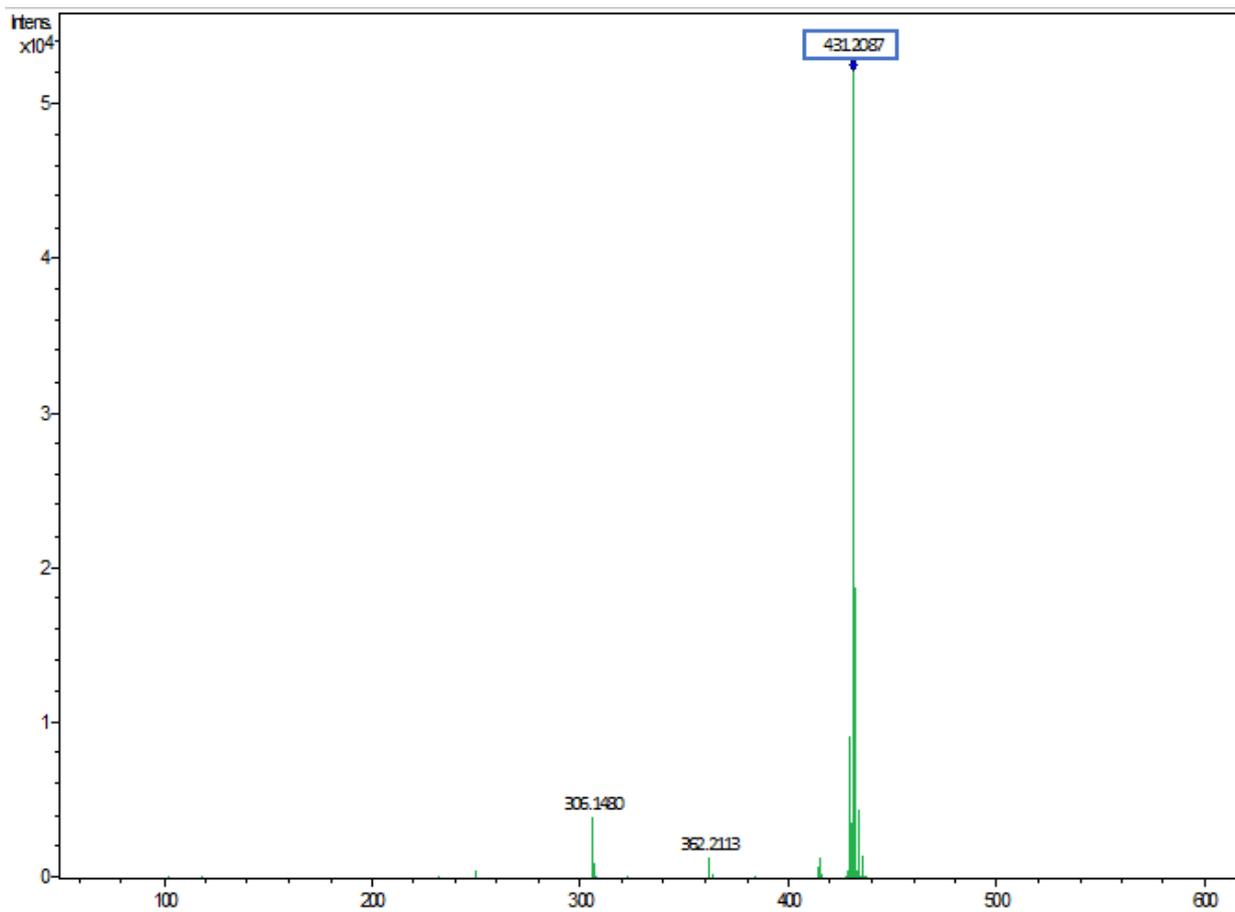
APÊNDICE A - ESPECTROS DOS DERIVADOS 1a-c

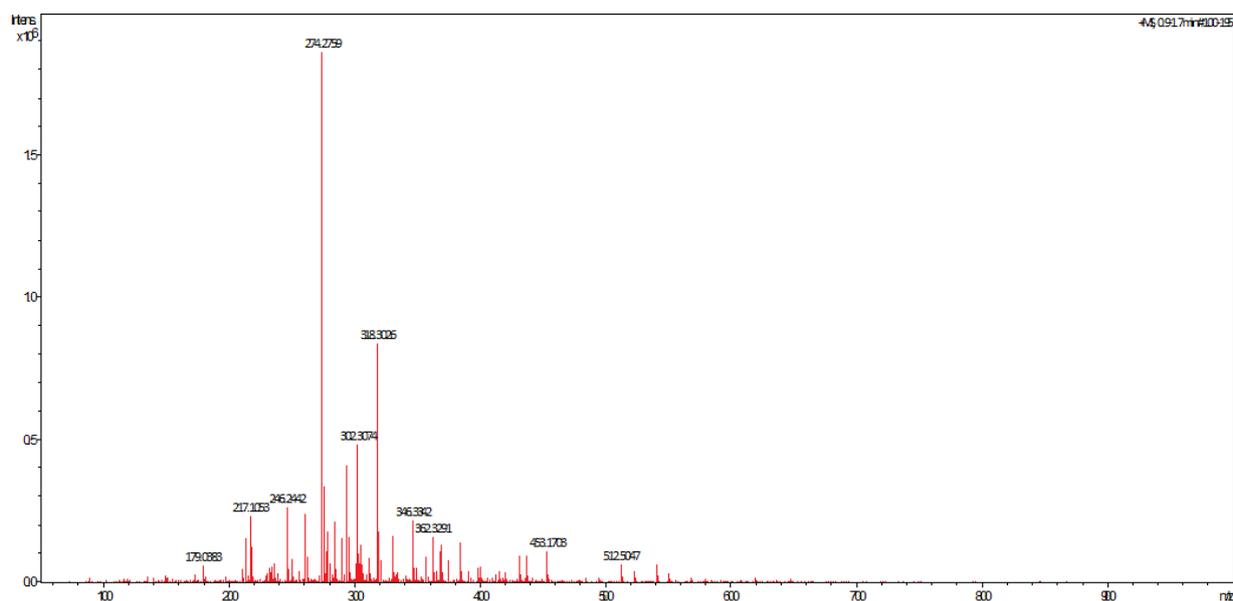
 RMN ^1H do derivado 1a





Espectro de massa de alta resolução **1a**

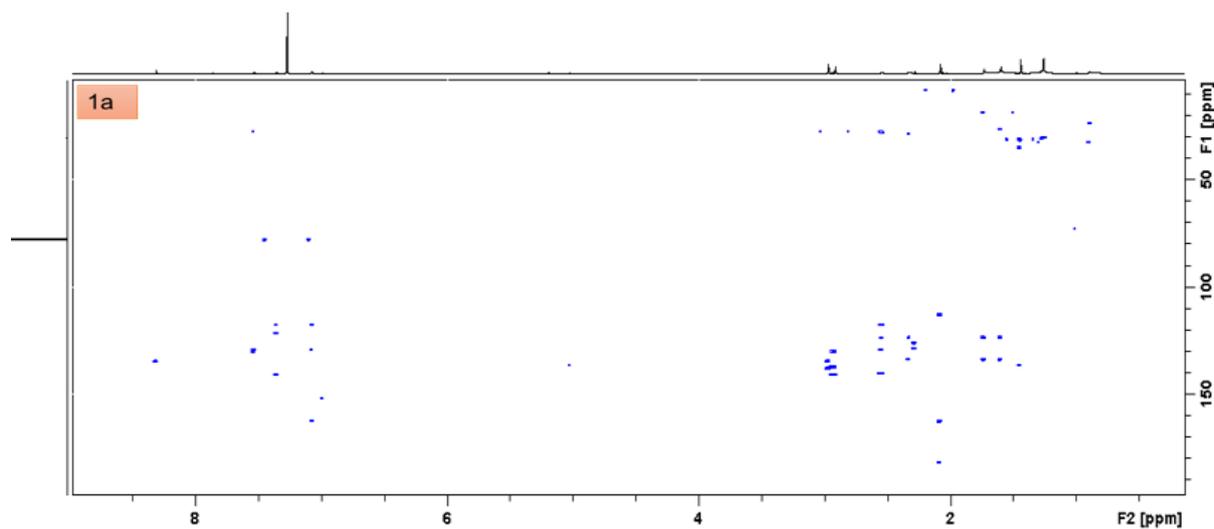




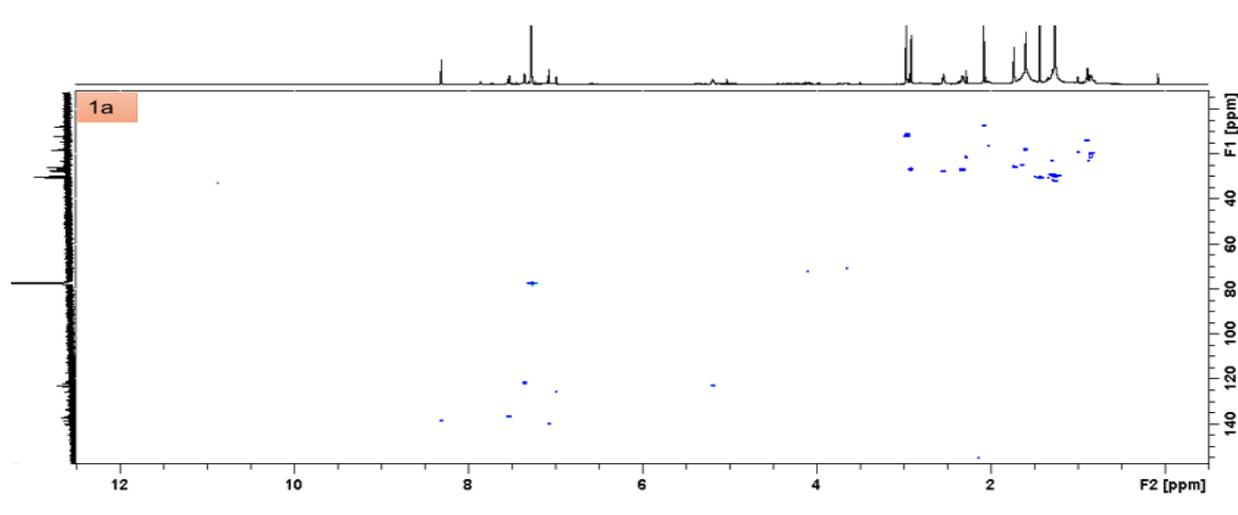
✚ Tabela da correlação entre RMN ^1H e ^{13}C do derivado **1a**

C	HSQC ^1JCH		HMBC	
	δC	δH	^2JCH	^3JCH
2	139.87	7.06 (s)	–	H-10
3	117.15	–	H-2 and H-10	H-5*
3a	128.81	–	H-4	H-2 and H-10
4	136.79	7.53 (d, 7.9)	–	–
5	121.80	7.35 (d, 8.0)	–	–
6	120.93	–	H-5	–
6a	129.65	–	–	–
7	–	–	–	–
8	181.34	–	–	H-17
9	112.54	–	–	H-17
9a	161.91	–	–	H-2 and H-17
9b	140.32	–	–	H-5* and H-16*
10	27.69	2.54 (t, 7.1)	H-11	H-2
11	27.15	2.32 (q, 7.1)	H-10	–
12	122.99	5.18 (tt, 1.3 and 7.1)	H-11	H-10, H-14 and H-15
13	133.49	–	H-14 and H-15	H-11
14	18.07	1.59 (s)	–	H-15
15	25.93	1.73 (s)	–	H-14
16	27.13	2.91 (br s)	–	–
17	7.60	2.07 (s)	–	–
18	–	–	–	–
19	136.79	–	–	H-20
20	138.45	8.31 (s)	–	–
21	133.49	–	H-22	H-20
22	12.12	2.97 (s)	–	–

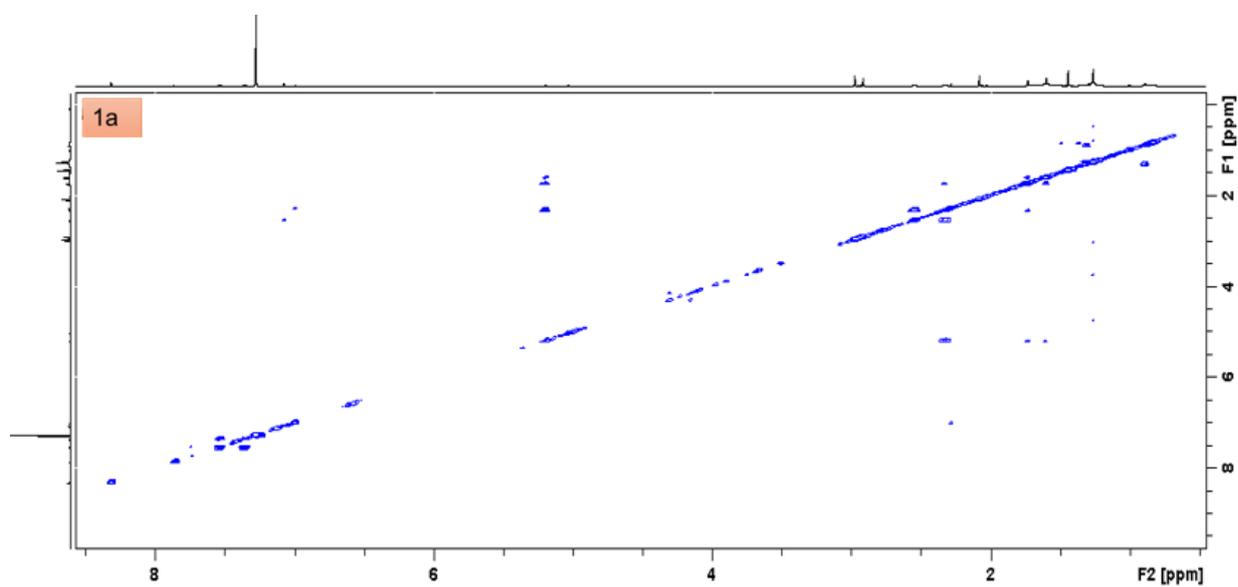
HMBC

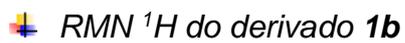


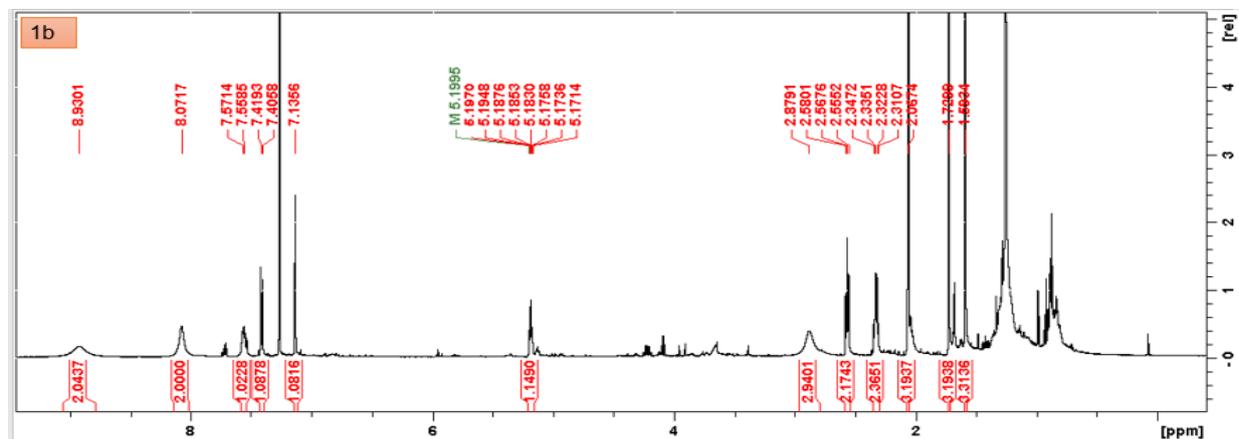
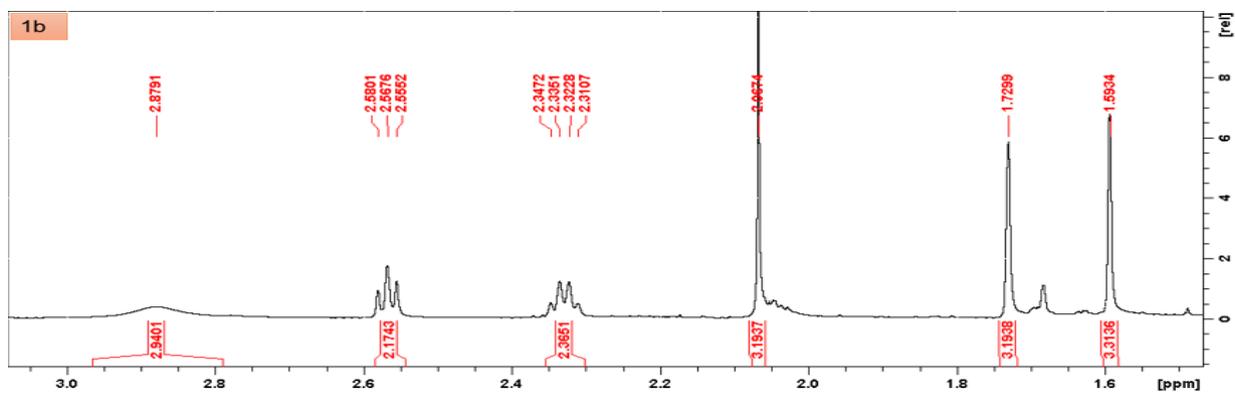
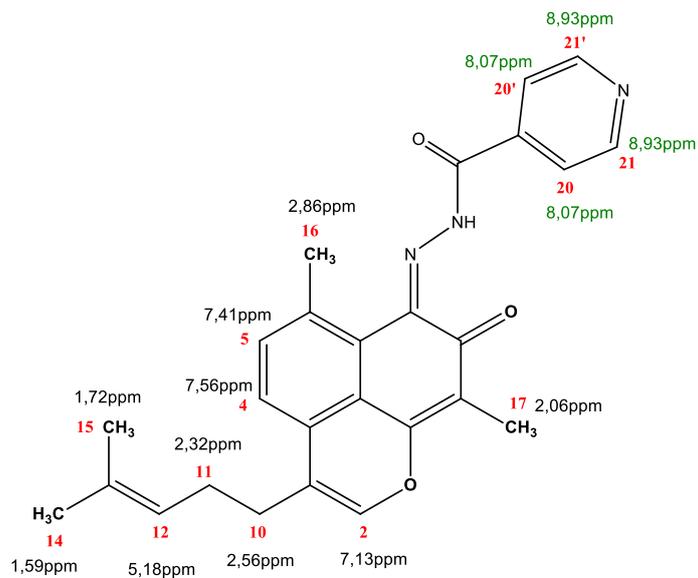
HSQC

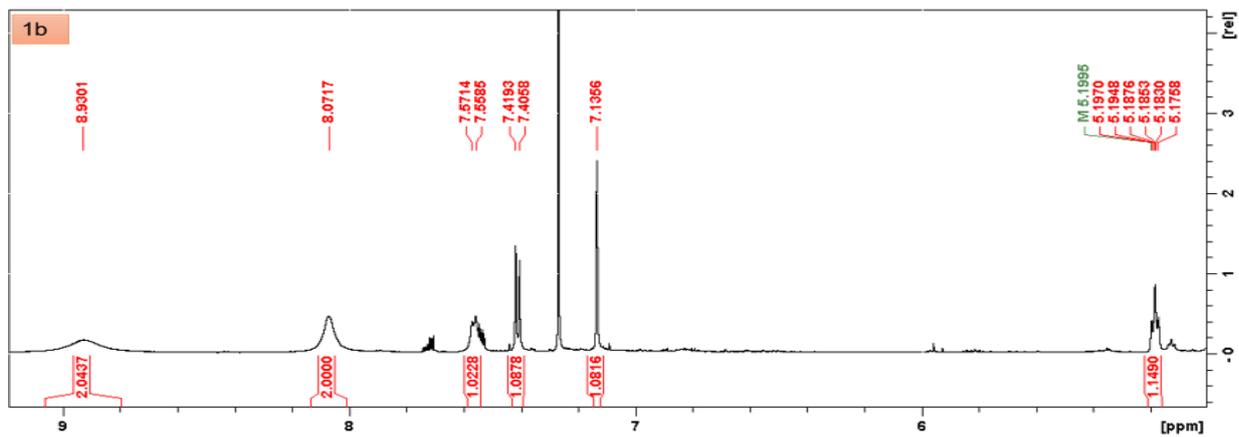


COSY

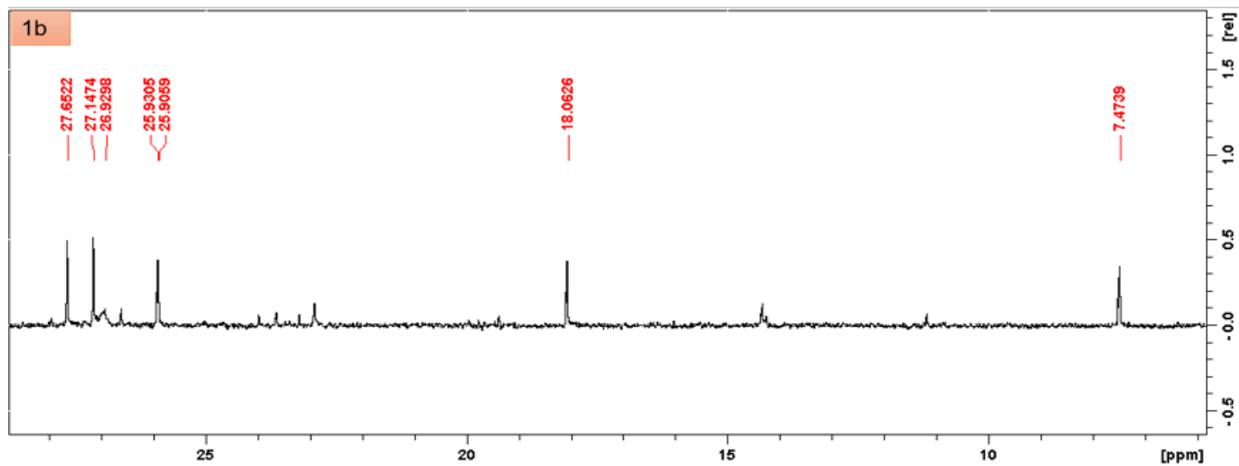
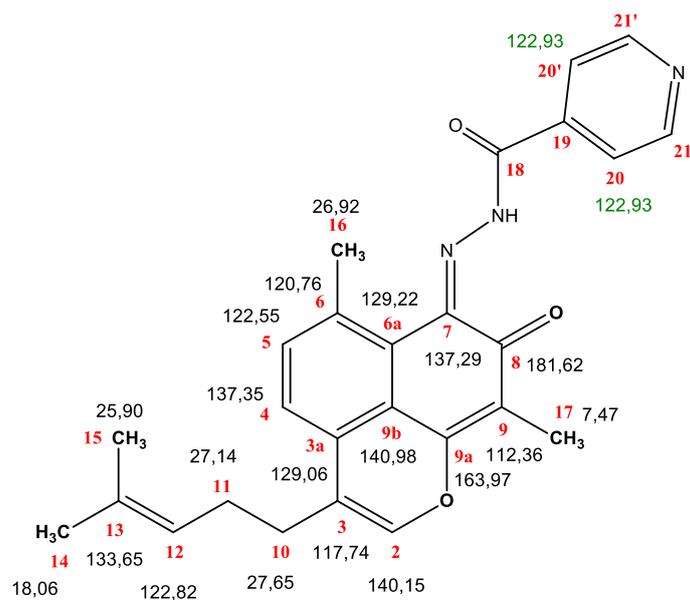


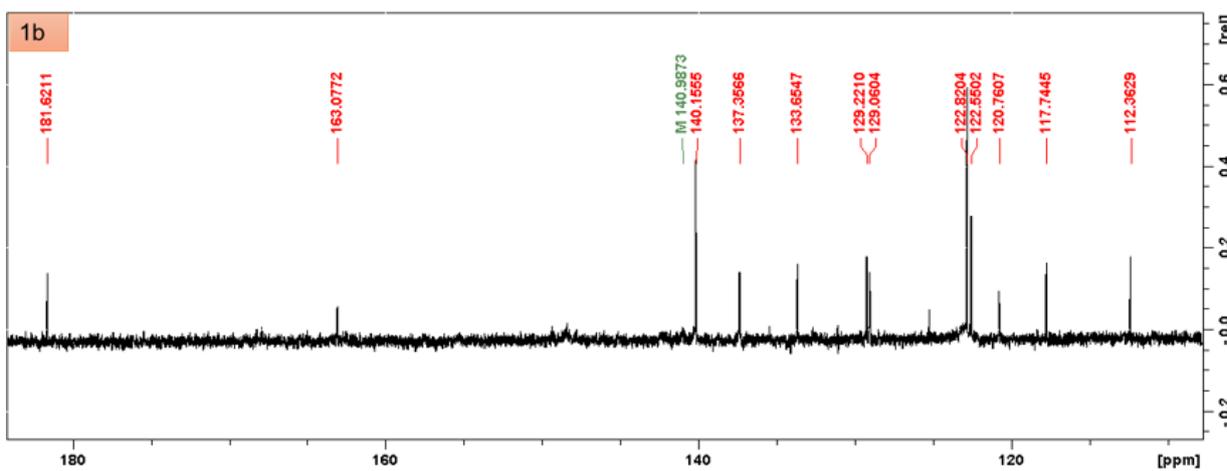
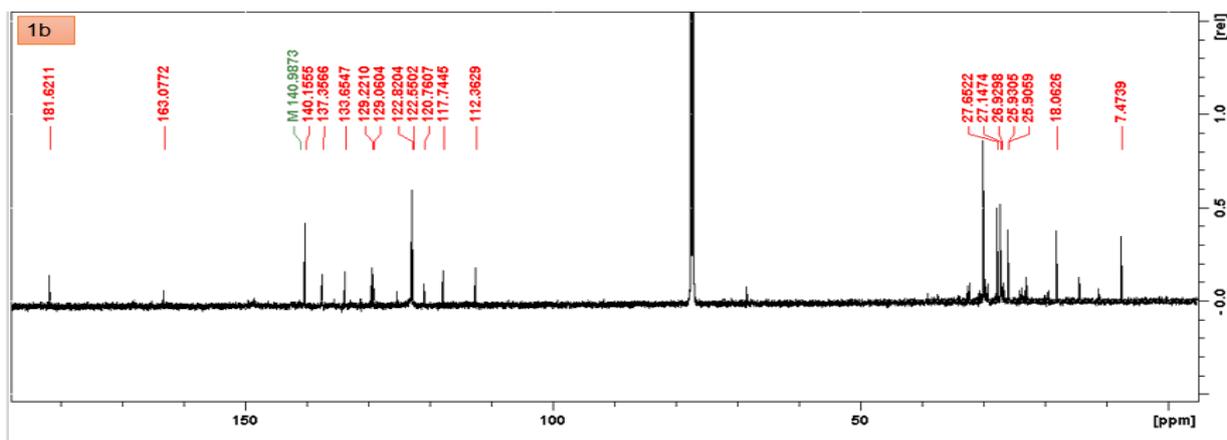




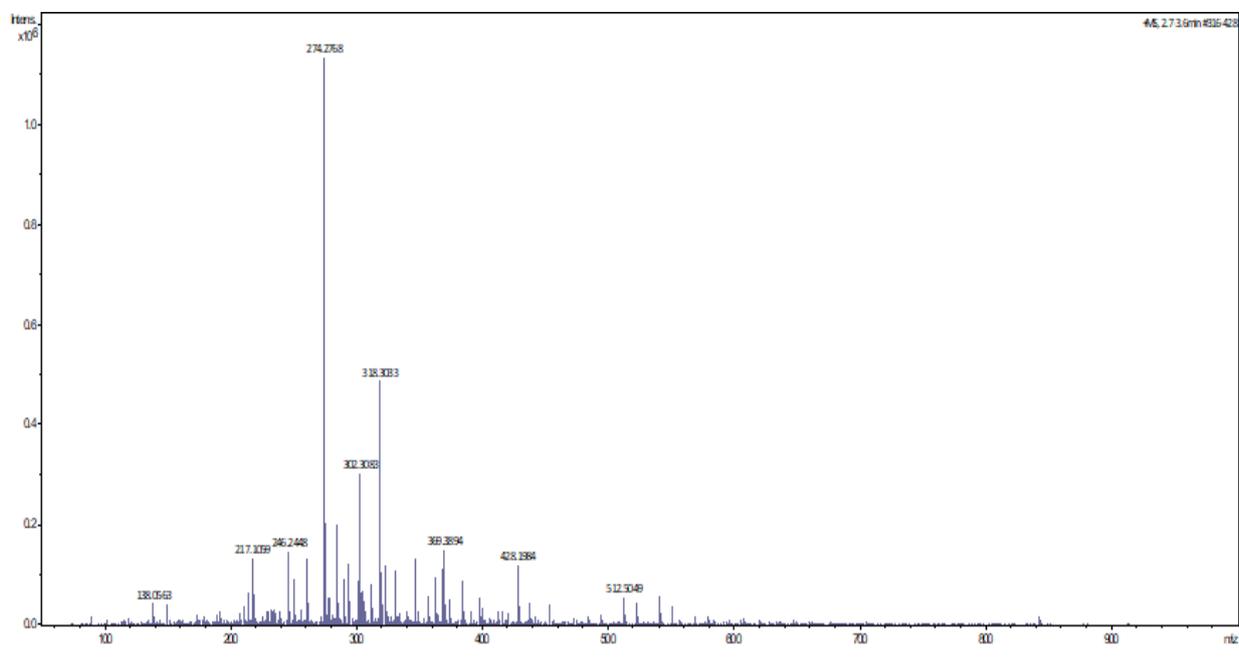


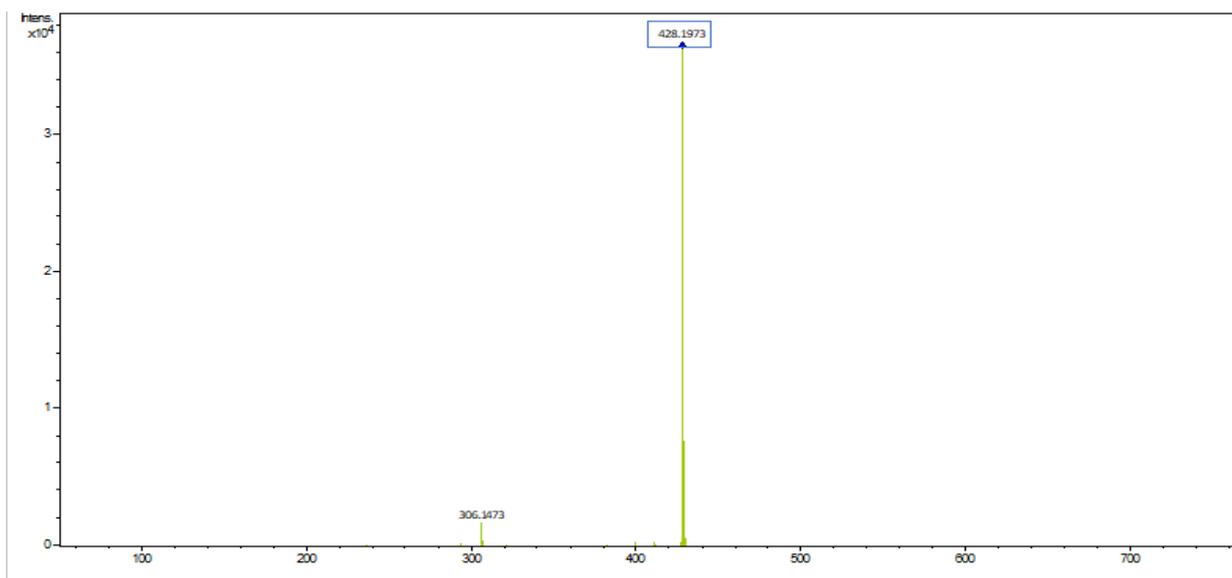
RMN ^{13}C do derivado **1b**



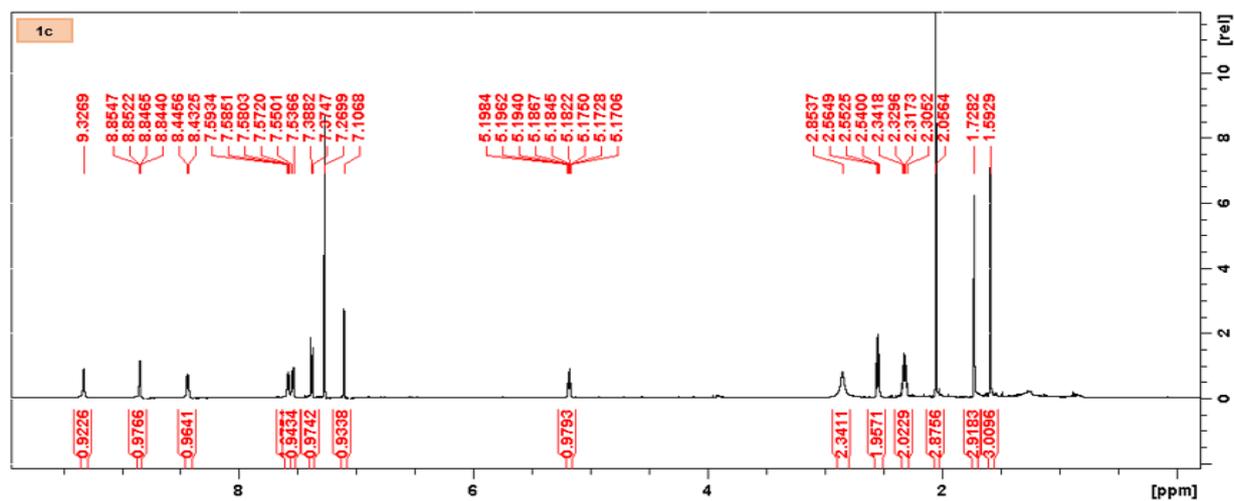
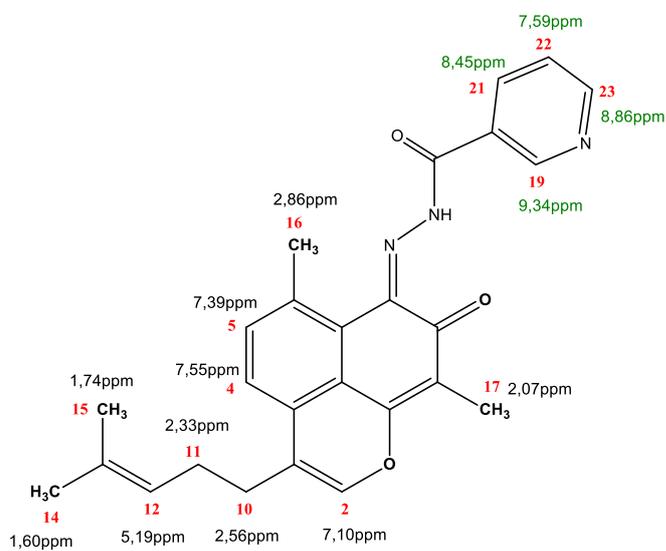


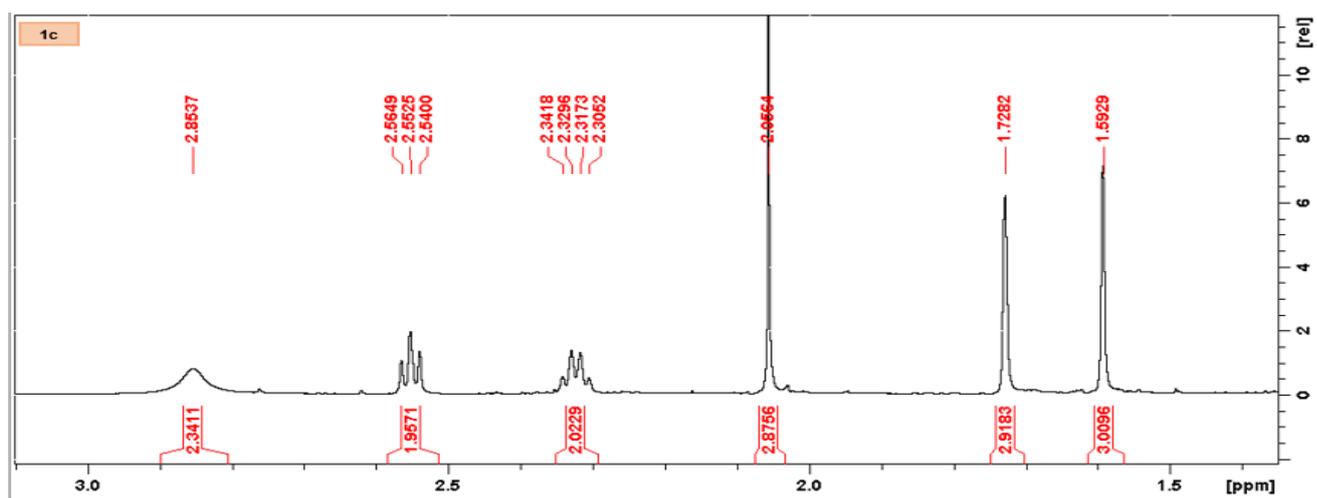
Espectro de massa de alta resolução do derivado **1b**



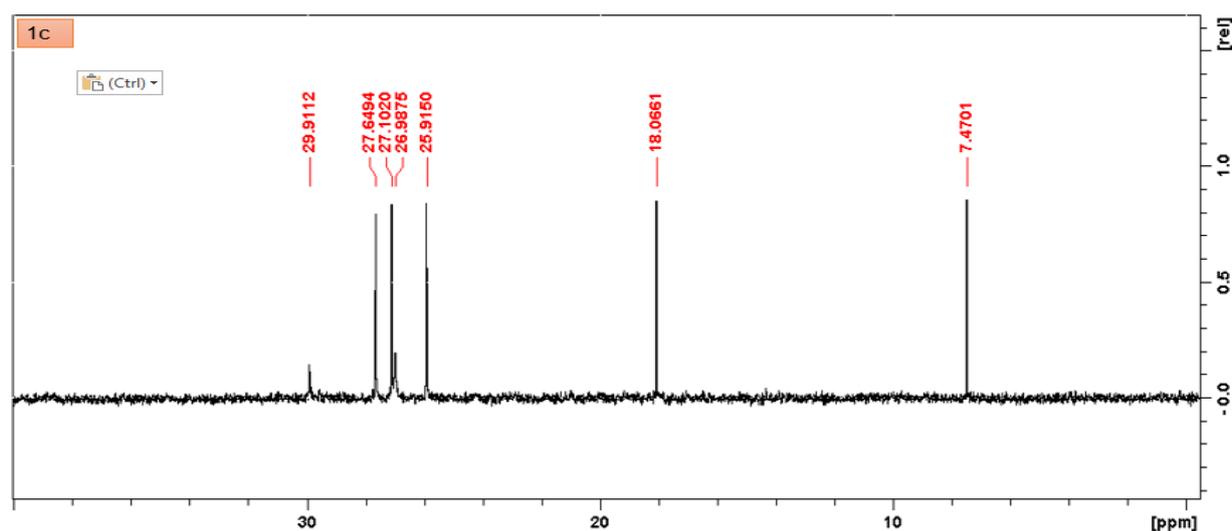
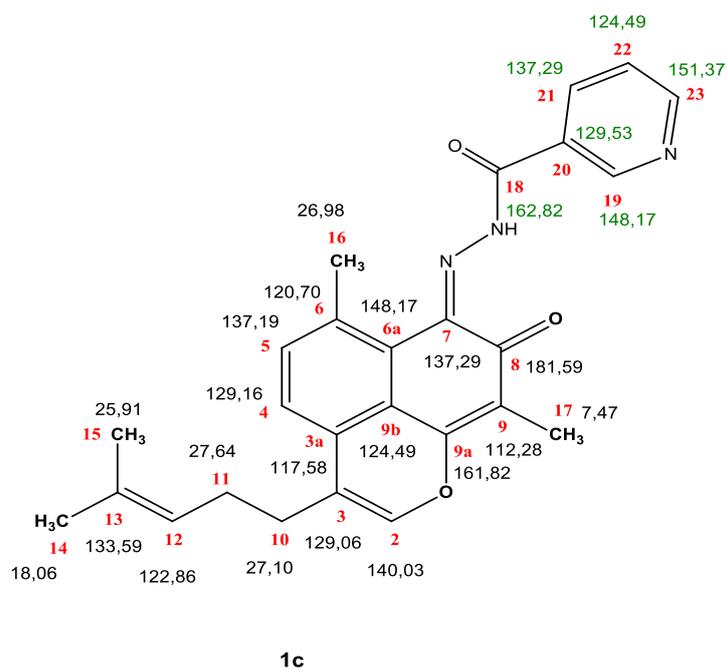


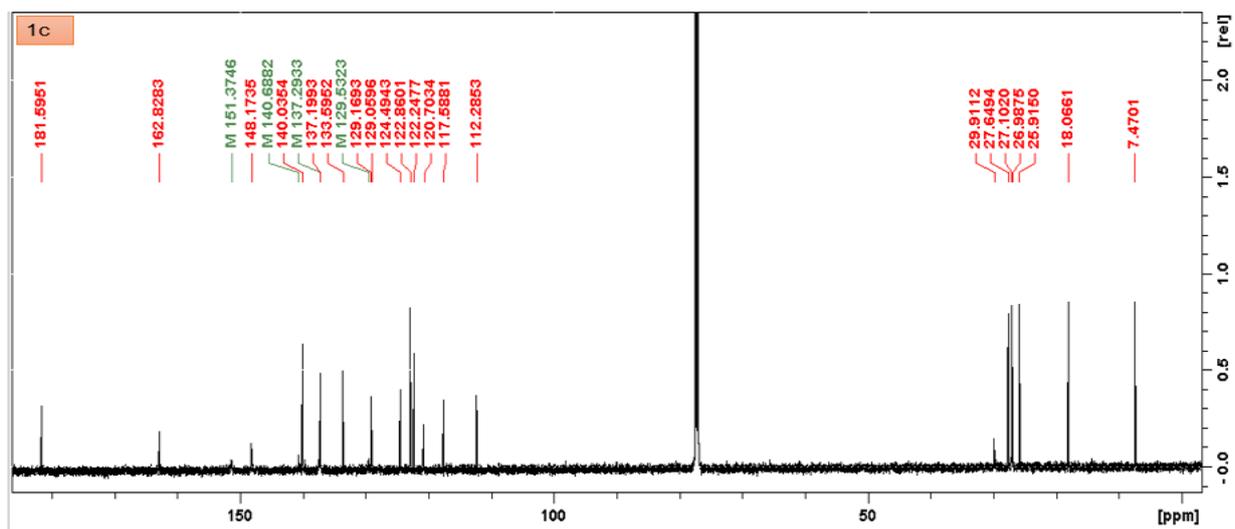
RMN ¹H do derivado 1c





RMN ^{13}C do derivado 1c





APÊNDICE B -ARTIGO DA DISSERTAÇÃO (PUBLICADO)

Original article

Evaluation of the immunomodulatory effect against splenocytes of Balb/c mice of biflorin obtained from *Capraria biflora* by a new isolation method

Mariza S. de Lima Silva^a, Jefferson de A. Santos^a, Antônio J. Alves^b, Rosali M. F. da Silva^b, Beate S. Santos^b, Virginia M. B. de Lorena^c, Gibson G. de Oliveira^d, Cristiane M. L. de Melo^a, Alexandre J. da Silva Góes^{*,a}

^aDepartamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

^bDepartamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

^cCentro de Pesquisa Ageu, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE, Brasil.

^dDepartamento de Física e Química, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

*Corresponding author: Alexandre José da Silva Góes, E-mail: ajsg@ufpe.br

Received 13 August 2018; Accepted 25 January 2019

Abstract: Biflorin (6,9-dimethyl-3-(4-methylpent-3-en-1-yl) benzo[de]chromene-7,8-dione) is a promising substance that has been increasingly studied in the past decades due to its diverse pharmacological properties (*i.e.* antitumor, antioxidant, antiinflammatory, antimicrobial activity etc). Aiming the comprehension of its antitumoral activity we investigated the cell proliferation and cytotoxicity habilities of biflorin against mice splenocytes Balb/c. Biflorin was able to stimulate mice splenocytes Balb/c in 48h of incubation at a concentration of 20.2µM. Its immunostimulation promoted the production of cytokines such as: TNF-α, IFN-γ, IL-2, IL-6 and IL-17, inducing the immune profile towards a Th1 response. Moreover, an original method which led to an excellent yield with less processing time compared to the methods described in the literature was developed to obtain biflorin, from sawdust of *Capraria biflora* L.,

Scrophulariaceae. This method shows a great potential of increasing the production of this pharmacological active compound.

Keywords: Biflorin; original method; biological activity; immunomodulatory effect

Introduction

Within a great variety of known phytochemicals, naphthoquinones represent an important group of compounds that show antitumor properties, which from the point of view of scientific research, make them good candidates for new drugs prototypes (Moraes et al., 2014; Jardim et al., 2015; Oliveira et al., 2017; Lara et al., 2018).

The biflorin, (6,9-dimethyl-3-(4-methylpent-3-en-1-yl) benzo[de]chromene-7,8-dione) CAS number 5957-32-4;99671-97-3 is a naphthoquinone found in the roots from *Capraria biflora* L. (Lima et al., 1953). This plant belongs to the Schrophulariaceae family, Angiosperm group, is originated at the Antilles and distributed from north to south America (Souza et al., 2012). In Brazil, this species is known as marajó tea, méxico tea, américa tea or river tea and is widely distributed throughout the country (Lemos et al., 2007). In popular medicine, the leaves of this species are used in the treatment of pain and fever, vomiting, diarrhea, hemorrhoids, rheumatism, and swelling. However, pharmacological studies with aqueous extract of the leaves presented analgesic activity, whereas of the roots an antimicrobial activity was reported (Correia, 1984; Lemos et al., 2007). Systematic studies have shown that biflorin induces antitumor activity (Vasconcellos et al., 2007), antioxidant activity (Vasconcellos et al., 2005; 2010), anti-inflammatory, antimicrobial, antibiotic and analgesic action (Souza et al., 2012). Moreover, biflorin is a promising substance due of its pharmacological activity against gram-positive alcohol-acid resistant bacteria (Wisintainer et al., 2014), demonstrating also cytotoxic activity against several tumor cell lines (Vasconcellos et al., 2005; 2007) indicating a potent antitumor therapeutic agent (Vasconcellos et al., 2011; 2015; Wisintainer et al., 2015). Ralph and collaborators (2016), for instance, showed that biflorin reduces the viability of melanoma cell lines by DNA interaction, proving to be a therapeutic option. More recently, Jeon and collaborators (2017) described the use of biflorin in the treatment of cognitive problems in mice.

Although many studies on the antitumor activity of biflorin have been presented in the literature, the scarcity of data on its immunological activation or the description of the cellular

stimulation *in vitro*, hinders the discussion on the possible mechanisms involved in interaction between biflorin and immunological cells. Immunostimulant compounds, especially substances that are able to act in antitumor, antiviral and immunological therapies, play a fundamental role in many different research fields being important targets of immune response research (Chacon et al., 2016; Davis et al., 2017).

The red-violet substance biflorin was first described in the literature in 1952 (Lima et al., 1953) and, since then, researchers have developed several methods to obtain this compound at a higher yield. For instance, Lima et al. (1958) applied biflorin acetone extracts to water-inactivated silica gel column chromatography using pure benzene and then acetone to yield 0.2% pure biflorin. Later, the same researchers, in order to increase this yield, developed a new method with industrial applicability. Biflorin extracts were obtained with ethyl ether at 50°C in a Soxhlet apparatus and then treated with 0.5% NaOH solution several times. After recrystallization a 0.4% yield of pure biflorin was reported (Lima et al., 1962). In 2003, Fonseca et al. (2003) used 450g of the roots of *C. biflora* and obtained 4.6g of the crude extract applying chloroform. Nevertheless after isolation by silica gel chromatography, only 0.022% yield (100mg) was observed. Vasconcellos et al. (2007) used 6kg of the root and isolated 2g of the crude criteria for two days and after column chromatography, 1.5g of the pure product was obtained, with an overall yield of 0.025%. All these studies show the inherent difficulty in obtaining higher yields of biflorin, hindering industrial applications of this natural product.

In the present study we used an original method of simultaneous extraction and purification of natural products from herbal materials developed by Góes (2018) and applied to sawdust from roots of *Capraria biflora*, aiming the scale up production of biflorin. The extraction procedure increases the yield of biflorin, combining solvent economy and low processing time. The extracted biflorin was applied to study the immunostimulation pathway promoted in spleen Balb/c mice cells.

Materials and methods

Chemicals

The melting point was determined in a Büchi-510 capillary apparatus. IR spectra were measured on a PerkinElmer® (Spectrum 400) IR spectrophotometer. ¹H NMR ¹³C NMR spectra were recorded on a Bruker Avance® DRX-400 spectrometer by using tetramethylsilane as the internal standard. The chemical shifts are reported in δ units, and coupling constants (*J*)

are reported in hertz. High resolution mass spectrometry (HRMS) analysis of the pure compounds was performed with a micrOTOF II apparatus. TLC development was conducted on 0.25mm silica gel plates (60F₂₅₄, Merck).

Extraction and isolation

First we tested the best elution condition for the biflorin, taking into account a retarding factor (R_f) of 0.3 – 0.45 and the more adequate solvent systems tested were (a) hexane/ethyl acetate 8:2 (R_f 0.39) and (b) hexane/ethyl ether 7:3 (v/v) (R_f 0.30). In order to perform the extraction and isolation of the biflorin we applied the set up described in Figure 1, where the column was partially filled by 25g of silica gel and then further filled using 20g of sawdust from *C. biflora* roots. After adding a quantity of 150ml of eluent hexane/ethyl acetate 8:2 (v/v) over the sawdust, the system was heated at a temperature sufficient to feed the column (~65°C). The extraction/isolation process was performed continuously for 5h until all biflorin was isolated. We applied the same elution solvent to monitor the fractions by thin layer chromatography (TLC). During the process, four fractions (~10ml) were collected in the bottom flask. Fractions of 2 to 4 were added together, rendering a pure violet compound, biflorin.

Biflorin (6,9-dimethyl-3-(4-methyl-3-pentenyl)naphtha[1,8-bc]-pyran-7,8-diona)

Violet solid; m.p. 147-148°C; IR (cm⁻¹): 2920;1682;1644; 1624;1596;1579;1475;1437. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)- δ_H (multiplicity, *J* in Hz): 1.60 (s, H-14); 1.74 (s, H-15); 2.01 (s, H-17); 2.28 (q, 7.2; H-11); 2.53 (t, 7.2; H-10); 2.74 (s, H-16); 5.18 (s, H-12); 7.10 (s, H-2); 7.42 (d, 8.1; H-5); 7.54 (d, 8.1; H-4). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃)-δ_C: 7.9 (C-17); 18.05 (C-14); 23.3 (C-16) 25.8 (C-15); 27.5 (C-10 and 11); 113.6 (C-9); 116.1 (C-3); 122.7 (C-12); 124.3 (C-9b); 126.8 (C-6); 128.4 (C-4); 129.0 (C-3); 133.5 (C-13); 136.3 (C-5); 140.9 (C-2); 146.7 (C-6); 161.8 (C-9);178.2 (C-8); 182.2 (C-7). HRMS (EI⁺): calcd. (C₂₀H₂₀O₃): 309.1485. Found: 309.1473. The data corroborate with those described in the literature (Lemos et al., 2007; Souza et al., 2012).

Plant material

The botanical material of the species *Capraria biflora* L., Scrophulariaceae, specifically the roots, was collected in May/2017, in an area located in the Itamaracá Island (Pernambuco, Brazil: coordinates 7 ° 44'43.8 "S 34 ° 49'32.1" W). The exsicata were identified (by Dr. Rita de Cássia Pereira, herbarium curator) and deposited in the herbarium of the Agronomic Institute of Pernambuco, registered under the Nr. 91544. For simultaneous extraction and purification process of the biflorin, roots of *C. biflora* were collected and kept at *ca.* 28°C for one week to remove plant humidity. After this, the roots were pulverized to reach fine particles.

Animals

Female BALB/c mice (6–8 weeks old) were raised and maintained at the animal facilities of the Keizo Asami Immunopathology Laboratory located in Federal University of Pernambuco, Brazil. Mice were kept under standard laboratory conditions (20–22°C and 12h day and night cycle) with free access to a standard diet (Labina/Purina, Campinas, Brazil) and water. All experimental procedures were performed with accordance of Ethics Committee of Animal Use of Federal University of Pernambuco (protocol number 0048/2016).

Preparation of splenocytes

This procedure was performed in accordance with a previous protocol (Melo et al., 2011). After euthanasia of animals with hydrochloride of xylazine 2% and hydrochloride of ketamine 10% followed by cervical dislocation, the spleen of each mouse was aseptically removed and placed in a Falcon tube containing RPMI 1640 with fetal calf serum (complete medium). In a vertical flow, each spleen was transferred to a Petri dish where they were soaked. The cell suspensions obtained from each spleen were transferred to Falcon tubes containing approximately 10ml of incomplete medium. Spleen homogenates were overlaid onto a Ficoll-Paque™ PLUS layer, with the density adjusted to 1.076g/ml, and centrifuged at 1000 × *g* at room temperature for 25min. The interface cell layer containing immune cells was recovered by Pasteur pipette, washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) and centrifuged twice at 500*g* for 10min. Cells were counted in a Neubauer chamber, and cell viability was determined by the trypan blue exclusion method. Cells were only used when viability was >98%.

Analysis of cell viability

Splenocytes from BALB/c mice treated with 10.1-162 μ M of biflorin for 24h of incubation as well as untreated cells were centrifuged at 450 \times g at 22°C for 10min. After discarding the supernatant, 1ml of PBS 1x was added to the precipitate and after resuspension, the cells were centrifuged again (450 \times g, 22°C, 10min). The pellet was resuspended in 300 μ l of binding buffer, transferred to a labelled cytometer tube, and Annexin V conjugated with fluorescein isothiocyanate (1:500) and propidium iodide (20 μ g.ml⁻¹) were added. Flow cytometry was performed on a FACSCalibur platform (BD Biosciences, San Jose, USA) and the results were analyzed using CellQuest Pro software (BD Biosciences).

Proliferation assay using CFSE staining

Same protocol to obtain splenocytes was used for proliferation assay. After acquiring splenocytes, cell solution was centrifuged at 300 \times g at room temperature for 5min with sterile PBS 1x containin SFB 5% (pH 7.2). The cell solution was adjusted then to 10⁷cels/ml and received 5mmol.l⁻¹ of 5(6)-carboxyfluorescein diacetate *N*-succinimidyl ester (CFSE). Cells were incubated for 10min at 28°C in the dark and then centrifuged twice at 300 \times g/5min with sterile PBS 1x. Stained cells were cultured for 24h with either 20.2 μ M of biflorin or with culture medium only (negative control). After culture time, cells were centrifuged (300 \times g/5min), and analyzed on a FACSCalibur platform (Becton Dickinson Biosciences) coupled with a cell Quest Pro software (Becton Dickinson).

Measurement of cytokine production in splenocyte cultures

Supernatants of cultures treated or not with biflorin (20.2 μ M) for 24h were collected for quantification of cytokines using the CBA (Cytometric Bead Array) Mice Th1/Th2 Cytokine Kit (Becton Dickinson Biosciences, USA) for simultaneous detection of interleukins (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), and interferon-gamma (IFN- γ). The assays were performed according to manufacturer's instructions and data were acquired on a FACSCalibur platform. Six individual cytokine standard curves (0–5000pg/ml) were run in each assay. The range of detection was set as 3000pg/ml-5000pg/ml. The cells were analyzed using the FACSCalibur platform according to manufacturer's instructions.

Statistical analysis

Data were analyzed using non-parametric tests. To detect the differences between groups, the Wilcoxon test was used. Student's t-test was used to analyze the results from cell viability assay. All results were expressed as mean \pm SD and a value of $p < 0.05$ was considered as statistically significant.

Results and discussion

Simultaneous extraction and purification

For the separation and the purification of the chemical compounds of plant origin, mainly, they are often subjected to extraction. Then, chromatographic procedures for purification are done, being commonly applied to column chromatography or followed by recrystallization.

In order to improve the yield of biflorin, as well as to save material and time, we used a new method of simultaneous extraction and purification (Góes, 2018). The results demonstrated that this process (Fig.1) showed to be more efficient and with excellent yield compared to the methods described in the literature. Applying 5h and using 20g sawdust, 25g of silica gel and 150ml of eluent, we obtained 126.6mg of the pure compound, yielding 0.6%. As far as we are aware, this is the highest yield obtained compared to those reported in the literature for biflorin. In this process it is also possible to increase the amount of sawdust and to maintain the same amounts of the eluent and silica. For the process of simultaneous extraction and purification it is necessary a Góes apparatus (c)(patent registration: BR 10 2017 021099 5) (Góes, 2018), a condenser; a round bottom flask; a heating blanket; sample test tubes; capillary tube for preparation of TLC chromatography plates; glass chromatographic vessel; silica gel chromatographic plates.

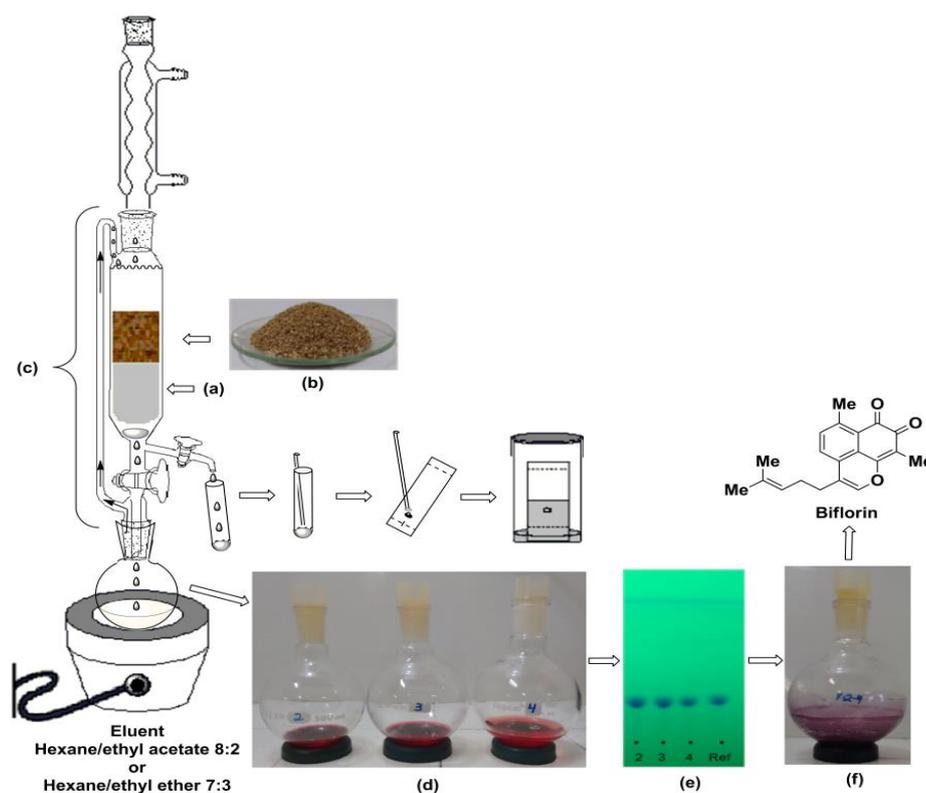


Fig.1. Process for extraction and simultaneous purification of biflorin. a. Silica gel; b. Root powder of *Capraria biflora*; c. Góes apparatus; d. Fractions collected containing pure compound; e. TLC plates hexane/ethyl acetate 8:2 (R_f 0.39); and f. round-bottom flask containing pure biflorin.

Study of the immunostimulatory profile of biflorin

Several *in vivo* and *in vitro* pharmacologic assays showed that even at lower concentrations biflorin is a potent pharmacological agent showing good biological activities (Vasconcellos et al., 2007; Montenegro et al., 2013; Carvalho et al., 2013; Ralph et al., 2016). Aiming to convert biflorin in a pharmacological compound, we investigated the immunostimulatory profile promoted by this compound on spleen mice cells. For this, we first evaluated if biflorin is cytotoxic this cell line.

Results showed that biflorin can be safely used for concentration values lower to 40.5 μ M in 24h cultures (Fig. 2). In this context, we chose the concentration of 20.2 μ M to evaluate the immunological stimulation promoted by biflorin.

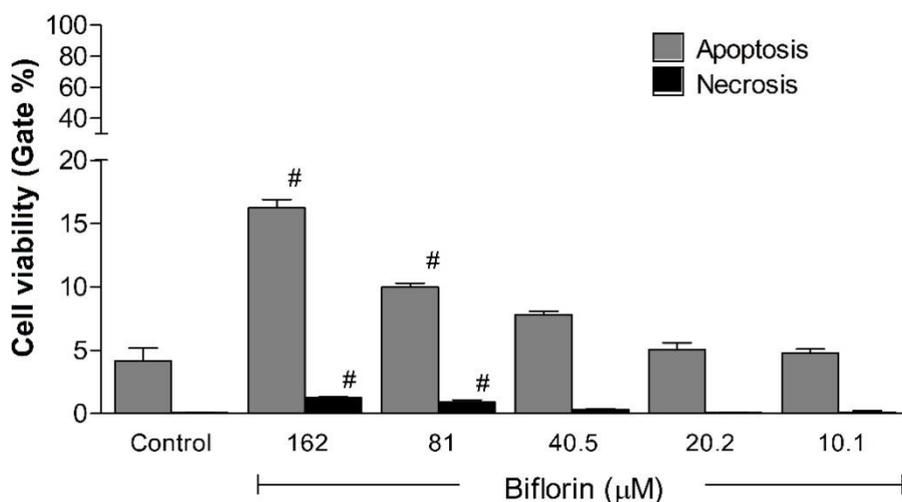


Fig.2. Evaluation of cytotoxicity effect promoted by biflorin in mice spleen cells in 24h culture. The safety dose to use biflorin is [biflorin] < 40.5μM. Horizontal bars represent the average of two independent experiments performed in duplicate. # $p = 0.0001$.

Our assays on immunostimulation were performed applying immune cell proliferation and cytokines production. Results about cell proliferation showed that biflorin was able to stimulate mice splenocytes in 48h of incubation (Fig.3). Moreover, this compound induced higher cytokines production and led the immunological profile to Th1 response. In fact, biflorin stimulated the higher production of TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-6 and IL-17 cytokines (Fig. 4).

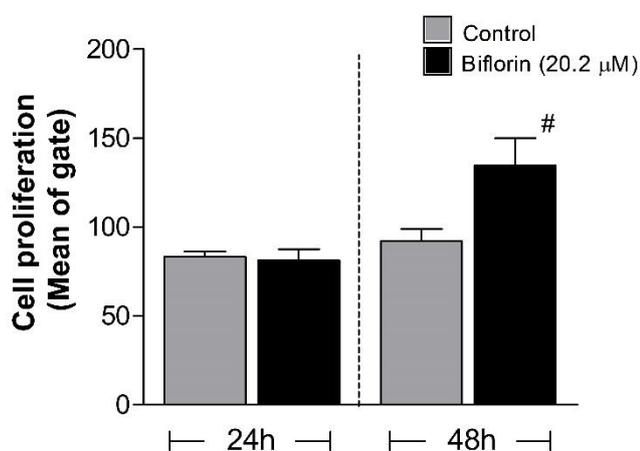


Fig.3. Investigation of cell proliferation in the 24h and 48h of incubation with biflorin at 20.2 μM. Biflorin induced higher cell proliferation in 48h of incubation. Horizontal bars represent the average of two independent experiments performed in duplicate. # $p = 0.002$.

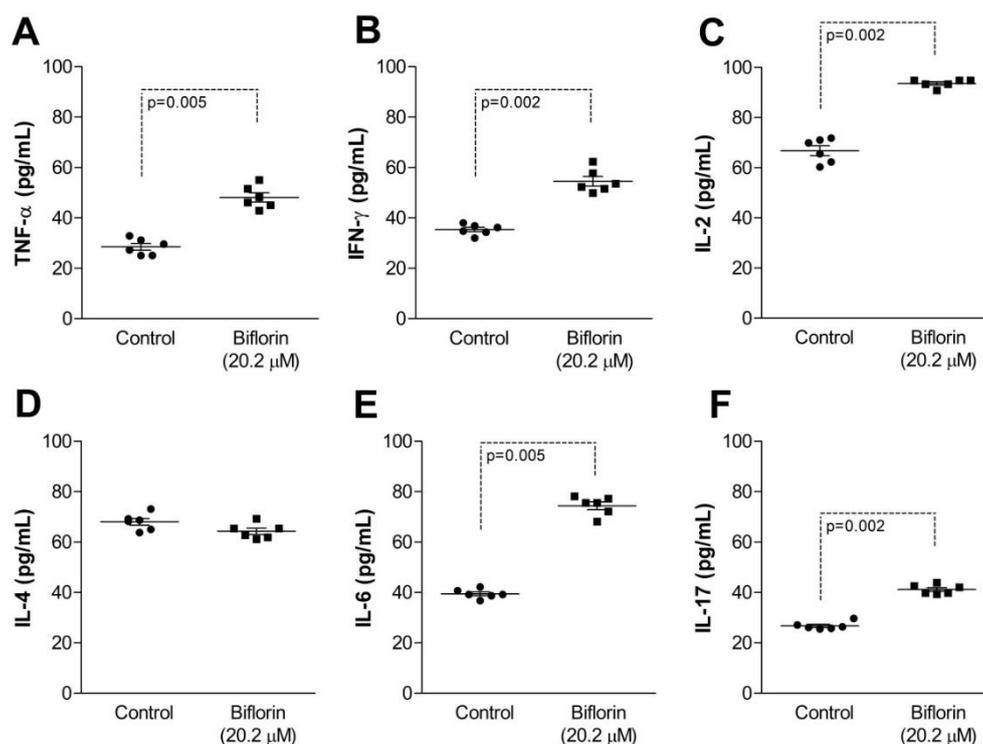


Fig.4. Study about immunostimulatory effect promoted by biflorin (20.2μM) in mice splenocytes cultures. Biflorin stimulated higher production of TNF-α (A), IFN-γ (B), IL-2 (C), IL-6 (E) and IL-17 (F). Similar values between control and biflorin treated cells were observed to IL-4 production (D).

However, naphthoquinones, especially β-lapachone, had similar effects to our study, where this substance represses the induction of nitric oxide synthase and tumor necrosis factor (TNF) (Tzeng et al., 2003), which may be applied in anti-inflammatory therapies (Choi et al., 2012; Tseng et al., 2013), as well as in the therapy of neuroinflammatory disorders (Lee et al., 2015) due to its function in modulating cytokines with both Th1 and Th2 profiles.

As mentioned, biflorin, a naphthoquinone, induced the Th1 immunological profile, being a relevant response for antitumor and antiviral activity, corroborating with the studies carried out by Vasconcellos et al. (2007). These authors showed that biflorin increased the efficacy of fluoracil (5-FU), caused morphological changes in mice spleens and reduced the rate of tumor proliferation. Moreover, the results obtained in the present study demonstrate that biflorin induced the production of cytokines, such as IFN-γ and IL-2. These cytokines have primordial function, mainly in tumor rejection and inhibition of viral infections, as well as the role of instigating the transcription of various proteins, inflammatory genes, such as the synthesis of nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) (Vila-de-sol et al.,

2008; Tanaka et al., 2012). Studies have reported that interleukin-6 (IL-6) is essential in inflammatory, chronic and autoimmune diseases, as well as in the differentiation of Th17 (Leech et al., 2012; Kimura and Kishimoto, 2010; Hunter and Jones, 2015) which is important in inflammatory responses and in defense against infections caused by extracellular microorganisms (Miossec and Kolls, 2012; Misiak et al., 2017).

Conclusion

The results demonstrate that the new extraction and purification proves to be a rentable process. In fact, we obtained 0.6% of pure biflorin, a percentage higher than the findings in the literature. This procedure can also be used on an industrial scale, not only due to the good yields but also due to the green process applying a reduced amount of solvent and time. We observed that biflorin stimulated the production of cytokines such as TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-17. Finally, biflorin presents as a promising molecule because this molecule induced a Th1 immunological profile, being a relevant compound for future antitumor and antiviral assays.

Author contributions

AJSG designed the study and the figures composed and edited; MSLS elaborated the manuscript and performed the experiment *in vitro*. AJA collected and registered the botanical material; VMBL e CMLM performed *in vitro* experiment; JAS and GGO performed the spectrometric analysis and characterized the isolated compound; RMFS and BSS critically revised the manuscript for clarity and intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

The authors acknowledge the Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de Pernambuco, Keizo Asami Immunopathology Laboratory, and Nucleus of Technological Platforms from Aggeu Magalhães Researches Centre (Fiocruz Pernambuco).

References

- Carvalho, A.A., Costa, P.M., Souza, L.G.S., Lemos, T.L.G., Alves, A.P.N.N., Pessoa, C., Moraes, M.O., 2013. Inhibition of metastatic potential of B16-F10 melanoma cell line *in vivo* and *in vitro* by biflorin. *Life Sci.* 93, 201-207.

- Chacon, J.A., Schutsky, K., Powell, D.J., 2016. The impact of chemotherapy, radiation and epigenetic modifiers in cancer cell expression of immune inhibitory and stimulatory molecules and anti-tumor efficacy. *Vaccines* 4, doi: [10.3390/vaccines4040043](https://doi.org/10.3390/vaccines4040043).
- Choi M., Park, I., Ju, J., Park, K.Y., Kim, K.H., 2012. Effects of β -lapachone on the production of th1 and th2 cytokines in C57BL/6 mice. *J. Environ. Pathol, Toxicol. Oncol.* 31, 87-94.
- Correia, M.P., 1984. *Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Plantas Exóticas Cultivadas*, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento, Rio de Janeiro, Vols. I-II,
- Davis, B.P., Ballas, Z.K., 2017. Biologic response modifiers: indications, implications and insights. *J. Allergy Clin. Immunol.* 139, 1445-1456.
- Fonseca, A.M., Pessoa, O.D.L., Silveira, E.R., Monte, F.J.Q., Braz-Filho, R., Lemos, T.L.G., 2003. Spectral assignments and reference data. *Mag. Res. Chem.* 41, 1038-1040.
- Góes A.J., 2018. Produto e processo para extração e purificação simultânea de substâncias de origem vegetal, sintética ou microbiana. BR, patente 1020170210995. INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial; RPI-2479.
- Hunter, C.A., Jones, S.A., 2015. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat. Immunol.* 16, 448-457.
- Jardim, G.A., Guimaraes, T.T., Pinto, M.C.F.R., Cavalcanti, B.C., de Farias, K.M., Pessoa, C., da Silva Júnior, E.N., 2015. Naphthoquinone-based chalcone hybrids and derivatives: synthesis and potent activity against cancer cell lines. *Med. Chem. Comm.* 6, 120-130.
- Jeon, S.J., Kim, B., Ryu, B., Kim, E., Lee, S., Jang, D. S., Ryu, J.H., 2017. Biflorin ameliorates memory impairments induced by cholinergic blockade in mice. *Biomol. Ther.* 25, 249-258.
- Kimura, A., Kishimoto, T., 2010. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur. J. Immunol.* 40, 1830-1835.
- Lara, L.S., Moreira, C.S., Calvet, C.M., Lechuga, G.C., Souza, R.S., Bourguignon, S.C., Pereira, M.C.S., 2018. Efficacy of 2-hydroxy-3-phenylsulfanylmethyl-[1,4]-naphthoquinone derivatives against different *Trypanosoma cruzi* discrete type units: identification of a promising hit compound. *J. Med. Chem.* 144, 572-581.
- Lee, E.J., Ko, H.M., Jeong, Y.H., Park, E.M., Kim, H.S., 2015. β -Lapachone suppresses neuroinflammation by modulating the expression of cytokines and matrix

- metalloproteinases in activated microglia. *J. Neuroinflammation* 12, doi: 10.1186/s12974-015-0355-z.
- Leech, M.D., Barr, T.O., Turner, D.G., Brown, S., O'Connor, R.A., Gray, D., Mellanby, R.J., Anderton, S.M., 2012. Cutting edge: IL-6-dependent autoimmune disease: dendritic cells as a sufficient, but transient, source. *J. Immunol* 190, 881-885.
- Lemos, T.L., Monte, F.J., Santos, A.K., Fonseca, A.M., Santos, H.S., Oliveira, M.F., Costa, S. M., Pessoa, O.D., Braz-Filho, R., 2007. Quinones from plants of northeastern Brazil: structural diversity, chemical transformations, NMR data and biological activities. *Nat. Prod. Res.* 21, 529-550.
- Lima, O.G., D'Albuquerque, I.L., Navarro, M.C.P., 1962. Novo método de extração e purificação da biflorina com possibilidade industrial. *Rev. Inst. Antibiot.* 1, 79-81.
- Lima, O.G., D'Albuquerque, I.L., Loureiro, P., Carmona, C.L., Benard, Z., 1958. Biflorina, novo antibiótico isolado da *Capraria biflora* (Scrophulariaceae). *Rev. Quim. Ind.* n 249.
- Lima, O.G., D'Albuquerque, I.L., Loureiro, P., 1953. Biflorina, novo antibiótico isolado da *Capraria biflora* (Scrophulariaceae). *Rev. de Quím. Ind.* (249) |1|-3.
- Melo, C.M.L., Melo, H., Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B., Silva, M.B., Pereira, V.R.A., 2011. Mitogenic response and cytokine production induced by cramoll 1,4 lectin in splenocytes of inoculated mice. *Scan J. Immunol.* 73, 112-121.
- Miossec, P., Kolls, J.K., 2012. Targeting IL-17 and Th17 cells in chronic inflammation. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 763-776.
- Misiak, A., Wilk, M.M., Raverdeau, M., Mills, K.H.G., 2017. IL-17-producing innate and pathogen-specific tissue resident memory gd T cells expand in the lungs of *Bordetella pertussis*-infected mice. *J. Immunol.* 198, 363-374.
- Montenegro, R.C., Vasconcellos, M.C., Barbosa, G.S., Burbano, R.M.R., Souza, L.G.S., Lemos, T.L.G., Costa-Lotufo, L.V., Moraes, M.O., 2013. A novel *o*-naphthoquinone inhibits *N*-cadherin expression and blocks melanoma cell invasion via AKT signaling. *Toxicol. in vitro* 27, 2076-2083.
- Moraes, T.A., Filha, M.J., Camara, C.A., Silva, T., Soares, B.M., Bomfim, I.S., Silva, V.A., 2014. Synthesis and cytotoxic evaluation of a series of 2-amino-naphthoquinones against human cancer cells. *Molecules* 19, 13188-13199.

- Oliveira, L.F.G., Souza-Silva, F., Cysne-Finkelstein, L., Rabelo, K., Amorim, J.F., Azevedo, A.D.S., Alves, C.R., 2017. Evidence for tissue toxicity in BALB/c exposed to a long-term treatment with oxiranes compared to meglumine antimoniate. *Biomed. Res. Int.* doi: 10.1155/2017/9840210.
- Ralph, A.C.L., Calcagno, D.Q., Souza, L.G.S., Lemos, T.L.G., Montenegro, R.C., Smith, M.A.C. Vasconcellos, M.C., 2016. Biflorin induces cytotoxicity by DNA interaction in genetically different human melanoma cell lines. *Toxicol, in vitro* 34, 237-245.
- Souza, L.G.S., Almeida, M.C.S., Monte, F.J.Q., Santiago, G.M.P., Filho, R.B., Lemos, T.L.G., 2012. Constituintes químicos de *Capraria biflora* (Scrophulariaceae) e atividade larvicida de seu óleo essencial. *Quim. Nova* 35, S1-S8.
- Tanaka, T., Narazaki, M., Kishimoto, T., 2012. Therapeutic targeting of the interleukin-6 receptor, *annu. Rev. Pharm. Toxicol.* 52, 199-219.
- Tseng, C.H., Cheng, C.M., Tzeng, C.C., Peng, S.I., Yang, C.L., 2013. Synthesis and anti-inflammatory evaluations of β -Lapachone derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 21, 523-531.
- Tzeng, H.P., Ho, P.M., Chao, K.F., Kuo, M.L., Lin-Shiau, S.Y, Liu, S.H., 2003. β -Lapachone reduces endotoxin-induced macrophage activation and lung edema and mortality. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 168, 85-91.
- Vasconcellos, M.C., Bezerra, D.P., Fonseca, A.M., Pereira M.R.P., Lemos T.L.G., Pessoa, O.D.L., Pessoa C., Moraes, M.O., Alves A.P.N.N., Costa-Lotufo L.V., 2007. Antitumor activity of biflorin, an *o*-naftoquinone isolated from *Capraria biflora*. *Biol. Pharm. Bull.* 30, 1416-1421.
- Vasconcellos, M.C., Montenegro, R.C., Militão, G.C.G., Pessoa, O.D., Fonseca, A.M., Lemos, T.L.G., Pessoa, C., Moraes, M.O., Costa-Lotufo, L.V., 2005. Bioactivity of biflorin, a typical *o*-naftoquinone isolated from *Capraria biflora*. *Z. Naturforsch.C* 60, 394-398.
- Vasconcellos, M.C., Costa, C.O., Terto, E.G.S., Moura, M.A.F.B., Vasconcelos, C.C., Abreu, F.C., Lemos, T.L.G., Costa-Lotufo, L.V., Montenegro, R.C., Goulart, M.O.F., 2015. Electrochemical, spectroscopic and pharmacological approaches toward the understanding of biflorin DNA damage effects. *J. Electroanal. Chem.* 765, 168-178
- Vasconcellos, M.C., Moura, D.J., Rosa, R.M., Machado, M.S., Guecheva, T.N., Villela, I., Immich, B.F., Montenegro, R.C., Fonseca, A.M., Lemos, T.L.G., Moraes, M.E.A., Say, J., Costa-Lotufo, L.V., Moraes, M.O., Henriques, J.A.P., 2010. Evaluation of the

cytotoxic and antimutagenic effects of biflorin, an antitumor 1,4 *o*-naphthoquinone isolated from *Capraria biflora* L. Arch.Toxicol. 84, 799-81015.

Vasconcellos, M.C., Bezerra, D.P., Fonseca, A.M., Araújo, J.A., Pessoa, C., Lemos T.L.G., Costa-Lotufo, L.V., Moraes, M.O., Montenegro, R.C.,2011. The *in vitro* and *in-vivo* inhibitory activity of biflorin in melanoma. Melanoma Res. 21,106-114.

Vila-de-Sol, V., Punzón, C., Fresno, M., 2008. IFN- γ induced TNF- α expression is regulated by interferon regulatory factors 1 and 8 in mouse macrophages. J. Immunol. 181, 4462-4470.

Wisintainer, G.G.N.S., Scola, G., Moura, S., Lemos, T.L.G., Pessoa, C., Moraes, M.O., Souza L.G.S., Roesch-Ely, M., Henrique, J.A.P.,2015. *o*-Naphthoquinone isolated from *Capraria biflora* L. induces selective cytotoxicity in tumor cell lines. Genet. Mol. Res. 14, 17472-17481.

Wisintainer, G.G.N.S., Simões, E.R.B., Lemos, T.L.G., Moura, S., Souza, L.G.S., D.P.,Fonseca., Moraes, M.O., Roesch-Ely, M., Henrique, J.A.P.,2014. Biflorin: an *o*-naphthoquinone of clinical significance. An. Acad. Bras. Cienc. 86, 1907-1914.

**ANEXO A- CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
(CEUA) DA UFPE**



**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências**

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 27 de dezembro de 2016.

Ofício nº 134/16

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof.ª Cristiane Moutinho Lagos de Melo**

Departamento de Antibióticos

Centro de Biociências

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº **0048/2016**

Certificamos que a proposta intitulada **“Investigação imunológica e antitumoral de compostos naturais extraídos de plantas”**, registrada com o nº **0048/2016**, sob a responsabilidade de Prof.ª **Cristiane Moutinho Lagos de Melo** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 07/12/2016.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Até 01/2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongos Swiss e BALB/c
Nº de animais	32
Peso/Idade	25-40g/ 60 dias
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério do Departamento de Antibióticos – CB/UFPE

Atenciosamente,

Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
UFPE SIAPE 1501584

ANEXO B- FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA



Secretaria de
Agricultura e
Reforma Agrária



PERNAMBUCO
GOVERNO DO ESTADO

HERBÁRIO IPA – DÁRDANO DE ANDRADE LIMA
FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

FIB Nº 27/2017

Nº de Tombo	Nome popular	Família	Nome Científico	Identificada por
1 91544	Balsaminha	Schrophulariaceae	<i>Capraria biflora</i> L.	Antonio J. Alves

Dr^a Rita de Cássia Pereira
Curadora do Herbario IPA

Consulta: Antonio José Alves tel.: (81) 988208838

Procedência: PE - Itamaracá, na propriedade do coletor, em terreno próximo, ruderal.

Coletor: o mesmo em 02/05/2017.

Confirmada em: 05.05.2017.

Obs.: Material botânico em estudo para fim de pesquisa de novos fármacos na UFPE - Depto. de Farmácia.

Resultado encaminhado por e mail: antonioalvesleac@gmail.com em 05.05.2017

Instituto Agronômico de Pernambuco - IPA

Vinculado à Secretaria de Agricultura e Reforma Agrária
Av. Gal. San Martin, 1371 – Bongi – 50761-000 – Recife – PE – C.P. 1022
CNPJ 10.912.293/0001-37 – PABX: (81) 3184-7200 – Fax: (81) 3184-7211
Home Page: www.ipa.br / E-mail: ipa@ipa.br

IPA – 77 anos semeando conhecimento

ANEXO C- PALESTRA E COMUNICAÇÃO ORAL

SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE PERNAMBUCO



Certificado

O Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco – *Campus Recife*, certifica que: **MARIZA SEVERINA DE LIMA SILVA**, inscrito(a) no CPF sob o nº 097.627.624-01, ministrou a palestra: “Síntese de substâncias com interesses terapêuticos”, no evento: PRIMEIRA SEMANA DE QUÍMICA E INTERDISCIPLINARIDADES, no dia 19 de junho de 2018, com carga horária de 01 hora.

Certificado registrado às fls **891 a 892** do Livro nº **09** da DPE, em 27/07/2018

Prof. Hilson Gomes Vilar de Andrade
Chefe da Divisão de Extensão - Campus Recife

Prof. Sofia Suely F. Brandão Rodrigues
Diretora de Pesquisa, Pós-graduação e Extensão - Campus Recife

PLANTAS MEDICINAIS
TRADIÇÃO & INOVAÇÃO

V Jornada
PERNAMBUCANA de
plantas MEDICINAIS
& fitoterapia

Recife, de 24 a 26 de outubro de 2018

Universidade Federal de Pernambuco
Laboratório de Produtos Naturais - LABOPNAT

CERTIFICADO

Certificamos que MARIZA SEVERINA DE LIMA SILVA participou da V Jornada Pernambucana de Plantas Medicinais e Fitoterapia, no dia 25 de outubro de 2018, apresentando a Comunicação Oral intitulada SEMISSÍNTESE: ESTRATÉGIA PARA OBTENÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS.

Recife, 25 de outubro de 2018.

Prof.ª Dr.ª Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim
Presidente da Comissão Organizadora

Prof.ª Dr.ª Cláudia Sampaio de Andrade Lima
Presidente da Comissão Científica

Patrocinadores Associados

Apoio

ANEXO D- PARTICIPAÇÃO EM ARTIGO (ACEITO PARA PUBLICAÇÃO)

From: LWW E-Submissions <em@editorialmanager.com>

To: Antonio Gomes de Castro Neto <litaree@yahoo.com>

Sent: Thursday, September 13, 2018, 3:33:44 PM GMT-3

Subject: Advances in Skin & Wound Care Decision

Sep 13 2018 02:33:28:127PM= = RE: lwwesubmissions-D-18-00333R1, entitled "Fatty acids determination in vegetable oils by gas chromatography and its potential use in wound care"

Dear Dr. Castro Neto,

After carefully reviewing your manuscript, we're happy to inform you that we feel it will make a valuable contribution to Advances in Skin & Wound Care journal, and that we plan to use it in a future issue. Prior to publication, we'll send you a copy of the edited version for your approval. Although this may be 12 months or more from now, in most cases it signals that your article has been tentatively scheduled for an issue. You will also receive complimentary copies of the issue to share with your co-authors upon publication.

Autors:

Anselmo Queiroz Alves

Alexandre José Silva Góes

Mariza Severina de Lima Silva

Gibson Gomes de Oliveira

Isla Vanessa Gomes Alves Bastos

Antonio Gomes de Castro Neto

Antonio José Alves

Valdemiro Amaro da Silva Jr