



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO ACADÊMICO DA VITÓRIA

CURSO DE NUTRIÇÃO

Emerson Peter da Silva Falcão

MEMORIAL DESCRITIVO DE ATIVIDADES DE ENSINO

PESQUISA E EXTENSÃO

Vitória de Santo Antão

-2023-

Emerson Peter da Silva Falcão

**MEMORIAL DESCRITIVO DE ATIVIDADES DE ENSINO
PESQUISA E EXTENSÃO**

Memorial apresentado como parte dos requisitos à promoção de Professor Associado, Classe D, a Professor Titular, Classe E, em conformidade com os artigos 18 e 19, seção V, da resolução 03/2014, do Conselho Universitário da Universidade Federal de Pernambuco.

Vitória de Santo Antão

-2023-

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Florisbela Arruda e Siqueira Campos

(Membro interno – UFPE)

Profa. Dra. Giselda Macena Lira

(Membro externo – UFAL)

Prof. Dr. Severino Mendes de Azevedo Júnior

(Membro externo – UFRPE)

Prof. Dra. Jairza Maria Barreto Medeiros

(Membro externo – UFBA)

Dedico este Memorial aos que me encaminharam, meus Pais, Emerson Falcão e Maria Gomes, aos que me deram suporte emocional e me permitiram seguir adiante, Minha esposa Epifânia Waléria de Oliveira Santos Falcão e Filhos, Beatriz Santos da Silva Falcão e Rafael Santos daSilva Falcão. Dedico ainda, e de maneira muito especial, àquele que acreditou em meu potencial e não desistiu de me fazer acreditar em mim mesmo, o Prof. Nicácio Henrique da Silva, em saudosa memória.

Agradecimentos

Aos meus Professores, TODOS ELES, que me prepararam e encorajaram, que me estimularam desde o início de minha trajetória.

À Profa. Dra. Eugênia Cristina Pereira, que sempre me surpreendia com sua criatividade e otimismo, amizade e apoio;

A Profa. Dra. Norma Buarque de Gusmão, que me formou, literalmente, em microbiologia;

A Profa. Dra. Tereza Jansen de Almeida Catanho sempre realista e que me embasou na farmacologia experimental;

Ao Prof. Dr. Sebastião José de Melo que me orientou durante o Doutorado e no período do DCR. Cujas parcerias científicas tornaram-se amizade duradoura;

Ao Prof. Dr. Rajendra Mohan Srivastava, por seu exemplo de profissionalismo e grande apoio científico;

Aos meus estudantes, que compartilharam comigo tanto de minha vida, profissional e também pessoal, trabalharam lado a lado, acreditando e apostando em ideias que, por vezes, sequer compreendiam perfeitamente, e neste processo aprenderam e me ajudaram a aprender e ser um humano melhor.

Aos meus colegas do Mestrado, Eduardo Beltrão, Myrtes Peixoto, João Ramos, Nicácio, Dianne Tenório, Vivianne e Valquíria Bezerra; pela amizade nos momentos difíceis;

Aos amigos do Doutorado, Ana Maria, Terezinha Gonçalves e Paulo Moscozo;.

Aos colegas de bancada, que labutaram ao meu lado durante os anos de doutorado e mestrado, apoiando-me em minhas angústias e incertezas experimentais, alguns continuaram como parceiros científicos em diversos artigos e trabalhos cujos nomes encheram diversas páginas e, portanto, deixarei representados pelas Dras. Mônica Cristina Barroso Martins, Maria de Lourdes Lacerda Buril.

A CAPES, ao CNPq e a FACEPE, pelo suporte financeiro evidenciado em projetos e Bolsas de estudo.

À nossa UFPE pelo suporte financeiro, de infraestrutura e ambiente propício ao desenvolvimento humano.

Aos colegas técnicos de laboratório, em especial o Sr. João Virgínio, que dedicaram substancial tempo a ensinar técnicas laboratoriais elaboradas e complexas que auxiliam muito a mim e meus estudantes. Também aos nossos bibliotecários, que permitiram, nos anos iniciais de minha carreira o acesso a artigos e textos importantíssimos, sem os quais não teria conseguido chegar longe. E, sem esquecer, os técnicos administrativos que mantêm funcionando cada um dos nossos muitos cursos, cuidando da importante e pesada organização extremamente necessária a estudantes e professores.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS.....	IV
SUMÁRIO.....	V
LISTA DE QUADROS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	X
1- Apresentação do Memorial.....	11
2- Biografia.....	12
2.1- Pré – Escolar e Ensino Fundamental I.....	12
2.2- Ensino Fundamental II.....	14
2.3- Ensino Médio.....	16
2.4- Ensino Superior.....	17
2.5- Mestrado.....	19
2.6- Doutorado.....	20
2.7- Experiência Pós – Doutoral.....	25
3- CARREIRA DOCENTE – UFPE	25
I- ATIVIDADES DE ENSINO E ORIENTAÇÃO, GRADUAÇÃO, PÓS-GRADUAÇÃO.....	26
I.1- Disciplinas ministradas na graduação.....	27
I.2- Disciplinas ministradas na pós-graduação.....	29

I.3-	Orientações, Coorientações e Supervisões Concluídas e em Andamento.....	30
I.3.1--	Graduação.....	31
	<i>Trabalhos de conclusão de curso, Iniciação Científica e Monitoria</i>	31
I.3.2--	Pós-Graduação.....	34
I.3.3-	Orientações e Supervisões em Andamento.....	35
II-	ATIVIDADES DE PRODUÇÃO INTELECTUAL	36
II.1-	Patentes	36
II.2-	Artigos Publicados em Periódicos.....	37
II.3-	Capítulos de Livros Publicados.....	45
II.4-	Resumos Simples Publicados em Anais de Eventos	46
II.5-	Resumos expandidos publicados em anais de congressos.....	59
II.6-	Trabalhos completos publicados em anais de congressos.....	60
III -	ATIVIDADES DE EXTENSÃO	60
III.1-	Coordenação de Projeto de Extensão.....	60
III.2--	Participação e Organização de Eventos.....	64
IV –	COORDENAÇÃO DE PROJETOS DE PESQUISA, ENSINO	65

OU EXTENSÃO E LIDERANÇA DE GRUPOS DE PESQUISA

IV.1-	Coordenação de Projetos de Pesquisa.....	65
IV.2-	Liderança e vice-liderança de grupos de pesquisa.....	66
V-	EXERCÍCIO DE CARGOS NA ADMINISTRAÇÃO CENTRAL E/OU COLEGIADOS CENTRAIS E/OU DE CHEFIA DE UNIDADES/SETORES E/OU DE REPRESENTAÇÃO	66
V.1--	Membro de colegiados de cursos de graduação.....	67
V.2-	Membro de Colegiados e de Conselhos de Cursos de Pós-Graduação.....	67
V.3-	Coordenação e Vice Coordenação de Cursos de Pós-Graduação.....	67
V4-	Representações.....	67
V.5.1-	Coordenação setorial de extensão.....	68
VI-	PARTICIPAÇÃO EM BANCAS DE CONCURSOS, DE MESTRADO E DE DOUTORADO.....	68
VI.1	Participação em bancas de concursos.....	68
VI.2	Participação em bancas de mestrado.....	69
VI.3-	Participação em Bancas de Doutorado.....	74

VI.4-	Participação em Bancas de Conclusão de Curso de Graduação.....	76
VII-	REPERCUSSÃO OU IMPACTO DA PRODUÇÃO ACADÊMICA DO DOCENTE.....	80
VIII-	OUTRAS ATIVIDADES RELEVANTES EM SUA CARREIRA ACADÊMICA....	81
IX	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	82

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1- Datas e portarias de progressão ao longo da carreira.....	11
Quadro 2- Lista de disciplinas ministradas ao longo da carreira, na Graduação.....	28
Quadro 3- Lista de disciplinas ministradas ao longo da carreira na Pós-Graduação.....	29
Quadro 4- Orientações em Graduação nos últimos anos.....	31
Quadro 5- Orientações em Pós-graduação nos últimos anos.....	34
Quadro 6- Orientações em andamento.....	35

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1- Turmas do jardim, 1977.....	13
Figura 2- Início do fundamental I, 1981 – Escola Regina Coeli, Limoeiro – PE. Foto tradicional.....	13
Figura 3- Terceira série. Aqui se foram minhas ilusões futebolísticas.....	16
Figura 4- Prof. Nicácio Henrique no seu laboratório, como sempre a organizar detalhadamente tudo.....	18
Figura 5- Carteira de estudante. Final do curso de Biomedicina.....	18
Figura 6- Esquema reacional para obtenção de 4-aminopirimidinas, com o grupo Phthalimidínico.....	22
Figura 7 Prof. Sebastião à minha direita e Zenaide, pós – Doutoranda.....	24
Figura 8 Prof. Rajendra Mohan Srivastava, não foi oficialmente co-orientador, mas, a ele devo muito de minha formação pelo exemplo e dedicação. À sua direita Profa. Janaína Versiani dos Anjos, grande amiga e colega de laboratório.....	24
Figura 9 Turma de Enfermagem, Bioquímica.....	28
Figura 10 Turma de Estrutura e Dinâmica da Terra em atividade de Campo.....	28
Figura 11- Produção absoluta de artigos em periódicos/ano.....	39
Figura 12- Turmas do Projeto de extensão Karatê – DO, uma ferramenta para a formação do caráter. A – um dos exames de graduação e B – Após uma aula.....	61
Figura 13- Turmas do Projeto CAVEST, turma 2020. A- Equipe docente e B - estudantes comemorando aprovação.....	63
Figura 14- Palestra do Dr. Ronaldo Rogério de Freitas Mourão por ocasião do aniversário do Clube Estudantil de Astronomia. Foto com a equipe do CEA e Diretor do Espaço Ciência Prof. Dr. Antonio Carlos Pavão.....	81
Figura 15- Minha Inspiração maior.....	84

1. Apresentação do Memorial

Eu, Emerson Peter da Silva Falcão, tenho a satisfação de apresentar o meu memorial descritivo, documento autobiográfico, como parte dos requisitos para promoção da Classe D (Professor associado IV) a Classe E (Professor Titular). De acordo com os artigos 18 e 19, Seção V, da Resolução 03/2014 do Conselho Universitário da Universidade Federal de Pernambuco.

Neste documento tento mostrar de forma discursiva e circunstanciada uma trajetória de dezessete anos, relatando todos os aspectos que julgo mais relevantes. Procurei organizá-lo de acordo com a resolução citada acima, após ter sido considerado apto à promoção pela comissão avaliadora do Centro Acadêmico de Vitória, com nota 10,0 (dez).

Peço, antes de tudo, a compreensão do leitor (a) para eventuais trechos por demais emocionais ou se, por descuido ou esquecimento, tiver me desviado da organização sugerida. Não se trata de apenas dezesseis anos de vida universitária, mas de toda uma vida, que ora tento resumir em algumas páginas, por vezes forçando a memória a anos longínquos. Períodos até de minha infância, mas, que certamente foram importantes para que chegássemos até este momento.

Abaixo (Quadro 1) cito as portarias que tratam de todas as promoções e progressões ao longo do período mencionado. Em todos os memoriais relacionados constam as minhas atividades nas áreas acadêmicas de Ensino, Pesquisa, Extensão e Gestão.

Quadro 1- Datas e portarias de progressão ao longo da carreira

Função	Portaria	Data
Prof. Adjunto I	1108	03 de junho de 2006 (nomeação)
Prof. adjunto II	3835	01 de dezembro de 2008
Prof. Adjunto III	976	01 de março de 2011
Prof. Adjunto IV	4729	04 de outubro de 2013
Prof. Associado I	4631	26 de setembro de 2014
Prof. Associado II	613	10 de fevereiro de 2017
Prof. Associado III	5.246	07 de dezembro de 2018
Prof. Associado IV	4.043	03 de dezembro de 2020

2. BIOGRAFIA

2.1 Pré-escolar e Ensino Fundamental I

O início de minha vida estudantil foi semelhante ao de muitos estudantes de classe média baixa. Comecei no maternal de uma escolinha pequena (perdão pelo pleonismo, mas, creio que se encaixa perfeitamente), a escola “Chapelzinho Vermelho”. Recordo até do lanche e das brincadeiras, também de meus colegas de classe, Geovanine, Benício, Quiciano, entre vários outros. Curiosamente, apesar de muitas de minhas lembranças juvenis serem bonitas, e algumas das melhores, serem bem nítidas, não recordo do nome das professoras daquela época, mas, da diretora da escola, “Tia Vânia Guerra”, recordo perfeitamente. Talvez pelo zelo com o qual tratava as crianças, mas, não sei ao certo. A ela devo, além de belas lembranças, todas guardadas com muito carinho, a promessa de uma “Kombi nova, com vários botões”, esta promessa receio que eu não venha a cumprir. A figura 1 mostra a minha turminha de Maternal e Jardim, junto a professoras.

Fui transferido ao final Jardim I, creio que aos quatro anos, para o colégio *Regina Coeli*, uma escola religiosa. Entretanto, não me admitiram na alfabetização, devido à minha idade, se tivesse nascido alguns meses antes, talvez fosse diferente. Precisei, portanto, repetir, um ano, o que significou um atraso em minha formação.

Eram os tempos da ditadura militar. Embora fosse difícil para uma criança perceber este “estado de coisas”, certamente alguns coleguinhas tinham privilégios em detrimento de outros. E, havia certo cuidado de meus pais com relação ao que diziam, para que não fosse repetir na escola coisas que ouvia. Isto só fui perceber décadas depois. E, como, se pode antever eu era um daqueles que não tinha qualquer privilégio. Mesmo assim foram bons aqueles anos, muito embora, devo admitir, sentia muitas saudades da antiga escola, não necessariamente dos colegas, pois a maioria fora transferida comigo, mas da escola. Me parece hoje, olhando para trás, que no *Regina Coeli*, o modelo pedagógico deveria ser um pouco menos “doce”.. Porém, não devo ser injusto, acredito que esta seja a forma usual na maioria dos grandes colégios, uma demanda de nosso modelo educacional, talvez do nosso modelo de sociedade, que precisa de um fornecimento constante de profissionais, sem tempo para as emoções, ou sem espaço para elas. Mas, me pergunto, será que não estamos deixando de lado algo muito importante para nós Humanos?



Figura 1 – Turmas do jardim, 1977 – eu sou o garotinho cabeludo, na terceira fila a sétima pessoa, ladeado por dois grandes amigos Benício, à minha esquerda e Geovanine, à direita.

Devo admitir que alguns acontecimentos contribuíram para o menor “gosto” pela nova escola. Já no segundo ano sofri um acidente com um dos cães de guarda, que, solto, atacou-me. Talvez o descaso, e me custa já a esta idade constatar isso, com o qual me trataram as freiras e professoras, tenha contribuído de alguma forma, para minha maior saudade da antiga escola do maternal, que perduraria por mais algum tempo.



Figura 2 – Início do fundamental I, 1981 – Escola *Regina Coeli*, Limoeiro – PE. Foto tradicional.

Tive um fundamental I até que normal, com poucas notas baixas, e sofrendo o *Bulling*, coisa quase tradicional em todas as escolas nos anos 70. Mas, sempre tive uma certa paixão pela ciência (embora de início nem soubesse o que significava a palavra), muito curioso. Como disse antes, isso me era inato. Bem, talvez amor pela ciência em idade tão tenra, seja forçar um pouco, o melhor a dizer é que tinha muita curiosidade, de fato.

Desta curiosidade minha mãe recorda bem. Lembro-me de um relógio que pedi gentilmente para ver como funcionava e, ao qual minha mãe cedeu entregando a peça em minhas mãos. Lamentavelmente, segundos depois fora despedaçado por uma “curiosidade voraz” materializada em um pesado martelo, “afinal não consegui abrir com minhas mãos, o que haveria então de fazer para ver como funcionava!” Imagino que minha mãe não ficou muito feliz, pelo relógio, tão pouco eu, pois ele parara de funcionar.

2.2- Ensino Fundamental II

Os primeiros projetos

Neste período muitas mudanças e experiências em minha vida ajudaram a forjar meu interesse pela científica, também meu caráter e minha forma de ver a escola. O contato com professores que souberam estimular minha curiosidade e a prática desportiva trouxeram maior segurança e me fortaleceram para crescer, apesar das adversidades de uma grande escola. Nesta época também iniciei, a meu modo, a “prática” científica, desenvolvendo dois projetos bem “inovadores”.

Uma professora se destacou neste período, a Profa. Silvania (lamentavelmente não me recordo de seu nome completo). Ela sempre me permitiu chamá-la pelo prenome e não lhe dava motivos para desgostar-me. Minha disciplina era adequada, nunca precisei ir à diretoria e as notas certamente não eram ruins. Esta professora ousou achar interessante um de meus primeiros projetos de ciências (se é que posso chamar assim).

Um grande amigo dos tempos do pré-escolar, alguém realmente muito inteligente, tinha tido um tatu de estimação, algo não incomum nos anos 70. Este animal havia morrido há um ano e em visita à sua casa resolvemos desenterrar os ossos do bichinho. Pedi os ossos e cuidadosamente levei-os para casa. Mais tarde iniciei o cuidadoso processo de montar o “quebra-cabeças”. Obviamente montei-o

seguindo minha imaginação, esquecendo ou deixando de lado como a natureza o “desenhou” ao longo do processo evolutivo. Os ossos faltantes, especialmente do crânio substituí com epóxi. Devo dizer que o animal resultante foi, no mínimo inovador, era bípede e tinha fortes e ameaçadoras garras. Levei o “produto” de meu esforço para a sala de aula no dia seguinte. A minha professora de quarta série (quinto ano atualmente) olhou-o, devo dizer, bem maravilhada. Foi uma das poucas vezes que percebi aquele tipo de olhar, o de alguém encantado com o que via. Daí passou a ser uma grande incentivadora, mesmo muitos anos depois. Entretanto, isso me custou alguns anos a mais de *Bulling*, mas, já havia me acostumado e aprendido a lidar com aquilo.

Com a “chegada” de meu irmão mais novo, senti-me tentado a fazer uso de tantas latas de leite em pó que eram descartadas. O que fazer? Um foguete, claro. Foi montado com as latinhas, unidas por fita crepe, as asas foram feitas de madeira cartolina e cola. Uma estrutura bem “robusta”. Faltavam os propulsores, pensamos em uma solução mais conservadora, seriam grandes busca-pés, feitos sob encomenda. Bem, este projeto me tomou alguns dias, mas, fortuitamente, não levei todo o projeto adiante, foi “abortado”, não dispúnhamos de recursos financeiros para os propulsores. Deste projeto não me arrependo de tê-lo deixado “pelo caminho”. Creio que as normas de segurança não eram preocupação aos “cientistas” envolvidos.

Por volta dos nove anos, iniciei a prática desportiva, inicialmente com futebol como a maioria das crianças, naqueles anos (Figura 3). Mas, posteriormente passei à natação, voleibol, atletismo e basquetebol. Participava de todas as competições estudantis, notadamente dos Jogos escolares, hoje meio esquecidos, em nosso estado. A prática desportiva também me fortaleceu bastante, mas, uma outra modalidade me foi fundamental. Uma que não sei se a classificação como desporto é adequada, o Karatê-DÔ. Cujas práticas iniciei aos 14 anos, e persisto até os dias atuais.

Todas estas mudanças acabaram por me fazer amar minha escola apesar de todas as dificuldades e problemas vividos especialmente nos anos iniciais. As mudanças sempre vêm, e novamente precisaria, mudar alguns anos mais tarde.



Figura 3- Terceira série. Aqui se foram minhas ilusões futebolísticas.

Nunca fui um estudante modelo, minhas médias caíam sempre no suficiente para a aprovação e tinha certa dificuldade em matemática, embora achasse esta disciplina fascinante. Aos treze anos, porém, houve uma mudança significativa neste “quadro”. Em visita à nossa casa, o meu avô “de opção”, Dr. Antônio de Matos, ao questionar minhas notas nesta disciplina deu-me uma lição que valeu por muitas. Disse-me: “Muitas vezes o problema com uma matéria está ou no professor, no seu relacionamento com ele, ou na própria disciplina e no seu relacionamento com ela. Se não é o primeiro caso e quer mudar isso, comece dizendo, eu adoro matemática.” Fiquei fascinado com esta forma de pensar, na qual a solução para um problema ou dificuldade estaria em mim mesmo, Vovô Antônio acabara de me dar autonomia. Minha primeira nota em matemática após esta conversa parece ter mostrado que ele estava certo, foi um 10,0.

Todas estas mudanças acabaram por me fazer amar minha escola apesar de todas as dificuldades e problemas vividos especialmente nos anos iniciais. As mudanças sempre vêm, e novamente precisaria, mudar alguns anos mais tarde.

2.3- Ensino Médio

Estudei no RC até os meus 16 anos. E primeiro ano do ensino médio. Porém, fechamento do ensino secundário naquela escola, forçou minha mãe e pai a me enviar para outra escola, mas, qual seria? Bem, minha mãe, a princípio, não tinha uma resposta, mas, sabia que eu iria precisaria sair de minha cidade se quisesse ter

maiores chances de me desenvolver. Ela tinha grandes planos para mim. Fui então para o Recife, mudei não somente de escola, mas, de cidade. Tempos desafiantes colocando frente a frente minha inocência de agrestino e a frieza da capital

Estudei no Colégio Nóbrega. Antes, porém, precisei passar por um processo seletivo. Passei. Não vi a lista de aprovados, mas, minha querida Tia Bernadete disse que tirei o primeiro lugar, acredito nela.

A adaptação à nova escola e o novo ambiente, uma pensão na rua sete de setembro, certamente não foi fácil. Dividia o quarto com outros três colegas. Entre outras coisas, um deles meu amigo Geovanive Oliveira que me acompanhou desde o maternal, não estava só, pelo menos. Precisei parar meu treinamento em Karatê, mas, por pouco tempo, logo já estaria treinando com um amigo de meu antigo professor. Foram períodos em que o tempo passava correndo, tinha pouco tempo para a tristeza da distancia de meus pais, amigos e minha cidade, no entanto, acabei me adaptando à frieza da capital, sem perder muito de minha inocência.

2.4-Ensino Superior

Fui aprovado no processo de vestibular em 1991 para o curso de Biomedicina a princípio foi um ano de preparação extremamente difícil (1990), como é para, todos, ou ao menos para a grande maioria de nossos jovens. No entanto, foi um período bom, apesar das dificuldades.

Não me defino como um dos melhores estudantes de minha turma, tão pouco como o pior, mas, gostei do curso. Fortaleceu minhas bases científicas. O primeiro semestre foi bastante importante, nele conheci pessoas que viriam a desempenhar um grande papel em minha formação, como o Prof. Nicácio Henrique da Silva, que viria a ser meu orientador durante a iniciação científica e durante o mestrado em Bioquímica.

A Bioquímica sempre fora uma disciplina fascinante, para mim, mas, o primeiro contato, no primeiro semestre do curso, certamente não foi tão feliz. Entretanto, os docentes da disciplina foram marcantes, especialmente o Prof. Nicácio Henrique da Silva. Em 1993, já a um ano de terminar o curso o procurei e pedi para que me orientasse em projeto de iniciação científica. De fato, gostaria de me aprofundar na matéria e após duas outras disciplinas correlatas, minhas notas melhoraram

substancialmente. Creio que o Prof. estava um tanto desconfiado, mas, me aceitou após alguns dias, (Figura 4).



Figura 4 – Prof. Nicácio Henrique no seu laboratório, como sempre a organizar detalhadamente tudo.

Desenvolvi o primeiro projeto com uma planta, a Erva lanceta. Foram diversas técnicas e um ano e meio de profundo aprendizado. Ao final do qual já estava me preparando para a seleção do mestrado em Bioquímica. E, com a ideia de um projeto a desenvolver, agora na área de liquenologia aplicada estava realmente muito estimulado com o futuro. Foi um período dinâmico. Mas, de muito estudo, acredito que me tornei mais compenetrado, mas, ainda conservava uma vasta cabeleira (Figura 5).



Figura 5 – Carteira de estudante. Final do curso de Biomedicina (sim, já usei barba e bigode).

2.5- Mestrado

O ingresso no Mestrado foi antecipado por grande ansiedade e esforço. Este foi um período muito rico em aprendizado, no qual tive contato com técnicas, conteúdos e, mais importante, com docentes que ajudariam a moldar minha formação científica. Ao final tinha conseguido resultados e dados que proporcionaram a publicação de três artigos e mais um não relacionado à minha dissertação.

Havia diversas formas de ingresso, e uma delas era o curso de “nivelamento”. Ótimo curso e período de minha vida. Conheci a maioria dos meus colegas de turma de mestrado durante o curso. Nicácio, Mirtes, Viviane, João, Eduardo, Valquíria, Dianne. A grande maioria atualmente é docente/pesquisador de instituições públicas e privadas.

A aprovação no processo seletivo foi uma alegria, salvo me engane fiquei em quinto lugar. Claro que os critérios eram outros, como disse eram três as formas de ingresso, e não havia pesos que diferenciasssem ou equalizassem as notas. Mas, fiquei satisfeito com meu desempenho.

A jornada diária era intensa. Iniciávamos às 08h e terminávamos ao final da tarde. Disciplinas de 15 dias. Com aulas teóricas e práticas, relatórios, seminários e, eventualmente avaliações teóricas. Mas, creio que estava acostumado.

Foi um período marcante em minha vida. Definitivamente uma época muito boa, na qual minhas habilidades foram desenvolvidas. Sentia um grande prazer em estudar e realizar experimentos. A câmara fria, apesar de ser escura, obviamente fria e ter um cheiro bem “peculiar”, por incrível que possa parecer me agradava bastante.

Durante os três anos e meio treinei e aprendi com grandes professores e professoras e me apaixonei ainda mais pela Química da vida e a química de maneira geral. Alguns professores foram particularmente marcantes como o Prof. Nicácio Henrique com sua perfeição técnica e o Prof. Kurt Rehn, além da Profa. Luana Cassandra, e tantos outros. Devo dizer que, de minha parte nunca construí barreiras que representassem obstáculos ao convívio com docentes ou qualquer pessoa. Isso, evidentemente ajudou bastante. Esta possivelmente foi uma contribuição de meus pais em minha formação, algo que agradeço muito. Entretanto, devo acrescentar que o Karatê também tem lá sua parte no controle de minhas emoções.

Portanto, acredito que o contato com pessoas bem diferentes, pesquisadores de diversas acrescentou uma visão ampla à minha formação. Uma visão que não sofreu a interferência das dificuldades de convivência observadas eventualmente entre os membros do departamento, algo não incomum ao meio acadêmico.

Como resultado do mestrado foram publicados três artigos e, durante o mestrado, contribuí em outro trabalho, realizado com o grupo da Profa. Galba Takaki, naquele estudo contribuí com as análises cromatográficas (Referências citadas abaixo).

- FALCÃO, E. P. S.; SILVA, N. H. ; PEREIRA, E. C. ; GUSMÃO, N. B. ; RIBEIRO, S. M. . Atividade antimicrobiana de Compostos Fenólicos do Líquen *Heterodermia leucomela* (L.) Poelt. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, v. 21, n.1, p. 43-49, 2002.
- FALCÃO, E. P. S.; SILVA, N. H. ; GUSMÃO, N. B. ; RIBEIRO, S. M. ; PEREIRA, E. C.. Atividade Antimicrobiana de Derivados Fenólicos de *Ramalina Sorediosa* (B. de Lesd) Laundron. *Acta Botanica Brasilica*, v. 18, n.04, p. 913-920, 2004.
- FALCÃO, E. P. S.; TAKAKI, G. M. C. ; XIOSAKI, R. K. ; SILVA, N. H. . Biochemical Markers in Taxonomy of the Genus *Cunninghamella*, *Revista Iberoamericana de Micologia*, 18: 123-127 (2001)

2.6- Doutorado

O Doutorado foi realizado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco. Em uma época em que ainda eram escassos os cursos de doutorado, com grande concorrência pelas vagas o que tornou o processo de seleção ainda mais “complexo”. O projeto desenvolvido envolvia síntese de fármacos, avaliação da ação antiinflamatória. Mas, ao longo do tempo sofreu algumas inserções e aperfeiçoamentos, versando o trabalho final em que, além do mencionado, envolvia Química medicinal, ação citotóxica e antitumoral. Definitivamente foi um excelente e produtivo período.

O processo seletivo foi cercado de diversas incertezas e dificuldades. O projeto deveria conter um número ínfimo de páginas, além disso, a apresentação tinha que ocorrer em dez minutos. Isso sem falar na entrevista. Além disso, estava a mudar de

área de pesquisa, embora tenha passado todo o mestrado estudando química de produtos naturais, não poderia dar continuidade à mesma área de pesquisa, meus orientadores não atuavam nos doutorados disponíveis.

A concorrência nunca me assustou, da mesma forma que no vestibular, sempre pensei que o que importava era a nota, ela era o objetivo se não a atingisse não mereceria a vaga, e, se alcançasse, não haveria quem a tirasse de mim. Mas, concorria com docentes consagrados de minha universidade, alguns que inclusive haviam sido meus professores. E que professores! Era o caso do Prof. Nicodemos Teles. Um docente que me inspirou por seu humanismo e competência.

Passei a pesquisar na área de química medicinal, mais especificamente em Síntese de fármacos. O orientador que apostou em mim foi o Prof. Sebastião José de Melo (Figura 7). Ao qual fui indicado pelo Prof. Nicácio Henrique. Fui aceito, certamente pelo prestígio de meu orientador de mestrado.

O desenvolvimento do projeto foi um processo que acrescentou muito à minha formação, dado o esforço para aprender a respeito de técnicas novas e, especialmente da química envolvida. Devo dizer ainda que o processo de levantamento bibliográfico, todo manual, analógico é o mais apropriado a se dizer, me obrigou a inúmeras visitas à Biblioteca Central da UFPE, para consultar intermináveis volumes compilados de referências bibliográficas ligadas a *American Chemical Society*. Mas, tive importante apoio de colega do período de mestrado que me passou parte do material utilizado em sua própria pesquisa bibliográfica, Viviane. Isto me deu um importante ponto de partida na construção do projeto.

Embora os sucessos sejam importantes e contem bastante, parece que teimamos em manter em nossas memórias os fracassos, afinal estes são mais custosos. Passei cerca de seis meses a tentar a inserção do grupo Phthalimida na posição 4-amino de minhas moléculas, e só após seis meses e muitas pesquisas bibliográficas conclui, junto ao meu orientador que aquela posição no anel pirimidínico estaria inacessível para a síntese da Phthalimida. Eu já estava realizando outros experimentos em paralelo com os outros compostos já sintetizados de modo que não foi efetivamente uma perda de tempo, mas, um processo de aprendizado valioso.

Esta dificuldade foi então contornada após uma reunião com um docente importantíssimo em minha jornada, o Prof. Ragendra Mohan Srivastava (Figura 8), que certamente atuou como coorientador. Ele sugeriu que poderíamos introduzir o grupo Phthalimidínico numa das posições de substituição da pirimidina, a partir de

uma Bisnitrila para-substituída com o grupo nitro e, posteriormente reduzida cataliticamente utilizando Pd (Figura 6). Esta reação foi um sucesso e tenho certeza de que meu treinamento prévio, incluindo-se os diversos erros técnicos, foi importante neste processo.

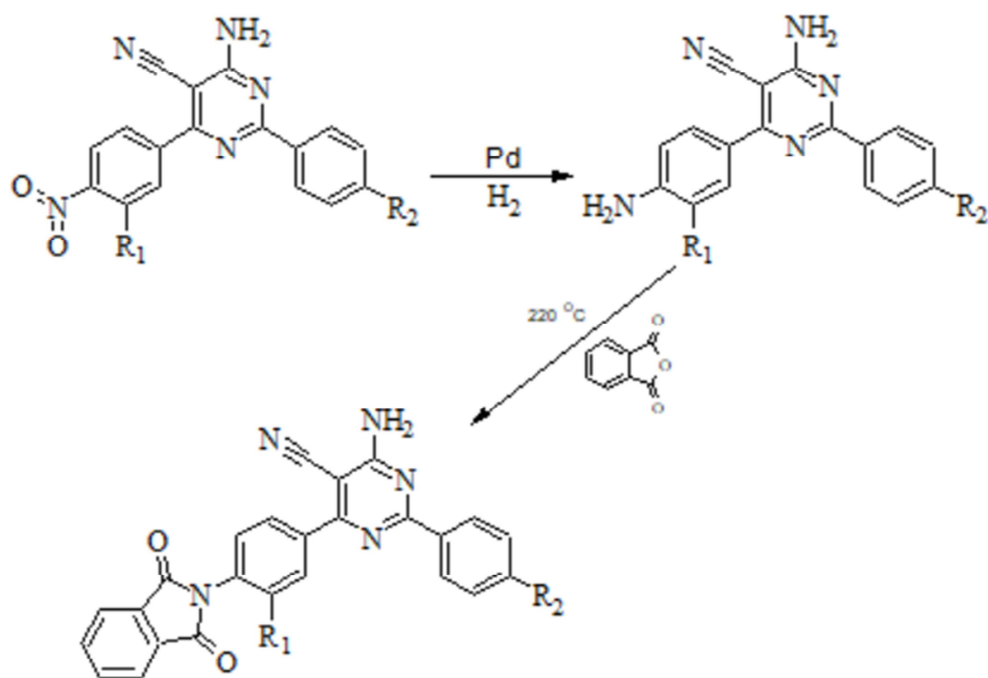


Figura 6- Esquema reacional para obtenção de 4-aminopirimidinas, com o grupo Phthalimidínico

Os ensaios farmacológicos englobaram a toxidez aguda e ação antiinflamatória, utilizando o método de edema de pata. Estes experimentos foram conduzidos no laboratório da Profa. Tereza Jansem, uma professora que já conhecia desde o período de mestrado, de uma humanidade cativante e humor sem igual. Além disso o laboratório era frequentado por uma comunidade de estudantes e técnicos que tornavam o labor diário bastante leve. Além disso a Profa. Tereza facilitava muito no momento de se traduzir os dados em possíveis mecanismos farmacológicos.

Os resultados conduziram a uma nova e desafiante etapa para a qual havia me preparado com importantes disciplinas de química medicinal conduzidas pelo Prof. Ivan da Rocha Pitta e a Profa. Sueli Galdino. Esta importante formação, me

proporcionou as ferramentas necessárias para os estudos de QSAR (Análise quantitativa da relação estrutura atividade biológica), conduzidos pelo grupo do Prof. Mozart Neves, a época reitor da UFPE. Foi mais um processo de grande aprendizado, junto ao Prof. João Bosco, docente parceiro do Prof. Mozart. Esta etapa nos rendeu uma quantidade imensa de dados, e também demandou uma nova revisão dos estudos *in vivo*. Com curvas dose x resposta e mais outras etapas sintéticas propostas pelo modelo matemático concluímos com um importante trabalho publicado no European Journal of Medicinal Chemistry.

Durante os quatro anos tive ainda a oportunidade de interagir com outros docentes-pesquisadores como a Profas. Maria do Carmo Alves de Lima, Sirlene Carneiro, Ivone Antonia de Souza, Márcia Silva do Nascimento, Julianna Ferreira Cavalcanti de Albuquerque e o Prof. Alexandre José da Silva Góes, que contribuíram com a minha formação.

Abaixo cito os artigos publicados em decorrência de minha tese de doutorado e outro no mesmo período, em conjunto com um grande colega e amigo do Laboratório o Dr. Vanildo Braga.

- MELO, S. J. ; SANTOS, L. C. ; FALCÃO, E. P. S. ; SRIVASTAVA, R. M. ; DUC, C. L..Synthesis of new 4-Amino-2,6-diarypyrimidine-5-carbonitriles. Journal of Chemical Research. Synopses, Inglaterra, v. 2002, p. 216-217, 2002.
- FALCÃO, E. P. S.; MELO, S. J. ; SRIVASTAVA, R. M. ; CATANHO, T. J. A. ; NASCIMENTO, S. C. Synthesis and Anti-inflammatory activity of 4-amino-2-aryl-5-cyano-6-{3- and 4-(N-phthalimidophenyl)}-pyrimidines.European Journal of Medicinal Chemistry, França, v. 41, n.000, p. 276-282, 2006.
- SILVA, J. B. P. ; BARRO NETO, B. ; MELO, S. J. ; FALCÃO, E. P. S. ; CATANHO, T. J. A.Quantitative Structure Activity Relationships (QSAR) of 4-Amino-2,6-Diarylpyrimidine-5-Carbonitriles Having Anti-inflammatory Activity. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 19, p. 337-343, 2008.
- BRAGA, V. M. L. ; MELO, S. J. ; SRIVASTAVA, R. M. ; FALCÃO, E. P. S. . Synthesis of New 1,2,4-Oxadiazoles Carrying (1S,2S)-t-Butyloxycarbonyl-1-

Amino-2-methyl-1-butyl and (1S)-t-Butyloxycarbonyl-1-. Journal of the Brazilian Chemical Society, Brasil, v. 15, n.04, p. 603-607, 2004.



Figura 7- Prof. Sebastião à minha direita e Zenaide, pós – doutoranda.



Figura 8- Prof. Rajendra Mohan Srivastava, não foi oficialmente co-orientador, mas, a ele devo muito de minha formação pelo exemplo e dedicação. À sua direita Profa. Janaína Versiani dos Anjos, grande amiga e colega de laboratório.

Passei a “desenhar a chave”. Era como, romanticamente, pensava. E ainda penso. De fato sintetizei diversas novas moléculas, sempre com ajustes pessoais às metodologias já existentes. Foram quatro anos bastante produtivos e enriquecedores. Mas, também cheios de incertezas. O mercado de trabalho, não era lá dos mais acolhedores e extremamente restrito. Estávamos vivendo um período de grande pressão sobre as universidades e institutos de pesquisa em nosso país. E esta situação certamente acrescentou uma dose maior e não necessária de *stress*, algo que marcou este período de minha formação.

2.7- Experiência Pós – Doutoral

Ao final do doutorado, submeti o projeto Síntese e avaliação das propriedades Farmacológicas de nucleosídeos 4-aminopirimidínicos. O projeto foi aprovado e pude desenvolver novas habilidades em síntese de Fármacos.

O projeto foi parcialmente desenvolvido no laboratório de química e síntese de produtos naturais do departamento de Antibióticos da UFPE, sob a supervisão do Prof. Sebastião José de Melo. Também com a imensa contribuição do Prof. Ajendra Mohan Srivastava, do laboratório de Síntese Orgânica do Departamento de química Fundamental da UFPE. Pude aumentar a interação com diversos docentes/pesquisadores já conhecidos, como a Profa... Apesar da dificuldade em se obter certos reagentes foi um período muito interessante no qual pude aumentar minha experiência laboratorial.

Bolsista de Desenvolvimento Científico Regional - DCR – FACEPE/CNPq 2004 a 2005.

3- CARREIRA DOCENTE UNIVERSITÁRIA - UFPE.

Em 2006, prestei concurso para a disciplina de Bioquímica, concurso promovido pelo Departamento de Bioquímica. Por insistência de meu orientador de mestrado e grande mentor o Prof. Nicácio, embora tivesse me inscrito em outro processo seletivo para o departamento de Antibióticos, concentrei esforços para o concurso da Bioquímica. Foi um concurso “complexo”, como todos naqueles tempos. Tendo

sido aprovado, mas, não classificado. Fui então, aproveitado para o nascente novo campus da UFPE que viria a ser instalado na cidade de Vitória de Santo Antão, município da zona da mata de Pernambuco.

Após a posse, ocorrida em 14/07/2006, passamos a trabalhar, no antigo Quatorze Biz, um bloco que atualmente não existe, mas, localizava-se mais ou menos no mesmo local do atual centro de Ciências Médicas do Campus Recife, da UFPE. Foi um período de muito aprendizado, pois os desafios de se desenvolver cursos e infraestrutura praticamente do nada, apesar de criarem uma situação de grande dificuldade também ofereciam uma oportunidade única de desenvolvimento profissional e pessoal.

Trabalhávamos intensamente, e devo dizer animadamente, havíamos treinado e estudado ao longo de anos para aquela função, e naquele momento estávamos diante de um grande passo a construção de um novo *campus*. Era uma situação ímpar, cheia de oportunidades. Afinal vivíamos o Reuni, um processo de expansão do sistema de educação superior nunca antes visto.

Aos poucos outros colegas foram se juntando, recordo-me da Profa. Cláudia Rohde que se juntou ao pequeno grupo sentando-se em uma mesa ao fundo da sala em que trabalhávamos. Naquele ambiente iniciamos o trabalho para os primeiros editais FINEPE que iriam prover de recursos para instalação de novos equipamentos o novo campus.

A primeira viagem para visitar as instalações do CAV e do Centro Acadêmico do Agreste, que aquele período ainda funcionava dentro de um Shopping de Caruaru, foi o primeiro contato com o futuro ambiente de trabalho. O clima de todos os envolvidos só era entusiasmo.

Aqui cabe uma pequena reflexão, no parágrafo anterior eu intencionalmente coloquei o verbo no pretérito perfeito, entretanto, creio que, apesar de gramaticalmente correto, de fato, é incorreto, visto que o processo de criação continua a acontecer.

I. ATIVIDADES DE ENSINO E ORIENTAÇÃO, GRADUAÇÃO, PÓS-GRADUAÇÃO

“O papel do professor é estabelecer relações dialógicas de ensino e aprendizagem; em que professor, ao passo que ensina, também aprende. Juntos,

professor e estudante aprendem juntos, em um encontro democrático e afetivo, em que todos podem se expressar”.

Ao longo dos anos tenho ministrado um grupo de disciplinas bastante ligado à química, bioquímica e química de produtos naturais, entretanto, dada a minha formação e, sem falsa modéstia, entusiasmo pelo trabalho, também ministro e ministrei outras disciplinas como Karatê-DÔ I. Sempre buscando manter o mínimo de 120h semestrais.

Acredito que um ser humano não deve se restringir demais em sua carreira acadêmica. Uma colega docente uma vez me disse que isto nos vai “burralizando”. Apesar de o termo não ser exatamente o mais adequado, certamente parece estar correto. O ser humano precisa ser estimulado de diversas formas e, creio eu, essa ideia não se refere apenas a crianças. Então o desafio do “novo” sempre me seduziu.

A seguir relaciono as disciplinas ministradas, na graduação e pós-graduação.

I.1- Disciplinas ministradas na graduação

Ao longo dos últimos anos tenho dedicado grande parte de minha carga horária semestral a ministrar disciplinas da graduação. Em geral relacionadas à área para a qual fui aprovado em concurso, Bioquímica (Figura 9), no entanto também ministro ou contribuo como colaborador em outras disciplinas, como Estrutura e Dinâmica da Terra, na figura 10 foto com a turma de Estrutura e dinâmica da Terra (EDT), em uma das memoráveis viagens de campo. No quadro 2 apresento a lista de disciplinas ministradas na graduação.



Figura 9 –Turma de Enfermagem, Bioquímica.



Figura 10 - Turma de Estrutura e Dinâmica da Terra em atividade de Campo.

Quadro 2- Lista de disciplinas ministradas ao longo da carreira, na Graduação.

Disciplina	Curso	Período
BIOL0002 – Fundamentos de Química	Licenciatura em Ciências Biológicas	2006.2 – 2013.1
NUTR0002 NA-BIOQUÍMICA 1	Bacharelado em Nutrição	2006.2 – 2013.1
NUTR0002 NB-BIOQUÍMICA 1	Bacharelado em Nutrição	2006.2 – 2013.1
NUTR0002 NB-BIOQUÍMICA 1	Bacharelado em Nutrição	2006.2 – 2013.1

ENFE0010	EN	–	Bacharelado em Enfermagem	2007.1 – 2012.1
BIOQUÍMICA 1				
ENFE0010	EA	–	Bacharelado em Enfermagem	2007.1 – 2012.1
BIOQUÍMICA 1				
BIOL0010	BA-		Licenciatura em Ciências Biológicas	2007.1-2013.1
BIOQUÍMICA				
BIOL0010	BB-		Licenciatura em Ciências Biológicas	2007.1-2013.1
BIOQUÍMICA				
BIOL0010	BI-		Licenciatura em Ciências Biológicas	2007.1-2013.1
BIOQUÍMICA				
NUTR0013	NA	–	Bacharelado em Nutrição	2008.1-2013.1
Bioquímica da Nutrição				
NUTR0013	NU	–	Bacharelado em Nutrição	2008.1-2013.1
Bioquímica da Nutrição				
NUTR0013	NB	–	Bacharelado em Nutrição	2008.1-2013.1
Bioquímica da Nutrição				
NEF0019 – KARATÊ – DÔ I			Bacharelado em Enfermagem	2011.1-2019.2
NEN0007 – BIOQUÍMICA			Bacharelado em Enfermagem	2012.1-2022.2
BIOL0081 – ESTRUTURA E DINÂMICA DA TERRA			Licenciatura em Ciências Biológicas	2013.2-2022.2
BIOL0094 – BIOQUÍMICA I			Licenciatura em Ciências Biológicas	2015.1 – 2022.2
BIOL0098 – BIOQUÍMICA II			Licenciatura em Ciências Biológicas	2015.1– 2022.2

I.2- Disciplinas ministradas na pós-graduação

Desde 2010, ano em que passei a participar de cursos de pós – graduação *stricto sensu*, ministro disciplinas que julgo relevantes. Estas, entretanto, têm usualmente periodicidade anual e não semestral.

Quadro 3- Lista de disciplinas ministradas ao longo da carreira na Pós-Graduação.

Disciplina	Curso	Período
SA908 - FÍSICO-QUÍMICA APLICADA	Saúde Humana e Meio Ambiente	2010-2013.2
SA923 - METABÓLITOS SECUNDÁRIOS MICROBIANOS	Saúde Humana e Meio Ambiente	2010-2015.2
SA918 – QUÍMICA DE PRODUTOS	Saúde Humana e Meio Ambiente	2014.2-2017.2

NATURAIS BIOATIVOS		
SA909 – BIOTECNOLOGIA	Saúde Humana e Meio Ambiente	2012.2 - 2013.1
SUB00661 – PRÁTICAS E/OU ESTRATÉGIAS ALTERNATIVAS DE ENSINO E APRENDIZAGEM DE BIOLOGIA	PROFBIO	2018.1
PBIO0902 – DA CONSTRUÇÃO DO CONHECIMENTO CIENTÍFICO AO ENSINO DE BIOLOGIA – TEMA 1 / APLICAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES EM SALA DE AULA 2	PROFBIO	2018.1 – 2019.2
SA935 – REDAÇÃO CIENTÍFICA	PROFBIO	2018.2

I.3- Orientações, Coorientações e Supervisões concluídas e em Andamento

Orientar e formar recursos humanos, para um docente, por mais ligado à pesquisa que possa ser, geralmente, é algo necessário, parte integrante da profissão. Mas, como todo processo de ensino e aprendizagem são necessários dois agentes neste processo, quem ensina / orienta e quem quer aprender e ser orientado neste processo. Portanto, tive bons estudantes.

Cada turma tem sua história, mas, as primeiras turmas são sempre especiais. Meu primeiro estudante talvez mereça uma menção a parte. Marinaldo Pacífico Neto foi corajoso (ou tolo) o suficiente para procurar o Prof. Peter, em um período em que o CAV tinha uma infra-estrutura muito menor que a que tem hoje. Conseguimos uma bolsa de Iniciação Científica e ele desenvolveu seu estágio no Departamento de Bioquímica, Laboratório de Química de Produtos Naturais sob a orientação da Profa. Eugênia Cristina Pereira e coorientação de minha parte. Após alguns meses a orientação foi passada para mim. Hoje Marinaldo é Prof. Adjunto na Federal do Amazonas.

Definitivamente nem sempre as coisas são fáceis, uma pequena ironia, já que para quem inicia geralmente as coisas, de fato, são mais difíceis. Tinha bastante interesse em orientar, e neste sentido, pouco tempo após o início de minhas atividades no CAV, o que certamente foi cedo, visto que fui o terceiro docente a ser contratado (atualmente o segundo mais antigo), procurei juntamente com outro colega, o Prof. César Augusto de Souza Andrade, o programa de Bioquímica da UFPE, o curso que nos havia formado, com esperanças de que nos acolhessem, mas, a palavra acolhimento está longe de

descrever a forma como fomos recebidos, não que tenhamos sido mal recepcionados, mas, a possibilidade de participar do colegiado daquele curso estava descartada, ao menos por alguns anos. Parece que tínhamos que continuar nos provando aos mesmos docentes que nos haviam treinado, e não estávamos dispostos a isto. Então pensamos em criar um curso de pós – graduação.

Existiam diversos professores jovens e ansiosos por “produzir”, a matéria prima era bastante promissora. E, Após alguns meses de intenso trabalho um grupo de docentes do CAV, Coordenado pelo Prof. César, grupo do qual fiz parte, foi capaz de enviar um APCN que culminou na abertura do Programa de Pós-graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, o primeiro programa *strictu sensu* do processo de interiorização de nossa UFPE. Devo dizer que foi um feito notável. Especialmente quando lembramos que era um grupo com experiência bastante limitada, muito jovem.

Abaixo listo (Quadro 4) as orientações ao longo dos últimos anos.

I.3.1 Graduação

Trabalhos de conclusão de curso, Iniciação Científica e Monitoria

Ao longo de minha carreira orientei diversos trabalhos de conclusão de curso, notadamente de estudantes dos cursos de Ciências Biológicas, Enfermagem e Nutrição. Mas, tenho a nítida impressão de que foram poucos. Talvez esta impressão esteja relacionada a minha área de atuação que é basicamente química, englobando a Síntese de Fármacos, Química de produtos naturais e Lichenologia aplicada. Receio que não seja lá tão atraente.

Quadro 4- Orientações em Graduação nos últimos anos.

Estudante	Tipo de Orientação	Curso/Ano
Alexsandra Nascimento de Carvalho	TCC	Licenciatura em Ciências Biológicas/2010
Marinaldo Pacífico Cavalcanti Neto	TCC	Enfermagem/2010
Bruna Maria Pereira da Costa Cordeiro	TCC	Licenciatura em Ciências Biológicas – UPE, campus Nazaré/2011
Tamiris Alves Rocha	TCC	Licenciatura em Ciências

		Biológicas/2012
Maria Aparecida da Conceição de Lira	TCC	Licenciatura em Ciências Biológicas/2013
Joelma Pessoa Gonçalves	TCC	Licenciatura em Ciências Biológicas/2013
Amanda Brito Nunes	TCC	Licenciatura em Ciências Biológicas/2014
José Laurentino dos Santos Neto	TCC	Licenciatura em Ciências Biológicas/2015
Camila Melo Alves de Lima	TCC	Bacharelado em Educação Física/2015
Cristiane Maria da Conceição	TCC	Licenciatura em Ciências Biológicas/2015
Dayvson José de Lima.	TCC	Licenciatura em Educação Física/2017
Pedro Henrique de Andrade Lima	TCC	Bacharelado em Educação Física/2018
Victória Beatriz Gomes da Silva	TCC	Licenciatura em Ciências Biológicas/2022
José Anderson dos Santos Paixão	TCC	Licenciatura em Ciências Biológicas/2023
Marinaldo Pacífico Neto	IC-FACEPE	Graduando em Enfermagem/2007
Leyliane Gomes da Mota Silv	IC-PROPESQ	Graduando em Licenciatura em Ciências Biológicas/2007
Tatyane Lima de Oliveira	IC-PROPESQ	Graduanda em Licenciatura em Ciências Biológicas/2007
Bruna Maria Pereira da Costa Cordeiro	IC-FACEPE	Graduanda em Bacharelado em Ciências Biológicas – UPE/2009
Alexsandra Nascimento de Carvalho	IC-FACEPE	Graduanda em Licenciatura em Ciências Biológicas/2009
Bruna Maria Pereira da Costa Cordeiro	IC-FACEPE	Graduanda em Licenciatura em Ciências Biológicas/2010
Tamiris Alves Rocha	IC-FACEPE	Graduanda em Licenciatura em Ciências Biológicas/2012
Maria Aparecida da Conceição de Lira	IC-FACEPE	Graduanda em Licenciatura em Ciências Biológicas/2013
Rose Kelly dos Santos Sousa	IC-PROPESQ	Graduanda em Licenciatura em Ciências Biológicas/2017
Rosália Rodrigues da Costa Silva	IC-PROPESQ	Licenciatura em Ciências Biológicas/2017

Brennda Raphaela Dionisio de Aguiar	IC-PROPESQ	Licenciatura em Ciências Biológicas/2017
Hugo Renan da Silva Amaral	IC-PROPESQ	Licenciatura em Ciências Biológicas/2021
Victoria Beatriz Gomes da Silva	IC-PROPESQ	Licenciatura em Ciências Biológicas/2022
Anderson Felipe da Silva Santos	Monitoria	Licenciatura em Ciências Biológicas/2009
Laryssa Grazielle Feitosa Lopes	Monitoria	Bacharelado em Enfermagem/2009
Joelma Pessoa Gonçalves	Monitoria	Licenciatura em Ciências Biológicas/2009
Marcus Vinicius Peregrino de Santana	Monitoria	Bacharelado em Enfermagem/2010
Marinaldo Pacífico Neto	Monitoria	Bacharelado em Enfermagem/2010
Delton Manoel dos Santos Silva	Monitoria	Bacharelado em Educação Física/2011
Yasmin Luana Costa Alves	Monitoria	Bacharelado em Nutrição/2011
Maurilia Palmeira da Costa	Monitoria	Licenciatura em Ciências Biológicas/2011
Prissila Muniz de Moraes	Monitoria	Bacharelado em Nutrição/2011
Karen Yasmin dos Santos Avelino	Monitoria	Bacharelado em Nutrição/2011
Aiany Cibelle Simões Alves	Monitoria	Bacharelado em Enfermagem/2012
Adriana Maria da Silva	Monitoria	Bacharelado em Enfermagem/2013
Luana Darc Silva de Andrade	Monitoria	Bacharelado em Nutrição/2015
Maria Islane Araújo Ferreira	Monitoria	Bacharelado em Enfermagem/2015
Marcos Ruan Marinho de Barros	Monitoria	Educação Física Bacharelado
Dayane Guimarães Silva	Monitoria	Licenciatura em Ciências Biológicas/2015
Jociellen Maria Gomes de Lima	Monitoria	Educação Física Bacharelado/2015
Ricardo Ribeiro de Oliveira	Monitoria	Educação Física Bacharelado/2016
Stephany Ferreira Souza da Silva	Monitoria	Bacharelado em Nutrição/2016
Maria Clara Silva Bezerra	Monitoria	Bacharelado em Enfermagem/2019

I.3.2- Pós-Graduação

Dissertações de Mestrado e Teses de Doutorado

Ao longo dos últimos anos tenho a grata satisfação de ter contribuído para a formação de 14 Mestres e 2 Doutores (Quadro 5).

Quadro 5- Orientações em Pós-graduação nos últimos anos.

Estudante	Tipo de Orientação	Curso/Ano
Débora Máximo das Neves Luna	Mestrado - Coorientação	Programa de Pós-graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente/2009
Daniel de Senna Alexandrino	Mestrado - Orientação	Programa de Pós-graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente/2010
Marcela Clementino de Araújo	Mestrado - Coorientação	Programa de Pós-graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente/2011
Sâmia Dayana Lemos de Lacerda	Mestrado - Orientação	Programa de Pós-graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente/2012
Janice Vasconcelos Oliveira	Mestrado - Orientação	Programa de Pós-graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente/2013
Bruno de Luna Oliveira	Mestrado - Orientação	Programa de Pós-graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente/2014
Andrea de Andrade Timoteo	Mestrado - Coorientação	Programa de Pós-graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente/2015
André Severino da Silva	Mestrado - Orientação	Programa de Pós-graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente/2016
Érima Maria de Amorim	Mestrado - Orientação	Programa de Pós-graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente/2016
Maria Aparecida da Conceição de Lira	Mestrado - Orientação	Programa de Pós-graduação em Saúde

		Humana e Meio Ambiente/2016
Gerliny Bezerra de Oliveira	Mestrado - Orientação	Programa de Pós-graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente/2017
Mariana Vasconcelos de Paula Souza	Mestrado - Orientação	Programa de Pós-graduação Profissional em Ensino de Biologia – PROFBIO/2019
Mariana Xavier dos Santos	Mestrado - Orientação	Programa de Pós-graduação Profissional em Ensino de Biologia – PROFBIO/2022
Ana Jackeline de França Santos	Mestrado - Orientação	Programa de Pós-graduação Profissional em Ensino de Biologia – PROFBIO/2020
André Severino da Silva	Doutorado - Coorientação	Doutorado em Biotecnologia
Maria Aparecida da Conceição de Lira	Doutorado - Coorientação	Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas

I.3.3- Orientações e Supervisões em Andamento.

No momento em que escrevo este documento estou a orientar três estudantes de Mestrado, dois de doutorado e dois em suas monografias de conclusão de curso (TCC), como se pode ler no quadro abaixo. Desde o auge da pandemia de COVID-19, ainda não retomei orientação de estudantes de IC, mas, espero novos candidatos para 2024.

Quadro 6- Orientações em andamento

Estudante	Tipo de Orientação	Curso/Ano
Higor Vinícius do Nascimento	Mestrado / Orientador	Programa de Pós-graduação em biologia celular e molecular aplicada – UPE/2022
Victória	Mestrado/Orientador	Programa de Pós-graduação em biologia celular e molecular aplicada – UPE/2023
Lizandra Ferraz da Silva	Mestrado / Coorientação	Programa de Pós-graduação em biologia celular e molecular aplicada – UPE/2022
Renatha Claudia Barros Sobreira	Doutorado / Coorientação	Doutorado em Ciências Farmacêuticas –

		UFPE/2019
Gerliny Bezerra de Oliveira	Doutorado / Coorientação	Doutorado em Ciências Farmacêuticas – UFPE/2018
Samuel Elias da Silva	TCC/Orientação	CAV/UFPE

II- ATIVIDADES DE PRODUÇÃO INTELECTUAL

Patentear nunca foi uma preocupação, no entanto, após algumas críticas e comentários de colegas, que de fato apresentaram argumentos sólidos, passou a ser uma de minhas preocupações nos últimos anos. No entanto, ainda não são “algo” corriqueiro em minha produção acadêmica.

Abaixo listo as poucas obtidas nos últimos anos.

II.1 - Patentes

1. Cordeiro B. M. P. ; SILVA, T. D. S. ; Gonçalves J. P. ; GUSMÃO, N. B. ; MENDONCA, R. Z. ; VIRGINIO, J. A. ; Falcão, E.P.S. ; Martins, M. C. B. ; BADARI, J. C. ; SILVA, N. H. . Atividade Antiviral do Ácido divaricático contra virus infecciosos. 2014, Brasil. Patente: Modelo de Utilidade. Número do registro: BR1020140290303, título: "Atividade Antiviral do Ácido divaricático contra virus infecciosos" , Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 21/11/2014
2. MELO, S. J. ; MONTE, Z. S. ; SRIVASTAVA, R. M. ; SILVA, RICARDO OLIVEIRA ; Falcão, E.P.S. . Heterociclos pirimidínicos potencialmente bioativos e respectivo processo de obtenção e elucidação estrutural. 2017, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR10201701512, título: "Heterociclos pirimidínicos potencialmente bioativos e respectivo processo de obtenção e elucidação estrutural", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 17/07/2017

II.2 Artigos Publicados em Periódicos

O conhecimento científico certamente não é produto exclusivo da genialidade de grandes cientistas, apesar de certamente dar grandes saltos pela participação deles. Basta se verificar a quantidade de citações em seus artigos. Seu mérito certamente está em serem capazes de enxergar algo que os outros de nós não “viram”. Mas, creio que o produto científico é, fruto de contribuições maiores ou menores que dão suporte a cada um dos trabalhos, sejam eles puramente teóricos, experimentais ou ainda tecnológicos. O produto do trabalho científico constitui portanto, uma grande pirâmide, com uma sólida e forte base, formada por inúmeros blocos de rocha e que sobe em direção aos céus.

Durante a carreira publiquei, até o momento, cerca de 47 artigos, sem contar os artigos já aceitos para o ano de 2023, mas, ainda sem numeração de página e DOI. A média de artigos completos por ano é de cerca de 2. Como se pode perceber (Figura 4) a produção não é regular, ao menos não como gostaria. Tenho o hábito de me envolver em diversos aspectos da vida acadêmica e, a pesquisa precisa de tempo e dedicação, sem falar de recursos. Além disso, meu trabalho fundamentalmente é experimental, dependendo de dados e resultados que demandam tempo de bancada. Isto torna a produção científica ao longo do período constituída de anos de grande produção intercalada a períodos de baixa produção. Além de diversos trabalhos “engavetados” com dados incompletos.

Certamente não considero minha produção quantitativamente muito expressiva, possivelmente poderia ser maior, entretanto, creio que o mais importante é a qualidade dos trabalhos e o impacto científico. Não creio, porém, que seja a pessoa mais adequada a avaliar o impacto de meus próprios produtos (e, também tenho minhas críticas ao sistema de métricas que as fomentadoras utilizam para medir o impacto de nossa produção). No entanto, imagino que meus artigos e demais produções servem ao propósito de acrescentar um alguns tijolos à imensa Pirâmide que se constitui o conhecimento humano, levando “adiante” nossa civilização.

Acrescento, entretanto, que minha produção científica, sofreu consideravelmente nos últimos dois anos devido á recente pandemia que ceifou milhões de vidas em nossa comunidade global. Apesar disso tenho me esforçado juntamente com minha equipe de colaboradores e estudantes de forma que, para o ano em curso, já publicamos três trabalhos e temos mais dois aprovados e outros dois em avaliação por revisores.

Grande parte de minha carreira tenho dedicado à pesquisa de produtos naturais com potencial aplicação biológica, em áreas como Microbiologia aplicada, atividade anti-inflamatória, antineoplásica, antiespectorante, atividade larvicida frente a *Aedes aegypti*, inseticida, atividade leishmanicida, antioxidante, genotóxica e mutagênica, moluscicida, antinoceptiva, entre outras. Além de alguns ensaios relacionados à educação, fitoquímica de plantas e algas e estudos a respeito do cultivo de líquens com fins de produção de metabólitos secundários de interesse biotecnológico e farmacológico.

Também tenho investido grande parte de meus esforços na síntese de compostos bioativos, notadamente com os núcleos pirimidínico, ftalimídico e oxadiazólico (e eventualmente os três juntos). No tocante aos compostos pirimidínicos nosso grupo tem publicado com frequência a respeito do potencial deste heterociclo e temos conduzido estudos a respeito das propriedades físico-químicas de moléculas contendo este núcleo que seriam responsáveis pelos efeitos biológicos observados. Estes estudos de Química Medicinal são conduzidos conjuntamente a grupos de pesquisa da UFPB e UFPE.

Em alguns momentos também enveredo por derivados sintéticos oriundos de compostos líquênicos com grande potencial como o ácido úsnico. Alguns trabalhos relacionados à potencialidade do sal potássico e sódico desta molécula já foram publicados em periódicos de alto impacto. Estudos a respeito de derivações mais complexas de depsídeos, e ácidos úsnicos são conduzidos com bons resultados, tendo levado recentemente a uma dissertação de mestrado. No entanto o artigo ainda não foi publicado, embora submetido.

Como se pode “ver” nas linhas acima, a minha produção se concentra na síntese e química de produtos naturais. Entretanto, devido a diversos fatores esta produção oscila ao longo dos anos, como pode ser observado na figura 11.

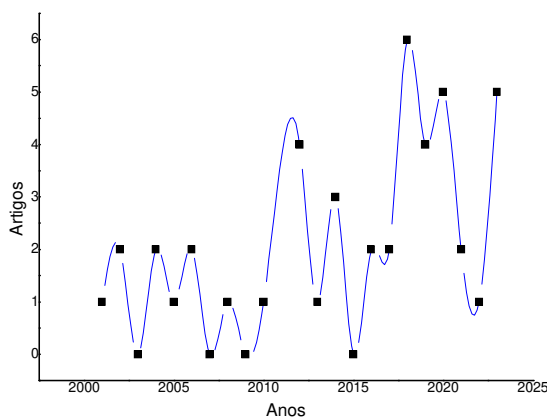


Figura 11- Produção absoluta de artigos em periódicos/ano

Abaixo listo estas pequenas contribuições científicas.

Ano	Publicação	Periódico
2023	Assessment of Cytotoxic/Antitumour Potential and <i>in Silico</i> Study of Salazinic Acid Isolated from <i>Parmotrema concurrens</i>. De Lira, Maria Aparecida da Conceição; Da Silva, Marllyn Marques; Alves Rocha, Tamiris; Feijó de Moura, Danielle; Santos Costa, Erick Caique; Dos Santos Maia, Mayara; Scotti, Luciana; Scotti, Marcus Tullius; Lacerda Buril, Maria de Lourdes; Pereira, Eugênia C.; de Aguiar Júnior, Francisco Carlos Amanajás; De Britto Lira Nogueira, Mariane Cajubá; Da Silva Santos, Noemia Pereira; da Silva Falcão, Emerson Peter; de Melo, Sebastião José	Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, v. 23, p. 000-000, 2023
	Histological evaluation of the liver of mice with sarcoma-180 treated with salazinic acid. Lira, Maria Aparecida da C. de; Silva, Marllyn M. da; Silva, Wanessa K.M.; Falcão, Emerson P.S.; Aguiar Júnior, Francisco C.A. de; Melo, Sebastião J. de.	Anais da Academia Brasileira de Ciências v. 95, p. 1-9, 2023.
	Larvicidal activity and docking study of <i>Ramalina complanata</i> and <i>Cladonia verticillaris</i> extracts and secondary metabolites against <i>Aedes aegypti</i>. Da Silva, André Severino; de Oliveira Farias de Aguiar, Júlio César Ribeiro; Da Silva Nascimento, Jéssica; Costa, Erick Caique Santos; Dos Santos, Fábio Henrique Galdino; Andrade de Araújo, Hallysson Douglas; Da Silva, Nicácio Henrique; Pereira, Eugênia Cristina; Martins, Mônica Cristina; Falcão, Emerson Peter Silva; Scotti, Luciana; Scotti, Marcus Tullius; Do Amaral Ferraz Navarro, Daniela Maria.	Industrial Crops and Products, v. 195, p. 116425, 2023.
2022	Histomorphometric evaluation of the kidneys of albino swiss mice exposed to extracts of <i>Parmotrema concurrens</i> (lichen). Lira, M. A. C. ; Silva, M. M. ; Silva, L. C. ; Silva, L. C. L. ; Silva, C. J. S. ; E.P.S. Falcão ; Aguiar Junior, F. C.	Brazilian Journal of Health Review, v. 5, p. 22203-22211, 2022.

	A. ; Melo, S. J.	
2021	Insecticidal activity of the ether extract from the lichen <i>Ramalina complanata</i> and an isolated metabolite (divaricatic acid) against <i>Sitophilus zeamais</i> (Coleoptera, Curculionidae). Da Silva, André Severino; De Lira Pimentel, Camila Soledade; dos Santos, Fábio Henrique Galdino; De Araújo, Hallysson Douglas Andrade ; Paiva, Patrícia Maria Guedes; Da Silva, Nicácio Henrique ; Pereira, Eugênia Cristina ; Martins, Mônica Cristina Barroso ; Buril, Maria de Lourdes Lacerda ; Napoleão, Thiago Henrique; Falcão, Emerson Peter Silva; Navarro, Daniela Maria do Amaral Ferraz.	Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 35, p. 102049-6, 2021.
	O Uso do <i>Stop Motion</i> No Ensino de Bioquímica Para o Nível Médio. Santos, A. J. F. ; Lima, K. E. C. ; Falcão, E.P.S. .	Investigações em Ensino de Ciências (UFRGS. IMPRESSO), v. 26, p. 127-144, 2021.
2020	Pyrimidine Derivatives: QSAR Studies of Larvicidal Activity against <i>Aedes aegypti</i>. Monte, Z. S. ; Navarro, D. M. A. F. ; Aguiar, J. C. R. O. F. ; Nascimento, J. S. ; Scotti, M. T. ; Scotti, L. T. ; Barros, R. P. C. ; Santos, A. C. S. ; Pereira, V. R. A. ; Falcão, E.P.S. ; Melo, S. J.	Journal of The Brazilian Chemical Society, v. 00, p. 1-10, 2020.
	<i>In silico</i> studies on the Antileishmania, cytotoxicity and anticancer activities of pyrimidine analogs. Monte, Z. S. ; Souza, S. M. ; Costa, N. T. ; Santos, A. C. S. ; Militao, G. C. G. ; Hernandez, M. Z. ; Silva, R. O. ; Falcão, E.P.S. ; Melo, S. J.	Latin American Journal of Pharmacy, v. 39, p. 1081-1093, 2020.
	Production of Bioactive Lichen Compounds by Alginate-Immobilized Bionts Isolated from <i>Cladonia verticillaris</i> : An <i>in vitro</i> Study. Santiago, R. ; Martins, M. C. B. ; Nascimento, T. ; Barros, L. F. ; Vilaca, M. ; Emerson Peter S. Falcão ; Silva, N. H. ; Legaz, M. E. ; Vicente, C. ; Pereira, E.C.	Journal of Plant Studies, v. 09, p. 43-58, 2020.
	Antioxidant Activity of Dictyotales from Tropical Reefs of Brazil. Rodrigues, Samara; Harb, Talissa Barroco; Falcão, Emerson Peter da Silva ; Pereira, Sonia Maria Barreto ; Chow, FungyI.	Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 00, p. 1-15, 2020.
	Lichen metabolites from the immobilized bionts isolated from <i>Cladonia salzmannii</i> . A study of their antioxidant and antimicrobial activities. Santiago, R. ; Martins, M. C. B. ; Barros, L. F. ; Vilaca, M. ; Nascimento, T. ; Falcão, E.P.S. ; Silva, N. H. ; Legaz, Maria Estrella ; Pereira, E.C. ; Vicente,	Journal of Medicinal Plants Studies, v. 8, p. 43-55, 2020.

	Carlos .	
2019	Evaluation of cytotoxic potential, oral toxicity, genotoxicity, and mutagenicity of organic extracts of <i>Pityrocarpa moniliformis</i>. Rocha, Tamiris Alves ; Moura, Danielle Feijó de ; Silva, Marllyn Marques da ; Dos Santos Souza, Talita Giselly ; Lira, Maria Aparecida da Conceição de ; Barros, Dayane de Melo ; Da Silva, Alexandre Gomes ; Ximenes, Rafael Matos ; Falcão, Emerson Peter da Silva; Chagas, Cristiano Aparecido ; Júnior, Francisco Carlos Amanajás de Aguiar ; Santos, Noêmia Pereira da Silva ; Silva, Marcia Vanusa da ; Correia, Maria Tereza dos Santos. Toxicological effects of <i>Ramalina aspera</i> (lichen) on <i>Biomphalaria glabrata</i> snails and <i>Schistosoma mansoni cercariae</i>. Pereira, E. C. ; Melo, A. ; Falcão, E.P.S. ; Silva, H. A. M. F. ; Sa, J. L. F. ; Buriel M. L. L. ; Lima, M. ; Martins, M. C. B. ; Albuquerque, M. C. P. A. ; Silva, N. H. ; Siqueira, W. Usnic Acid Potassium Salt: Evaluation of the Acute Toxicity and Antinociceptive Effect in Murine Model. Araujo, H. D. A. ; Silva Junior, J. G. ; Oliveira, J. R. S. ; Ribeiro, M. H. M. L. ; Martins, M. C. B. ; Bezerra, M. A. C. ; Aires, A. L. ; Albuquerque, M. C. P. A. ; Melo-Junior, M. R. ; Pontes Filho, N. T. ; Pereira, E. C. ; Silva, D. J. R. ; Anjos, J. V. ; Emerson Peter S. Falcão ; SILVA, N. H. ; Lima, V. L. M. Optical Properties Pyrimidine Derivatives: Effect of Electron-Donor/Acceptor Substituents In Molecular Topology. Monte, Z. S. ; Falcão, E. P. S. ; Melo, S. J.	Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A-Current Issues, v. 00, p. 1-16, 2019. Acta Tropica, v. 196, p. 172-179, 2019. Molecules, v. 24, p. 2042-2059, 2019. International research journal of pharmacy, v. 10, p. 5-13, 2019.
2018	Effects of Usnic, Barbatic and Fumarprotocetraric acids on Survival of <i>Nasutitermes corniger</i> (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae). Martins, Monica C B ; Lopes, Rosineide Silva ; Barbosa, Patricia Silva ; Santiago, Rocio ; Rodrigues, Bruno Rafael ; Albuquerque, Auristela Correia De; Flacão, Emerson Peter S. ; Lima, Vera Lucia De M. ; Silva, Nicácio H. Da ; Pereira, Eugênia C. Phytochemical and biological evaluation of metabolites produced by alginate-immobilized Bionts isolated from the lichen <i>Cladonia substellata</i> vain. Santiago, Rocío ; Martins, Mônica C.B. ; Vilaça, Matheus D. ; De Barros, Luiz F.B. ; Nascimento, Tais ; Da Silva, Nicácio H. ; Falcão,	SOCIOBIOLOGY, v. 65, p. 79, 2018. Fitoterapia, v. 131, p. 23-34, 2018.

	Emerson P.S. ; Legaz, María-Estrella ; Vicente, Carlos ; Pereira, Eugênia C.	
	Hexane extract from <i>Spondias tuberosa</i> (Anacardiaceae) leaves has antioxidant activity and is an anti-Candida agent by causing mitochondrial and lysosomal damages. Da Costa Cordeiro, Bruna Maria Pereira; De Lima Santos, Nataly Diniz; Ferreira, Magda Rhayanny Assunção; De Araújo, Larissa Cardoso Corrêa ; Junior, Alexsander Rodrigues Carvalho ; Da Conceição Santos, Alan Diego ; De Oliveira, Ana Paula ; Da Silva, Alexandre Gomes ; Da Silva Falcão, Emerson Peter ; Dos Santos Correia, Maria Tereza ; Da Silva Almeida, Jackson Roberto Guedes ; Da Silva, Luís Cláudio Nascimento ; Soares, Luiz Alberto Lira ; Napoleão, Thiago Henrique ; Da Silva, Márcia Vanusa ; Paiva, Patrícia Maria Guedes.	BMC Complementary and Alternative Medicine, v. 18, p. 1-10, 2018.
	Synthesis, antitrypanosomal activity and molecular docking studies of pyrimidine derivatives. De Melo, Sebastião José; Do Monte, Zenaide Severina ; Da Silva Santos, Aline Caroline ; Silva, Ana Catarina Cristovão ; Ferreira, Luiz Felipe Gomes Rebello ; Hernandes, Marcelo Zaldini ; Silva, Ricardo Oliveira; da Silva Falcão, Emerson Peter ; Brelaz-De-Castro, Maria Carolina Accioly ; Srivastava, Rajendra M. ; Pereira, Valeria Rêgo Alves.	Medicinal Chemistry Research, v. 27, p. 2512-2522, 2018.
	Antineoplastic Activity and Genotoxicity of Organic Extracts and Barbatic Acid Isolated from the Lichen <i>Cladonia salzmännii</i> Nyl. Gonçalves J. P. ; Martins, Mônica Cristina Barroso ; Buril, M. L. L. ; Aguiar, J. S. ; Souza, T. G. S. ; Santos, N. P. S. ; Chagas, C. A. ; Pereira, E. C. ; Falcão, Emerson Peter da Silva ; Silva, N. H.	International Archives of Medicine, v. 11, p. 1-12, 2018.
	Comparison of Antibacterial and Antibiofilm Potential of Organic Extracts of <i>Pityrocarpa moniliformis</i> Leafs Obtained by Different Methods of Extraction. Rocha, T. A. ; Souza, C. M. ; Nascimento Junior, J. A. A. ; Moura, D. F. ; Barros, D. M. ; Lira, M. A. C. ; Silva, M. M. ; Silva, A. G. ; Oliveira, I. S. ; Falcão, E.P.S. ; Silva, M. V. ; Correia, M. T. S.	International Journal of Recent Scientific Research, v. 9, p. 29791-29795, 2018.
2017	Barbatic Acid Offers a New Possibility for Control of <i>Biomphalaria Glabrata</i> and Schistosomiasis. Martins, Mônica ; Silva, Monique ; Silva, Hianna ; Silva, Luanna ; Albuquerque, Mônica ; Aires, André ; Falcão, Emerson ;	Molecules (Basel. Online), v. 22, p. 568-578, 2017.

	Pereira, Eugênia ; De Melo, Ana ; Da Silva, Nicácio.	
	Synthesis and evaluation of arylamidine derivatives for new antimicrobial and cytotoxic activities. Do Monte, Zenaide Severina ; Amanda M. Silva ; Cláucia M. S. Lima ; Silva, T. G. ; Marques, K. M. R.; Rodrigues, M. D. ; Falcão, E. P. S. ; Melo, S. J.	ANAIS DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIENCIAS, v. 89, p. 1051-1059, 2017.
	Biologically-Active Compounds from Brazilian Lichens and their Affinity with Ether. Pereira, E. C.; Martins, M. C. B. ; Buril M. L. L. ; Santiago, R. ; Falcão, Emerson P. S. ; Silva, N. H. ; Legasz, E. ; Vicente, C.	Journal of drug design and research, v. 4, p. 1057-1062, 2017.
2016	Synthesis of 4-amino-2,6-diaryl-5-cyanopyrimidines as Antimicrobial Agents. Do Monte, Zenaide Severina ; Monteiro, Maria Renata Leite ; Borba, Camila Beatriz Atanásio ; Gusmão, Norma Buarque de ; Falcão, Emerson Peter da Silva ; Silva, Ricardo Oliveira ; Srivastava, Rajendra M. ; De Melo, Sebastião José.	Synthetic Communications, p. 983-991, 2016.
	In vitro and In vivo Antineoplastic Activity of Barbatic Acid. Martins, M. C. B. ; Rocha, T. A. ; Silva, T. D. S. ; Cavalcanti Neto, M. P. ; Santos, N. P. ; Silva, T. G. ; Aguiar Junior, F. C. A. ; Falcão, E. P. S. ; Pereira, E. C. ; Silva, N. H.	International Archives of Medicine, p. 1-9, 2016.
2014	Usnic Acid Potassium Salt: an Alternative for the Control of <i>Biomphalaria glabrata</i> (Say, 1818). Martins, Mônica C. B. ; Silva, Monique C. ; Silva, Luanna R. S. ; Lima, Vera L. M. ; Pereira, Eugênia C. ; Falcão, Emerson P. S. ; Melo, Ana M. M. A. ; Da Silva, Nicácio Henrique .	Plos One, v. 9, p. e111102, 2014.
	Auriculoterapia: tratamento dos transtornos da amamentação. Maymone, Cristiana Marinho ; Pinto, Rogélia Herculano ; Falcão, Emerson Peter da Silva ; Júnior, Bartolomeu José dos Santos	Ciência, Cuidado e Saúde (Online), v. 13, p. 577, 2014.
	Expectorant and antioxidant activities of purified fumarprotocetraric acid from <i>Cladonia verticillaris</i> lichen in mice. De Barros Alves, Glícia Maria ; De Sousa Maia, Maria Bernadete ; De Souza Franco, Eryvelton ; Galvão, André Martins ; Da Silva, Teresinha Gonçalves ; Gomes, Renata Miranda ; Martins, Mônica Barroso ; Da Silva Falcão, Emerson Peter ; De Castro, Célia Maria Machado Barbosa ; Da Silva, Nicácio Henrique .	Pulmonary Pharmacology & Therapeutics, v. 27, p. 139-143, 2014.
2013	Antinociceptive pyrimidine derivatives: aqueous multicomponent microwave assisted synthesis. Xavier, Augusto L. ; Simas, Alfredo M. ; Falcão, Emerson P. da S. ;	Tetrahedron Letters, v. 54, p. 3462-3465, 2013.

	dos Anjos, Janaína V.	
2012	Allelopathic and bioherbicidal potential of <i>Cladonia verticillaris</i> on the germination and growth of <i>Lactuca sativa</i>. Falcão, E. P. S.; Tigre, R.C. ; Silva, N.H. ; Santos, M.G. ; Honda, N.K. ; Pereira, E.C.	Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 84, p. 125-132, 2012.
	O Anel Pirimidínico e sua importância na busca por novos fármacos: Uma breve revisão. Falcão, E.P.S.; MELO, S. J.	Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, v. 9, p. 84-106, 2012.
	Produção de compostos fenólicos a partir de células imobilizadas do líquen <i>Parmotrema andinum</i> (Müll. Arg.) Hale e avaliação de atividade antimicrobiana. Nóbrega, Nadejda de Azevedo; Ribeiro, Sheyla Mara ; Pereira, Eugênia Cristina ; Marcelli, Marcelo ; Martins, Mônica Cristina Barroso ; Falcão, E. P. S. ; Gusmão, Norma Buarque de ; SILVA, N. H.	Acta Botanica Brasílica (Impresso), v. 26, p. 101-107, 2012.
	Substâncias Obtidas de <i>Ramalina aspera</i> através de imobilização celular utilizando biorreator com movimento constante. Cordeiro, B. M. P. C. ; Martins, Mônica Cristina Barroso ; Carvalho, A. N. ; Buril, M. L. L. ; Falcão, E. P. S. ; Pereira, E. C. ; Silva, N. H.	Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, v. 9, p. 226-237, 2012.
2010	Interfacial properties of a novel pyrimidine derivative and poly(ethylene glycol)-grafted phospholipid floating monolaye. Luna, D. M. N. ; Falcão, E. P. S. ; Melo, S. J. ; Andrade, C. A. S.	Colloids and Surfaces. A, Physicochemical and Engineering Aspects (Print), v. 358, p. 54-65, 2010.
2008	Quantitative Structure Activity Relationships (QSAR) of 4-Amino-2,6-Diarylpyrimidine-5-Carbonitriles Having Anti-inflammatory Activity. Silva, J. B. P. ; Barro Neto, B. ; Melo, S. J. ; Falcão, E. P. S. ; Catanho, T. J. A.	Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 19, p. 337-343, 2008.
2006	Synthesis and Anti-inflammatory activity of 4-amino-2-aryl-5-cyano-6-{3- and 4-(N-phthalimidophenyl)} pyrimidines. Falcão, E. P. S.; Melo, S. J. ; Srivastava, R. M. ; Catanho, T. J. A. ; Nascimento, S. C.	European Journal of Medicinal Chemistry, França, v. 41, n.000, p. 276-282, 2006.
	Produção de metabólitos bioativos pelo líquen <i>Cladonia substellata</i> Vainio. Ribeiro, S. M. ; Pereira, E. C. ; Gusmão, N. B. ; Falcão, E. P. S. ; Silva, N. H.	Acta Botanica Brasilica, v. 20, p. 265-272, 2006.
2005	A Simple approach for the Synthesis of 2,6-Diaril-4-oxo-3,4-dihydropyrimidine-5-carbonitriles. Mendonca Junior, F. J. B. ; Anjos, J. V. ; Falcão, E. P. S. ; Yamamoto, A. P. ; Melo, S. J. ; Srivastava, R. M.	Heterocyclic Communications, v. 11, n.000, p. 479/ 6-484, 2005.

2004	Atividade Antimicrobiana de Derivados Fenólicos de <i>Ramalina sorediosa</i> (B. de Lesd) Laundron. Falcão, E. P. S.; Silva, N. H. ; Gusmão, N. B. ; Ribeiro, S. M. ; Pereira, E. C.	Acta Botanica Brasilica, v. 18, n.04, p. 913-920, 2004.
	Synthesis of New 1,2,4-Oxadiazoles Carrying (1S,2S)-t-Butyloxycarbonyl-1-Amino-2-methyl-1-butyl and (1S)-t-Butyloxycarbonyl-1-. Braga, V. M. L. ; Melo, S. J. ; Srivastava, R. M. ; Falcão, E. P. S.	Journal of the Brazilian Chemical Society, Brasil, v. 15, n.04, p. 603-607, 2004.
2002	Atividade antimicrobiana de Compostos Fenólicos do Líquen <i>Heterodermia leucomela</i> (L.) Poelt. Falcão, E. P. S.; Silva, N. H. ; Pereira, E. C. ; Gusmão, N. B. ; Ribeiro, S. M.	Acta Farmacéutica Bonaerense, v. 21, n.1, p. 43-49, 2002.
	Synthesis of new 4-Amino-2,6-diarypyrimidine-5-carbonitriles. Melo, S. J. ; Santos, L. C. ; Falcão, E. P. S. ; Srivastava, R. M. ; Duc, C. L.	Journal of Chemical Research. Synopses, Inglaterra, v. 2002, p. 216-217, 2002.
2001	Biochemical Markers in Taxonomy of the Genus <i>Cunnighamella</i>. Falcão, E. P. S.; Takaki, G. M. C. ; Xiosaki, R. K. ; Silva, N. H.	Revista Iberoamericana de Micologia, 18: 123-127, 2001.

II.3- Capítulos de Livros Publicados

Ao longo dos últimos anos publicamos dois capítulos de livros, em parceria com colegas docentes e pesquisadores. Ambos os trabalhos relacionados à liquenologia.

1. Pereira, Eugênia C. ; da Silva, Nicácio H.; Buril, Maria de Lourdes L. ; Martins, Mônica C. B. ; Silva, Hianna A. M. F. ; Falcão, Emerson Peter S. ; de Oliveira, Helinando P. ; da Costa, Mateus Matiuzzi ; Legaz, Maria Estrella ; Santiago, Rocío; Vicente, Carlos . Bioactive Compounds from Brazilian Lichens and Their Biotechnological Applications. In: Mallappa Kumara Swamy. (Org.). Plant-derived Bioactives. 000ed.Singapore: Springer Singapore, 2020, v. 000, p. 209-238.
2. Ribeiro, S. M. ; Falcão, E. P. S. ; Pereira, E. C. ; Silva, N. H. ; Gusmão, N. B. ; Honda, N. K. ; Quilhot, W. . Detection of Antibacterial Activity of Lichen Substances through microdilution tests. In: Calvelo, S.; Feuerer, T. (Org.). Lichenology. : Institut Fuer Allgemeine Botanik, 2002, v. , p. 185-194.

II.4- Resumos Simples publicados em anais de eventos

1. Oliveira, I. S. ; Silva Neto, J. L. ; Conceicao, C. M. ; Nunes, A. B. ; Lira, M. A. ; Falcão, E. P. S. Avaliação da Atividade Antimicrobiana dos Extratos de Cladina dendroides. In: Reunião Regional da Federação das Sociedades de Biologia Experimental, 2015, Salvador. Livro de Resumos da Reunião Regional da Federação das Sociedades de Biologia Experimental, 2015. v. 000. p. 000-000.
2. Cavalcanti Filho, J. R. N. ; Cordeiro B. M. P. ; Gomes, N. F. ; Martins, Mônica Barroso ; Silva. T. D. S. ; Silva, C. R. ; Ferreira, A. C. M. ; Melo, E. J. V. ; Sena, E. J. V. ; Falcão, E.P.S. ; Gusmão, N. B. ; Silva, N. H. . Evaluation of the minimum inhibitory concentration (MIC) of the purified divaricatic acid of the lichen *Ramalina aspera* front isolated species of *Enterococcus* SSP. In: XIII Reunião Regional Nordeste da SBBq, 2014, Natal - RN. Livro de resumos da XIII Reunião Regional Nordeste da SBBq, 2014. v. 000. p. 000-000.
3. Cabral, A. S. ; Aguiar Junior, F. C. A. ; Lacerda, S. D. L. ; Tavares C. A. ; Silva. T. D. S. ; Silva, N.H. ; Pereira, E.C. ; Falcão, E.P.S. . Agnor count in erlich carcinoma cells after treatment with organic extract of *Pseudociphalaria aurata*. In: III Congresso Luso-Brasileiro de Patologia Experimental (XIII Simpósio Internacional sobre técnicas experimentais), 2013, Tiradentes. Livro de Resumos do III Congresso Luso-Brasileiro de Patologia Experimental (XIII Simpósio Internacional sobre técnicas experimentais), 2013. v. 000. p. 000-000.
4. Oliveira, J. V. ; Tavares C. A. ; Melo, A. O. ; Silva. T. D. S. ; Santos, N. P. S. ; Falcão, E.P.S. . Developed OH Lipossomes Containing Compound 2-Phenyl - 4 - Amino - 6 - P - phluorophenyl - 5 - carbonitrile - pyrimidine with antitumoral property. In: III Congresso Luso-Brasileiro de Patologia Experimental (XIII Simpósio Internacional sobre técnicas experimentais), 2013, Tiradentes. Livro de Resumos do III Congresso Luso-Brasileiro de Patologia Experimental (XIII Simpósio Internacional sobre técnicas experimentais), 2013. v. 000. p. 000-000.

5. Lira, M. A. ; Rocha, T. A. ; Falcão, E.P.S. . Síntese de composto 4-amino-2-(fenil)-6-(p-metoxi-fenil)-5-carbonitrila pirimidina e avaliação de suas propriedades antimicrobianas. In: 53o Congresso Brasileiro de Química, 2013, Rio de Janeiro. Anais do 53o Congresso Brasileiro de Química, 2013. v. 000. p. 000-000.
6. Gonçalves J. P. ; Cordeiro B. M. P. ; Falcão, E.P.S. . Obtainment and evaluation of the chromatographic profile of organic extracts of *Ramalina aspera* (Lichen). In: ExTech 2013 15th International Symposium on advances in extraction technologies, 2013, João Pessoa. ExTech 2013, 2013. v. 000. p. 000-000.
7. Melo, P. ; Cordeiro B. M. P. ; Falcão, E. P. S. ; Pereira, E. C. ; Silva, N. H. ; Rodrigues, B. R. M. . Atividade antimicrobiana dos extratos brutos após irradiação gama de *Cladonia salzmanii*. In: 35a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2012, Águas de Lindóia. Anais da 35a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2012. v. 000. p. 000-000.
8. Falcão, E.P.S.; Aguiar Junior, F. C. A. ; Santos, N. P. S. . Evaluation of antitumor activity of barbatic acid of *Cladonia salzmanii* in Sarcoma-180 trough histochemical AgNOR method. In: Congresso Luso-Brasileiro de Histopatologia Experimental e no XI International Symposium on Experimental Techniques, 2012, Recife. Anais do Congresso Luso-Brasileiro de Histopatologia Experimental e no XI International Symposium on Experimental Techniques, 2012. v. 000. p. 000-000.
9. Siqueira, R. S. ; Moura, R. M. ; Oliveira, I. S. ; Falcão, E. P. S. . Detection Of Patulin Mycotoxin Using Tlc In Samples Of Banana, Apple And Pear Infected With *Penicillium Sclerotigenum*. In: XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia (XXI ALAM), 2012, Santos. Anais do XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia (XXI ALAM), 2012. v. 000. p. 000.
10. Lira, M. A. ; Rocha, T. A. ; Cordeiro B. M. P. ; Gusmão, N. B. ; Falcão, E. P. S. . Síntese de Novos Heterociclos 4-amino-pirimidínicos-2,6-bissubstituídos e avaliação de suas propriedades antimicrobianas. In: VII Reunião Regional das

- Sociedades de Biologia Experimental - FESBE, 2012, Maceió - AL. Anais da VII Reunião Regional das Sociedades de Biologia Experimental - FESBE, 2012. v. 000. p. 000-000.
11. Silva, M.F.G. ; Carreteiro, M. B. ; Lima, C. O. R. ; Alves, D. S. ; Gomes, A. M. N. L. ; Ferreira, N. R. M. ; Guimarães, M. A. L. ; Silva, L. N. O. S. ; FALCÃO, E. P. S. . Efeito do Percurso do Álcool no Organismo. In: II Encontro Internacional de Pesquisa em Educação Física, 2011, Vitória de Santo Antão - PE. Anais do II Encontro Internacional de Pesquisa em Educação Física, 2011. v. 000. p. 000-000.
 12. Dias, S. A. ; Santos, N. P. S. ; Falcão, E. P. S. ; Freitas, E. M. S. ; Chagas, C. A. . Genotoxic Effect of 4-amino-2-phenyl, 6-(p-fluor-phenyl)-5-carbonitrile-pyrimidine assessed by the comet assay. In: X Congresso da Brasileiro da Sociedade Brasileira de Mutagenese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental (SBMCTA), 2011, São Pedro - SP. Anais do X Congresso da Brasileiro da Sociedade Brasileira de Mutagenese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental (SBMCTA), 2011. v. 000. p. 000-000.
 13. Bezerra, L. B. ; Araujo, A. E. P. ; Falcão, E.P.S. ; Silva, E. F. L. ; De Melo, G. C. ; Silva, G. A. . A Multi-Wavelength Solar Observatory. In: XXXVI Reunião Anual da Sociedade Astronômica Brasileira, 2011, Águas de Lindóia. Anais do XXXVI Reunião Anual da Sociedade Astronômica Brasileira, 2011. v. 000. p. 59-59.
 14. Martins, M. C. B. ; Silva, R. C. S. ; Pereira, E. C. ; Falcão, E. P. S. ; SILVA, N. H. . Potencial inseticida do ácido úsnico de *Cladonia substellata* vainio contra a lagarta predadora do algodão *Alabama argillacea* Hubner.. In: XXIII Congresso Brasileiro de Entomologia, 2010, Natal. Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Entomologia, 2010. v. 000. p. 000-000.
 15. Silva, R. C. S. ; Martins, M. C. B. ; Pereira, E. C. ; Falcão, E. P. S. ; Silva, N. H. . Atividade inseticida do ácido úsnico sobre *Alabama argillacea* Hubner e seu predador *Podisus nigrispinus* Dallas. In: XXIII Congresso Brasileiro de

- entomologia, 2010, Natal - RN. Anais XXIII Congresso Brasileiro de entomologia, 2010. v. 000. p. 000-000.
16. Arruda, A. C. P. ; Martins, M. C. B. ; Guerreiro, I. G. V. ; Cordeiro B. M. P. ; Falcão, E. P. S. ; Gusmão, N. B. ; Pereira, E. C. ; Silva, N. H. . Atividade Sinérgica Entre os Compostos de *Cladonia substellata* e Antibióticos no Combate a Bactérias Patogênicas. In: Quinto Encontro de Grupo Brasileiro de Liquenologia, 2010, Recife. Livro de Resumos 5o GBL, 2010. v. 000. p. 39-39.
 17. Cordeiro B. M. P. ; Falcão, E. P. S. ; Silva, N. H. ; Pereira, E. C. ; Gusmão, N. B. . Avaliação da Atividade Antibacteriana de Extratos Orgânicos e de *Ramalina aspera* (LÍQUEN). In: Quinto Encontro de Grupo Brasileiro de Liquenologia, 2010, Recife. Livro de Resumos 5o GBL, 2010. v. 000. p. 43-43.
 18. Gonçalves J. P.; Falcão, E. P. S. ; Silva, N. H. ; Pereira, E. C. . Avaliação da Atividade Citotóxica de Extratos Orgânicos de *Ramalina aspera* (LÍQUEN). In: Quinto Encontro do Grupo Brasileiro de Liquenologia, 2010, Recife. Livro de Resumos 5o GBL, 2010. v. 000. p. 45-45.
 19. Luna, D. M. N. ; Falcão, E. P. S. ; Melo, S. J. ; Andrade, C. A. S. . Caracterização físico-química de monocamadas Interfaciais mistas compostas por composto 4-amino-2-fenil-6-(p-fluor-fenil)-5-carbonitrila-pirimidina. In: 62 Reunião Anual da SBPC, 2010, Natal. Anais da 62 Reunião Anual da SBPC, 2010. v. 000. p. 000-000.
 20. Luna, D. M. N. ; Falcão, E. P. S. ; Andrade, C. A. S. . Interfacial properties of a novel pyrimidine derivative and poly(ethylene Glycol)-Grafted phospholipid floating monolayers. In: X Reunião Regional Nordeste da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular-SBBq, 2010, Salvador. Anais da X Reunião Regional Nordeste da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular-SBBq, 2010. v. 000. p. 000-000.
 21. Silva, R. C. S. ; Martins, M. C. B. ; Falcão, E. P. S. ; Pereira, E. C. ; Silva, N. H. . Efeito Inseticida do Extrato Orgânico e do Ácido Úsnico Purificado de

- Cladonia susbtellata* Vainio Sobre o Predador *Podisus nigrispinus* (Dallas). In: V Encontro do Grupo Brasileiro de Liquenologia, 2010, Recife. Livro de Resumos do 5 GBL, 2010. v. 000. p. 48-48.
22. Martins, M. C. B. ; Silva, R. C. S. ; Falcão, E. P. S. ; Pereira, E. C. ; Silva, N. H. . Efeito do Ácido Úsnico obtido de *Cladonia substellata* VAINIO sobre a Sobrevivência da Lagarta *Alabama argillacea* (HUBNER) e seu Predador *Podisus nigrispinus* (DALAS). In: V Encontro do Grupo Brasileiro de Liquenologia, 2010, Recife. Livro de Resumos do 5 GBL, 2010. v. 000. p. 50-50.
23. Araujo, A. A. B. ; Martins, M. C. B. ; Falcão, E. P. S. ; Pereira, E. C. ; Silva, N. H. . Produção do Ácido Barbático por *Cladia aggregata* (SW.) NYL em Sistema de Imobilização fixo. In: V Encontro do Grupo Brasileiro de Liquenologia, 2010, Recife. Livro de Resumos do 5 GBL, 2010. v. 000. p. 53-53.
24. Araujo, A. A. B. ; Martins, M. C. B. ; Falcão, E. P. S. ; Pereira, E. C. ; Silva, N. H. . Avaliação do Sistema Fixo de Bioprodução para Síntese do Ácido Barbático por *Cladia aggregata* (SW.) NYL. In: V Encontro do Grupo Brasileiro de Liquenologia, 2010, Recife. Livro de Resumos do V GBL, 2010. v. 000. p. 54-54.
25. Carvalho, A. N. ; Silva, M. I. L. ; Falcão, E. P. S. ; Silva, N. H. ; Pereira, E. C. . Bioprodução de Metabólitos Secundários do Líquen *Cladonia corallifera* (Kunze.) Nyl. Através de Imobilização de Fragmentos do Talo em Sistema de Fluxo Contínuo com Caulinita. In: V Encontro do Grupo Brasileiro de Liquenologia, 2010, Recife. Livro de Resumos do V GBL, 2010. v. 000. p. 54-54.
26. Guerreiro, I. G. V. ; Martins, M. C. B. ; Silva, R. S. ; Falcão, E. P. S. ; Silva, N. H. ; Pereira, E. C. . Eficiência Bioprodutiva de Atranorina nos Fragmentos de Talo de *Heterodermia leucomela*. In: V Encontro do Grupo Brasileiro de Liquenologia, 2010, Recife. Livro de Resumos do V GBL, 2010. v. 000. p. 60-60.

27. Guerreiro, I. G. V. ; Martins, M. C. B. ; Silva, R. S. ; Falcão, E. P. S. ; Silva, N. H. ; Pereira, E. C. . Produção do Ácido Salazínico por Sistemas de Imobilização com Fragmentos do Talo de *Heterodermia leucomela*. In: V Encontro do Grupo Brasileiro de Liquenologia, 2010, Recife. Livro de Resumos do V GBL, 2010. v. 000. p. 62-62.
28. Bezerra, L. B. ; Araujo, A. E. P. ; Silva, E. F. L. ; E.P.S. Falcão ; De Melo, G. C. ; Silva, G. A. . Characterisation of Optical Turbulence Above a Pre-Selected Astronomical Site.. In: XXXV Reunião Anual da Sociedade Astronômica Brasileira, 2010, Passa Quatro. Anais da XXXV Reunião Anual da Sociedade Astronômica Brasileira, 2010, 2010. v. 000. p. 000.
29. Carvalho, A. N. ; Falcão, E. P. S. ; Silva, N. H. ; Pereira, E. C. ; Buril M. L. L. . . Bioprodução de Metabólitos do Líquen *Ramalina aspera* Räsänen por imobilização celular de fragmentos do talo em sistema de fluxo contínuo com caulinita. In: IX Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão da Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2009, Recife. Resumos da IX Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão da Universidade Federal Rural de Pernambuco. 000: 000, 2009. v. 000. p. 000-000.
30. Cavalcanti Neto, M. P. ; Falcão, E. P. S. ; Silva, N. H. ; Pereira, E. C. . Análise dos Metabólitos Secundários de *Cladonia salzmanii* (Líquén) produzidos Através de Imobilização celular em sistema fixo com caulinita.. In: Sétimo Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, 2009, Ribeirão Preto - SP. Anais do Sétimo Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, 2009. v. 000. p. 000-000.
31. Buril M. L. L.; Carvalho, A. N. ; Pereira, E. C. ; Silva, N. H. ; Falcão, E. P. S. . . Bioprodução de Metabólitos de *Ramalina aspera* Räsänen Por Sistema de Imobilização em Movimento sem Caulinita. In: IX Encuentro del Grupo Latinoamericano de Liquenólogos, 2009, Corrientes - Argentina. LIBRO DE RESÚMENES, 2009. v. 0000. p. 65-65.

32. Vasconcelos, T. L. ; Pereira, E. C. ; Silva, N. H. ; Falcão, E. P. S. . Ação do Fósforo em *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. e Sua Influência na Composição Química do Solo de Origem. In: IX Encuentro del Grupo Latinoamericano de Liquenólogos - GLAL9, 2009, Corrientes. LIBRO DE RESÚMENES, 2009. v. 0000. p. 67-67.
33. Vasconcelos, T. L. ; Pereira, E. C. ; Silva, N. H. ; Falcão, E. P. S. . Produção de Substâncias de *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. a Partir da Influência do Fósforo. In: IX Encuentro del Grupo Latinoamericano de Liquenólogos - GLAL9, 2009, Corrientes. LIBRO DE RESÚMENES, 2009. v. 0000. p. 68-68.
34. Martins, M. C. B. ; Silva, R. C. S. ; Neves, R. C. S. ; Falcão, E. P. S. ; Pereira, E. C. ; Silva, N. H. . Ação Inseticida de Extratos Orgânicos e Ácido Úsnico de *Cladonia Substellata* Contra *Tenebrio Molitor*. In: IX Encuentro del Grupo Latinoamericano de Liquenólogos - GLAL9, 2009, Corrientes. LIBRO DE RESÚMENES, 2009. v. 000. p. 69-69
35. Carvalho, A. N. ; Martins, M. C. B. ; Falcão, E. P. S. ; Pereira, E. C. ; Silva, N. H. . Bioprodução de Metabólitos Secundários de *Ramalina aspera* Através de Imobilização Celular em Sistema Fluxo Contínuo sem Caulinita. In: IX Encuentro del Grupo Latinoamericano de Liquenólogos - GLAL9., 2009, Corrientes. LIBRO DE RESÚMENES, 2009. v. 000. p. 71-71.
36. Silva, R. C. S. ; Martins, M. C. B. ; Pontes I. V. A. F. ; Falcão, E. P. S. ; Pereira, E. C. ; Silva, N. H. . Ação de Extratos Orgânicos e Ácido Úsnico Isolado de *Cladonia Substellata* (Líquen) Sobre O Desenvolvimento Embrionário e Pós Embrionário de *Dysdercus Maurus*. In: IX Encuentro del Grupo Latinoamericano de Liquenólogos - GLAL9, 2009, Corrientes. Libro de Resúmens, 2009. v. 000. p. 73-73.
37. Barbosa, H. M. S. ; Pereira, E. C. ; Silva, N. H. ; Falcão, E. P. S. ; Vasconcelos, T. L. . Influência da Uréia No Metabolismo de *Cladonia Substellata* Vainio e Biossíntese do Ácido Úsnico. In: IX Encuentro del Grupo Latinoamericano de

- Liquenólogos - GLAL9., 2009, Corrientes. Libro de Resúmens, 2009. v. 000. p. 74-74.
- 38.** Gonçalves J. P. ; Lima J. R. ; Cordeiro E. Queiroz ; Falcão, E. P. S. ; Andrade, C. A. S. . Bioquímica do Amadurecimento de *Passifloriaceae*. In: IV Simpósio Integrado de Ciências Biológicas e da Saúde do Centro Acadêmico de Vitória, 2009, Vitória de Santo Antão - PE. Livro de Resumos, 2009. v. 000. p. 000-000.
- 39.** Cavalcanti Neto, M. P. ; Andrade, C. A. S. ; Silva, N. H. ; Falcão, E. P. S. . Desenvolvimento de Nanoformulações lipossomais contendo ácido barbático de *Cladonia salzmanii* (liquen). In: IV Simpósio Integrado de Ciências Biológicas e da Saúde do Centro Acadêmico de Vitória - UFPE, 2009, Vitória de Santo Antão - PE. Livro de Resumos, 2009. v. 000. p. 000-000.
- 40.** Cordeiro B. M. P. ; Falcão, E. P. S. . Produção de açúcar por células de *Ramalina aspera* através de imobilização utilizando-se sistema em movimento e caulinita. In: Congresso de Iniciação Científica da UFPE - CONIC, 2009, Recife - PE. Anais do XVII Congresso de Iniciação Científica da UFPE (CONIC), 2009. v. 000. p. 000-000.
- 41.** Carvalho, A. N. ; Rodrigues A. C. G. ; Silva, L. G. M. ; Cavalcanti Neto, M. P. ; Braz, M. B. C. ; Oliveira, T. L. ; Pereira, E. C. ; Silva, N. H. ; Falcão, E. P. S. ; Martins, M. C. B. . Bioprodução de Metabólitos Secundários de *Ramalina aspera* Räsänen através de imobilização celular.. In: Terceira Reunião Brasileira de Estudos Liquenológicos - 3a REBEL, 2008, Mogi-Guaçu. Livro de Resumos da 3a REBEL, 2008. v. 000. p. 34-34.
- 42.** Falcão, E. P. S.; Melo, S. J. ; Souza, I. A. ; Anjos, J. V. . Síntese e avaliação da atividade antitumoral de derivados 4-amino-2,6-diaril-5-carbonitrila pirimidínicos. In: 31ª Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia - SP. Resumos da 31ª RASBQ, 2008. v. 000. p. 000-000.
- 43.** Buril M. L. L. ; CARVALHO, A. N. ; PEREIRA, E. C. ; SILVA, N. H. ; FALCÃO, E. P. S. . Bioprodução de Metabólitos Secundários de *Ramalina*

- aspera* (Líquen) através de imobilização celular em sistema fixo com caulinita.. In: 59o Congresso Nacional de Botânica, 2008, Natal. Anais do 59o Congresso Nacional de Botânica, 2008. v. 000. p. 000-000.
44. D Melo, G. C. ; Araujo, A. E. P. ; Bezerra, L. B. ; Falcão, E. P. S. . Relógio de Sol: O Uso da Astronomia Como Elemento Motivador e Interdisciplinar em Sala de Aula. In: XXXIV Reunião Anual da Sociedade Astronômica Brasileira, 2008, Passa-Quatro - MG. Anais da XXXIV Reunião Anual da Sociedade Astronômica Brasileira, 2008. v. 000. p. 000-000.
45. Bezerra, L. B. ; Falcão, E. P. S. ; Araujo, A. E. P. . Equivalent Width of Selected Balmer Emission. In: XXXIV Reunião da Sociedade Astronômica Brasileira, 2008, Passa Quatro - MG. Anais da XXXIV Reunião da Sociedade Astronômica Brasileira, 2008. v. 000. p. 000-000.
46. Carvalho, A. N. ; Rodrigues A. C. G. ; De Lima, C. R. V. ; Falcão, E. P. S. ; Silva, N. H. ; Pereira, E. C. ; Gusmão, N. B. ; Cavalcanti Neto, M. P. . Atividade antibacteriana de fenóis ativos do líquen *Ramalina aspera*. In: IV Encontro do Grupo Brasileiro de Lichenólogos - GBL, 2008, Curitiba. IV Encontro do Grupo Brasileiro de Lichenólogos - GBL, 2008. v. 000. p. 000-000.
47. Leal, T. V. ; Falcão, E. P. S. ; Melo, S. J. ; De Melo, C. P. ; Andrade, C. A. S. . Avaliação físico-química de filmes monomoleculares de 4-amino-2,6-diaril-5-ciano-pirimidínicos. In: 3º Simpósio Integrado de Ciências da Saúde e Biológicas e 2 Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2008, Vitória de Santo Antão. Anais do III Simpósio integrado de Ciências Biológicas e da Saúde e do II Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão do Centro Acadêmico de Vitória., 2008. v. 000. p. 000-000.
48. Bezerra, L. B. ; Araujo, A. E. P. ; Silva, E. F. L. ; E.P.S. Falcão . On-Sky Testing of the Seeing Behavior to Optimise Flexible Scheduling in Astronomical Observatories.. In: European and National Astronomy Meeting - JENAM 2010, 2008, Lisboa. Proceedings of the 2010 Joint European and National Astronomy Meeting, 2010, 2008. v. 000. p. 000.

- 49.** De Melo, G. C. ; Bezerra, L. B. ; Araujo, A. E. P. ; Falcão, E.P.S. . Relógio de Sol: O Uso da Astronomia como Elemento Motivador e Interdisciplinar em Sala de Aula.. In: XXXIV Reunião Anual da Sociedade Astronômica Brasileira, 2008., 2008, Passa Quatro. Anais da XXXIV Reunião Anual da Sociedade Astronômica Brasileira, 2008. v. 000.
- 50.** Falcão, E. P. S.; Silva L. G. M. ; Santana A. M. B. ; Braz, M. B. C. ; Pereira, E. C.; Silva, N. H. ; Carvalho, A. N. . Avaliação do Perfil Cromatográfico de *Ramalina aspera* Líquen.. In: 2º Simpósio Integrado de Ciências da Saúde e Biológicas do Centro Acadêmico de Vitória - CAV/UFPE, 2007, Vitória de Santo Antão. Resumos do 2º Simpósio Integrado de Ciências da Saúde e Biológicas do Centro Acadêmico de Vitória - CAV/UFPE, 2007. v. 000. p. 000-000.
- 51.** Falcão, E. P. S.; Melo, S. J. ; Srivastava, R. M. ; Anjos, J. V. ; Mendonca Junior, F. J. B. ; Catanho, T. J. A. ; Souza, I. A. . Síntese e avaliação da atividade citotóxica de um derivado 4-amino-2-aril-6-(N-phthalim dofetil)-pirimidínico. In: 1º Simpósio Integrado de Ciências da Saúde e Biológicas., 2006, Vitória de Santo Antão. Resumos do 1º Simpósio Integrado de Ciências da Saúde e Biológicas do CAV., 2006. v. 000. p. 000-000.
- 52.** Falcão, E. P. S.; Neri, D. F. M. ; Melo, S. J. ; Beltrao, E. I. ; Carvalho Jr, L. B.. Quantitative Analysis of Lectin Histochemistry of Experimental Tumors. In: XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica SBBq, 2004, Caxambu. Resumos. Caxambu, 2004. v. 0000. p. 44-44.
- 53.** Falcão, E. P. S.; Mendonca Junior, F. J. B. ; Melo, S. J. ; Anjos, J. V. ; Costa, L. W. D. ; Yamamoto, A. P. . Síntese de Novos Análogos 4-amino-5-Carbonitrila-2,6-Diaril-Pirimidínicos. In: Congresso Latinoamericano de Química, 2004, Salvador-Ba. Livro de Resumos do Congresso Latinoamericano de Química, 2004. v. 000. p. 000-000.

- 54.** Falcão, E. P. S.; Mendonca Junior, F. J. B. ; Anjos, J. V. ; Yamamoto, A. P. ; Costa, L. W. D. . Obtenção de 2,6-diaril-4-(3H)-pirimidinonas. In: Congresso Latinoamericano de Química, 2004, Salvador-Ba. Livro de Resumos do Congresso Latinoamericano de Química, 2004. v. 000. p. 000-000.
- 55.** Falcão, E. P. S.; Araujo, A. E. P. ; Silva, E. F. L. ; Bezerra, L. B. . Automated Alert Response System to Capture Gamma-ray Burst Afterglows In Optical Range. In: Optical and Infared Astronomical Instrumentation for Modern Telescopes, 2003, Angra dos Reis, RJ. Optical and Resumes of Infared Astronomical Instrumentation for Modern Telescopes. Angra dos Reis, 2003. v. 00. p. 000-00.
- 56.** Bezerra, L. B. ; Araujo, A. E. P. ; Silva, E. F. L. ; Melo, W. M. ; Falcão, E. P. S. . Automated Alert Response System to Capture Gamma-ray Burst Afterglows In Optical Range. In: Encontro Anual da Sociedade Astronômica do Brasil, SAB, 2003, Caxambú. Livro de Resumos do Encontro Anual da Sociedade Astronômica do Brasil, SAB. Caxambú, 2003. v. 000. p. 000-000.
- 57.** Bezerra, L. B. ; Araujo, A. E. P. ; Silva, E. F. L. ; Melo, W. M. ; Falcão, E. P. S. Implementação de Observatório Astronômico Automatizado em Sítio Remoto. In: 55 Encontro Anual da SBPC, 2003, Recife/PE. Resumos da 55a Reunião Anual da SBPC, 2003.
- 58.** Costa, L. W. D. ; Falcão, E. P. S. ; Melo, S. J. ; Yamamoto, A. P. ; Mendonca Junior, F. J. B. ; Anjos, J. V. ; Soares Sobrinho, J. L. . Síntese de Derivados 4-Amino-2,6-Diaril-5-Carbonitrila Pirimidínicos. In: 55a. Reunião Anual da SBPC, 2003, Recife-PE. Resumos da 55a. Reunião Anual da SBPC, 2003.
- 59.** Melo, S. J. ; Falcão, E. P. S. ; Mendonca Junior, F. J. B. ; Anjos, J. V. ; Yamamoto, A. P. ; Costa, L. W. D. . Estudo dos Fenômenos de Tautomerismo e Dimerização em Heterociclos do Tipo Pirimidinônicos. In: XXVI Encontro Nacional dos Estudantes de Farmácia, 2003, Cuiabá-MT. Anais do XXVI ENEF, 2003. v. 56. p. 56-56.

- 60.** Neri, D. F. M. ; Guimaraes, M. T. ; Falcão, E. P. S. ; Melo-Junior, M. ; Coelho, L. C. B. B. ; Melo, S. J. ; Carvalho Jr, L. B. ; Beltrao, E. I. . Lectin Binding in Erhlich Carcinoma Treated with Anti-neoplastic Pyrimidinic Analogous. In: XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2003, Caxambú. XXXII Reunião Anual Programa e Resumos, 2003. v. 000. p. 30-30.
- 61.** Falcão, E. P. S.; Mendonca Junior, F. J. B. ; Melo, S. J. ; Souza, I. A. ; Anjos, J. V. ; Costa, L. W. D. ; Yamamoto, A. P. . Síntese e Avaliação da Atividade Antitumoral de Derivados Pirimidínicos 4-amino-2,6-diaril-5-carbonitrila pirimidínicos. In: XLIII Congresso Brasileiro de Química, 2003, Ouro Preto. Livro de Resumos, 2003. v. 000. p. 357-357.
- 62.** Santos, L. C. ; Falcão, E. P. S. ; Melo, S. J. ; Catanho, T. J. A. ; Viana, O. S. . Avaliação Quanto à Atividade Antiinflamatória de Derivados 4-Amino-5-Ciano-2,6-Dissubstituídos Pirimidínicos. In: XI Congresso Brasileiro de Química, 2000, Recife. Anais do XI Congresso Brasileiro de Química, 2000.
- 63.** Falcão, E. P. S.; Santos, L. C. ; Melo, S. J. . Síntese de Novos Derivados 4-Amino-5-Ciano-2,6-Dissubstituídos Pirimidínicos. In: XI Congresso Brasileiro de Química, 2000, Recife. Anais do XI Congresso Brasileiro de Química, 2000.
- 64.** FALCÃO, E. P. S.; SILVA, N. H. ; PEREIRA, E. C. ; GUSMÃO, N. B. . Detecção do princípio Ativo de *Ramalina solediosa* (B. de Lesd) Landron (Líquen) Através de Ensaios Biocromatográficos. In: 50º Congresso Nacional de Botânica, 1999, Blumenau. Anais do 50º Congresso Nacional de Botânica.
- 65.** Falcão, E. P. S.; Silva, N. H. ; Pereira, E. C. ; Ribeiro, S. M. ; Gusmão, N. B. . Identificação dos Princípios Ativos de *Cladonia substellata* Vainio (Líquen) de Diferentes Procedências, através de Métodos biocromatográficos. In: XXII Reunião Nordestina de Botânica, 1999, Maceió. Anais da XXII Reunião Nordestina de Botânica, 1999.

66. Ribeiro, M. A. ; Pereira, E. C. ; Silva, N. H. ; Falcão, E. P. S. ; Gusmão, N. B. ; Honda, N. K. ; Quilhot, W. . Detecção da atividade antibacteriana de substâncias líquênicas através do teste de microdiluição.. In: 4º Encontro Internacional de Liquenólogos., 1999, Bariloche. Anais do 4º Encontro Internacional de Liquenólogos, 1999. v. 000. p. 000-000.

67. Ribeiro, S. M. ; Falcão, E. P. S. ; Pereira, E. C. ; Gusmão, N. B. ; SILVA, N. H. . Determinação dos princípios ativos de *Cladonia substellata*, através de métodos biocromatográficos. In: XXII Reunião Nordestina de Botânica, 1999, Maceió-Al. Anais da XXII Reunião Nordestina de Botânica, 1999. v. 000. p. 000-000.

68. Falcão, E. P. S.; Silva, N. H. ; Gusmão, N. B. ; Pereira, E. C. . Atividade Antibiótica in vitro de Substâncias Líquênicas.. In: XV Simpósio de Plantas Medicinais, 1998, Águas de Lindóia. Anais do XV Simpósio de Plantas Medicinais, 1998.

69. Falcão, E. P. S.; Gusmão, N. B.. Evaluation of Ethnobotanical Information About a Folk Medicine: Use of a Factorial Planning in Determination of Antifungic Activity. In: Symposium Future Trends in Phytochemistry, 1998, Rolduc na Holanda. Symposium Future Trends in Phytochemistry. Rolduc na Holanda, 1998.

70. Falcão, E. P. S.; Ribeiro, S. M. ; Silva, N. H. ; Gusmão, N. B. ; Pereira, E. C. . Influência Ambiental na Produção de Metabólitos Líquênicos Ativos contra Microrganismos Patogênicos. In: XX Reunião Nordestina De Botânica, 1998, REcife. Anais da XX Reunião Nordestina De Botânica, 1998.

71. Ribeiro, S. M. ; Pereira, E. C. ; Silva, N. H. ; Falcão, E. P. S. ; Takaki, G. M. C. ; Gusmão, N. B. . Influência ambiental na produção de metabólitos líquênicos ativos contra microrganismos patogênicos.. In: II Encontro Brasileiro de Liquenólogos., 1998, Campo Grande. Anais do II Encontro Brasileiro de Liquenólogos.. Campo Grande, 1998. v. 000. p. 000-000.

72. Falcão, E. P. S.; Gusmão, N. B. ; Silva, N. H. ; Pereira, E. C. ; RIBEIRO, S. M. .
Atividade Antimicrobiana de *Ramalina solediosa* e *Ramalina complanata*. In:
XXI Reunião Nordestina De Botânica, 1997, Caxias - MA. Anais da XXI
Reunião Nordestina de Botânica, 1997.
73. Falcão, E. P. S.; Gusmão, N. B. ; Pereira, E. C. ; Silva, N. H. . Avaliação do
Grau de Inibição do Crescimento de Amostras de *Candida parapsilosis* em
diferentes Concentrações de Dimetilsulfóxido. In: XIX Congresso Brasileiro de
Microbiologia, 1997, Rio de Janeiro - RJ. Re-collecting Vainio GLAL-3, 1997.
p. 35-35.
74. Falcão, E. P. S.; Pereira, E. C. ; Silva, N. H. ; Gusmão, N. B. ; Takaki, G. M. C. .
Atividade Antimicrobiana de Substâncias Derivadas do Ácido Úsnico. In:
Terceiro Encontro de Lichenólogos da América Latina, 1997, Campos do Jordão
- SP. Anais do Terceiro Encontro de Lichenólogos da América Latina, 1997.
75. Falcão, E. P. S.; Pereira, E. C. ; Silva, N. H. ; Gusmão, N. B. . Detecção do
Princípio ativo de *Ramalina solediosa* e *Heterodermia leucomela*. In: Terceiro
Encontro de Lichenólogos da América Latina, 1997, em Campos do Jordão - SP.
Anais do Terceiro Encontro de Lichenólogos da América Latina, 1997.
76. Falcão, E. P. S.; Silva, N. H. ; Pereira, E. C. ; Takaki, G. M. C. ; GUSMÃO, N.
B. . Suscetibilidade de Espécies de *Candida* a Diferentes Extratos de Líquens.
In: Apresentado no XIV Simpósio de Plantas Medicinais de Brasil, 1996,
Florianópolis - SC. Anais do XIV Simpósio de Plantas Medicinais de Brasil,
1996.

II.5- Resumos expandidos publicados em anais de congressos

1. Xavier, A. L. ; Alexandrino, D. S. ; Falcão, E. P. S. ; Srivastava, R. M. ; Anjos,
J. V. . A green, microwave-mediated, multicomponent synthesis of pyrimidine
and pyrimidinone derivatives. In: 14th Brazilian Meeting on Organic Chemistry-
2011, 2011, Brasília, DF. Anais do 14th Brazilian Meeting on Organic
Chemistry-2011, 2011. v. 000. p. 000-000.

II.6- Trabalhos completos publicados em anais de congressos

1. Correia, W. B. ; Silva, M. A. C. ; Silva, L. M. ; Falcão, Emerson Peter Da Silva ; Helegda, L. C. . Teaching Fighting in Physical Education classes: Theoretical - Metodological aspects. In: 34o Congresso Internacional de Educação Física - FIEP 2019, 2019, Foz do Iguaçu. FIEP Bulletin, 2019. v. 89. p. 66-67.
2. Falcão, E. P. S.; Santos, L. C. ; Melo, S. J. ; Catanho, T. J. A. . Síntese e Avaliação da Atividade Antiinflamatória do 2-(4-Metoxi-Fenil)-6-(4-Flúor-Feil)-4-Amino-5-Cianopirimidina. In: XLII Congresso Brasileiro de Química, 2002, Rio de Janeiro. Anais do XLII Congresso Brasileiro de Química, 2002. p. 355-355.
3. Falcão, E. P. S.; Pereira, E. C. ; Silva, N. H. ; Gusmão, N. B. . Atividade Antimicrobiana de Líquens do Nordeste Brasileiro. In: Terceiro Encontro de Liquenólogos da América Latina, 1997, em Campos do Jordão - SP. Anais do Terceiro Encontro de Liquenólogos da América Latina, 1997.

III – ATIVIDADES DE EXTENSÃO

III.1 Coordenação de Projetos de Extensão

O Centro Acadêmico de Vitória é um campus cujos professores apresentam grande vocação para a atividade extensionista. Ao longo dos últimos anos tenho participado de diversas ações, incluindo-se o Projeto Bioquímica Solidária, sob a coordenação da Profa. Camem Ligia Burgos Ambrósio, além de outros projetos importantes, entretanto, listo apenas os projetos que coordenei, conforme se pode ler a seguir.

O projeto **Karatê-DÔ, uma ferramenta para a formação do caráter**, ocorreu durante os anos de 2012 a 2019, sendo registrado anualmente até o início da pandemia. basicamente se caracterizou por um curso de Karatê, voltado para a comunidade. Com ênfase não apenas ao desporto, mas, também aos fundamentos Zenbudistas e taoístas,

que embasam as artes marciais, mais especificamente o Karatê. Este projeto foi interrompido um ano antes da pandemia. Mas, chegou a formar um faixa marrom, cinco faixas verde e uma roxa, a se saber, um faixa marrom só se forma após o tempo de carência e treinamento adequado o que leva, em média, cerca de três a quatro anos. Acredito que o aprimoramento proporcionado pelas artes marciais, acrescidas do fundamento teórico, é importante no desenvolvimento integral do ser humano. A figura 12 (A e B) apresenta alguns dos estudantes do curso, incluindo o meu professor o *Sensei* Angelo Rafael Peregrino Neves que respaldava nossa ação junto à federação Shotokan de Karatê.



Figura 12- Turmas do Projeto de extensão Karatê – DO, uma ferramenta para a formação do caráter. **A** – um dos exames de graduação e **B** – Após uma aula.

O projeto Jyu Jitsu ocorreu durante dois anos, de 2017 a 2018. Também tinha a mesma conformação. Caracterizava-se por aulas voltadas a estudantes da comunidade e alunos do CAV, que praticam aquela arte marcial. Entretanto, neste caso, não ministrava aulas, mas, dava suporte e acompanhamento aos treinamentos. Esta parte da ação era realizada por estudantes graduados em Jyu Jitsu.

O projeto CAVEST é de longe a ação contínua mais longa da qual participo e uma das ações de extensão mais longevas do CAV. Também devo dizer que é de uma importância social ímpar para muitos estudantes carentes que buscam apoio acadêmico para preparação adequada com vistas ao ingresso em universidades públicas.

Foi proposto originalmente em 2007, pelo Prof. César Augusto de Souza Andrade, colega de longa data e também amigo de antes do nosso ingresso na carreira Docente. Em suas primeiras edições fui um colaborador. A partir de 2012 passei a coordenar a

ação. Embora o coordene, certamente, por sua natureza peculiar a palavra participar é a que mais se adequa. Tentarei explicar melhor.

O projeto se caracteriza por oferecer a comunidade aulas preparatórias para os Vestibulares, originalmente, e atualmente para o ENEM. Estas aulas são ministradas por graduandos dos cursos de licenciatura e bacharelado de nossa universidade, ou de outras Instituições, além de voluntários, graduados ou graduandos, muitas vezes egressos do próprio CAVEST.

Ao longo dos anos tem se proposto a atuar com objetivos de criar um ambiente de “treinamento” para estudantes dos cursos de licenciatura da UFPE e, como dito acima, preparação de estudantes da rede pública para o ENEM. Mas, é inegável a função social do projeto, ao apoiar a entrada de estudantes das redes públicas, notadamente estudantes carentes em seu processo de “passagem” pelo ENEM e ingresso em universidades.

O projeto, ao longo dos anos tem se adaptado à realidade da comunidade atendida que efetivamente necessita de grande apoio não apenas em sua preparação para uma avaliação, mas também, uma formação mais humana e completa. Esta percepção fez com que fosse proposto um calendário anual de atividades que inclui, além de aulas regulares e encontros adicionais, como os madrugadões e simulados, também semanas multiculturais, feira de livros, piquenique junino dentre outros. Todos criados pelos estudantes/professores, atendendo às demandas da comunidade atendida, com o intuito de fazer mais que apenas preparar estudantes para um processo de avaliação.

Ao longo dos últimos anos foram realizadas também avaliações e acompanhamentos de nossos alunos que utilizam-se do CAVEST. Muitos foram aprovados em IES públicas nos mais diversos cursos, como Direito, História, Enfermagem, Ciências Biológicas, Medicina entre outros.

A figura 13 mostra a comemoração das aprovações do ano de 2020.



Figura 13- Turmas do Projeto CAVEST, turma 2020. **A-** Equipe docente e **B** - estudantes comemorando aprovação.

Abaixo listo as edições do CAVEST e outros projetos que coordenei.

1. CAVEST – Um passo Rumo à Universidade2012;
2. CAVEST – Um passo Rumo à Universidade2013;
3. CAVEST – Um passo Rumo à Universidade2014;
4. CAVEST – Um passo Rumo à Universidade2015;

5. Karatê-DÔ, uma ferramenta para a formação humana – 2015
6. CAVEST – Um passo Rumo à Universidade 2016;
7. Karatê-DÔ, uma ferramenta para a formação humana – 2017
8. CAVEST – Um passo Rumo à Universidade 2017;
9. Jyu Jitsu para a Comunidade – 2017;
10. CAVEST – Um passo Rumo à Universidade – 2018;
11. CAVEST – Um passo Rumo à Universidade – 2019;
12. CAVEST – Um passo Rumo à Universidade – 2020;
13. CAVEST – Um passo Rumo à Universidade – 2021;
14. CAVEST – Um passo Rumo à Universidade – 2022 (em execução);
15. CAVEST – Um passo Rumo à Universidade – 2022 (Aprovado com recursos, Edital Pibexc, 2022, em execução);

III.2 Participação e Organização de Eventos

1. Falcão, E. P. S.; Garcia, J. E. ; Francelino, M. C. ; Ferraz, J. C. S. ; Santos, A. M. M. . V Simpósio Integrado de Ciências Biológicas e da Saúde do Centro Acadêmico de Vitória/ Reunião Regional da SBPC. 2010. (Congresso).
2. Falcão, E. P. S.; Ferraz, J. C. S. ; Santos, A. M. M. ; Francelino, M. C. ; Garcia, J. E. . IV Simpósio Integrado de Ciências Biológicas e da Saúde do Centro Acadêmico de Vitória. 2009. (Congresso).

3. Falcão, E. P. S.; Andrade, C. A. S. ; Santos, A. M. M. ; Santiago, A. C. P. ; Magalhaes, C. P. ; Gomes, E. C. S. ; Oliveira, I. S. ; Ferraz, J. C. S. ; Freitas, E. M. S. ; Cruz, R. R. G. C. . III Simpósio integrado de Ciências Biológicas e da Saúde do Centro Acadêmico de Vitória. 2008. (Congresso).
4. Andrade, C. A. S. ; Falcão, E. P. S. ; Campos F., A., S. . II Simpósio Integrado de Ciências da Saúde e Biológicas do Centro Acadêmico de Vitória. 2007. (Congresso).
5. Andrade, C. A. S. ; Falcão, E. P. S. . I Simpósio Integrado de Ciências da Saúde e Biológicas do Centro Acadêmico de Vitória. 2006. (Outro).

IV- COORDENAÇÃO DE PROJETOS DE PESQUISA, ENSINO OU EXTENSÃO E LIDERANÇA DE GRUPOS DE PESQUISA

Ao longo dos anos tenho tido a oportunidade de colocar em ação algumas ideias de pesquisa científica e também de participar da realização das ideias de outros colegas. Tem sido um processo de descoberta intenso e extremamente interessante. A seguir cito e descrevo, em linhas gerais, alguns dos projetos que coordenei.

IV.1 Coordenação de Projetos de Pesquisa

1- 2014 - Síntese e avaliação da atividade mutagênica e genotóxica de compostos 4-amino-pirimidínicos-2,6-bissubstituídos

Descrição: Os heterocíclis pirimidínicos são amplamente conhecidos por suas propriedades biológicas, citando-se atividade antiinflamatória, citotóxica, antimicrobiana, antineoplásica, entre outras. Este projeto objetiva estudar efeitos de compostos 4-amino-2,6-bissubstituídos-5-carbonitrila-pirimidínicos sobre o material genético de *Drosophila melanogaster in vivo* e *in vitro*.

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico: (1).

2. 2014 - Síntese e avaliação da atividade mutagênica e genotóxica de compostos 4-amino-pirimidínicos-2,6-bissubstituídos

Descrição: Os heterocíclis pirimidínicos são amplamente conhecidos por suas propriedades biológicas, citando-se atividade antiinflamatória, citotóxica, antimicrobiana, antineoplásica, entre outras. Este projeto objetiva estudar efeitos de compostos 4-amino-2,6-bissubstituídos-5-carbonitrila-pirimidínicos sobre o material genético de *Drosophila melanogaster in vivo e in vitro*.

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico: (1).

3- 2009 - Avaliação da composição de metabólitos secundários liquênicos e avaliação de seu potencial antimicrobiano e farmacológico

Descrição: Avaliação da composição fenólica e isolamento de compostos bioativos liquênicos utilizando-se técnicas cromatográficas, CCD e CLAE. Avaliação de potencial antimicrobiano e farmacológico de compostos isolados e extratos orgânicos..

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (1) / Mestrado acadêmico: (1) .

IV.2- Liderança e Vice-Liderança de Grupos de Pesquisa

1- Grupo de Pesquisa em Produtos Naturais Bioativos e Novos Fármacos, Lider.

V- EXERCÍCIO DE CARGOS NA ADMINISTRAÇÃO CENTRAL E/OU COLEGIADOS CENTRAIS E/OU DE CHEFIA DE UNIDADES/SETORES E/OU DE REPRESENTAÇÃO

Lecionar em uma instituição nova, ou melhor, em um novo campus, dá a oportunidade de se participar intensamente do processo de gestão. A seguir listo minha passagem por Colegiados de cursos de graduação e pós-graduação, além da participação em câmaras de gestão institucionais. Ambientes que me trouxeram uma visão bastante ampla da Universidade e do ensino superior.

V.1 Membro de Colegiados de Cursos de Graduação

Membro do Colegiado do Curso de Enfermagem de 2006 a 2007

V.2 Membro de Colegiados e de Conselhos de Cursos de Pós-Graduação

1- Membro do Colegiado do Curso de Saúde Humana e Meio Ambiente – 2017

2- Membro do Colegiado do programa de Pós-Graduação Profissional em ensino de Biologia – PROFBIO

V.3- Coordenação e Vice Coordenação de Cursos de Pós-Graduação

- Vice coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, 2014-2015;
- Coordenador do Programa de Saúde Humana e Meio Ambiente, 2016-2018.

V.4- Representações

- Representante TITULAR do Conselho Coordenador de Ensino Pesquisa e Extensão (CCEPE) e do Conselho Superior da Universidade Federal de Pernambuco, 2021 até a presente data;
- Representante Titular do CAV no Conselho Universitário da Universidade Federal de Pernambuco, 2021 a presente data.

V.5.1- Coordenação Setorial de Extensão.

- Vice Coordenador do Núcleo de Pesquisa e Extensão (Setorial de Extensão) de 2006 a 2008
- Coordenador do Núcleo de Pesquisa e Extensão (Setorial de Extensão) de 2009 a 2012.
- Vice- coordenador setorial de extensão, 2021 até a presente data.

VI.- PARTICIPAÇÃO EM BANCAS DE CONCURSOS, DE MESTRADO E DE DOUTORADO

VI.1 Participação em Bancas de Concursos

1. Falcão, E. P. S.; Lima, M. C. A.; Andrade, C. A. S.. Concurso Público para o cargo de Professor Adjunto em Bioquímica pela Universidade Estadual da Paraíba. 2007. Universidade Estadual da Paraíba.
2. Falcão, E. P. S.. Processo Seletivo Simplificado para preenchimento de vaga para o cargo de Professor Substituto - Área: Bioquímica da Nutrição. 2008. Universidade Federal de Pernambuco.
3. Falcão, E. P. S.. Processo Seletivo simplificado para Professor Substituto. 2008. Universidade Federal de Pernambuco.
4. Falcão, E. P. S.; Leandro, C. V. G.; Silveira L.. Concurso Público para professor Adjunto área Bioquímica - sub-área Bioquímica do Exercício Físico. 2010. Universidade Federal de Pernambuco.
5. De Faro, Z. P.; BRITO, M.; Falcão, E. P. S.. Seleção Pública Simplificada para Professor Temporário - Área Judô, 2011. Centro Acadêmico de Vitória.
6. Campos F., A., S.; Falcão, E.P.S.; Filho, A. G.. Seleção Simplificada para Professor Temporário - Bioquímica. 2013. Centro Acadêmico de Vitória.

7. Falcão, E.P.S.; Almeida, M. B.; Araújo, G.. Banca de seleção para professor efetivo do Curso de Ed. Física sub-área Judô. 2013. Centro Acadêmico de Vitória.
8. Falcão, E. P. S.. Seleção Pública Simplificada para Prof. Substituto - Núcleo de Saúde Coletiva, área: Administração e Gestão. 2016. Centro Acadêmico de Vitória.

VI.2 Participação em Bancas de Mestrado

1. Pereira, E. C.; Castilho, C. J. M.; Falcão, E. P. S.. Participação em banca de Andreia Luiza Alves. Identificação de Impactos Ambientais no curso inferior do Rio Pratagy - Al: Imediações do parque residencial Benedito Bentes. 2004. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) - Universidade Federal de Pernambuco.
2. Pereira, E. C.; Araujo, M. S. B.; Gehlen, V. R. F.; Falcão, E. P. S.. Participação em banca de Valéria Brito Silva. Diagnóstico da Desertificação no município de Imbimirim - PE. 2006. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) - Universidade Federal de Pernambuco.
3. Pereira, E. C.; Silva, V. B.; Falcão, E. P. S.. Participação em banca de Valéria Brito Silva. Diagnóstico da Desertificação no Município de Imbimirim ? PE. 2006. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) - Universidade Federal de Pernambuco.
4. Coelho, L. C. B. B.; Silva, M. P. C.; Falcão, E. P. S.. Participação em banca de Alba Tatiana Serafim do Nascimento. Bioprodução de Metabólitos de Canoparmelia texana (Tuck) Elix & Hale a partir de Imobilização Celular.. 2007. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia) - Universidade Federal de Pernambuco.

5. Correia, M. T. S.; Ximenes, E. C. P. A.; Falcão, E. P. S.; Silva, N. H.. Participação em banca de Maria Catarina Gomes Gadêlha de Moura. Atividade Antimicrobiana de compostos de *Canoparmelia texana* (Liquen). 2008. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia) - Universidade Federal de Pernambuco.
6. Falcão, E. P. S.; Pereira, E. C.. Participação em banca de Talitha Lucena de Vasconcelos. Influência do Fósforo na Produção de Substâncias transformadoras do Solo sob *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. 2009 - Universidade Federal de Pernambuco.
7. De Lima, C. R. V.; Falcão, E. P. S.; Coelho, L. C. B. B.; Silva, N. H.. Participação em banca de Cinthia Renata Vieira de Lima. Produção de Metabólitos Bioativos de *Pseudocyphellaria aurata* (ACH.) Vainio por imobilização de fragmentos do talo.. 2009. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal de Pernambuco.
8. Coelho, L. C. B. B.; Falcão, E. P. S.; Lima, V. L. M.; Silva, C. A.. Participação em banca de Tiago Gomes Araújo. Efeitos Metabólicos in vivo de Derivados Benzilideno-Tiazolidinadionas. 2009. Dissertação (Mestrado em Pós - Graduação em Bioquímica e Fisiologia) - Universidade Federal de Pernambuco.
9. Andrade, C. A. S.; Santos-Magalhães S. N.; Santos, N. P. S.; Falcão, E. P. S.. Participação em banca de Jadilson Medeiros do Nascimento Filho. Avaliação Termodinâmica de filmes mistos compostos por trans-desidrocrotonina e fosfolipídeos.. 2010. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) - Universidade Federal de Pernambuco.
10. Pereira, A. K. V.; Aguiar Junior, F. C. A.; Lira, M. C. B.; Falcão, E. P. S.. Participação em banca de Ana Karina Vidal Pereira. Preparação e Caracterização de Lipossomas contendo o anestésico Tetracaína. 2012. Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) - Universidade Federal de Pernambuco.

11. Campos, T. A.; Lira, M. C. B.; Santos, N. P. S.; Falcão, E. P. S.. Participação em banca de Thiers Araújo Campos. Complexos de Inclusão Ácido Fumarprotocetrárico:2-Hidroxipropil-Beta-Ciclodextrina: Preparação, caracterização e encapsulação em lipossomas. 2012. Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) - Universidade Federal de Pernambuco.
12. Catanho, T. J. A.; Silva, N. H.; Falcão, E. P. S.. Participação em banca de Mosar Lopes da Silva. Uso do Ácido Barbático de *Cladonia salzmanii* Nyl (liquen) no tratamento de feridas cutâneas em ratos Wistar. 2012. Dissertação (Mestrado em Pós - Graduação em Bioquímica e Fisiologia) - Universidade Federal de Pernambuco.
13. Florêncio, S. G. L.; Falcão, E. P. S.; Silva, C. G. M.; Lima, C. E. P.. Participação em banca de Sloana Giesta Lemos Florêncio. Influência da Radiação Gama sobre *Aspergillus*, teor de fenólicos e atividade antioxidante do chá verde. 2012. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Energéticas e Nucleares) - Universidade Federal de Pernambuco.
14. Lira, M. C. B.; Falcão, E. P. S.. Participação em banca de Soraia Lins de Arruda. Avaliação da ação cicatrizante de extratos orgânicos do muco produzido pelo Zoantídeo *Palythoa caribaeorum*. 2013. Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) - Universidade Federal de Pernambuco.
15. Melo, S. J.; Araujo, J. M.; Falcão, E.P.S.. Participação em banca de Grace Kelly Cordeiro da Silva. Caracterização Química e Biológica da *Senna alata* L. Roxb e *Senna simea* (Lam.) H. S. Irwin & Barneby. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco.
16. Lima, V. L. M.; Lima, L.; Falcão, E.P.S.. Participação em banca de Bruna Maria Pereira da Costa Ribeiro. Avaliação da Ação Sinérgica de ácido Divaricático e extrato etéreo de *Ramalina aspera* (ränsänen) frente a microrganismos multiresistentes.. 2014. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia) - Universidade Federal de Pernambuco.

17. Falcão, E.P.S.; Finkler C. L. L.. Participação em banca de Roberto Siqueira dos Santos. Contaminação de Banana, Maçã, Pera e Inhame com a micotoxina Patulina produzida por *Penicillium sclerotigenum*. 2014. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia) - Universidade Federal de Pernambuco.
18. Falcão, E. P. S.. Participação em banca de Ana Paula Vieira de Melo. "Educação Alimentar e nutricional: Relato de experiência em uma escola da rede pública estadual de ensino do município de Vitória de Santo Antão. 2015. Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) - Universidade Federal de Pernambuco.
19. Falcão, E. P. S.. Participação em banca de Sandra Cabral de Silva. Caracterização farmacológica pré-clínica da atividade anti-inflamatória de novos derivados N-acilhidrazonicos. 2015. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) - Universidade Federal de Pernambuco.
20. Coelho, L. C. B. B.; Falcão, E. P. S.; Lima, V. L. M.. Participação em banca de José Guedes da Silva Júnior. Estudo do potencial antitumoral de derivados químicos de ftalimidas glicoconjugadas. 2015. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia) - Universidade Federal de Pernambuco.
21. Falcão, E. P. S.; Ribeiro, M. A.. Participação em banca de Renata Soares de Lima. Adesão à Merenda escolar por alunos das escolas da rede pública estadual de ensino do município de Vitória de Santo Antão. 2015. Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) - Universidade Federal de Pernambuco.
22. Sttanford, T.; Falcão, E.P.S.. Participação em banca de Pricilla Gregório de Oliveira. Bioatividade de Quitosana como cobertura comestível de queijo de coalho na inibição de *Listeria monocytogenes*. 2015. Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) - Universidade Federal de Pernambuco.
23. Falcão, E. P. S.; Silva, R. A.; Salviano, T. L.. Participação em banca de Marllyn Marques da Silva. Atividades Biológicas e perfil Proteômico do muco produzido

- pelo zooantídeo *Palithoa caribaeorum*. 2016. Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) - Universidade Federal de Pernambuco.
24. Falcão, E. P. S.; Jorge, R. J. B.; Renh, V. N. C.. Participação em banca de Igor Cavalcanti Ferraz. Estudo de Atividades Farmacológicas do Óleo Essencial de *Eugenia brejoensis* Mazine. 2016. Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) - Universidade Federal de Pernambuco.
25. Falcão, E. P. S.; Silva, P. C. V.; Renh, V. N. C.. Participação em banca de Claudinelly Yara Braz dos Santos. Esquistossomose mansoni na zona da mata de Pernambuco: Fatores socioambientais, educação ambiental e em saúde.. 2017. Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) - Universidade Federal de Pernambuco.
26. Santos F. M. S.; Houllou, L. M.; Falcão, E. P. S.. Participação em banca de Patrícia Virgínia Padilha Dantas. Prospecção Biotecnológica de fungos endofíticos de bambu micropropagado na produção de enzimas e atividade antimicrobiana. 2017. Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) - Universidade Federal de Pernambuco.
27. Freitas, E. M. S.; Magnata, S. S. L. P.; Falcão, E. P. S.. Participação em banca de Mariana Vasconcelos de Paula Souza. Projetos Científicos no ensino médio: Uma ferramenta para a aprendizagem de Bioquímica. 2018. Dissertação (Mestrado em PROFBIO) - Universidade Federal de Minas Gerais.
28. Cavalcanti, I. M. F.; Arruda, S. G. B.; Flacão, Emerson Peter S.. Participação em banca de Rosélia Odete Justino da Silva. CAracterização Fenotípica de Resistência Antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* spp. e Termotolerantes isolados de queijos de coalho. 2018. Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) - Universidade Federal de Pernambuco.
29. Falcão, E. P. S.; Lira, M. C. B.; Finkler, L.. Participação em banca de Aralí da Costa Gomes. Extração e Microencapsulação de Bixina por liofilização. 2019.

Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) - Universidade Federal de Pernambuco.

30. Emerson Peter S. Falcão; Garcia, J. E.; Maia, R. T.. Participação em banca de José Alexandre Batista de Freitas. A Gamificação aliada ao uso das tecnologias móveis (smartphone e tablets) e o QR code como estratégia facilitadora de aprendizagem dos conteúdos de genética. 2019. Dissertação (Mestrado em PROFBIO) - Universidade Federal de Pernambuco.
31. Falcão, E.P.S.; Garcia, J. E.; Vercosa, C. J.. Participação em Banca de Gabriel Soares Pereira. A Composição Musical como Ferramenta Didático-Pedagógica Para o Ensino de Genética na Educação Básica. 2020. Dissertação (Mestrado em PROFBIO) - Universidade Federal de Pernambuco.

VI.3- Participação em Bancas de Doutorado.

1. Chagas, C. A.; Aguiar Junior, F. C. A.; Falcão, E.P.S.; Vanusa, M.; Correia, M. T. S.. Participação em banca de Tamiris Alves Rocha. Isolamento, purificação e caracterização de metabólitos secundários de *Ptyrocarpa moniliformes* e avaliação de seu potencial biológico. 2019. Tese (Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco.
2. Silva, N. H.; Napoleão, Thiago Henrique; E.P.S. Falcão. Participação em banca de Alexsandra Nascimento de Carvalho. Potencial Biológico do ácido úsnico no controle da esquistossomose. 2019. Tese (Doutorado em Bioquímica e Fisiologia) - Universidade Federal de Pernambuco.
3. Ximenes, Rafael Matos; Falcão, E. P. S.; Aguiar, J. S.; Chagas, C. A.; Nascimento, M. S.. Participação em banca de Érika Maria de Amorim. Avaliação do efeito genotóxico, mutagênico e teratogênico das plantas medicinais *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardeaceae) e *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. & Shult.) T. D. Penn. (Sapotaceae). 2018. Tese (Doutorado em Programa de Pós graduação em Biotecnologia - PPG - Renorbio) - Universidade Federal de Pernambuco.

4. Silva, E. B.; Villavicencio, A. L. C. H.; Lopes, C. F. J. A.; Silva Filha, M. H. N. L.; Falcão, E. P. S.. Participação em banca de Sloana Giesta Lemos Florêncio. Potencial do uso de machos esterelizados por radiação gama (^{60}Co) para o controle populacional de *Aedes Aegypti* (Diptera - culicidae): Um caminho biotecnológico do laboratório para o campo.. 2017. Tese (Doutorado em Tecnologias Energéticas e Nucleares) - Universidade Federal de Pernambuco.
5. Melo, S. J.; Falcão, E. P. S.; Lima, G. M. S.; Santos-Magalhães S. N.; Faria, A. R.. Participação em banca de Zenaide Severina do Monte. Pirimidinas: de potenciais fármacos a marcadores fluorescentes. 2016. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco.
6. Ramalho, H. M. M.; Oliveira, J. S.; Dimenstein, R.; Campos F., A., S.; Falcão, E. P. S.. Participação em banca de Danielle Soares Bezerra. Efeito da Suplementação materna com megadose de vitamina A, administrada em diferentes intervalos, nas concentrações de retinol no leite materno.. 2015. Tese (Doutorado em Nutrição) - Universidade Federal de Pernambuco.
7. Pereira, E. C.; Andrade, L. H. C.; Santos, N. D.; Pontual, E. V.; Falcão, E.P.S.. Participação em banca de Bruno Rafael Monteiro Rodrigues. Efeito do Nitrogênio e do Fósforo no Metabolismo de Três Espécies de *Cladonia*. 2014. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal de Pernambuco.
8. Barbosa, H. M. S.; Filho, F. O. M.; Torres, M. F. A.; Mariano, G.; Silva, H. P. B.; Falcão, E. P. S.. Participação em banca de Hérিকা Maria da Silva Barbosa. Intemperismo Biogeoquímico e ciclagem de nitrogênio pela interação do líquen *Cladonia substellata* Vainio com granito e basalto. 2014. Tese (Doutorado em Geografia) - Universidade Federal de Pernambuco.
9. Melo, S. J.; Nascimento, S. C.; Stanford, T. L. M.; Lemos, T. L. G.; Falcão, E.P.S.. Participação em banca de Janaína Gonçalves da Silva Melo. Caracterização Química e Avaliação da Atividade Biológica dos metabólitos de actinobactéria endofítica isolada de *Momordica charantia* L.. 2013. Tese

(Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco.

10. Silva, N. H.; Lima, V. L. M.; Falcão, E. P. S.; Amancio, F. F.. Participação em banca de Mônica Cristina Barroso Martins. Aplicações Biotecnológicas de compostos obtidos dos líquens.. 2012. Tese (Doutorado em Bioquímica e Fisiologia) - Universidade Federal de Pernambuco.
11. Colaço, W.; Falcão, E. P. S.; Amancio, F. F.; Araujo, E. S.; Tabosa, J. N.. Participação em banca de Helena Paula de Barros Silva. Efeitos das radiações gama e ultravioleta sobre *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. (líquen) coletado em diferentes ambientes. 2011. Tese (Doutorado em Tecnologias Energéticas e Nucleares) - Universidade Federal de Pernambuco.

VI.4- Participação em Bancas de Conclusão de Curso de Graduação

1. Silva, N. H.; Cavalcanti, M. S. M.; Falcão, E. P. S.. Participação em banca de Fernanda Magalhães Amaral. Modificação e Aperfeiçoamento de técnicas para bioprodução de fenóis produzidos por *Cladonia verticillaris* (Líquen). 2006. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade de Pernambuco.
2. Silva, N. H.; Pereira, E. C.; Falcão, E. P. S.. Participação em banca de Giselle Lauritzen Duarte. Modificação e Aperfeiçoamento de Técnicas de Bioprodução de fenóis produzidos por *Cladonia verticillaris*. 2006. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco.
3. Moraes, F. C.; Almeida, M. B.; Falcão, E. P. S.. Participação em banca de Dayvson José de Lima. Karatê-do como um mecanismo de contenção da agressividade dos estudantes. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Licenciatura em Educação Física) - Centro Acadêmico de Vitória.

4. Amaral, F. M.; Falcão, E. P. S.. Participação em banca de Fernanda Magalhães Amaral. A Lavanderia do Hospital das Clínicas sob o olhar da Biossegurança. 2006. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biomédicas) - Universidade Federal de Pernambuco.
5. Buril M. L. L.; Falcão, E. P. S.; Silva, N. H.; Martins, M. C. B.; Pereira, E. C.. Participação em banca de Maria de Lourdes Lacerda Buril. Bioprodução de metabólitos do líquen *Ramalina aspera* Räsänen por imobilização de fragmentos do talo.. 2008. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco.
6. Melo, S. J.; Araujo, J. M.; Falcão, E. P. S.. Participação em banca de Jônatas Barbosa Xavier. Rubiaceae: breve revisão bibliográfica, composição química e atividades farmacológicas.. 2008. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biomédicas) - Universidade Federal de Pernambuco.
7. Falcão, E. P. S.; Melo, S. J.; Nascimento, S. C.. Participação em banca de Ana Caroline dos Santos Barreto. Síntese e Avaliação da Atividade Antimicrobiana de 5-cianopirimidinona. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biomédicas) - Universidade Federal de Pernambuco
8. Melo, S. J.; Falcão, E. P. S.. Participação em banca de Ana Caroline dos Santos Barreto. Atividade Antimicrobiana de 5-Cianopirimidinona. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biomédicas) - Universidade Federal de Pernambuco.
9. Carvalho, A. N.; Falcão, E. P. S.. Participação em banca de Alexsandra Nascimento de Carvalho. Bioprodução de Metabólitos do líquen *Cladonia corallifera* (Kunze) Nyl. 2010. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco.
10. Falcão, E. P. S.; Martins, M. C. B.; Silva, N. H.. Participação em banca de Rayane Cristine Santos da Silva. Efeito do ácido úsnico de *Cladonia substellata* Vainio sobre o desenvolvimento pós-embrionário do *Podisus nigrispinus*

- (dallas) (*Heteroptera: Pentatomidae*). 2010. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco.
- 11.** Araujo, A. A. B.; Falcão, E. P. S.; Santos, N. P. S.; Silva, N. H.. Participação em banca de Ana Aline Batista de Araújo. Obtenção de ácido barbático por diferentes sistemas de imobilização de *Cladia aggregata* (Sw.). 2010. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco.
- 12.** Falcão, E. P. S.; Santos, N. P. S.; Finkler C. L. L.. Participação em banca de Marinaldo Pacífico Cavalcanti Neto. Avaliação da atividade antineoplásica *in vivo* de ácido barbático de *Cladonia salzmanii* (Nyl.) e formulação de nanoestruturas lipossomais. 2010. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Enfermagem) - Universidade Federal de Pernambuco.
- 13.** Silva, B. M.; Silva, N. H.; Martins, M. C. B.; Falcão, E. P. S.. Participação em banca de Bruna Mazulo da Silva. Atividade Citotóxica e Hemolítica do Extrato Etéreo e Ácido Barbático Purificado de *Cladonia salzmanii* Nyl.. 2010. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biomédicas) - Universidade Federal de Pernambuco.
- 14.** Santos, N. P. S.; Falcão, E. P. S.. Participação em banca de Tamiris Alves Rocha. Síntese de novos heterocíclis 4-amino-pirimidínicos-2,6-bissubstituídos e avaliação de suas propriedades citotóxicas.. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas) - Centro Acadêmico de Vitória.
- 15.** Anjos, J. V.; Falcão, E. P. S.. Participação em banca de Ivângela Elizabete Alves da Silva. 2-Amino-6-amil-4-(3H)-Pirimidinonas: Síntese Multicomponente e Avaliação da Atividade antimicrobiana.. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Bacharelado em Química) - Universidade Federal de Pernambuco.

16. Falcão, E.P.S.; Pires, E. H.. Participação em banca de André Severino da Silva. Ausência de Atividade Mutagênica e Recombinogênica de Compostos Pirimidínicos com Propriedades Anti-inflamatórias em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. 2013.
17. Falcão, E.P.S.; Aciole, E. H. P.. Participação em banca de André Severino da Silva. Avaliação da Atividade Mutagênica e Recombinogênica de Compostos Pirimidínicos em Células Somáticas de *Drosophila melanogaster*. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas) - Centro Acadêmico de Vitória.
18. Falcão, E.P.S.; Martins, M. C. B.; Santos, N. P. S.. Participação em banca de Joelma Pessoa Gonçalves. Avaliação da Atividade Citotóxica de Extratos orgânicos e ácido divaricático purificado de *Ramalina aspera* (liquen). 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco.
19. Falcão, E. P. S.; Chagas, C. A.; Oliveira, I. S.. Participação em banca de Amanda de Brito Nunes. Avaliação da atividade antibacteriana do liquen *Ramalina usnea* L. frente a oito bactérias.. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas) - Centro Acadêmico de Vitória.
20. Santos, J. A.; Santos, F. X.; Falcão, E. P. S.. Participação em banca de Camila Melo Alves de Lima. Qualidade de Vida Relacionada a Praticantes de Karatê-Dô. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Educação Física Bacharelado) - Centro Acadêmico de Vitória.
21. Oliveira, G. F.; Falcão, E. P. S.; Rohde, C.. Participação em banca de Samuel Lima de Santana. O Ensaio Cometa em *Drosophila melanogaster* como bioindicador da poluição atmosférica em uma área urbana e rural. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas) - Centro Acadêmico de Vitória.

22. Chagas, C. A.; Rocha, T. A.; Falcão, E. P. S.. Participação em banca de Cristiane Maria da Conceição. Estudo sobre a atividade citotóxica de *Ramalina usnea* Liqueen.. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas) - Centro Acadêmico de Vitória.
23. Falcão, E.P.S.; Ribeiro, E. N.; Lira, M. M. R.. Participação em banca de Victória Beatriz Gomes da Silva. Propostas de mapas mentais como instrumento de aprendizagem para o Ensino Médio. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco.

VII- REPERCUSSÃO OU IMPACTO DA PRODUÇÃO ACADÊMICA DO DOCENTE

Certamente o maior produto da atividade de um docente são seus estudantes, que, de fato, são numerosos ao longo de sua carreira, a contar cerca de 100 por semestre, após alguns anos este número pode se transformar em algumas dezenas de milhares. No entanto, este fator é de difícil mensuração. Já o impacto de sua produção científica pode ser avaliado utilizando-se índices. Que, certamente podem aumentar ao longo do tempo.

Minha produção acadêmica é modesta. Ao longo dos últimos anos foram publicados 41 artigos científicos. Em sua grande maioria nas áreas de Química de produtos naturais, Síntese orgânica e Química Medicinal.

Na plataforma Google Acadêmico Existem registrados 20 destes trabalhos, com 510 citações. O índice H = 13 e i10=16. Na plataforma Scopus, registram-se 29 artigos com índice H = 8. Portanto, uma produção modesta, mas, com razoável número de citações e índices.

VIII- OUTRAS ATIVIDADES RELEVANTES EM SUA CARREIRA ACADÊMICA

Conforme mencionei anteriormente, ainda no primeiro ano do curso de Graduação, encontrei o Clube Estudantil de Astronomia, Organização Não Governamental, sem fins lucrativos, à qual me associei. Fiz o curso de iniciação à Astronomia, que é uma paixão desde minha infância, a minha participação em diversos projetos amadores, muitos dos quais relacionados à divulgação científica, fortaleceu minha formação acadêmica, na área de ciência básica.

Em alguns destes projetos tive a oportunidade de receber estudantes secundaristas e do ensino fundamental de escolas públicas, das redes municipais e estaduais na antiga sede do clube, situada na Várzea, bairro INOCOP. Palestrávamos a respeito de objetos do sistema solar, estrelas binárias e variáveis, etc.

O Clube continuou suas atividades na Várzea até perder sua sede em 1992. Entretanto, os membros continuaram a realizar atividades de divulgação científica. Em certa ocasião conseguimos trazer o Falecido Prof. Ronaldo Rogério de Freitas Mourão, Astrônomo do Observatório Nacional, que palestrou no Espaço Ciência (Figura 14).



Figura 14- Palestra do Dr. Ronaldo Rogério de Freitas Mourão por ocasião do aniversário do Clube Estudantil de Astronomia. Foto com a equipe do CEA e Diretor do Espaço Ciência Prof. Dr. Antonio Carlos Pavão

Esta experiência ajudou a moldar minha formação científica, notadamente a necessidade de se “dividir”, divulgar, o produto do conhecimento científico, em linguagem clara para as pessoas simples, e, efetivamente para jovens. Como se diz, nós apenas cuidamos deste mundo para as gerações que vêm após nós mesmo.

Ao longo dos anos, entretanto, nosso grupo tem aprovado, alguns projetos de divulgação apoiados pelo CNPq que abrangem cidades do interior de Pernambuco, notadamente o sertão, nestes projetos desenvolvemos palestras, noites de observação, divulgando a Astronomia com o objetivo de atrair e despertar o interesse científico em jovens, mais especificamente, jovens de escolas públicas oriundos de áreas carentes.

Todo o stress e desgastes vivenciados na confecção de projetos e infindáveis reuniões do grupo é esquecido quando apresentamos a curiosos jovens e adolescentes um belíssimo e assombroso Universo de novas descobertas, “cerrado” de lindas gemas brilhantes, nuvens de poeira e gás ionizado, galáxias distantes e quasares, entre outros objetos que desafiam a nossa imaginação. Imaginação que deve ser a força motriz para o desenvolvimento científico e, por conseguinte, de nossa civilização.

IX- CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Definitivamente sinto a tentação de dizer que tudo foi em “um abrir e fechar de olhos”, mas, certamente não foi assim. Ainda bem que não. Foram muitos anos de trabalho duro, outros tantos de muitas incertezas, mas, certamente recheados pelo apoio da família e amigos, pelo suporte de professores e colegas, e por uma paixão pela natureza e pela descoberta. E a necessidade de se dar um sentido à vida colocando “ao serviço” todo o conhecimento adquirido.

Tenho a consciência de que tudo o que construí e construo é produto de muitas “mãos” e, portanto, devo dizer que espero honrar o apoio recebido continuando a história de todos os docentes que me formaram. Desta forma tenho algumas ideias que pretendo colocar em andamento, ao longo do tempo, não direi ao longo dos anos vindouros, pois o senso de urgência deixado pela Pandemia me impele adiante com muita força, o tempo “urge”. Estas ideias incluem o ensino de Graduação, a pesquisa e a Extensão Universitária. Cito-as, em linhas gerais a seguir, iniciando pela extensão e findando na pesquisa científica.

- O projeto CAVEST, juntamente com outros pré-acadêmicos tem tido especial atenção pela Proexc, de modo que temos recebido, através de editais recursos importantes. Pretendo aperfeiçoar o projeto, introduzir no ambiente do Projeto novas atividades relativas à divulgação de ciências, notadamente Astronomia. Tentei isto, pouco antes da pandemia, mas, o esforço não logrou êxito devido ao isolamento que se seguiu;
- Devo retomar um curso de iniciação à Astronomia, como fiz, em 2006 (não mencionado nas páginas anteriores), com o intuito de se criar a semente à formação de um clube de Astronomia em Vitória de Santo Antão;
- Devo retomar o projeto de Karatê-DÔ, abrindo mais espaço para os alunos antigos, já graduados, no sentido de se ampliar o número de vagas, buscando a interação com a Federação Pernambucana de Karatê para a formação de novos atletas;
- Depois de anos verificando a deficiência de nossos ingressantes nos cursos de graduação na disciplina de Química, tenho a intensão de propor uma disciplina de graduação, eletiva, contemplando o conteúdo de Química Orgânica, de forma mais aprofundada. Neste sentido iniciei conversações com o Colegiado do Curso de Biológicas e conversarei com os docentes da área;
- Recentemente iniciamos, alguns colegas e eu, uma proposta de novo curso em formato EAD, em ciências naturais, enfatizando áreas de química e física. Temos a esperança de concluir até o final deste ano.
- Continuo esperançoso de que recursos sejam alocados para o desenvolvimento da infraestrutura de nosso centro no sentido de se viabilizar a implantação dos cursos já autorizados pelas câmaras superiores de nossa UFPE, quando espero contribuir para a implantação destes cursos;
- Em se tratando das ideias para pesquisa em Química sintética e Química de Líquens tenho “uma ou duas” ideias bastante interessantes, a meu ver,

envolvendo alguns fenóis liquênicos recém-isolados pelo nosso grupo e o núcleo pirimidínico. Algumas moléculas inéditas que já nascem com grande potencial;

- O ácido estético, um fenol liquênico isolado há alguns anos ainda precisa ser melhor caracterizado quanto ao seu potencial farmacológico, estamos trabalhando nos primeiros ensaios, com um mestrando e um pós-doutorando;
- Estamos atualmente em fase inicial do estudo de uma *Cyperaceae* do gênero *Rhynchospora* que parece ter potencial ação hipoglicêmica, esperamos poder obter bons resultados nos próximos meses;
- Ainda intenciono retomar a pesquisa com metabólitos secundários de macroalgas de nosso litoral, área que iniciei com colegas da UFRPE.

Alguns destes projetos já estão, por certo, mais ou “menos delineados”, uns até em andamento, mas, não creio que sejam os únicos ou últimos, pois a inspiração não tem hora para bater à porta. Além disso com a inspiração familiar de que disponho (Figura 15), não pretendo diminuir o ritmo.



Figura 15- Minha inspiração maior

ANEXOS



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DA VITÓRIA**

Ata da 7ª defesa de Memorial para Promoção à Classe E (Professor Titular) de EMERSON PETER DA SILVA FALCAO do Centro Acadêmico da Vitória da Universidade Federal de Pernambuco, realizada em 10 de agosto de 2023. Proc. 23076.092207/2022-74

Ao 10 dias do mês de agosto de 2023, às 13:00h, em atendimento à Minuta Normativa nº 08 de 01 de abril de 2020 que regulamenta as atividades de trabalho remoto na Instituição, esteve reunida por vídeo conferência através da ferramenta Google Meet (<https://meet.google.com/ouz-pgws-edm>) disponibilizada pela UFPE a Comissão Especial Avaliadora para Promoção à Classe E (Professor Titular) do Centro Acadêmico da Vitória, cuja composição encontra-se em consonância com o Art. 28 da Resolução do Conselho Universitário nº 03/2014 de 10 de junho de 2014. A Comissão Especial Avaliadora foi constituída pelos Professores Titulares: Dr.^a Florisbela de Arruda Camara e Siqueira Campos (Centro Acadêmico da Vitória /UFPE, membro interno - Titular e Presidente da Comissão), Dr.^a Dr.^a Giselda Macena Lira (Faculdade de Nutrição da UFAL, membro externo - Suplente), Dr.^a Jairza Maria Barreto Medeiros (Departamento de Ciências da Nutrição, da Escola de Nutrição da UFBA, membro externo - Titular), Dr. Severino Mendes de Azevedo Júnior, (Departamento de Biologia/UFRPE, membro externo - Titular), estando presentes os membros titulares para a apresentação e defesa do Memorial do Professor(a) Emerson Peter da Silva Falcão do Curso de Nutrição do Centro Acadêmico da Vitória. A sessão foi aberta pela Professora Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos (membro interno - Titular e Presidente da Comissão) que fez a apresentação da Comissão, explicando aos presentes que o(a) Prof. Emerson Peter da Silva Falcão já havia cumprido a primeira etapa do seu pleito, tendo obtido a **nota 10 (dez)** pela Comissão Avaliadora ao julgar o seu relatório de atividades, primeira fase do processo de promoção, se tratando a apresentação e defesa do Memorial, a segunda etapa do processo. Dando continuidade, passou a palavra para o Prof. Emerson Peter da Silva Falcão Santos e informou que ele dispunha de 45 (quarenta e cinco) a 55 (cinquenta e cinco) minutos para expor seu Memorial e que em seguida, cada membro teria até 20 (vinte) minutos para, em forma de diálogo, expor suas considerações quanto ao trabalho do candidato à promoção pretendida. Finalizada a arguição, a Comissão Especial Avaliadora, deliberando em outra sala virtual restrita aos membros, resolveu atribuir ao Prof. Emerson Peter da Silva Falcão a menção "**aprovado por unanimidade**" com média **9,75** (nove pontos e 75 décimos). Nada mais havendo a tratar, eu, Mirana Carla da Silva, Secretária das Câmaras Setoriais do CAV/UFPE, neste ato secretariando os trabalhos, lavrei



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DA VITÓRIA**

a presente Ata, que assino juntamente com o candidato, com a Comissão Especial Avaliadora e com quem de direito. Vitória de Santo Antão, 10 de agosto de 2023.

Candidato:

Prof. Emerson Peter da Silva Falcão

Comissão Especial Avaliadora:


Prof.ª Dr.ª Florisbela de Arruda C. S. Camnos.

Documento assinado digitalmente



GISELDA MACENA LIRA

Data: 15/08/2023 20:17:23-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.ª Dr.ª Giselda Macena Lira

Documento assinado digitalmente



JAIRZA MARIA BARRETO MEDEIROS

Data: 21/08/2023 13:20:45-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.ª Dr.ª Jairza Maria Barreto M


Prof. Dr. Severino Mendes de Azevedo Júnior

Secretária

Mirana Carla da Silva



Emitido em 21/08/2023

ATA DE APROVACAO Nº 382/2023 - USG - CAV (12.34.39)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 21/08/2023 15:40)
FLORISBELA DE ARRUDA CAMARA E SIQUEIRA
CAMPOS
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
CEF CAV (12.34.20)
Matrícula: ###308#5

(Assinado digitalmente em 21/08/2023 15:41)
MIRANA CARLA DA SILVA
SECRETARIO - TITULAR
CSEC - CAV (12.34.29)
Matrícula: ###273#3

Visualize o documento original em <http://sipac.ufpe.br/documentos/> informando seu número: **382**, ano: **2023**, tipo:
ATA DE APROVACAO, data de emissão: **21/08/2023** e o código de verificação: **6f2000282b**



República Federativa do Brasil
Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

O Reitor da Universidade Federal de Pernambuco, no uso de suas atribuições, tendo em vista

a conclusão do Curso de DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

no 1º semestre do ano de 2003 e colação de grau a 19 / 08 /2003

confere o título de

DOUTOR

a EMERSON PETER DA SILVA FALCÃO

cédula de identidade nº 3.854.072

órgão expedidor SSP / PE

filho(a) de EMERSON LUCENA FALCÃO e

MARIA GOMES DA SILVA FALCÃO

natural de PERNAMBUCO

nascido(a) a 20 de SETEMBRO de 1972

nacionalidade BRASILEIRA

outorgando-lhe o presente Diploma, a fim de que possa gozar

de todos os direitos e prerrogativas legais.

Prof. Celso Augusto de Melo
Prof. Celso Augusto de Melo
Reitor da Universidade Federal de Pernambuco
Pós-Graduação / PROPSQ

Amato Henrique Pessoa Lins
Prof. Amato Henrique Pessoa Lins
Reitor / UFPE

Coordenadora do Curso
Coordenadora do Curso

Emerson Peter da Silva Falcão
Diplomado(a)

Coordenadora
Coordenadora

Chanceler
Chanceler

Doutorado em Ciências Biológicas
Doutorado em Ciências Biológicas
CCB / UFPE

Curso de Doutorado em Ciências Biológicas

Reconhecido através da Portaria nº 2.530/02, do MEC

de 04 / 09 / 02

Publicado no D.O.U. em 06 / 09 / 2002

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

Universidade Federal de Pernambuco

Serviço de Registro de Diplomas

Diploma registrado sob nº 314

no Livro PGR-6 Folha 159 de acordo com

o Processo nº 00623/04-SRD

Em 18 de março de 2004

Elisabete Araújo de Oliveira

Encarregada dos Registros

ELISABETE ARAÚJO DE OLIVEIRA

Em 18 de março de 2004

Ivanise Barbosa Ferreira

Chefe do Serviço de Registro de Diplomas

Ivanise Barbosa Ferreira

Registro feito por subdelegação de competência
do Magnífico Reitor da UFPE, através da Portaria
Nº 242 de 14 de 02 de 95



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO



O REITOR DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, no uso de suas atribuições, tendo em vista a

MESTRADO EM BIOQUÍMICA

conclusão do Curso de
no **2º** semestre do ano de **1998** e colação de grau a **15 DEZEMBRO /1999**

MESTRE

confere o título de
a **EMERSON PETER DA SILVA FALCÃO**

cédula de identidade nº **3854 072** órgão expedidor **SSP/PE**

filho (a) de **EMERSON LUCENA FALCÃO e MARIA GOMES DA SILVA FALCÃO**

natural de **PERNAMBUCO** nascido (a) a **20 SETEMBRO /1972**

nacionalidade **BRASILEIRA** e outorga-lhe o presente Diploma, a fim de que possa gozar de todos os

direitos e prerrogativas legais.
Recife (PE), **13** de **SETEMBRO** de **2000**

Paulo Roberto

Profº Paulo Roberto Freire Cunha

Pró-Reitor Para Assuntos de

Pesquisa e Pós-Graduação

Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Maria de Pa. C. U.

Profª Dña. de Pa. Carvalho da Silva

Coordenadora do Mestrado em Bioquímica

Mat. - SJAF - 11 3299

Coordenador do Curso

Genel. J. Cunha

Reitor

Prof. Genel. J. Cunha

Gerente do Serviço de Registro de Diplomas

Vice-Reitor - UFPE

da UFPE-MEC

Em 30 de 03 de 2001

Chefe

Emerson Peter da Silva Falcão

Diplomado

Curso de MESTRADO em BLOQUÍNICA
Reconhecido através da Portaria nº 132 / 99
do MEC em 02 / 02 / 1999, publicada
no DOU em 03 / 02 / 1999

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

Universidade Federal de Pernambuco
Serviço de Registro de Diplomas

Diploma registrado sob nº 200
no Livro 3-folha 041 de acordo com o processo nº 04269/00 SRO
Em 30 de março de 2001

Maria do Carmo Reis Rodrigues
ENCARREGADO(A) DOS REGISTROS
Maria do Carmo Reis Rodrigues

Em 30 de março de 2001
Gonizle Barbosa Ferreira
CHEFE DO SERVIÇO DE REGISTRO DE DIPLOMAS
Gonizle Barbosa Ferreira

Registro feito por subdelegação de competência do Magnífico Reitor da
UFPE, através Portaria Nº 242 de 14 de 02 de 95



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

O REITOR DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, no uso de suas atribuições, tendo em vista a conclusão do Curso de
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MODALIDADE BIOMÉDICA)

no **2º** semestre do ano de **1994** p. colação de grau a **25 / JANEIRO / 1995**

confere o título de

a **EMERSON PETER DA SILVA FALCÃO**

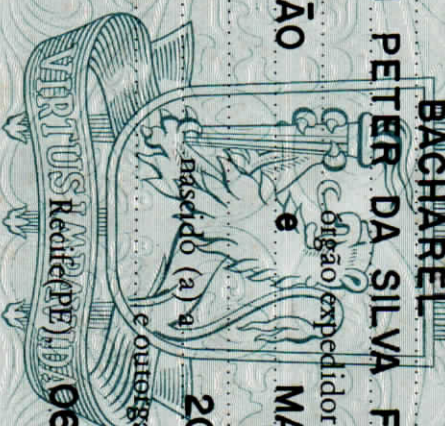
cédula de identidade nº **3854072** órgão expedidor **SSP/PE**

filho (a) de **EMERSON LUCENA FALCÃO** e **MARIA GOMES DA SILVA FALCÃO**

natural de **PERNAMBUCO** nascido (a) a **20 / SETEMBRO / 1972**

nacionalidade **BRASILEIRA** e outorga-lhe o presente Diploma, a fim de que possa gozar de

todos os direitos e prerrogativas legais.



06 de **MARÇO** de 19 **95**

Manoel do Carmo Lima
Diretor do Deptº Controle Acadêmico

Prof. Maria do Carmo Ferreira Lima
Diretora Geral do Depto. de Controle Acadêmico - PROACAD-UFPE

Prof. José Luiz Barreira Gillo
Reitor
Vice Reitor

Serviço de Registro de Diplomas
da UFPE - MEC

Em 18 de Maio de 1995
Joanae Barbosa Ferreira
Chefe

CONSELHO REGIONAL DE ODONTOLOGIA EM PERNAMBUCODiploma registrado sob o n.º 644 fls 84vLivro 001, de conformidade com o decreto

Lei n.º 150 de 09.02.65 e da Portaria nº 1.151, N.º 0001/84 - D.O.U. de 27.08.84.

Data 11/11/96

Dr. Arlone Vieira do Nascimento
 CRBM-PE 2.ª Região
 Presidente em Exercício

Curso de Curso: Ciências FisiológicasReconhecido através Reconhecido pelo Decreto LeiN.º 1712 de 23.03.72 D.O. 24.03.72 no D.O.U. /**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**

Universidade Federal de Pernambuco
 Serviço de Registro de Diplomas

Diploma registrado sob n.º 736no Livro 125 folha 377 de acordo com o processo n.º 00 286/95 SD-2Em 18 de Maio de 19 95Elizabete Regina Lima BrasilELIZABETE REGINA LIMA BRASILEm 18 de Maio de 19 95Vanice Barbosa Moreira

CHÉFE DO SERVIÇO DE REGISTRO DE DIPLOMAS

Joanise Barbosa Ferreira

Registro feito por subdelegação de competência do Magnífico Reitor da
 UFPE, através Portaria N.º 242 de 14 de Fevereiro de 95

CERTIFICADO

Certificamos que **Emerson Peter da Silva Falcão** participou na qualidade de OUVINTE da Mesa Redonda: Ensinar e aprender a partir da experiência pandêmica: processos, aprendizagens e desafios, da **IX Semana de Planejamento e Formação Pedagógica** da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, realizada no dia 15 de julho de 2022, com carga horária de 03 horas.



Profª. Magna do Carmo Silva
Pró-Reitora de Graduação
PROGRAD



PROGRAD
PRÓ-REITORIA
DE GRADUAÇÃO

IX SEMANA DE
PLANEJAMENTO
E FORMAÇÃO
PEDAGÓGICA
DA UFPE



Roseane Patrícia de Souza e Silva
Diretora de Desenvolvimento de Ensino
DDE/PROGRAD

CERTIFICADO

VIII SEMANA DE FORMAÇÃO PEDAGÓGICA DA UFPE

Certificamos que **Emerson Peter da Silva Falcão** participou na qualidade de **OUVINTE** da **VIII Semana de Formação Pedagógica da UFPE**, realizada nos dias **08 e 09 de novembro de 2021**, através do Canal Oficial da UFPE no YouTube, cumprindo carga horária de **7 horas**.

Recife, 09 de novembro de 2021



Profª Magna do Carmo Silva
Pró-reitora de Graduação
PROGRAD



Profª Roseane Patrícia de S. e Silva
Diretoria de Desenvolvimento de Ensino
DDE/PROGRAD



UFPE

PROGRAD
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO

CERTIFICADO

Certificamos que **Emerson Peter da Silva Falcão** participou na qualidade de OUVINTE da Mesa Redonda: Saúde mental e docência: (re)construção de caminhos possíveis, da **IX Semana de Planejamento e Formação Pedagógica** da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, realizada no dia 14 de julho de 2022, com carga horária de 02 horas.



Profª. Magna do Carmo Silva
Pró-Reitora de Graduação
PROGRAD



PROGRAD
PRÓ-REITORIA
DE GRADUAÇÃO

IX SEMANA DE
PLANEJAMENTO
E FORMAÇÃO
PEDAGÓGICA
DA UFPE



Roseane Patrícia de Souza e Silva
Diretora de Desenvolvimento de Ensino
DDE/PROGRAD



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA DE SANTO ANTÃO – UFPE / CAV

Declaramos para os devidos fins, que **EMERSON PETER DA SILVA FALCÃO**, SIAPE 1541578, Professor lotado no Curso de Nutrição, é membro do Conselho de Centro, como Vice Coordenador Setorial de Extensão e Cultura desde 04 de fevereiro de 2021 até os dias atuais.

Vitória de Santo Antão, 16 de agosto de 2022

Atenciosamente,



José Eduardo Garcia
Centro Acadêmico de Vitória/UFPE
Diretor
SIAPE 1605570

Prof. Dr. José Eduardo Garcia
Diretor
Centro Acadêmico de Vitória/UFPE



CAV
CENTRO ACADÊMICO
DE VITÓRIA



Homenagem

Ao professor

Emerson Peter da Silva Falcão

Coordenador do Projeto de Extensão **CAVEST**, do Centro Acadêmico de Vitória - CAV - UFPE, a nossa homenagem em agradecimento ao notável desempenho em prol da educação brasileira, por mais de 15 anos.

Vitória de Santo Antão, 25 de Julho
de 2023

Coordenação Setorial de Extensão e
Cultura do CAV



DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que **Emerson Peter da Silva Falcão** , CPF nº 771.480.454-87, coordenador do departamento de Nutrição no Centro Acadêmico de Vitória - CAV da Universidade Federal de Pernambuco, atua como orientador do discente Luan Maxwell Alves da Silva, bolsista no pré acadêmico “**CAVEST - Programa Pré-Acadêmico**”, desenvolvido no Centro Acadêmico de Vitória - CAV, registrado no SIGPROJ- Sistema de Informação e Gestão de Projetos, nº **125643.315520.1919.87315.03122021**, coordenado pelo professor Emerson Peter da Silva Falcão.

Recife, 29 de agosto de 2022

Oussama Naouar
SIAPE: 1971764
Pró-Reitor de Extensão e Cultura/PROEXC



DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que **Emerson Peter da Silva Falcão** , CPF nº 771.480.454-87, coordenador do departamento de Nutrição no Centro Acadêmico de Vitória - CAV da Universidade Federal de Pernambuco, atua como orientador do discente Vinicius Nunes dos Santos, bolsista no pré acadêmico “**CAVEST - Programa Pré-Acadêmico**”, desenvolvido no Centro Acadêmico de Vitória - CAV, registrado no SIGPROJ- Sistema de Informação e Gestão de Projetos, nº **125643.315520.1919.87315.03122021**, coordenado pelo professor Emerson Peter da Silva Falcão.

Recife, 29 de agosto de 2022

Oussama Naouar
SIAPE: 1971764
Pró-Reitor de Extensão e Cultura/PROEXC



DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que **Emerson Peter da Silva Falcão** , CPF nº 771.480.454-87, coordenador do departamento de Nutrição no Centro Acadêmico de Vitória - CAV da Universidade Federal de Pernambuco, atua como orientador do discente Jenisson Everton Batista da Silva, bolsista no pré acadêmico “**CAVEST - Programa Pré-Acadêmico**”, desenvolvido no Centro Acadêmico de Vitória - CAV, registrado no SIGPROJ- Sistema de Informação e Gestão de Projetos, nº **125643.315520.1919.87315.03122021**, coordenado pelo professor Emerson Peter da Silva Falcão.

Recife, 29 de agosto de 2022

Oussama Naouar
SIAPE: 1971764
Pró-Reitor de Extensão e Cultura/PROEXC



UFPE

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro Acadêmico da Vitória
Coordenação Setorial de Extensão e Cultura**

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que o Prof. **Emerson Peter da Silva Falcão** (CAV/UFPE) é coordenador do projeto de extensão intitulado “**CAVEST - Um passo rumo à Universidade**”, a ser realizado no período de julho de 2022 a julho de 2023, com carga horária total prevista de 1740 horas. Este projeto foi aprovado no 2022-07 - Edital Pibexc de Apoio Financeiro a Programas e Projetos de Extensão, sob o número de protocolo 383305.2167.87315.06062022.

Vitória de Santo Antão, 26 de agosto de 2022.

Profº. Dr. Adriano Bento Santos
SIAPE: 2936135
Coordenador Setorial de Extensão e Cultura



Emitido em 26/08/2022

DECLARACAO Nº 18266/2022 - CSEC - CAV (12.34.29)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 26/08/2022 18:32)

ADRIANO BENTO SANTOS

COORDENADOR - TITULAR

CSEC - CAV (12.34.29)

Matrícula: 2936135

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <http://sipac.ufpe.br/documentos/> informando seu número:
18266, ano: **2022**, tipo: **DECLARACAO**, data de emissão: **26/08/2022** e o código de verificação: **2a5964cc24**



DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que **Emerson Peter da Silva Falcão** , CPF nº 771.480.454-87, coordenador do departamento de Nutrição no Centro Acadêmico de Vitória - CAV da Universidade Federal de Pernambuco, atua como orientador do discente Adriano José Peres Bezerra Filho, bolsista no pré acadêmico **“CAVEST - Programa Pré-Acadêmico”**, desenvolvido no Centro Acadêmico de Vitória - CAV, registrado no SIGPROJ- Sistema de Informação e Gestão de Projetos, nº **125643.315520.1919.87315.03122021**, coordenado pelo professor Emerson Peter da Silva Falcão.

Recife, 29 de agosto de 2022

Oussama Naouar
SIAPE: 1971764
Pró-Reitor de Extensão e Cultura/PROEXC



DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que **Emerson Peter da Silva Falcão**, CPF nº 771.480.454-87, coordenador do departamento de Nutrição no Centro Acadêmico de Vitória - CAV da Universidade Federal de Pernambuco, atua como orientador da discente Amanda Letícia Tavares dos Santos, bolsista no pré acadêmico “**CAVEST - Programa Pré-Acadêmico**”, desenvolvido no Centro Acadêmico de Vitória - CAV, registrado no SIGPROJ- Sistema de Informação e Gestão de Projetos, nº 125643.315520.1919.87315.03122021, coordenado pelo professor Emerson Peter da Silva Falcão.

Recife, 29 de agosto de 2022

Oussama Naouar
SIAPE: 1971764
Pró-Reitor de Extensão e Cultura/PROEXC



DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que **Emerson Peter da Silva Falcão** , CPF nº 771.480.454-87, coordenador do departamento de Nutrição no Centro Acadêmico de Vitória - CAV da Universidade Federal de Pernambuco, atua como orientador da discente Ana Karina de Carvalho, bolsista no pré acadêmico “**CAVEST - Programa Pré-Acadêmico**”, desenvolvido no Centro Acadêmico de Vitória - CAV, registrado no SIGPROJ- Sistema de Informação e Gestão de Projetos, nº **125643.315520.1919.87315.03122021**, coordenado pelo professor Emerson Peter da Silva Falcão.

Recife, 29 de agosto de 2022

Oussama Naouar
SIAPE: 1971764
Pró-Reitor de Extensão e Cultura/PROEXC



DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que **Emerson Peter da Silva Falcão** , CPF nº 771.480.454-87, coordenador do departamento de Nutrição no Centro Acadêmico de Vitória - CAV da Universidade Federal de Pernambuco, atua como orientador do discente Filipe de Melo Barbosa, bolsista no pré acadêmico “**CAVEST - Programa Pré-Acadêmico**”, desenvolvido no Centro Acadêmico de Vitória - CAV, registrado no SIGPROJ- Sistema de Informação e Gestão de Projetos, nº **125643.315520.1919.87315.03122021**, coordenado pelo professor Emerson Peter da Silva Falcão.

Recife, 29 de agosto de 2022

Oussama Naouar
SIAPE: 1971764
Pró-Reitor de Extensão e Cultura/PROEXC



DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que **Emerson Peter da Silva Falcão** , CPF nº 771.480.454-87, coordenador do departamento de Nutrição no Centro Acadêmico de Vitória - CAV da Universidade Federal de Pernambuco, atua como orientador do discente Jefferson Aires Falcão, bolsista no pré acadêmico “**CAVEST - Programa Pré-Acadêmico**”, desenvolvido no Centro Acadêmico de Vitória - CAV, registrado no SIGPROJ- Sistema de Informação e Gestão de Projetos, nº **125643.315520.1919.87315.03122021**, coordenado pelo professor Emerson Peter da Silva Falcão.

Recife, 29 de agosto de 2022

Oussama Naouar
SIAPE: 1971764
Pró-Reitor de Extensão e Cultura/PROEXC



DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que **Emerson Peter da Silva Falcão** , CPF nº 771.480.454-87, coordenador do departamento de Nutrição no Centro Acadêmico de Vitória - CAV da Universidade Federal de Pernambuco, atua como orientador da discente Júlia Grazielle da Silva, bolsista no pré acadêmico “**CAVEST - Programa Pré-Acadêmico**”, desenvolvido no Centro Acadêmico de Vitória - CAV, registrado no SIGPROJ- Sistema de Informação e Gestão de Projetos, nº **125643.315520.1919.87315.03122021**, coordenado pelo professor Emerson Peter da Silva Falcão.

Recife, 29 de agosto de 2022

Oussama Naouar
SIAPE: 1971764
Pró-Reitor de Extensão e Cultura/PROEXC



DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que **Emerson Peter da Silva Falcão** , CPF nº 771.480.454-87, coordenador do departamento de Nutrição no Centro Acadêmico de Vitória - CAV da Universidade Federal de Pernambuco, atua como orientador do discente **Júlio César de Oliveira**, bolsista no pré acadêmico “**CAVEST - Programa Pré-Acadêmico**”, desenvolvido no Centro Acadêmico de Vitória - CAV, registrado no SIGPROJ- Sistema de Informação e Gestão de Projetos, nº **125643.315520.1919.87315.03122021**, coordenado pelo professor Emerson Peter da Silva Falcão.

Recife, 29 de agosto de 2022

Oussama Naouar
SIAPE: 1971764
Pró-Reitor de Extensão e Cultura/PROEXC

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que **Emerson Peter da Silva Falcão**, CPF nº 771.480.454-87, coordenador do departamento de Nutrição no Centro Acadêmico de Vitória - CAV da Universidade Federal de Pernambuco, atua como orientador da discente Kalline Fernanda da Conceição Silva, bolsista no pré acadêmico “**CAVEST - Programa Pré-Acadêmico**”, desenvolvido no Centro Acadêmico de Vitória - CAV, registrado no SIGPROJ- Sistema de Informação e Gestão de Projetos, nº 125643.315520.1919.87315.03122021, coordenado pelo professor Emerson Peter da Silva Falcão.

Recife, 29 de agosto de 2022



Oussama Naouar
SIAPE: 1971764
Pró-Reitor de Extensão e Cultura/PROEXC

O USO DO STOP MOTION NO ENSINO DE BIOQUÍMICA PARA O NÍVEL MÉDIO

The use of Stop Motion in teaching biochemistry to the middle level

Ana Jackeline de França Santos [jack.bioprof@gmail.com]

Mestra em Ensino de Biologia (PROFBIO)

Escola de Referência Erem Dom Acácio Rodrigues Alves.

Rua Agamenon Magalhães, s/n, bairro Santo Onofre, Palmares – PE.

Emerson Peter Falcão [emerson.sfalcao@ufpe.br]

Kênio Erithon Cavalcante Lima [kenio.lima@ufpe.br]

Professores no Mestrado Profissional em Ensino de Biologia (PROFBIO)

Centro Acadêmico de Vitória – Universidade Federal de Pernambuco.

R. Alto do Reservatório - Alto José Leal, Vitória de Santo Antão - PE, 55608-680.

Resumo

Este trabalho analisa a produção e a aplicação de vídeos de animação usando a técnica de *Stop Motion* em uma Sequência Didática com o objetivo de operacionalizar os conhecimentos sobre respiração celular aeróbica, o que oportunizou construir conhecimentos científicos na perspectiva da Aprendizagem Significativa. Os estudantes de uma turma de terceiro ano do Ensino Médio realizaram pesquisas e trabalhos em equipe para a criação, com intervenções artesanais, das estruturas representativas das reações bioquímicas sobre o tema, acrescido de socialização do conhecimento construído e identificação de equívocos nas representações com as animações. Essas intervenções mobilizaram reestruturações nas concepções prévias sobre a Bioquímica, reorganização cognitiva com ancoramento de novas informações e subsunções modificados, implicando mudanças significativas quando se analisam resultados de testes Pré e Pós-construção e socialização das animações. Por tais resultados, compreendemos que o uso do Stop Motion oportunizou os estudantes a reestruturarem suas concepções e conceitos sobre o assunto de forma constante, no percurso que surgiam dúvidas e alcançavam novos entendimentos, culminando na socialização das animações prontas para novas aprendizagens e reorganização de suas representações mentais sobre o tema respiração celular aeróbica.

Palavras-chave: Stop Motion; Ensino de Biologia; Respiração Celular; Ferramentas Didáticas; Bioquímica no Ensino Médio.

Abstract

This article analyzes the production and application of animation videos using the Stop Motion technique in a Didactic Sequence using knowledge about aerobic cell respiration. This technique allows to build scientific knowledge in the perspective of Meaningful Learning. In group, students, with artisanal interventions, in a third-year high school class conducted research to create structures representative of biochemical reactions on the topic, plus socialization of constructed knowledge and identification of misunderstandings in representations with animations. These interventions mobilized restructurings in previous conceptions about Biochemistry, cognitive reorganization with anchoring of new information and modified subunits, implying significant changes when analyzing results of pre-construction and post-construction tests and socialization of animations. For these results, we understand that Stop Motion can help students to restructure their conceptions and ideas about the subject and, during the course, their doubts have become opportunity to get new understandings which may be socialized through ready-made animations for new learning and reorganization of their mental representations on the topic of aerobic cell respiration.

Keywords: Stop Motion; Biology Teaching; Cellular respiration; Teaching Tools; Biochemistry in High School.

INTRODUÇÃO

A organização social e os processos de ensino se colocam, cada vez mais, numa perspectiva tecnológica e digital (MEC, 2018). De acordo com a Base Nacional Comum Curricular (BNCC), torna-se pouco provável, nos dias atuais, imaginarmos uma aula para o ensino da Biologia em que o professor utilize apenas diálogos e exposições das teorias. Por certo, compreendendo a maior disponibilidade de recursos e estratégias atualmente incentivadas pela BNCC, é sempre viável que o professor se utilize de recursos didáticos tecnológicos disponíveis para ampliar os meios de comunicação e de novas aprendizagens com seus estudantes (Silva & Correa, 2014). Nesse sentido, podemos imaginar que várias técnicas podem ser aplicadas por profissionais da educação na tentativa de facilitar a construção do conhecimento pelos estudantes, oportunizando novas aprendizagens que reestruturam as representações conceituais existentes, a exemplo das animações em vídeo *Stop Motion*, as quais são nosso foco de estudo.

Mas o que é o *Stop Motion*? A expressão *Stop Motion* significa “movimento parado”. Trata-se de uma técnica em que uma situação, processo e/ ou acontecimento é fotografado em diferentes momentos e posições para dar ideia de movimento às imagens que foram fotografadas. Para isso, as fotografias são colocadas em ordem cronológica ou de acordo com a evolução dos acontecimentos para, com o auxílio de um software de edição de vídeos, serem passadas em sequência por um tempo determinado pelo editor, o que dará a percepção de estar se movimentando. Em outra proposta de definição, ainda referente ao significado da técnica de *Stop Motion*, Nascimento (2016) especifica que:

Ela utiliza um sequencial de fotografias de posições diferentes de um mesmo objeto simulando assim um movimento (pois nada mais é do que uma ilusão de ótica). O fotógrafo deve tirar as fotos sempre na mesma posição e deve sofrer uma leve mudança de lugar, o objeto a ser fotografado, pois é isso que ao final da montagem dá a ideia de movimento (p. 10).

De acordo com Oliveira (2010, p. 51), a primeira vez em que se fez uso da técnica de *Stop Motion* foi em uma situação inusitada na qual, “durante uma filmagem, a câmera de Méliès parou por alguns instantes e voltou a gravar, posteriormente. O artista descobriu que podia utilizar este recurso para produzir vários efeitos e deu o nome de *stop-action* a essa técnica.” Em breve explicação, Barbosa, Santos, Alcoforado e Sartore (2012, p. 25) descreve a técnica como sendo o “... processo artístico manual ou computacional de criar ilusão de movimento contínuo através de imagens que, isoladamente são estáticas, mas quando sequenciadas de forma veloz proporcionam essa sensação de movimento ao observador”, o que faz estruturas inanimadas se moverem como se estivessem vivas. Por essa peculiaridade da técnica, Shaw (2012) intitulou a introdução de seu livro como “*Brincando de Deus*”.

Com o passar do tempo e do aperfeiçoamento da técnica, já é possível dispormos de vários materiais e formas de se trabalhar a produção desses vídeos no campo educacional usando o conhecimento do conteúdo, os detalhes das cenas e a criatividade. Como forma de diferenciação das imagens ou vídeos prontos (como os que utilizamos em sala de aula) da produção derivada da técnica de *Stop Motion*, Santaella (2007) destaca a importância da construção da informação a partir do pensar para produzir, não se limitando ao fato do simples registrar dos fatos, como muitas vezes acontece em vídeos educativos. Em outro entendimento, apresentado por Oliveira (2010), destaca-se que (...)

(...) enquanto na foto e no filme, uma vez registrada, a informação é irreversível, nada pode ser mudado, a informação digital representa exatamente o oposto. Tudo nela é variável e adaptável. Não apenas pode ser controlada e manipulada em sua inteireza, mas também em cada um de seus pontos individuais (p. 51).

Ao criarmos as condições de maior contato tátil e visual através da técnica do *Stop Motion*, referentes aos conhecimentos das estruturas e acontecimentos biológicos, espera-se que o estudante desenvolva maior sinergia (ato de sistemas biológicos serem ativados ao executar uma dada função) acerca de um determinado conteúdo de modo que este permaneça por mais tempo em sua memória.

De acordo com Bossler e Caldeira (2013), em consonância com a importância da utilização de alternativas que possam reproduzir de forma concreta conteúdos com aspectos microscópicos, destaca-se que, quando o estudante tem a oportunidade de construir os recursos que materializam os conceitos abstratos das Ciências da Natureza, ocorre a oportunidade de observarem seus equívocos conceituais e reconstruírem seus modelos mentais com aproximações do que se é esperado como conhecimento científico. Neste processo, há a necessidade de os estudantes aprofundarem com as leituras sobre as teorias que embasam o conteúdo, de organizarem as estruturas para dar animações e de construir o enredo das histórias (sequências), ocorre a possibilidade de maior contato desses com o conhecimento em questão, reestruturando suas representações e definições conceituais com maior aproximação dos modelos estruturados no campo do conhecimento científico.

Ratificando a pertinência da técnica para o processo de aprendizagem, Rodrigues e Lavino (2020) afirmam que o trabalho com animações *Stop Motion* mobiliza o estudante a construir sínteses de conceitos e a representar, pelo uso de analogias e modelos concretos, as estruturas científicas estabelecidas cognitivamente. Ou seja, cria-se um canal para que as representações de um mundo imaginário – muitas vezes construídos teoricamente em aulas expositivas e por imagens planas em quadros brancos – assumam materialidade, com capacidade de serem mais bem visualizados e avaliados por outros, dentre estes, o próprio professor que construiu o canal para as representações e significados aos conceitos científicos assimilados.

Nesse processo, espera-se que as pessoas envolvidas na confecção de animações em *Stop Motion* consigam mostrar, de forma mais espontânea, dúvidas sobre o conteúdo a partir da produção das animações, de tal maneira que esses equívocos se façam mais evidentes com a aplicação da técnica. Em síntese, de acordo com Lima, Santos, Matias e Lima (2015, p. 06), *“...recursos alternativos como o Stop Motion, análogo ao acontecimento real dos fenômenos biológicos com imagens e mídia tecnológica, do tipo animação, colabora na aproximação do conhecimento científico ao entendimento do estudante”*. Para tanto, acredita-se que é significativo que o professor crie e defina estratégias e procedimentos favoráveis para se construir as condições pertinentes às diversas formas de assimilação do conhecimento científico pelos estudantes, como também intermedie as ações e intervenções desses para que se promovam as condições de aprendizagem pela adesão de novos conhecimentos aos já existentes em suas estruturas cognitivas (Ausubel, Novak & Hanesian, 1980). Para a compreensão de aprendizagem, construídas nas propostas de intervenção com animações tipo *Stop Motion* para o trabalho com conceitos abstratos, acompanhando relatos e considerações na literatura pertinentes, é coerente o olhar na perspectiva da teoria da Aprendizagem Significativa, a qual é definida como (...).

(...) a aquisição dos significados e das mudanças organizacionais não transitórias na estrutura cognitiva, acompanhando este processo na medida em que o aprendiz responde às apresentações iniciais e sucessivas da tarefa a ser aprendida (Ausubel et al., 1980, p.259).

Por essa teoria, estabelece-se, em condições favoráveis construídas para tal propósito, o ancoramento de novas informações às estruturas mentais constituintes de conhecimentos pré-existentes – o cognitivo do indivíduo – por assimilação e acomodação com consequente indissociabilidade dessa composição se for coerente à estrutura pré-existente (Ausubel et al., 1980). Em condições favoráveis, estabelecem-se subsunçores modificados. Nesse campo teórico, é possível entender e se esperar que a nova informação expanda o sentido e amplie os conhecimentos aos já existentes, constituindo uma nova estrutura, não dissociada das anteriores. Mas, em situações em que não se estabelecem conexões de forma consistente – não acontecem assimilações entre o novo conhecimento e o já existente por não se encontrar significância “ancoragem” – entre os saberes arrebatados, faz-se coerente se utilizar de estratégias e recursos outros que aproximem ou criem as condições para novas aprendizagens.

Considerando a possibilidade então descrita, de não existir subsunçores que garantam a ancoragem dos novos saberes, Ribeiro, Silva e Kosciński (2012) descrevem a aplicabilidade de estratégias e recursos que se coloquem como organizadores prévios, então considerados como *“mecanismos pedagógicos auxiliares na ligação entre aquilo que o aprendiz já sabe e aquilo que irá adquirir”* (p.171). Em mesma perspectiva, justifica-se a aplicação dos denominados organizadores prévios, como é o caso das animações *Stop Motion*, compreendidos à luz da Aprendizagem Significativa, pelo fato de que *“as ideias existentes na estrutura cognitiva do aprendiz podem não ter a relevância e o conteúdo suficientes para estabelecerem ligações com as novas ideias introduzidas*

pelo material de instrução” (p.171), o que se faz necessário, por ação do educador, melhor estruturar o percurso de aprendizagem diante do material e/ ou conhecimento a ser assimilado. Em seu trabalho, os mesmos autores consideraram as animações *Stop Motion* confeccionadas para objetivos específicos de intervenção exploradas como recurso intermediário – mediação – para a aquisição de novas aprendizagens, entendendo-os como organizadores prévios. Já em trabalho de Bossler e Caldeira (2013), a técnica de construção da animação pelos participantes se fez instrumento de avaliação, pois consideraram os conflitos e a ressignificação conceitual que aplicaram para estruturarem as representações e darem *“materialidade a conceitos e fenômenos existentes para ele apenas como imagens mentais”* (Bossler & Caldeira, 2013, p.478).

Diante do já exposto e considerando a associação das intervenções com nossas experiências docentes, partimos com a compreensão de que as aulas de Bioquímica exigem que os estudantes exercitem diferentes estratégias e a capacidade de apropriação, muitas vezes, para assimilar termos associados às reações químicas e fenômenos biológicos que acontecem durante um dado processo. A apreensão desses conteúdos no Ensino Médio é algo desafiador, pois necessita de grande abstração, por parte dos estudantes, e elevado grau de criatividade e sensibilidade, por parte do docente, para empregar técnicas pedagógicas e ferramentas que possibilitem ao educando o aprendizado significativo adequado.

Ao construirmos nossos entendimentos sobre a técnica do *Stop Motion*, refletindo sobre o desafio de ensinar conteúdos biológicos que são, por sua natureza, abstratos, surgiu-nos a necessidade de pensar em uma ferramenta que pudesse estimular o processo criativo dos estudantes e, ao mesmo tempo, confrontá-los com o desafio de ensinar/ expor o conhecimento apreendido na forma de vídeos para, então, expressarem como o conhecimento científico foi ancorado e modificado no subsunção dos estudantes envolvidos. Some-se a isso a própria característica dos jovens envolvidos pelo mundo da telecomunicação via celular e que possuem potencial de usufruírem de aplicativos que estimulam a criatividade na essência desses.

Apesar de ter surgido como técnica cinematográfica, essa proposta se tornou mais um recurso de ensino na Biologia por ajudar a ilustrar conceitos abstratos e por representar fenômenos de conteúdos didáticos pouco atrativos. De acordo com esse pensamento, Oliveira (2010) menciona que essa técnica facilita a representação de cenas inexistentes na vida real (no nosso caso, cenas abaixo do limite da microscopia óptica). Considerando a temática respiração celular aeróbica, percebe-se que é um tema interdisciplinar, envolvendo Química e Biologia, contendo conceitos de alta complexidade que escapam aos sentidos comuns, exigindo diversos conhecimentos e grande dose de abstração para a adequada apreensão.

Em situações como esta, percebe-se o estudante buscando construir modelos-chave mentais para desvendar detalhes factíveis a uma compreensão do conteúdo estudado; já o professor, seja por imagens do livro, seja por ilustrações feitas por ele mesmo no quadro, buscará favorecer a aproximação do conceito científico a essa representação, supostamente construída pelo estudante. Mas, como saber se o conceito científico e a representação mental do estudante estão compatíveis? É sempre um dilema a ser avaliado. Desse modo, na busca de diferenciar essas novas possibilidades de ensino do “método tradicional”, chamado assim por Nascimento (2016, p. 22) ao caracterizar a atuação do professor com o uso restrito da oratória para emitir seu conhecimento aos estudantes, admite-se que *“impedimos, muitas vezes, que o aluno construa essas representações, dificultando, assim, a aprendizagem”*.

Ao refletir sobre a relevância do *Stop Motion* como prática auxiliar na compreensão de temáticas abstratas, a exemplo da respiração celular aeróbica, Nascimento (2016) e Rodrigues e Lavino (2020) reforçam a importância do uso desses meios para estimular o interesse e dar sentido à teoria a partir da prática, materializando o abstrato e desenvolvendo o conhecimento dentro dos limites e interesses científicos. Para tanto, Nascimento (2016, p. 10) também admite que (...)

A teoria aliada à prática estimula o estudante a aprender o conteúdo e além de dinamizar a aula desperta o interesse deste, dando-o uma nova forma de construir seu conhecimento; permite que o aluno veja, sinta, perceba o que a teoria menciona como está relacionada e como o que está nos livros influencia diretamente na vida.

Trazendo para o contexto deste estudo, como é possível enfatizar para os estudantes envolvidos a relação existente entre a respiração fisiológica que eles conhecem e sentem e o processo mitocondrial de produção de energia fundamental à vida, que necessita de oxigênio como um agente oxidante para o processo químico ocorrer? A representação que o professor faz, dessas estruturas micro e macroscópicas envolvidas nos processos, talvez possa levar a uma compreensão equivocada, como o fato de expor a imagem em *datashow* ou até mesmo no livro. Um exemplo seria a ilustração das proteínas transportadoras de prótons e elétrons, as quais poderiam ser confundidas pelos estudantes ao achar que elas seriam um conjunto único, não existindo, assim, outras sequências em diferentes locais da crista mitocondrial, ou até mesmo o desenho de uma mitocôndria, que poderia simbolizar, para ele, uma célula.

A partir disso, considerando as aulas de Bioquímica para o estudo dos processos não verificáveis a olho nu, construímos questionamentos, pelos quais buscamos entender a seguinte pergunta: de que forma e em que dimensão a produção do *Stop Motion* colabora com a apropriação dos conceitos científicos mais abstratos das estruturas bioquímicas? Em que condições a produção das animações em *Stop Motion* pelos estudantes complementam entendimentos das ilustrações bioquímicas presentes nos livros didáticos?

Por objetivos desta pesquisa, buscamos não só compreender como a produção e compartilhamento de animações tipo *Stop Motion* colaboram com a aprendizagem de conceitos científicos mais abstratos sobre estruturas moleculares exploradas na Bioquímica, como também avaliar de que forma a produção e compartilhamento de animações *Stop Motion*, confeccionadas por estudantes, colaboram com a Aprendizagem Significativa desses em referência a conceitos e imagens bioquímicas contidas nos livros didáticos. Como hipótese para o nosso estudo, afirmamos que o *Stop Motion* é uma ferramenta capaz de melhor aproximar o conhecimento acerca de conceitos abstratos da Bioquímica que necessitem modelar, de forma macroscópica, estruturas microscópicas para se buscar, com isso, uma melhor apropriação e compreensão científica desses conceitos pelos estudantes.

METODOLOGIA

Nosso estudo teve cunho investigativo, construído para fins de entendimentos que resultassem em um propósito de pesquisa qualitativa em diversas de suas intervenções: observações durante a construção e a apresentação de modelos biológicos próprios a animações, levantamento pré e pós-intervenções com questões discursivas, interações entre os participantes para análise sobre o que foi construído, o que estruturou conhecimentos importantes e atributos necessários no desenvolvimento, aplicação e avaliação em torno do nosso principal produto – animações em *Stop Motion*. Firma-se tal aplicação de recurso e estratégia como proposta adaptável e replicável para a Educação Básica por ser de fácil disseminação em diversas outras situações de ensino nos diferentes espaços de aprendizagem dos nossos estudantes.

Para a construção dos resultados, seguimos uma proposta de Sequência Didática (SD) com etapas constituídas de diferentes recursos e estratégias que nos permitiram registrar as consequências das orientações e intervenções, pertinentes às nossas análises, e confirmar a eficácia das estratégias e de suas técnicas então aplicadas para o maior envolvimento dos estudantes ao aprendizado de conteúdos da Bioquímica. Como diretriz para esta pesquisa, realizada antes de ocorrer as restrições sanitárias por conta da Pandemia do COVID-19, afirmamos que as intervenções foram respaldadas no parecer do Comitê de ética da UFPE com o número 3.716.276, de acordo com o CAAE: 21956719.9.0000.9430.

Participaram das intervenções da SD 32 (trinta e dois) estudantes do terceiro ano do Ensino Médio de uma escola pública estadual da cidade de Palmares – PE por já possuírem conhecimentos prévios sobre Bioquímica, comumente trabalhados no primeiro ano do Ensino Médio. Para o início das intervenções, os estudantes se organizaram em 04 (quatro) equipes para a realização de estudos individualizados e em grupo sobre conceitos e estruturas da Bioquímica, como também participaram de oficinas para apropriação de técnicas básicas para a confecção de *Stop Motion*. Como consequência das intervenções da SD, os estudantes procederam com as pesquisas, os estudos e a confecção das diferentes animações sobre o mesmo tema: respiração celular aeróbica, além de outras intervenções, conforme as etapas/ momentos apresentados na sequência SD. Utilizaram-se de

materiais diversos, escolhidos pelas equipes, para a execução das animações, o que oportunizou a liberdade criativa necessária para materializarem nas animações os conceitos que possuíam.

Nossas intervenções se iniciaram com a pesquisa dos estudantes sobre o conteúdo “respiração celular aeróbica” em livros e textos impressos, disponibilizados pelo professor responsável, com o propósito de reorganizar conceitos referentes ao assunto proposto. Os estudantes, reunidos em suas respectivas equipes, concluíram esta fase com a confecção de textos-sínteses das principais informações que acreditam ser necessárias à confecção futura das animações. Em outro momento, com aula presencial, o professor retornou ao assunto respiração celular aeróbica através das anotações que realizaram, utilizando-se de imagens em cartazes para reorganizar os conceitos e representações referentes às etapas da glicólise, do ciclo de Krebs e da fosforilação oxidativa.

Após esses dois momentos de intervenção – pesquisas e aula expositiva dialogada –, aplicou-se o primeiro instrumento avaliativo/ investigativo na forma de questionário com perguntas discursivas (Apêndice A) com o propósito de um primeiro diagnóstico sobre os conceitos até então revisados. Com esse procedimento, foi possível propor as primeiras intervenções e reuniões que culminaram nas estruturas e escolhas para as animações *Stop Motion* pelos estudantes. Em outro momento, com materiais diversos (caixas de massa de modelar, cartolinas, papéis-cartão e folhas de emborrachado de cores variadas, canetas hidrográficas, lápis de diversas cores, cola branca tradicional, cola bastão, pistola para cola quente, tripé suporte para celular e tesoura) e espaço físico com mesas, adequado para a organização das equipes, os estudantes iniciaram o processo de confecção das estruturas presentes no processo de respiração celular aeróbica. Como estratégia orientada para a confecção das animações, salientamos que os estudantes tiveram que colocar o celular em um tripé para que a câmera permanecesse fixa durante a captação das imagens, o que minimizou os riscos de perderem a qualidade dos registros. Outras equipes optaram em conectar o fone de ouvido para usar o botão de aumento de volume como dispositivo de captura de imagem, o que evitou tocar na tela e fazer o celular estremecer, garantindo, ainda mais, a qualidade das imagens construídas.

No momento da confecção, cada equipe conjugou as mesas para analisarem as fontes de informação que levaram, dos escritos que fizeram em aulas e de pesquisas em vídeos da internet com o uso dos próprios aparelhos celulares com a intenção de revisarem os conteúdos para aproximarem ao máximo possível do processo correto. No processo de confecção das estruturas, fizeram uso dos materiais disponíveis para a montagem das várias estruturas constituintes do processo da respiração celular aeróbica, como moléculas e componentes celulares (Fig. 01). Em alguns momentos dessa etapa, surgiam dúvidas e a necessidade de novas pesquisas, mas a professora não intervia com respostas prontas, apenas realizava o registro para resgate e diagnóstico em etapas futuras. À medida que as dúvidas eram minimizadas e as figuras representativas dos diversos processos relacionados à respiração celular aeróbica ficavam prontas, os respectivos grupos prosseguiram com as fotografias em uma sequência ordenada de acontecimentos, como é característica da técnica do *Stop Motion*.



Figura 01 – Montagem das peças. Fonte: Autores, 2019.

Torna-se exemplo o processo de uma das equipes que fez uma introdução em sua animação de um personagem que comia uma fatia de pizza para ilustrar a ingestão da glicose pelo

organismo (Fig. 02). Para isso, foram retiradas algumas fotografias, iniciadas com a foto do personagem e da pizza desenhados, recortados e colocados sobre uma cartolina a uma determinada distância, seguida de outras imagens que aproximavam o alimento da boca do personagem de modo sequenciado. As demais equipes prosseguiram com essa mesma estratégia e foram construindo suas imagens para a posterior animação (Fig. 02).

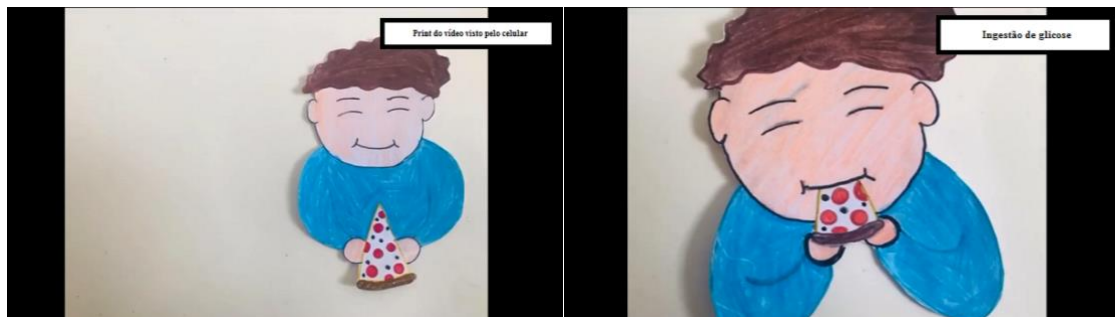


Figura 02 – Fotografias retiradas das animações prontas. **Fonte:** Autores, 2019.

A montagem das animações pelas equipes aconteceu no laboratório de informática da própria escola, que dispunha, em seus computadores do *Windows*, *Movie Maker*® (programa de edição de vídeos), ativando, em seguida, o comando “Adicionar vídeos e fotos”. Feito isso, iniciaram as edições e posterior ajustes na velocidade do vídeo, inserindo explicações, músicas e textos informativos, procedimentos comuns na construção das animações *Stop Motion*. Os vídeos foram encaminhados ao docente responsável para a pré-avaliação do material construído (Fig. 03), em que se avaliou a coerência das estruturas moleculares, a pertinência conceitual referente ao conteúdo explorado “respiração celular aeróbica” e a sequência dos respectivos processos constituintes da reação bioquímica em questão.

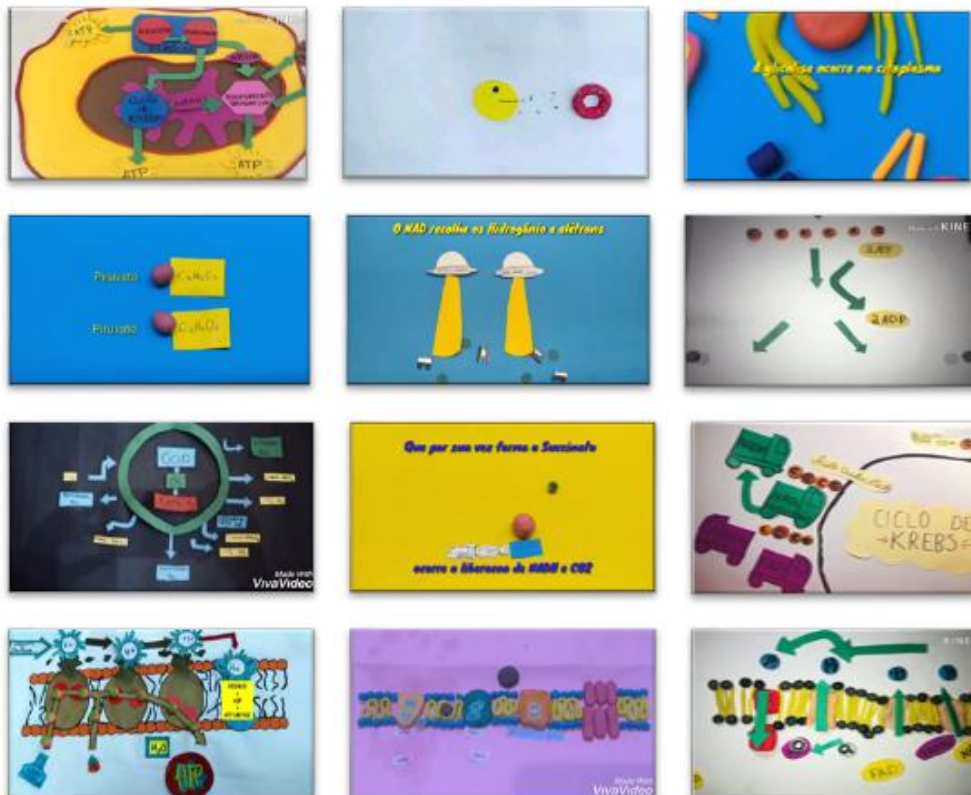


Figura 03 – Fotografias retiradas das animações prontas. **Fonte:** Autores, 2019.

Como meio de validação conceitual e estrutural do que foi construído nas animações, um professor de Biologia do Ensino Superior, conhecedor dos aspectos bioquímicos envolvidos na

proposta, também realizou a análise dos vídeos como forma de diagnóstico de sua pertinência e coerência conceitual então explorada.

Ao concluirmos as diversas etapas, culminadas na confecção e apresentação das animações *Stop Motion* então confeccionadas pelos estudantes, aplicamos um segundo questionário, também com questões discursivas (Apêndice B). O propósito desse instrumento avaliativo foi entendermos como a vivência de pesquisar sobre o conteúdo bioquímico em estudo, a confecção e compartilhamento das animações em *Stop Motion* colaboraram ao melhor conhecimento sobre o conteúdo da respiração celular aeróbica entre os estudantes participantes dessa SD.

O produto do processo nesta pesquisa

A interpretação dos nossos resultados possibilitou a validação de uma Sequência Didática – produto final de um Trabalho de Conclusão de Mestrado – oportunizando que outras pessoas também usufruam das propostas. Ratificando essa nossa percepção, Sarmento *et al.* (2013, p. 10) já compreendia que (...)

(...) os dados colhidos sobre o uso de tais princípios no contexto em que conduzimos nosso estudo poderão ser transformados em evidências transferíveis para outros contextos, numa generalização teórica e situada, caso outros professores percebam semelhança com suas situações de ensino, em termos de variáveis contextuais compartilhadas.

Nesse processo, a construção do material para as análises empíricas foi registrada a partir de anotações feitas durante todo o percurso das intervenções, em que se verificaram comentários, mesmo que esporádicos, realizados pelos estudantes de forma descontraída, como também as respostas aos questionamentos e comentários provocados pelo professor. Também utilizamos de registros feitos pelo professor, o que evidencia mudanças conceituais e exercícios/ execução de argumentações dentro dos grupos para a confecção das estruturas com respeito aos conceitos científicos então construídos nas intervenções anteriores. Também aconteceram avaliações nas próprias animações já concluídas, em que se constatou a pertinência científica das estruturas abstratas então materializadas, o que permitiu inferir apropriação de conhecimentos dentro do desejado para o ensino de Bioquímica na Educação Básica.

Assim, levamos em conta a propriedade no uso de palavras, de conceitos e o conhecimento de estruturas e etapas que acontecem na respiração celular aeróbica, o que nos levou aos indicativos de confirmação de aprendizagem do conteúdo construídos por nossas interpretações. As questões discursivas foram, então, fragmentadas e categorizadas *a posteriori*, baseadas na Análise de Conteúdo (Bardin, 2011), as quais foram organizadas em quadros e figuras para melhor apresentarmos as evidências de apropriação de conhecimentos científicos pelos estudantes participantes das etapas da SD. Os questionários aplicados no período de pré e pós-intervenções (Apêndices A e B) foram confeccionados com questões diferentes, ainda que abordassem as mesmas temáticas relacionadas à respiração celular. Colocamos como observação referente aos questionários o não interesse em comparações entre as respostas do antes e do depois das intervenções por compreendermos melhor como a vivência das etapas de construção e apresentação das animações em *Stop Motion* efetivamente colaboraram com a construção de entendimentos dentro do campo científico sobre a bioquímica envolvida no processo de respiração celular aeróbica, desejado para a Educação Básica, como destacado por pesquisas na áreas sobre a proposta de animações.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Iniciamos nossas análises reconhecendo as potencialidades da técnica *Stop Motion* para a formação dos estudantes ao materializarmos conceitos e modelos explorados no ensino de Biologia com o conteúdo de bioquímica. O propósito dessa temática surgiu de experiências anteriores ao trabalharmos o conteúdo de bioenergética, em que os estudantes aceitaram o desafio de produzirem vídeos explicando o processo da fotossíntese. As equipes, então, construíram filmes com os colegas relatando o processo, fizeram um jornal, construíram paródias e também uma animação em formato *Stop Motion*. Essa produção teve repercussão pelo fato de quererem assistir a elas mais de uma vez e por ficarem curiosos em relação à sua produção. Por percebermos que essa proposta tomou a

atenção dos estudantes, resolvemos repetir a experiência, agora com toda a turma vivenciando uma Sequência Didática (SD) que explorou o conteúdo de Respiração Celular Aeróbica através da produção de animações em *Stop Motion*.

Dados apreendidos da análise da aula e de fontes

A aplicação da SD teve início com a apropriação de informações sobre a temática através de fontes diversas (leitura do tema no livro didático e em folhas impressas de site). As pesquisas e leituras dos materiais pesquisados oportunizaram um claro exercício do protagonismo na elaboração de textos sínteses/ resumos e consequente assimilação do conteúdo explorado, com o evidente propósito de *“modificar as atitudes e habilidades do estudante de forma que este fosse capaz de buscar, por si só, o conhecimento em sua fonte”* (Vieira et al., 2001, p. 02). Como apropriação de novos saberes, registramos a assimilação de termos científicos, amplo diálogo sobre tópicos que classificamos como interessantes e/ ou curiosidades. Dentre essas, registramos o porquê de algumas fontes se referirem à cadeia transportadora de elétrons como fosforilação oxidativa e outras como cadeia respiratória.

Detalhamento e análise do primeiro questionário

Ao aplicarmos o primeiro questionário (Apêndice A), constituído de 14 (quatorze) perguntas para respostas discursivas, buscamos identificar quais conhecimentos os estudantes já possuíam sobre Bioquímica, já que eram estudantes do terceiro ano do Ensino Médio e realizaram pesquisas e participaram de revisões em sala de aula. Para melhor mensurarmos a situação de conhecimento, trabalhamos com uma escala, a qual atribuía 0,71 (zero, setenta e um) ponto para respostas corretas e completas, 0,5 (zero, cinco) ponto se a resposta estivesse incompleta e 0,0 (zero) ponto se estivesse errada, o que possibilitaria um possível somatório total de 10,0 (dez) se todas as 14 (quatorze) perguntas estivessem corretas e completas.

As perguntas exploraram todas as etapas do processo referente à respiração celular aeróbica, coerente com o que se é exigido para o Ensino Médio, com conhecimentos gerais e específicos. Sobre glicólise, questionamos o produto resultante dessa etapa, o saldo final de ATP e o porquê, como também por qual motivo, essa fase glicolítica é chamada, pela maioria dos livros didáticos, de anaeróbica, e a função do NAD⁺. Do ciclo de Krebs, buscamos registrar o que o estudante sabia sobre a função da coenzima A, quais os outros nomes que o ciclo de Krebs recebe e o porquê dos nomes, a diferença entre GTP e ATP e se ele era capaz de relacionar o ciclo de Krebs com a produção do gás carbônico que expiramos. Por fim, identificar onde ocorre a fosforilação oxidativa, a função dos prótons e elétrons nesta etapa do processo, o conhecimento sobre as proteínas participantes e, em última análise, uma breve síntese da produção de ATP pela cadeia transportadora de elétrons. Nessa primeira análise diagnóstica, percebemos significativa quantidade de estudantes que erraram ou não responderam as questões ou que tiveram baixa quantidade de acertos (Figura 04), mesmo após participarem das pesquisas e da revisão dos conceitos relativos.

Constatamos que o quantitativo de acertos decaía nas questões que demandavam conhecimentos e informações mais complexas sobre os conteúdos explorados, como também exigiam maior abstração. Esses dados revelaram a existência de lacunas conceituais e de apropriação das estruturas abstratas dos conteúdos mais complexos que unem a Química e a Biologia em uma mesma perspectiva. Trata-se de conhecimentos sobre as várias estruturas moleculares, imperceptíveis a olho nu, o que concorda com Beckhauser, Almeida e Zeni (2006, p. B1) quando afirma que *“a Bioquímica exige do aluno uma capacidade de abstração além de conhecimentos prévios de outras ciências para um bom desenvolvimento da disciplina”*. Corroborando também com nossas percepções e resultados, temos que (...)

Fenômenos que regem os processos biológicos são ensinados sem vínculos com a realidade dos alunos. Desta forma, o conteúdo referente à Biologia é visto pelos estudantes como abstrato, fictício, sem envolvimento com o seu cotidiano e pouca aplicabilidade (Pinheiro & Pompilho, 2011, p. A2).

Ao compreendermos que *“um modelo desprovido de reflexões, sem um olhar crítico sobre a ciência, é um saber científico adquirido de forma equivocada, sem produzir ganhos para a sociedade”* (Canga, Gonçalves & Buza, 2010, p. 29), confirmamos que os estudantes participantes ainda

confundiam ou não abstraíam os modelos que representavam as estruturas e as reações com condições de assimilar conhecimentos referentes a aspectos da Bioquímica.

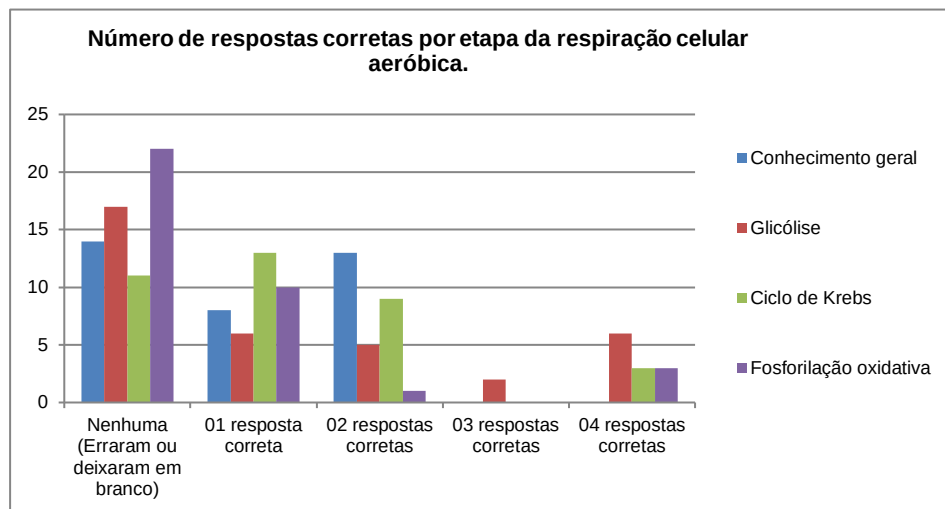


Figura 04 - Resultado do Questionário 1. **Fonte:** Autores, 2019.

Em relato, representativo como êxito para o ensino molecular da Biologia, Alves *et al.* (2016, p. 107) admitem “o uso de modelos tridimensionais, ilustrações e jogos como responsáveis pela melhora na capacidade de adquirir e guardar informações em comparação com métodos de ensino tradicionais”, pois, como lembrado por Scatigno e Torres (2016, p. 31), “... boa parte das dificuldades de aprendizado derivam da falta de integração dos níveis representacionais dos fenômenos químicos e bioquímicos: macroscópico, microscópico ou submicroscópico e simbólico, necessária para o aprendizado significativo”. Mas, como oportunizar as condições para apropriar os estudantes dos conhecimentos dentro do campo micro e da abstração? Dentre as possibilidades, destaca-se que ...

a elaboração de uma sequência de aulas a partir de um contexto significativo e variedade de recursos/ atividades didáticos para os estudantes pode se configurar como excelente alternativa a aprendizagem de conteúdos de difícil compreensão, principalmente conteúdos que discutem conceitos abstratos e representativos da matéria (Silva & Santos, 2017, p. 4098).

Assim, concordamos que o ensino de Bioquímica exige mais que o livro e as imagens criadas pelo professor nesse contexto para oportunizar que os estudantes façam a própria representação dos modelos e conceitos, compatíveis e aceitos dentro do campo do conhecimento científico. Por certo, concordamos com Jófili, Sá e Carneiro-Leão (2010, p 436), ao afirmar que “... a aprendizagem é um processo de construção interna e não ocorre, exclusivamente, através da transmissão de conhecimentos feita pelo professor”.

Processos e percursos: confecção, aplicação e análise crítica das animações *Stop Motion*

Ao pensarmos na perspectiva de que as tecnologias da informação e comunicação (TIC) já é um bem global, com o uso amplamente estimulado nas escolas e nos diversos processos de aprendizagem, o *Stop Motion* já não é mais estranho como recurso e estratégia promotores de aprendizagem. Seguindo essa perspectiva, concordamos que as TICs oportunizam diferentes perspectivas de ensino e aprendizagem, em que o maior acesso à internet “disponibiliza para a vida das pessoas autonomia para criar, desenvolver e aperfeiçoar mecanismos que contribuem para a construção de variados conhecimentos” (Lima *et al.*, 2015, p. 03), em que o *Stop Motion* pode traduzir a linguagem usada nos livros que, pela sua complexidade, não faria sentido para os estudantes, recaindo no dilema de se tornarem símbolos a serem memorizados.

Com a produção de vídeos de animação, é possível ampliarmos o ensino com analogias que buscam assemelhar as figuras confeccionadas com aquelas presentes nos processos

microscópicos, cientificamente descritos, confirmando que uma animação “*constitui ferramenta singular no que diz respeito a termos acesso ao arranjo que os alunos fazem do conhecimento que lhes é apresentado, para além daquilo que é possível conferir com as avaliações alicerçadas exclusivamente no universo das palavras*” (Bossler & Caldeira, 2013, p. 478). Nessa lógica, a produção de animações por estudantes nos possibilita constatar o que possuem de síntese e de representações cognitivas sobre os conceitos explorados (Rodrigues & Lavino, 2020). Tal situação assume significado no próprio processo avaliativo, já que as animações expressarão as representações e assimilações de modelos que os estudantes possuem das estruturas.

Seguindo essa lógica, ao analisarmos a produção dos estudantes participantes da SD, registramos questionamentos que embasaram o processo de construção das animações em *Stop Motion*, no fluxo com que iam confeccionando e dando movimento ao material que representava as diferentes reações bioquímicas da respiração aeróbica. Ocorreram comentários como “Professora, qual termo devemos usar, cadeia respiratória ou fosforilação oxidativa?”, “O que significa acceptor final de elétrons?”, “O GTP conta no saldo junto com o ATP?”, “Por que somente o ciclo de Krebs e cadeia respiratória acontecem dentro da mitocôndria?”, “Temos que colocar a quantidade exata de ATPs?”, a esses comentários, entretanto, a professora não forneceu respostas, o que os levou à necessidade de retornar às suas anotações e efetuar novas investigações, o que colaborou com mudanças de decisões e de estratégias para a montagem das estruturas e da sequência dos registros para a animação.

Nessa passagem, observando os registros do professor, avaliou-se que as intervenções anteriores e as novas pesquisas realizadas pelos estudantes com os termos e conceitos científicos durante a confecção das animações colaboraram na assimilação e acomodação, relevantes aos novos rearranjos, para o ancoramento dessas informações e consequente estabelecimento de subsunçores reestruturados (Ausubel *et al.*, 1980). Contudo os novos subsunçores não se faziam ainda suficientemente estruturados de forma a lhes dar significativa representatividade conceitual através da modelarem das estruturas bioquímicas referentes às reações e estruturas moleculares pertencentes ao processo da respiração celular aeróbica. Seriam necessárias ainda intervenções que aproximassem os estudantes, ainda mais, na composição bioquímica em questão, cientes de que tudo se tratava de representações moleculares constituintes de conceitos abstratos e complexos. Mesmo assim, por esse primeiro recorte e descrição da fase inicial da produção das animações, confirma-se que o ensino com a proposta do *Stop Motion*, animações efetivadas na SD, assumiu diferenciação no processo de aprendizagem, pois os estudantes ficaram mais próximos dos conceitos estruturantes do conteúdo, revisitando-o através das fontes e criando suas próprias imagens para tentar alcançar o máximo de consistência e fidedignidade na informação produzida com o vídeo (Lima *et al.*, 2015; Rodrigues & Lavino, 2020).

Já com as animações prontas, o processo nos permitiu aferir mudanças na aprendizagem (Fig. 05) ao nos apropriarmos das decisões que o coletivo das equipes efetuou e das etapas que seguiram para gerar um produto na forma de animações. Para melhor descrevermos e avaliarmos o processo, analisamos a síntese das etapas, representadas em categorias (Quadro 01), em que destacamos os aspectos desejáveis que foram alcançados com a aplicação do *Stop Motion*. Utilizamos como classificação os seguintes adjetivos: “Bom” para quando a equipe estivesse de acordo com o aspecto desejável; “Regular” quando muito resumido e “Não satisfatório” para a equipe que não tivesse desenvolvido o aspecto desejável.

Ao assistir às animações criadas pelos estudantes, foi solicitado que as equipes pudessem opinar, dando sugestões e principalmente fazendo correções sobre o que não estivesse de acordo com as etapas da respiração celular aeróbica. No percurso em que os vídeos eram reproduzidos, foi pedido que fizessem anotações para que, ao final, ocorresse a socialização. Nessa etapa, a observação de erros e equívocos presentes nas animações serviram para detectar as dúvidas que os estudantes possuíam acerca do conteúdo e que não foram superadas nas intervenções durante a confecção das animações – novas pesquisas e interações entre os estudantes – de modo que estas pudessem ser posteriormente esclarecidas pela professora. A maioria desses detalhes/ informações não constava nas fontes que os estudantes haviam trazido para as novas consultas. Mesmo assim, é possível afirmarmos que o conhecimento básico e necessário sobre respiração celular aeróbica, a nível médio, foi alcançado (MEC, 2018). Tal fato vem confirmar compreensão de Bossler e Caldeira (2013, p. 477) quando afirmam que “*os aprendizes, no momento em que buscam dar materialidade ao conhecimento organizado abstratamente, revelam aquilo que conhecem e também o que desconhecem sobre o assunto, ao deixar de representar estruturas ou etapas*”, o que amplia a

importância do professor, em momento oportuno, atuando como facilitador, intervir com outros recursos para correções ou ajustes conceituais quando necessários.



Figura 05- Animação pronta. **Fonte:** Autores, 2019.

Quadro 01 - Aspectos alcançados com a aplicação do *Stop Motion*. A equipe está representada pela letra inicial do nome do representante de cada uma delas. (Quadro construído pela autora, 2019)

Aspectos desejáveis com a produção de <i>Stop Motion</i> .	Equipe F	Equipe N	Equipe C	Equipe H	Equipe R
Local onde ocorre cada etapa.	Bom	Não Satisfatório	Bom	Bom	Bom
Conhecimento básico das estruturas participantes.	Bom	Bom	Bom	Bom	Bom
Detalhamento de cada etapa.	Bom	Regular	Bom	Bom	Bom
Criação própria de acordo com o entendimento.	Bom	Bom	Bom	Bom	Bom
Organização para que a animação fosse compreendida.	Bom	Regular	Bom	Bom	Bom
Ordem correta das etapas.	Bom	Bom	Bom	Bom	Bom
Compreensão básica de cada etapa.	Bom	Bom	Bom	Bom	Bom

Fonte: Autores, 2019.

Como diagnóstico das intervenções executadas na Sequência Didática, destacamos que os diversos equívocos identificados nas construções dos estudantes foram posteriormente socializados e corrigidos (Quadro 02), o que oportunizou a reestruturação cognitiva por novas ancoragens sobre as já realizadas em etapas anteriores, oportunizando novos rearranjos nos subsunçores dos estudantes (Ausubel *et al.*, 1980). A apresentação dos equívocos ao coletivo serviu de propulsor para que revelássemos dúvidas acerca do conteúdo, em que as inferências feitas pela professora desencadeavam as discussões e posteriores reflexões baseada em problematizações. Nesse sentido, os vídeos compartilhados entre as equipes já expressavam o que já tinham construído conceitualmente e cognitivamente como representação esquemática até o momento; como também, oportunizaram perceber o que ainda não construíram sobre as estruturas e o fluxo das reações bioquímicas envolvidas, o que criou espaço oportuno para a professora realizar suas considerações e reorganizações diante do que continha nas animações. De mesma forma, é necessário ponderarmos que as animações compartilhadas e as falas argumentadas entre os estudantes atuaram como reorganizadores, pois, ao observar e analisar o diferencial entre as exposições das equipes – do que uma equipe errou e a outra acertou na representação estrutural e conceitual – melhor auxiliaram as equipes com equívocos de se aproximarem das representações visuais nas animações que se desejava como representação científica, mediando o que se sabia com o que ainda se precisava conhecer (Ribeiro *et al.*, 2012), agindo como processo colaborativo a novas assimilações coerentes à teoria da Aprendizagem Significativa (Ausubel *et al.*, 1980).

Quadro 02 - Análise dos vídeos de *Stop Motion*

Nome representativo das equipes	Equívocos sobre o conteúdo observados no vídeo.
Equipe F	-A enzima desidrogenase piruvato “dissolve” o piruvato; -A cadeia transportadora de elétrons para; -Os H ⁺ saltam junto com os elétrons pelas proteínas.
Equipe N	-O CO ₂ entra no processo para buscar o Carbono.
Equipe C	-Sem equívocos.
Equipe H	-O acetilCoA se forma no citosol; -O Nad ⁺ é que retira o carbono e reage formando CO ₂ .
Equipe R	-Os prótons H ⁺ saltam pelas proteínas, ao invés dos elétrons.

Fonte: A autora, 2019.

Como registro, identificamos que muitos questionamentos e comentários só surgiram após a aplicação da técnica de *Stop Motion*, o que evidencia que “os vídeos educacionais são ferramentas de grande importância para o aluno do tipo visual, mas, que pode atrair o aluno verbal” (Coelho et al., 2017, p. 215). De modo intrínseco, os estudantes, a partir do contato com o real do conteúdo, produzidos por eles, fizeram emergir o que Jófili et al. (2010) chama, em todo o seu texto, de “lacunas conceituais”, de modo que sem essa estratégia talvez se tornasse impossível conhecer os equívocos conceituais dos estudantes.

Detalhamento e análise do segundo questionário

O questionário 2 foi aplicado após a execução da prática e socialização das animações de *Stop Motion* com o objetivo de avaliar o desenvolvimento do conhecimento científico sobre a respiração celular aeróbica, desenvolvida pelos estudantes, em relação ao diagnosticado no primeiro momento de nossas intervenções. Como foi observado no primeiro questionário, a maior dificuldade dos estudantes estava relacionada às duas últimas etapas do processo, ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa. Devido a isso, o Questionário 2 (Apêndice B), com construção posterior ao diagnóstico e análise do primeiro questionário, foi elaborado aumentando-se o número de perguntas acerca destes tópicos, visando à análise do desenvolvimento cognitivo acerca de todas as etapas do processo.

Durante a aplicação do segundo questionário, ao contrário do primeiro, foi visto que todos os estudantes se mantiveram mais concentrados, possivelmente por possuírem novos conhecimentos coerentes em relação aos que já tinham sido questionados, o que oportunizou a construção de respostas mais satisfatórias e demonstrou grau maior de apropriação do conhecimento científico, relativo à temática. Sobre o processo de glicólise, 31 (trinta e um) estudantes conseguiram acertar as duas questões enquanto 5 (cinco) acertaram apenas uma das duas e nenhum errou ou deixou em branco, em comparação aos resultados do Questionário 1. No caso do ciclo de Krebs, 7 (sete) estudantes acertaram quatro das seis questões, 21 (vinte e um) acertaram cinco e 8 (oito) acertaram as seis. Em relação à fosforilação oxidativa, apenas 1 (um) estudante deixou de responder às seis questões, entregando em branco, enquanto 5 (cinco) estudantes acertaram duas questões das seis existentes, 14 (quatorze) acertaram três, 7 (sete) acertaram quatro, 8 (oito) acertaram cinco e 1 (um) estudante acertou as seis (Figura 06).

Observando o resultado das respostas para o Questionário 2, com destaque sobre a fosforilação oxidativa, houve um desenvolvimento bom em comparação ao resultado construído antes da produção das animações com o *Stop Motion*, o que enfatiza que os estudantes não conseguiam assimilar, de forma satisfatória, o conteúdo dessa etapa apenas com leituras próprias, consultas ao livro didático e explanação feita pela professora. Foi perceptível a diferença de comportamento, interesse e segurança nas respostas em relação à fase anterior dos trabalhos feitos com animação. Esses resultados só confirmam “a necessidade de buscar alternativas metodológicas que estimulem a problematização e a contextualização para o ensino de conceitos básicos e que contribuam para a construção do conhecimento” (Alves et al., 2016, p. 101), principalmente quando se referem a processos complexos de conceitos abstratos, pois o processo conjunto das intervenções de

pesquisas, produção, apresentação e socialização das animações entre as equipes proporcionou maior envolvimento e consequente apropriação de conhecimentos científicos pelos estudantes participantes da SD. Como forma de validação de nossos resultados, consequência das intervenções para a confecção das animações, concordamos que “os educadores devem buscar métodos diferenciados e alternativos para o ensino (...), facilitadores do processo de ensino-aprendizagem, permitindo a participação mais ativa dos estudantes” (Glaser, Pierre & Fioreze, 2017, p. 51), em que o processo é diagnosticado, mostrando o percurso evolutivo alcançado por eles.

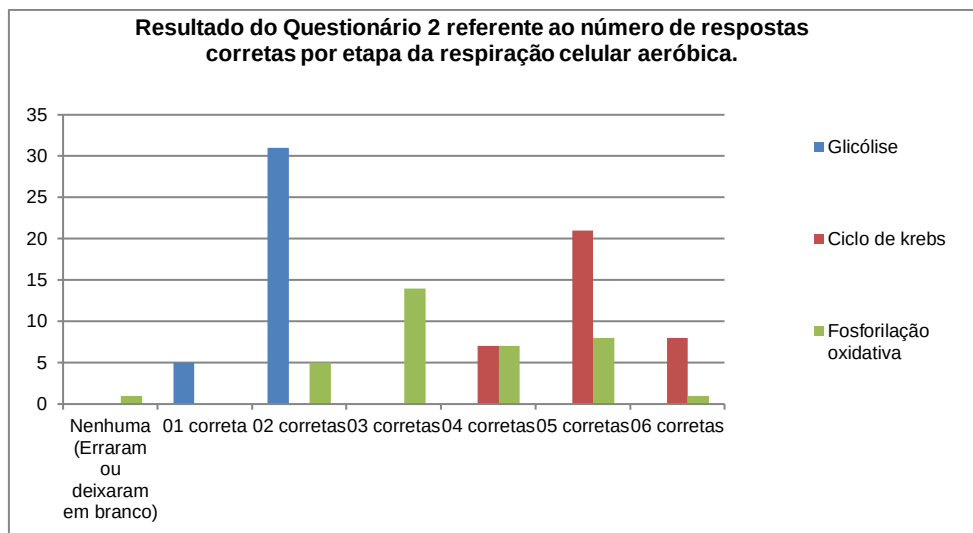


Figura 06 - Resultado do Questionário 2. Fonte: Autores, 2019.

Em uma proposta de avaliação e comparação entre os dois instrumentos diagnósticos, constata-se nitidamente o quanto é evidenciada a apropriação de conhecimentos relativos à respiração celular aeróbica pelos estudantes, auxiliados pelo processo decorrido com a produção das animações em *Stop Motion*. A Figura 07 reflete essa nossa percepção de o quanto construir o percurso para a elaboração das animações, explorado com a SD, oportunizou aos estudantes revisitar conhecimentos sobre a Bioquímica em fontes diversas, não restritas à fala do professor, além do trabalho em equipe, no exercício da argumentação e das trocas de informações (res)significantes e reestruturantes para os conhecimentos que possuíam.

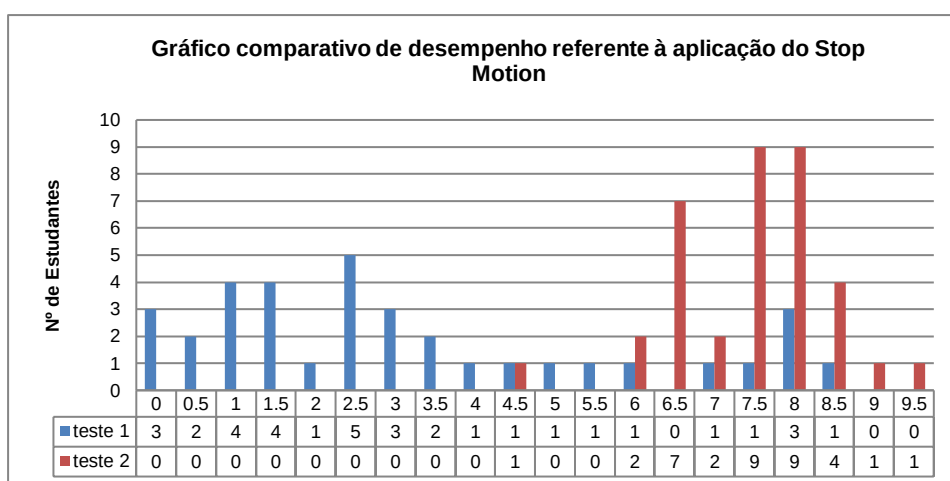


Figura 07 - Resultado total dos Questionários 1 e 2. Fonte: Autores, 2019.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pesquisa inferiu, a partir de questionamentos e exposições de animações, o quanto a técnica de produção e socialização do *Stop Motion* sobre conceitos abstratos e complexos seria uma opção viável para melhorar a compreensão e reconstrução dos modelos mentais sobre as moléculas participantes das reações e processos relacionados ao conteúdo de Bioquímica da respiração celular aeróbica. A realização dessas intervenções como SD com estudantes do Ensino Médio nos permite constatar não só o quanto a interação de pesquisas investigativas, as socializações e a expressão do entendimento construído cognitivamente através das animações permitem ao professor avaliar o antes e o depois, como também compreender o processo de reorganização dos subsunçores dos estudantes pelo ancoramento das novas informações que se acomodam e reorganizam os esquemas mentais dos estudantes, estabelecendo aprendizagens significativas válidas para novas apropriações conceituais. Isso porque conteúdos de Bioquímica exigem, do estudante, múltiplos saberes de forma unificada, ou seja, que todos eles sejam complementares para que possam ser compreendidos, constituindo, assim, o questionamento desta pesquisa. A resposta para a indagação deste estudo é que sejam utilizadas ferramentas que simulem imagens que sejam mais próximas do real e tornem o conteúdo compreensível, de forma que os estudantes criem uma conexão com tais assuntos, estabelecendo conhecimentos coerentes e pertinentes à sua vida e contexto.

A produção de animações a partir da técnica de *Stop Motion* promoveu a materialização de estruturas e reações do processo de respiração celular aeróbica e ampliou a capacidade de abstração requerida pelo conteúdo para que ele mesmo fosse compreendido. A ferramenta é eficaz no processo de ensino-aprendizagem ao trazer uma dinâmica prática para um conteúdo que exige abstração dos estudantes e constante remodelação em suas representações e esquemas mentais. A produção dos vídeos despertou não só o interesse e a participação de todos, mas também desenvolveu a capacidade cognitiva autônoma acerca de vários saberes envolvidos nas reações bioquímicas, o que oportunizou diversas acomodações das novas informações, proporcionadas por facilitadores prévios, esquemas visuais diversos, socializações e retomadas aos modelos que construíram, dando-se conta do que já alcançaram e do que ainda precisaria reestruturar para se aproximarem do que se é pertinente ao conhecimento científico no conjunto de conceitos referentes à Respiração Celular Aeróbica.

Por certo, os equívocos registrados e os comentários feitos durante a socialização das animações serviram para detectar os trechos do conteúdo em que os estudantes tinham mais dúvidas. A socialização e as explicações para esses equívocos complementaram o conhecimento adquirido durante a produção, formalizando a compreensão total do processo. Além da construção do conhecimento pelos estudantes, a produção das animações em *Stop Motion* incentivou o protagonismo, a ludicidade e a troca de ideias dentro de cada equipe. A criação própria também foi verificada durante a construção dos textos e das imagens constituintes de cada etapa da respiração.

Os estudantes atingiram níveis desejáveis de compreensão sobre o processo de respiração celular aeróbica após a aplicação da técnica de *Stop Motion*, confirmando nossa hipótese no que concerne ao efeito positivo para a Aprendizagem Significativa da produção dessas animações, que, embora tenha formalizado conhecimentos básicos de um conteúdo reconhecidamente complexo e abstrato, foi suficiente para o ensino de nível médio.

Agradecimentos

Ao Mestrado Profissional em Ensino de Biologia (PROFBIO) por sua seriedade e oportunidade aos docentes em aperfeiçoar e inovar processos de ensino para a aprendizagem dos estudantes na Educação Básica. Aos docentes, técnicos e estudantes da EREM Dom Acácio Rodrigues Alves, em especial aos estudantes do 3º Ano A, pela disponibilidade e contribuição considerável nas intervenções. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos (código de financiamento 001).

REFERÊNCIAS

- Alves, T. A., Falcão, L. S., Souza, A. T., Amaral, T. S., Lima, S. P., & Carvalho T. B. (2016). Físio card game: um jogo didático para o ensino da fisiologia na educação básica. *Journal of biochemistry education: Revista de Ensino de Bioquímica*, 14(1), 99-120. <https://doi.org/10.16923/reb.v14i1.614>
- Ausubel, D. P., Novak, J. D., & Hanesian, H. (1980). *Psicologia educacional*. (Trad. Eva Nick et al., da 2a ed. Educational psychology: a cognitive view). Rio de Janeiro, RJ: Interamericana.
- Barbosa, M. C., Santos, P. H., Alcoforado, M. G., & Sartore, A. R. (2012). Educando com design de animação: uma metodologia de ensino e aprendizagem. *Revista brasileira de Design da Informação/ Brazilian journal of information design*, São Paulo, 9(1), 21-32. <https://doi.org/10.51358/id.v9i1.112>.
- Bardin, L. (2011). *Análise de conteúdo*. São Paulo, SP: Edições 70.
- Beckhauser, P. F., Almeida, E. M., & Zeni, A. L. B. (2006) O universo discente e o ensino de bioquímica. *Journal of biochemistry education: Revista de Ensino de Bioquímica*, São Paulo, (2) B1-B7. <http://dx.doi.org/10.16923/reb.v4i2.24>.
- Bossler, A. P., & Caldeira, P. Z. (2013). Evidências das aprendizagens em ciências e biologia em atividades de produção de animação com massa de modelar usando a técnica Stop Motion. In.: *Atas do IX Congresso Internacional sobre Investigación en Didáctica de las Ciencias*. (p.474). Girona, Espanha. Recuperada de <https://raco.cat/index.php/Ensenanza/article/view/296144>.
- Canga, J. L., Gonçalves, T. V. O., & Buza, R. G. C. (2010) Ciência e ensino de ciências: ideias e práticas de professores de ciências no ensino médio em cabinda/angola. *Revista de Educação em Ciências e Matemáticas*, Amazônia, 6(12) 23-31. <http://dx.doi.org/10.18542/amazrecm.v7i0.1693>.
- Glaser, V., Pierre, P. M. O., & Fioreze, A. C. C. L. (2017) Estratégias didático-pedagógicas como alternativas para o ensino de Biologia Celular: curso aos professores de escolas públicas de Ensino Médio de Curitiba-SC. *Journal of Biochemistry Education: Revista de Ensino de Bioquímica*, São Paulo, 15(2) 49-74. <http://dx.doi.org/10.16923/reb.v15i2.675>.
- Jófil, Z. M. S., Sá, R. G. B., & Carneiro-Leão, A. M. A. (2010) A via glicolítica: investigando a formação de conceitos abstratos no ensino de biologia. In *Atas do V Congresso Iberoamericano de Educación en Ciencias Experimentales*. Florianópolis, SC, Brasil. Recuperada de https://www.academia.edu/2434978/A_via_glicol%C3%ADtica_investigando_a_forma%C3%A7%C3%A3o_de_conceitos_abstratos_no_ensino_de_biologia
- Lima, G. H., Santos, J. P. J. P., Matias, K. T. G., & Lima, K. E. C. (2015) *Animações Stop Motion no estudo contextualizado do sistema digestivo para o ENEM*. In: *Atas do X Encontro Nacional de Pesquisa em Educação em Ciências*. Águas de Lindóia, SP, Brasil. Recuperada de <http://www.abrapecnet.org.br/enpec/x-enpec/anais2015/resumos/R0625-1.PDF>
- MEC – Ministério da Educação. (2018). *Base Nacional Comum Curricular: Educação é a base*. Brasília: MEC. Recuperada de http://basenacionalcomum.mec.gov.br/images/BNCC_EI_EF_110518_versaofinal_site.pdf.
- Nascimento, J. M. (2016). *Stop Motion como estratégia metodológica aplicada ao ensino de Biologia: Relato de experiência didática no âmbito do PIBID*. 28f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas)- Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2016. Recuperada de <http://dspace.bc.uepb.edu.br/jspui/handle/123456789/10171>
- Oliveira, F. G. (2010). *Panorama e proposições da animação em Stop Motion*. Dissertação (Mestrado em Processos e Sistemas Visuais, Educação e Visualidade) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 217 f. Recuperada de <https://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tde/2834>
- Pinheiro, W. A., & Pompilho, W. M. (2011). O ensino de enzimas: uma abordagem experimental de baixo custo. *Journal of Biochemistry Education: Revista de Ensino de Bioquímica*, São Paulo, (1) A1-A8. <http://dx.doi.org/10.16923/reb.v9i1.43>

- Ribeiro, R. J., Silva, S. C. S., & Koscianski, A. (2012). Organizadores prévios para aprendizagem significativa em Física: o formato curta de animação. *Revista Ensaio*, Belo Horizonte, v. 14(3) 167-183. <http://dx.doi.org/10.1590/1983-21172012140311>
- Rodrigues, E. V., & Lavino, D. (2020). Modelagem no ensino de Física via produção de *Stop Motion*, com o computador Raspberry Pi. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, 42, e20190012. <http://dx.doi.org/10.1590/1806-9126-rbef-2019-0012>
- Sarmiento, A. C. H., Muniz, C. R. R., Silva, N. R., Pereira, V. A., Santana, M. A. S., Sá, T. S., & El-Hani, C. N. (2013). Investigando princípios de *design* de uma sequência didática sobre metabolismo energético. *Ciência e Educação*, Bauru, 19(3) 573-598. <https://doi.org/10.1590/S1516-73132013000300006>.
- Scatigno, A. C., & Torres, B. B. (2016). Diagnósticos e intervenções no ensino de bioquímica. *Journal of Biochemistry Education: Revista de Ensino de Bioquímica*, 24(1) 19-51. <http://dx.doi.org/10.16923/reb.v14i1.626>.
- Shaw, S. (2012). *Stop Motion: Técnicas manuais para animação com modelos*. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier..
- Silva, C. N., & Santos, V. S. (2017). O açaí como contexto para uma aula de bioquímica na educação de jovens e adultos da amazônia. In.: X Congresso Internacional sobre *investigación en Didáctica de las Ciencias*. Sevilla, Espanha. Recuperada de <https://core.ac.uk/download/pdf/147042872.pdf>
- Silva, R. F., & Correa, E. S. (2014) Novas Tecnologias e Educação: a evolução do processo de ensino e aprendizagem na sociedade contemporânea. *Educação & Linguagem*, 1(1) 23-35. Recuperada de <https://www.fvj.br/revista/wp-content/uploads/2014/12/2Artigo1.pdf>
- Vieira, L. Q., Nicoli, J. R., Prado, V. F., Santoro, M. M., Teixeira, S. M. R., Bemquerer, M., & Beirão, P. S. L. (2001) Abordagem Prática Para o Ensino de Bioquímica. *Journal of Biochemistry Education: Revista de Ensino de Bioquímica*, (1), 1-7. <http://dx.doi.org/10.16923/reb.v1i1.6>

Recebido em: 05.02.2021

Aceito em: 05.08.2021

APÊNDICE A – MODELO DE QUESTIONÁRIO 1



EREM – XXXXXXXXXXXXXXXXXX

Aluno(a): _____
Série: _____ Mestranda: XXXXXXXXXXXXXXXXXX

Teste de Sondagem - 1

- Quais os locais em que acontece cada fenômeno: glicólise, ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa?

- Qual a substância resultante do processo de glicólise?

- Por que ao final do processo de glicólise consideramos um saldo energético de duas moléculas de ATP?

- Explique o real motivo do processo de glicólise ser classificado como anaeróbico?

- Qual a função da CoA (coenzima A)?

- O ciclo de Krebs também recebe outro nome? Se sim, diga qual e por quê?

- Quais as funções das moléculas de NAD⁺ e FADH?

- Especifique a diferença entre GTP e ATP e a função das mesmas:

- Em que local da célula acontece o ciclo do Krebs?

- Em qual dos três processos da respiração celular aeróbica ocorre a formação de CO₂ (Gás Carbônico)?

- Em que local da célula acontece a fosforilação oxidativa?

- Para que serve a cadeia transportadora de elétrons e a diferença na concentração de prótons?

- Quais as proteínas participantes do processo de fosforilação oxidativa?

- Explique a formação do ATP pelo processo da cadeia respiratória:

APÊNDICE B – MODELO DE QUESTIONÁRIO 2



EREM – XXXXXXXXXXXXXXXXXX

Aluno(a): _____
Série: _____ Mestranda: XXXXXXXXXXXXXXXXXX

Teste de Sondagem - 2

- Em qual dos processos da respiração celular aeróbica ocorre a formação de ácido pirúvico?

- Por que dizemos que existe a fase de pagamento no processo de glicólise?

- Qual das etapas de respiração celular aeróbica ocorre a utilização do O₂?

- Qual o objetivo das moléculas de NADH e FADH₂?

- Em que processo ocorre a oxidação do piruvato em CO₂?

- Qual o resultado da junção da Acetil-CoA com o ácido oxalacético?

- Sabemos que o resultado da respiração também é a produção de CO₂. Em quais dos processos da respiração celular aeróbica o mesmo é produzido?

- Qual o saldo de ATP's no final dos 2 primeiros processos da respiração celular aeróbica?

- O que você entende por fosforilação oxidativa?

- Por que a cadeia transportadora de elétrons só acontece na crista mitocondrial?

- Quanto hidrogênio e elétrons são apreendidos pelas moléculas transportadoras?

- O ácido oxalacético reage com a acetil-CoA formando ácido cítrico. O que ocorre com este ácido no final do processo?

- Explique como funciona a ATP-sintase:

- Qual a função do gás oxigênio durante a fosforilação oxidativa?



BIOMEDICAL SCIENCES

4-amino-2-phenyl-6-(*p*-fluorophenyl)-5-carbonitrile-pyrimidine-bis-substituted-loaded liposomes as promising system for cancer treatment

JANICE V. OLIVEIRA, GLEYBSON C. ALMEIDA, MARIANE C.B.L. NOGUEIRA, FRANCISCO C.A. AGUIAR JÚNIOR, AUDENES O. MELO, THIAGO D.S. SILVA, NOEMIA P.S. SANTOS, NEREIDE S.S. MAGALHÃES, SEBASTIÃO J. MELO & EMERSON P.S. FALCÃO

Abstract: The aim of the present study was to perform *in vitro* and *in vivo* assessments of the antineoplastic action of 4-amino-pyrimidine encapsulated in liposomes. Liposomes were prepared and characterized for particle size and drug encapsulation and submitted to long-term stability tests. Cytotoxicity assays were performed in HeLa cells. Antineoplastic activity was investigated using the experimental sarcoma 180 tumor in Swiss albino mice. Encapsulation efficiency was $82.93 \pm 0.04\%$ and no significant changes were found with respect to particle size or pH after centrifugation and mechanical agitation tests. The *in vitro* results at concentration of $20 \mu\text{g/mL}$ indicated a considerable reduction in cell viability after treatment with encapsulated pyrimidine (75.91%). The *in vivo* assays using the compounds in encapsulated and free forms and 5-fluorouracil achieved tumor inhibition rates of $66.47 \pm 26.8\%$, $50.46 \pm 16.24\%$ and $14.47 \pm 9.22\%$, respectively. Mitotic counts demonstrated a greater reduction in the number of mitoses in animals treated with liposomal pyrimidine (32.15%) compared to those treated with the pyrimidine free (87.69%) and 5-fluorouracil (71.39%). This study demonstrated that the development of liposome formulations containing 4-amino-pyrimidine is a promising alternative for overcoming limitations related to the toxicity of current cancer treatment, ensuring greater therapeutic efficacy.

Key words: Antitumor activity, hela cells, liposomes, mitotic count, pyrimidine.

INTRODUCTION

Cancer comprises a group of diseases characterized by the uncontrolled multiplication of cells capable of developing and spreading tumors throughout the body (Pérez-Herrero & Fernández-Medarde 2015). According to the World Health Organization (WHO), cancer was the first or second leading cause of death before age 70 in 112 countries in 2019 and ranked third or fourth in 23 other countries (Sung et al. 2021). Despite considerable progress in cancer therapy,

GLOBOCAN reports that around 19.3 million new cases of cancer occurred worldwide in 2020, with almost 10.0 million deaths and an expected increase to 28.4 million by 2040 (Sung et al. 2021).

Chemotherapy is the main form of treatment for most malignant tumors due to its ability to reach metastatic cells. However, this treatment modality has numerous side effects (Jesus et al. 2016). To find drugs that are effective at resisting anti-tumor cells and can reduce the occurrence of side effects caused by the use of

current anticancer drugs, new molecules lethal to neoplastic cells are under development, most of which have heterocycles in their structure, especially pyrimidines (Zarenezhad et al. 2021). The pyrimidine nucleus is one of the constituents of DNA and RNA chains in living beings (Jubeen et al. 2018) and is found in the scaffold of drugs widely used against diseases such as cancer, i.e., 5-fluorouracil (5-FU) (Vodenkova et al. 2020), and AIDS, i.e., zidovudine (de Clercq 2010). The pyrimidine nucleus has also been the object of numerous studies for the development new prototypes with several biological activities (de Coen et al. 2016), such as antibacterial (Verbitskiy et al. 2015), anticancer (Zarenezhad et al. 2021), antiviral (Zhuang et al. 2020) and antiparasitic (de Melo et al. 2018).

Despite considerable advances in the production of molecules for cancer therapy, directing the action to neoplastic cells is a line of research of considerable growth (Pérez-Herrero & Fernández-Medarde 2015) and has achieved success in overcoming harm to non-neoplastic cells. Such studies are based on the production of drug delivery systems (Dianat-Moghadam et al. 2018). Nano-encapsulation systems, such as liposomes, improve the solubility of substances, serving as carriers to the target, promote better stability of the compound within the body by interfering with the process of biodegradation or systemic biodistribution and favor the pharmacokinetics of therapeutic agents, which would drastically decrease the therapeutic index and, consequently, the toxic effects of drugs (Belfiore et al. 2018).

De Melo et al. (2002) developed pyrimidine prototypes using derivatives with numerous biological activities. The present study involves the encapsulation of 2-phenyl-4-amino-6-(*p*-fluorophenyl)-5-carbonitrile-pyrimidine (Pyr-Free) and the use of this encapsulated compound in studies with the HeLa cell line

(cervical epithelial carcinoma) and sarcoma 180. Sarcoma-180 was discovered in 1914 as a solid mass in the right armpit of a white mouse (Qi & Xu 2006). The tumor invades skeletal muscle, fatty tissue, nerves and blood vessels. Despite its locally aggressive behavior, this neoplasm does not metastasize (Kurashige & Mitsuhashi 1982). Thus, the aim of the present study was to investigate the optimization of the antineoplastic potential of 4-amino-pyrimidinic-bis-substituted derivatives.

MATERIALS AND METHODS

Materials

The synthesized 4-amino pyrimidine compound was kindly supplied by the Research Group on New Bioactive Drugs and Natural Products supervised by Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão. Cholesterol (CHO), stearylamine (SA) and 5-FU were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, USA). Soybean phosphatidylcholine (PC) was obtained from Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany). Methanol and chloroform were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Aqueous solutions were prepared with purified water obtained from the Human UP 900 purification system (Human Corporation, Seoul, Korea).

Synthesis of pyrimidine compounds

The pyrimidine derivative was produced by the Research Group on New Drugs and Bioactive Natural Products through consecutive reactions (Figure 1) using the method described by de Melo et al. (2002). An appropriate aromatic aldehyde initially (Figure 1a) reacted with malononitrile (Figure 1b) to give substituted bisnitrile (Figure 1c), which was purified and crystallized and then reacted with an amidine (Figure 1d), yielding the compound Pyr-Free (Figure 1e). The synthetic reaction was monitored by thin

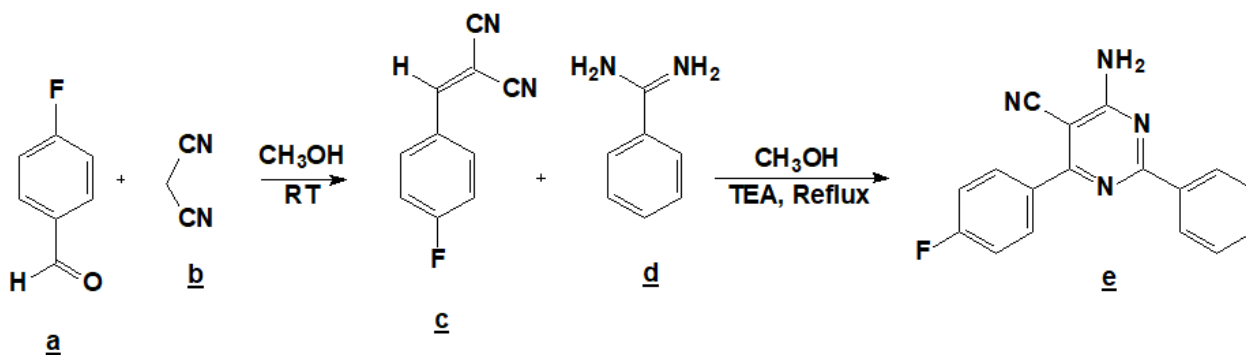


Figure 1. Reaction scheme. **a**: Aromatic aldehyde; **b**: Malononitrile; **c**: Substituted bisnitrile; **d**: Amidine; **e**: 2-Phenyl-4-amino-5-carbonitrile-6-(*p*-fluorophenyl)-pyrimidine.

layer chromatography (TLC). The synthetic structure was confirmed by the common technique of mass spectrometry (Delsi-Nermag mass spectrometer coupled to a HP 5890 gas chromatograph), Nuclear Magnetic Resonance (NMR) (UNITY spectrophotometer, Varian model), infrared spectrometry (Burker spectrometer, IFS 66 model) and the melting point (Electrothermal digital - model 9100).

Preparation of liposomes containing 2-phenyl-4-amino-6-(*p*-fluorophenyl)-5 carbonitrile-pyrimidine compound

Liposomes containing the 4-amino-pyrimidine-bis-substituted compound (Pyr-LIPO) were prepared using the hydration lipid film method (Lira et al. 2009). Lipids (PC, CHO and SA - 7:2:1, 42 mM) and the pyrimidine derivative (10 mg) were solubilized in a mixture of chloroform and methanol (3:1 v/v). The mixture was submitted to vacuum evaporation for complete elimination of the organic solvents and consequent formation of a thin lipid film. The film was then hydrated with 10 mL of 7.4 pH phosphate buffer to form Multilamellar Lipid Vesicles (MLVs). Small Unilamellar Vesicles (SUVs) were obtained from the sonication of the MLVs (Vibra cell, BRANSON, USA) at 200 W and 40 Hz for 300 s.

Characterization of liposomes containing 2-phenyl-4-amino-6-(*p*-fluorophenyl)-5-carbonitrile-pyrimidine compound

The following physicochemical characteristics of the Pyr-LIPOs were analyzed: macroscopic appearance, pH, particle size, polydispersity index (PDI), zeta potential and drug encapsulation efficiency. Pyr-LIPOs were checked at predetermined times to determine stability.

In the study of physical stability under forced conditions, the preparations were submitted to stress conditions to simulate processes such as those occurring during transport and storage (Lapenda et al. 2012). For such, the formulations were aliquoted and subjected to centrifugation at 6000 rpm for 1 h at $4 \pm 1^\circ\text{C}$ (KN-70 centrifuge, Kubota, Japan), simulating the accelerated passage of time. For the mechanical stress tests, the samples were placed into a microtube, immersed in a water bath and subjected to horizontal shaking at 180 vibrations/min at a controlled temperature of $37 \pm 1^\circ\text{C}$ for 48 h (Polytest® 20 Bioblock Scientific, France) to simulate transport conditions. Stability tests were conducted at predetermined times (0, 7, 15 and 30 days) (Santos-Magalhães et al. 2000) and the formulations were maintained at 4°C and under atmospheric pressure.

Macroscopic analysis was performed to observe changes in the general appearance of the preparations, such as homogeneity, color, viscosity, deposition of materials, formation of crumbs, cremating, flocculation, coalescence and separation of phases. Particle size and the polydispersity index were determined by photon correlation spectroscopy using a laser particle size analyzer (Beckman Coulter, UK). For such, three samples of each liposome (50 μ L) formulation were diluted in ultra-pure water (950 μ L) (Lapenda et al. 2012). The zeta potential (surface charge of vesicles) was measured by determining electrophoretic mobility (Nanotrac[®], USA). Three 50- μ L samples were diluted in 950 μ L of ultrapure water. All results were expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD).

Drug content and encapsulation efficiency were analyzed by UV-Vis spectrophotometry (Ultrospec[®] 3000 pro, Amersham Biosciences, Sweden). Analyses were performed in triplicate and values were expressed as mean $\pm$ SD. The content of the 4-amino-pyrimidine-bis-substituted compound was quantified by withdrawing an aliquot of the liposome suspension (20 μ L), which was dissolved in methanol and sonicated for 5 min. The compound was then quantified by spectrophotometry (260 nm) using the standard 4-amino-pyrimidine-bis-substituted curve with concentrations ranging from 0.5 to 5 μ g/mL in methanol.

Encapsulation efficiency was determined by the ultrafiltration/ultracentrifugation technique (Andrade et al. 2004, da Silva Santos et al. 2006) using Microcon[®] units (Millipore, USA). An aliquot of the liposome formulation (400 μ L) was centrifuged at 10,000 rpm for 1 h at 4 °C. The filtrate was quantified by UV-Vis spectrophotometry (260 nm). Encapsulation efficiency was calculated by the equation $EE\% = ((\text{total 4-amino-pyrimidine-bis-substituted compound}) - (\text{4-amino-pyrimidine-bis-substituted free}) /$

(total of 4-amino-pyrimidine-bis-substituted compound)) $\times$ 100%.

Cell culture

In vitro assays were performed at the NanoBioCel Laboratory (UFPE – CAV) using the HeLa cell line in the exponential growth phase. The cells were obtained from the Cell Bank of Rio de Janeiro (BCRJ), cultured in a DMEM culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% antibiotic solution (penicillin 1000 IU/mL + streptomycin 250 mg/mL) and 1% L-glutamine 200 mM and incubated at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere with 80% humidity.

Determination of cell viability

Cell viability was determined using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (Mosmann 1983), which is based on the reduction of the yellow salts of tetrazolium by mitochondrial reductase from metabolically active cells. Purple crystals are formed intracellularly, which are solubilized and further analyzed by UV-visible spectrophotometry. A lower MTT reduction and lower spectrophotometric signal indicate lower cell viability.

The cell suspension (10⁵ cells/mL) was distributed in a 96-well culture plate (198 μ L/well). The plates were incubated at 37 °C in an incubator (Sedas, Milan-Italy) with a humid atmosphere enriched with 5% CO₂. After 24 h of incubation, the 4-aminopyrimidine-bis-substituted compound in its free form (DMSO-diluted) and encapsulated forms, in addition to 5-FU, were diluted in DMEM to obtain final concentrations of 20, 10, 5 and 2.5 μ g/mL. Next, 22 μ L of each solution were added to the wells. Untreated cells were used as control. The cytotoxic effects of the test samples were assessed after 72 h and the cells were incubated for 3 h with MTT for further reading. Absorbance

was read using a plate reader at a wavelength of 490 nm. Mean absorbance of the control group was considered 100% viability. Thus, the results were assessed by determining the inhibition of cell proliferation in relation to the control. Each test was performed three times. In the analyses, the results were expressed as a mean $\pm$ SD and were interpreted using analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's correction to identify significant differences ($p < 0.05$). Statistical analysis was performed with the aid of the GraphPad Prisma 5.0 program.

***In vivo* antitumor assay**

Experimental animals

Male Swiss albino (*Mus musculus*) mice aged 35 to 60 days with a mean weight of 30.0 g ($n = 24$) were acquired from the Keizo Asami Immunopathology Laboratory (UFPE) and kept at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ under a natural 12-h light/dark photoperiod with free access to water and food throughout the experiment. The animals were distributed in groups according to experimental design (negative control group treated with saline, positive control groups treated with 5-FU, Pyr-free and Pyr-LIPO). The experiments were conducted in accordance with the protocol of the UFPE Ethics Commission on Animal Experimentation (Recife, Brazil) (process no. 23076.050686/2012-43).

Antitumor activity of 4-amino-pyrimidine-bis-substituted compound in free and encapsulated forms

The *in vivo* antitumor activity of the 4-amino-pyrimidine-bis-substituted compound was assessed in its free and encapsulated forms against sarcoma 180. Tumor cells ($5.0 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ cells) in ascitic form were obtained by puncture and subcutaneous inoculation in the right axillary region of the mice. The test was

performed with four groups of six animals each (negative control group treated with saline, positive control group treated with 5-FU, Pyr-free and Pyr-LIPO). Treatment began 24 h after tumor inoculation and was carried out for seven consecutive days. Injections of free 4-amino-pyrimidine-bis-substituted solutions and encapsulated in liposomes at a dose equivalent to 15 mg/Kg of body weight, 5-FU (positive control) at a dose of 20 mg/Kg and weight-dependent placebos (saline) were given intraperitoneally. The therapeutic doses were studied previously (Da Silva et al. 2008, Falcão et al. 2006) The 4-amino-pyrimidine-bis-substituted compound was dissolved in a solution of 2.5% Tween 80 in sterile 0.9% NaCl solution.

After one week of treatment, the animals were sacrificed with an overdose of urethane (1.25 g/kg). The tumors were removed and weighed prior to microscopic analysis. Tumor inhibition was determined from the mean tumor weight of the groups of treated animals relative to the untreated control group using the following equation: $\text{IT\%} = (C - T / C) \times 100\%$, in which C is the mean tumor weight of the animals from the control group (saline solution) and T corresponds to the mean tumor weight of the animals in the treated groups (Pyr-free, Pyr-LIPO and 5-FU).

Mitotic counts

The tumors were removed and submitted to mitotic count analysis. The tissues were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Sections were cut using a microtome set to $4 \mu\text{m}$ and submitted to hematoxylin-eosin staining. The histological images of the slides were captured by a digital camera (Moticam 3.0) coupled to the optical microscope (Nikon-E200) with a fixed focus and field clarity, obtaining 10 fields per slide with a final magnification of 400 x. The photomicrographs were evaluated using

ImageJ version 1.44 (Research Services Branch, US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). In each field, the number of mitoses were counted and determined as the mean number of mitoses per tumor. To create the graph, the values were normalized to the control, which was considered equal to 100%. The data from the histomorphometric analysis were statistically analyzed. The results were expressed as a mean $\pm$ SD and were interpreted using ANOVA with Tukey's post hoc test to identify significant differences ($p < 0.05$). Statistical analysis was performed with the aid of the GraphPad Prisma 5.0 program.

RESULTS AND DISCUSSION

Preparation and characterization of liposomes

Pyr-LIPO (1 mg/mL) was prepared using the lipid film hydration method, which is suitable for the encapsulation of liposoluble substances, as the low polarity makes these substances insoluble in aqueous solutions (identified by solubility

tests). The organic phase (chloroform:methanol) was added and the compound could then be incorporated into the liposome membranes (Frézard et al. 2005). After the preparation process, the liposome formulations had an opaque, homogeneous milky appearance with an evident Tyndall effect, confirming the presence of SUVs (Lapenda et al. 2012). A stability study was performed to analyze the behavior of the 4-amino-pyrimidine-bis-substituted compound in the formulations. A previous study demonstrated an interesting interaction between 4-amino pyrimidine compounds and lipid membranes (Luna et al. 2011), avoiding possible drug precipitation. Macroscopic aspects, particle size, PDI and pH of the formulations were analyzed in the study of physical stability in forced conditions (Table I), as recommended in the literature (Batista et al. 2007). The liposome formulations containing the 4-amino-pyrimidine-bis-substituted compound did not present changes in visual appearance

Table I. Study of physical stability in forced conditions of liposomes containing 4-amino-pyrimidine-bis-substituted compound.

PARAMETERS	Unloaded-LIPO	Pyr-LIPO
INITIALS	Φ : 138.45 $\pm$ 25.04 PDI: 0.32 $\pm$ 0.04 pH: 6.53 $\pm$ 0.05 macroscopic evaluation: no changes	Φ : 270.04 $\pm$ 24.94 PDI: 0.39 $\pm$ 0.10 pH: 7.17 $\pm$ 0.23 macroscopic evaluation: no changes
CENTRIFUGATION	Φ : 149.55 $\pm$ 9.83 PDI: 0.31 $\pm$ 0.05 pH: 7.34 $\pm$ 0.13 macroscopic evaluation: no changes	Φ : 276.90 $\pm$ 35.21 PDI: 0.34 $\pm$ 0.05 pH: 7.16 $\pm$ 0.16 macroscopic evaluation: no changes
MECANIC STRESS	Φ : 103.82 $\pm$ 8.73 PDI: 0.36 $\pm$ 0.01 pH: 6.58 $\pm$ 0.10 macroscopic evaluation: no changes	Φ : 285.18 $\pm$ 20.88 PDI: 0.38 $\pm$ 0.02 pH: 7.41 $\pm$ 0.13 macroscopic evaluation: no changes

Φ : Particle size; PDI: Polydispersity Index; pH: Hydrogenic potential; Micro and macroscopic analysis: homogeneity, color, viscosity, deposition of material, formation of lumps, flocculation, coalescence and separation of phases.

and were stable during centrifugation and mechanical stress, as shown in Table I.

Stability tests at predetermined times (Table II) performed over a 30-day period demonstrated no macroscopic changes and the formulations maintained the characteristics presented after preparation. The diameter of the liposomes containing 4-amino-pyrimidine-bis-substituted ranged from 270.04 ± 24.94 (Day 0) to 341 ± 25.32 (Day 30), with PDI values around 0.37. The diameter increased due to the presence of the lipolytic substance (Chorilli et al. 2007). Moreover, the discrete increase may be related to the tendency of the particles to aggregate over time (Schaffazick et al. 2003). No significant changes were found in the PDI, indicating homogeneity in the distribution of vesicle size (Chorilli et al. 2007). A slight decrease in pH was found between the onset of the test (7.17 ± 0.23) and the last day of assessment (6.61 ± 0.12). However, these variations do not constitute instability in the formulations.

The pyrimidine-loaded liposomes had a zeta potential value of 37.7 ± 2.26 , whereas the unloaded liposomes had a potential of 37.5 ± 1.62 . The presence of positively charged lipid stearylamine in the bilayer composition gives liposomes a positively charged surface. The similar zeta potentials of the pyrimidine-loaded

and unloaded liposomes indicate no drug on the surface of the liposomes, remaining in the lipid bilayer, as expected. Liposomes with negative or positive zeta potential values above 30 mV are stable in suspensions, as repulsive forces prevent the aggregation of the vesicles (Calvo et al. 1997, Schaffazick et al. 2003). Divergent opinions are found in the literature regarding the interaction between the charge of the nanocarrier and tumor. However, Honary & Zahir (2013) found that nanoparticles with a positive charge are preferentially absorbed by tumor cells and retained for a longer time compared to neutral or negative nanoparticles. The authors also found that a more positive nanoparticle surface led to stronger bonds between the nanoparticle and plasma membrane of tumor cells, which are generally anionic. Thus, the positive zeta potential values likely determine that the liposomes developed in this investigation contribute to the increase in the antitumor activity of the pyrimidine compound.

Encapsulation efficiency calculated by relating the total and free percentage of the compound was 82.93 ± 0.04 . The standard curve equation was $Y = 0.1675X + 0.0442$, in which the X axis is the concentration of liposome (dissolved in analytical grade methanol) and the Y axis

Table II. Study of stability at predetermined times (0 to 30 days) of blank liposomes and liposomes containing 4-amino-pyrimidine-bis-substituted compound.

(days)	Unloaded LIPO			Pyr-LIPO		
	ϕ	PDI	pH	ϕ	PDI	pH
0	138.45 ± 25.04	0.32 ± 0.04	6.53 ± 0.05	270.04 ± 24.94	0.39 ± 0.10	7.17 ± 0.23
7	151.86 ± 26.31	0.26 ± 0.03	6.22 ± 0.02	287.88 ± 20.58	0.37 ± 0.01	7.12 ± 0.39
15	151 ± 27.47	0.31 ± 0.18	6.01 ± 0.11	295.74 ± 73.10	0.36 ± 0.03	6.58 ± 0.04
30	170 ± 12.94	0.33 ± 0.05	6.02 ± 1.33	341.35 ± 25.32	0.36 ± 0.02	6.61 ± 0.12

Formulations maintained at 4 °C and under atmospheric pressure. ϕ : Particle size; PDI: Polydispersity Index; pH: Hydrogenic potential.

corresponds to absorbance at the wavelength of 203 nm, with an $R^2 = 0.9885$.

Cell viability study

The viability study with the HeLa cell line was performed to assess the effect of the 4-amino-pyrimidine-bis-substituted compound in its free and encapsulated forms and 5-FU, which is a drug with known activity. Figure 2 demonstrates the cell viability of HeLa versus the compounds tested. An increase in the concentration of the compounds generated a decrease in cell viability, denoting increased mortality, as reported in the literature (Moghimi et al. 2018). Pyr-LIPO exhibited greater cytotoxicity compared to the other compounds tested at concentrations of 5, 10 and 20 $\mu\text{g/mL}$. This result is in agreement with data described in the literature (Mirgorodskaya et al. 2020), showing an increase in the therapeutic efficacy of compounds when encapsulated.

Cytotoxic activity of the compounds was determined according to the National Cancer Institute (NCI) scale (Cocco et al. 2006). Compounds are considered to lack cytotoxic activity when inhibition is in the range of 1-20% and exhibit little activity when between 20 and 50%, moderate activity when inhibition is 50 to 70% and high activity when the inhibition range

is between 70 to 100%. Therefore, the compound encapsulated at the concentration of 20 $\mu\text{g/mL}$ had high activity (75.91%), while the free compound at the same concentration had little activity (46.63%) and 5-FU had moderate activity (60%). These data underscore the advantages of liposomes and are in agreement with the results of the analyses carried out in this study, demonstrating that the compound encapsulated in liposomes has greater cytotoxicity at lower concentrations compared to the other compounds tested, even 5-FU.

Study of antitumor activity *in vivo*

In addition to the 4-amino-pyrimidine-bis-substituted compound in its free and encapsulated forms, we used 5-FU as a positive control in this study because this drug has been shown to be clinically effective against cancer in mice and humans (Zhang et al. 2012) and is a pyrimidine analog, thus a possible mechanism of action may be attributed to the drug. The doses used were defined based on preliminary studies conducted by Falcão et al. (2006) with the aim of defining the toxicity of some pyrimidine derivatives, demonstrating that these derivatives have low toxicity. Thus, a minimal dose capable of producing an antitumor effect was defined

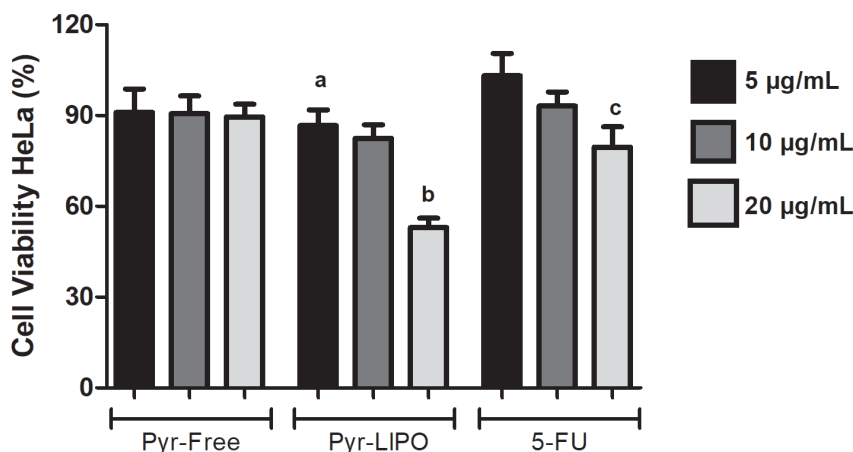


Figure 2. Viability of HeLa cells exposed to free pyrimidine (Pyr-Free), encapsulated pyrimidine (Pyr-LIPO) and 5-fluorouracil (5-FU). Statistically significant differences between groups determined by ANOVA with Bonferroni correction, * $p < 0.05$. Data expressed as mean $\pm$ SD of three independent experiments. "a" significantly less than 5-FU at same concentration; "b" significantly less than Pyr-Free and 5-FU at same concentration; "c" significantly less than Pyr-Free.

for this study. Antitumor activity was calculated by comparing the mean weight of the tumors from the various experimental groups to that of the control group. After treatment, a change was found in tumor weight (Figure 3). A greater reduction was found in the group treated with liposomes containing the 4-amino-pyrimidine-bis-substituted compound (1.42 ± 1.14 g), compared to its free form (2.10 ± 0.69 g) and 5-FU (3.63 ± 0.39 g). The animals in the control group had tumors with a mean mass of 4.24 ± 0.91 g. These results demonstrate that Pyr-LIPO produced a greater regressive effect on tumor mass than Pyr-Free and even 5-FU, which has recognized antitumor activity.

The animals treated with Pyr-LIPO presented satisfactory tumor inhibition of $66.47 \pm 26.8\%$ (Figure 4). According to the NCI, tumor inhibition rates above 60% are considered satisfactory. The suspension compound achieved $50.46 \pm$

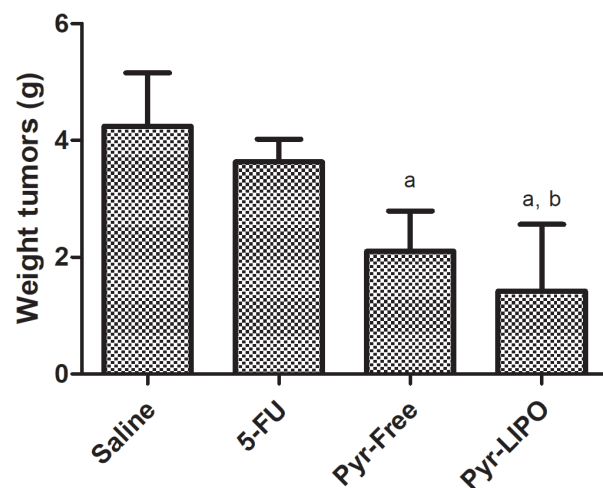


Figure 3. Tumor weight in groups treated with saline solution, 20 mg/kg body weight of 5-fluorouracyl (5-FU) and 15 mg/kg body weight of free (Pyr-Free) and encapsulated 4-amino-pyrimidine-bis-substituted compound (Pyr-LIPO). Statistically significant differences between groups determined by ANOVA followed by Tukey's post hoc test, * $p < 0.05$. Data expressed as mean $\pm$ SD of three independent experiments. "a" significant difference compared to saline group; "b" significant difference compared to 5-FU group.

16.24% inhibition, whereas inhibition in the 5-FU group was $14.47 \pm 9.22\%$, which was less than that produced by the compound tested. The antitumor activity of compounds containing the pyrimidine scaffold has been described in the literature and is attributed to the presence of the pyrimidine ring and *p*-fluorophenyl region (Muthuraja et al. 2019).

The increase in the effectiveness of these compounds when encapsulated, however, has not previously been reported in the literature, although some studies report that liposomes are able to increase the effectiveness of the substances they encapsulate. Pyrimidine derivatives, such as CDK inhibitors, α -TNF inhibitors, protein tyrosine kinase inhibitors, kinase inhibitors (PI-3 and AKT) and cytokine inhibitors, have potent antitumor activity (Xie et al. 2009). 5-FU, which is a pyrimidine analogue, mainly interferes with thymidylate synthesis (Zhang et al. 2012). It is possible that the 4-amino-pyrimidine compound studied has a similar mechanism of action, but additional data are needed to infer the specific mechanism with certainty.

The increased inhibition found with the 4-amino-pyrimidine compound when encapsulated demonstrates that liposomes may be suitable carriers for this class of compounds used for antitumor therapy due to the ability to enhance drug effectiveness (Pérez-Herrero & Fernández-Medarde 2015). It is possible that this effect is due to a change in the pharmacokinetics and biodistribution of the drug, as documented for other antineoplastic drugs (Dianat-Moghadam et al. 2018).

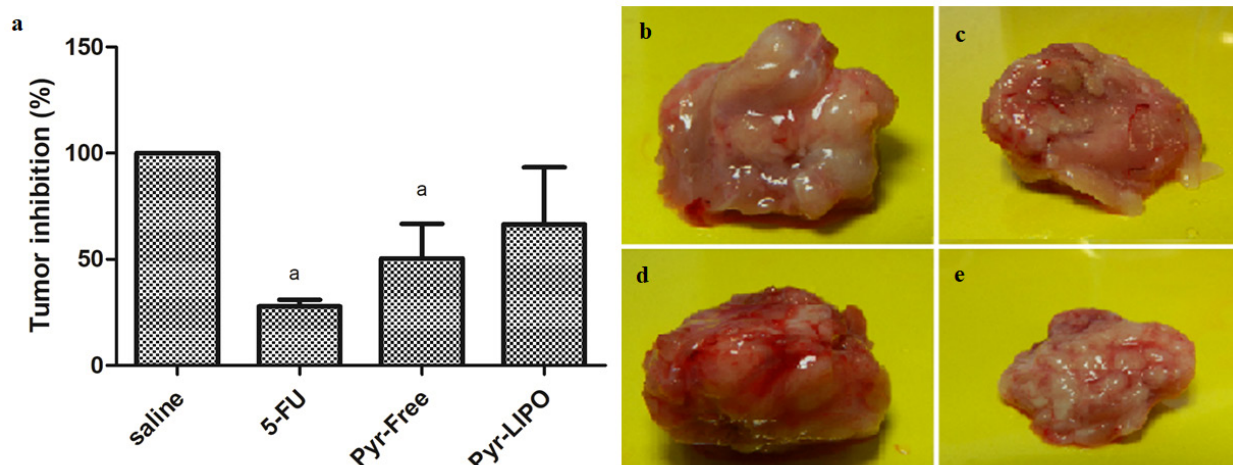


Figure 4. Tumor inhibition in groups treated with free 5-FU (20 mg/kg), Pyr-Free (15 mg/kg body weight) and Pyr-LIPO (15 mg/kg of body weight) (a). Macroscopic aspect of tumor after treatment with saline (b), 5-FU (c), Pyr-Free (d) and Pyr-LIPO (e). Statistically significant differences between groups determined by ANOVA followed by Tukey's test, * $p < 0.05$. Data expressed as mean $\pm$ SD of three independent experiments. "a" significant difference compared to saline group.

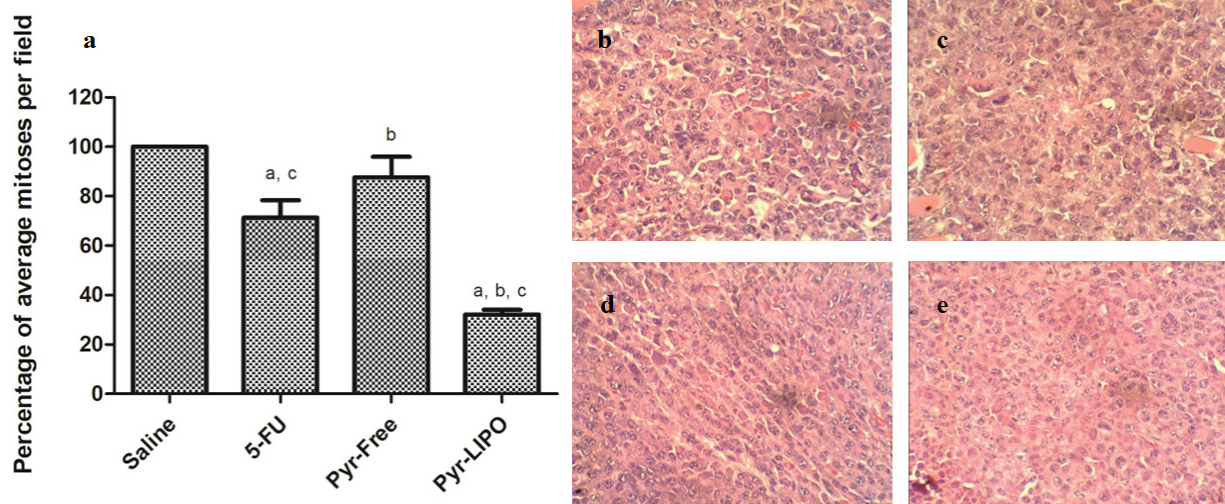


Figure 5. Effect of administration of free 5-FU (20 mg/kg), Pyr-Free (15 mg/kg body weight) and Pyr-LIPO (15 mg/kg body weight) on quantity of mitoses. Values normalized to control (100%) (a). Histological photomicrographic images stained with hematoxylin/eosin of groups treated with saline (b), 5-FU (c), Pyr-Free (d) and Pyr-LIPO (e). * Indicates statistically significant differences ($p < 0.05$). Significant differences between groups determined by ANOVA followed by Tukey's test, * $p < 0.05$. Data expressed as mean $\pm$ SD of three independent experiments. "a" significant difference compared to saline group; "b" significant difference compared to 5-FU group; "c" significant difference compared to Pyr-Free group.

Determination of mitotic count

Regardless of the group studied, the tumors invaded muscle, bone and fatty tissues. Areas of necrosis and hemorrhage were also found. Neoplastic cells were predominantly arranged in a large solid pleomorphic pattern, with

abundant cytoplasm and no defined edges. The nuclei were hyperchromatic and large and ranged in shape from oval to elongated. Several mitotic figures were observed, some of which were atypical. As the number of mitoses expresses cell division activity, a greater number

of mitoses denotes greater proliferative activity in the tissue (Ministério da Saúde 2019). Thus, the mitotic count is an important indicator of adequate cell proliferation (Gadano et al. 2002), enabling better knowledge on mitoses (degree of cellular activity of the tissue under study) and providing information on biological behavior. The inhibition of cell division demonstrated by the mitotic index values (Figure 5) shows greater inhibition of the number of mitoses in animals treated with the Pyr-LIPO compound (32.15%) compared to those treated with 5-FU (71.39%) and Pyr-Free (87.69%). This demonstrates that the compound tested has an antiproliferative capacity that is enhanced by encapsulation in liposomes, thereby increasing the therapeutic efficacy of the compound.

The results demonstrated that liposome formulations containing the compound 2-phenyl-4-amino-6-*p*-fluorophenyl-5-carbonitrile-pyrimidine increased the effect and efficacy of the test compound compared to use in its free form, producing greater tumor inhibition compared to the control group and 5-fluoracil. Therefore, the development of liposomes containing the 4-amino-pyrimidine-bis-substituted compound is an option that can be adopted to overcome limitations related to current antineoplastic treatment, thus ensuring safety and therapeutic efficacy. Furthermore, the compound was shown to be more effective than 5-FU, which is a clinically accepted drug in antitumor therapy.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the financial assistance granted through a Master's scholarship provided through the Programa de Apoio a Planos de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais (REUNI).

REFERENCES

- ANDRADE CAS, CORREIA MTS, COELHO LCBB, NASCIMENTO SC & SANTOS-MAGALHÃES NS. 2004. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. *Int J Pharm* 278: 435-445.
- BATISTA CM, DE CARVALHO CMB & MAGALHÃES NSS. 2007. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. *Rev Bras Cienc Farm J Pharm Sci* 43: 167-179.
- BELFIORE L, SAUNDERS DN, RANSON M, THURECHT KJ, STORM G & VINE KL. 2018. Towards clinical translation of ligand-functionalized liposomes in targeted cancer therapy: Challenges and opportunities. *J Control Release* 277: 1-13.
- CALVO P, VILA-JATO JL & ALONSO MJ. 1997. Evaluation of cationic polymer-coated nanocapsules as ocular drug carriers. *Int J Pharm* 153: 41-50.
- CHORILLI M, RIMÉRIO TC, DE OLIVEIRA AG & SCARPA MV. 2007. Obtaining and characterization of small unilamellar liposomes containing caffeine. *Lat Am J Pharm* 26: 715-722.
- COCCO MT, CONGIU C, LILLIU V & ONNIS V. 2006. Synthesis and *in vitro* antitumoral activity of new hydrazinopyrimidine-5-carbonitrile derivatives. *Bioorganic Med Chem* 14: 366-372.
- DA SILVA JBP ET AL. 2008. Quantitative structure-activity relationships (QSAR) of 4-amino-2,6-diarylpyrimidine-5-carbonitriles with anti-inflammatory activity. *J Braz Chem Soc* 19: 337-343.
- DA SILVA SANTOS NP, NASCIMENTO SC, WANDERLEY MSO, PONTES-FILHO NT, DA SILVA JF, DE CASTRO CMMB, PEREIRA EC, DA SILVA NH, HONDA NK & SANTOS-MAGALHÃES NS. 2006. Nanoencapsulation of usnic acid: An attempt to improve antitumour activity and reduce hepatotoxicity. *Eur J Pharm Biopharm* 64: 154-160.
- DE CLERCQ E. 2010. Antiretroviral drugs. *Curr Opin Pharmacol* 10: 507-515.
- DE COEN LM, HEUGEBAERT TSA, GARCÍA D & STEVENS CV. 2016. Synthetic Entries to and Biological Activity of Pyrrolopyrimidines. *Chem Rev* 116: 80-139.
- DE MELO SJ ET AL. 2018. Synthesis, antitrypanosomal activity and molecular docking studies of pyrimidine derivatives. *Med Chem Res* 27: 2512-2522.
- DE MELO SJ, SANTOS LC DE, FALCÃO EP DA S, SRIVASTAVA RM & LUU-DUC C. 2002. Synthesis of new 4-amino-2,6-diarylpyrimidine-5-carbonitriles. *J Chem Res* 2002: 216-217.
- DIANAT-MOGHADAM H, HEIDARIFARD M, JAHANBAN-ESFAHLAN R, PANAHI Y, HAMISHEHKAR H, POUREMAMALI F, RAHBARGHAZI

R & NOURI M. 2018. Cancer stem cells-emanated therapy resistance: Implications for liposomal drug delivery systems. *J Control Release* 288: 62-83.

FALCÃO EPDS, DE MELO SJ, SRIVASTAVA RM, CATANHO MTJDA & NASCIMENTO SCD. 2006. Synthesis and antiinflammatory activity of 4-amino-2-aryl-5-cyano-6-{3- and 4-(N-phthalimidophenyl)} pyrimidines. *Eur J Med Chem* 41: 276-282.

FRÉZARD F, SCHETTINI DA, ROCHA OGF & DEMICHELI C. 2005. Liposomes: Physicochemical and pharmacological properties, applications in antimony-based chemotherapy. *Quim Nova* 28: 511-518.

GADANO A, GURNI A, LÓPEZ P, FERRARO G & CARBALLO M. 2002. *In vitro* genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* L. *J Ethnopharmacol* 81: 11-16.

HONARY S & ZAHIR F. 2013. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - A review (Part 1). *Trop J Pharmac Res* 12: 255-264.

JESUS LG DE, CICCHELLI M, MARTINS GB, PEREIRA MCC, LIMA HS & MEDRADO ARAP. 2016. Repercussões orais de drogas antineoplásicas: uma revisão de literatura. *Rev da Fac Odontol - UPF* 21: 130-135.

JUBEEN F, IQBAL SZ, SHAFIQ N, KHAN M, PARVEEN S, IQBAL M & NAZIR A. 2018. Eco-friendly synthesis of pyrimidines and its derivatives: A review on broad spectrum bioactive moiety with huge therapeutic profile. *Synth Commun* 48: 601-625.

KURASHIGE S & MITSUHASHI S. 1982. Macrophage activities in sarcoma 180 bearing mice and EL4 bearing mice. *Gann Gan* 73: 85-90.

LAPENDA TLS, MORAIS WA, ALMEIDA FJF, FERRAZ MS, LIRA MCB, SANTOS NPS, MACIEL MAM & SANTOS-MAGALHÃES NS. 2012. Encapsulation of trans-dehydrocrotonin in liposomes: An enhancement of the antitumor activity. *J Biomed Nanotechnol* 9: 499-510.

LIRA MCB, SIQUEIRA-MOURA MP, ROLIM-SANTOS HML, GALETTI FCS, SIMIONI AR, SANTOS NP, DO EGITO EST, SILVA CL, TEDESCO AC & SANTOS-MAGALHÃES NS. 2009. *In vitro* uptake and antimycobacterial activity of liposomal usnic acid formulation. *J Liposome Res* 19: 49-58.

LUNA DMN, FALCÃO EPS, MELO SJ & ANDRADE CAS. 2011. Interfacial properties of a novel pyrimidine derivative and poly(ethylene glycol)-grafted phospholipid floating monolayers. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 373: 22-28.

MINISTÉRIOD A SAÚDE - MS Manual de Bases Técnicas da Oncologia - SIA/SUS - Sistema de Informações Ambulatoriais. Brasília: Ministério da Saúde.

MIRGORODSKAYA AB ET AL. 2020. Soft nanocarriers for new poorly soluble conjugate of pteridine and benzimidazole: Synthesis and cytotoxic activity against tumor cells. *J Mol Liq* 317: 114007.

MOGHIMIPOUR E, REZAEI M, RAMEZANI Z, KOUCHAK M, AMINI M, ANGALI KA, DORKOOSHF FA & HANDALI S. 2018. Folic acid-modified liposomal drug delivery strategy for tumor targeting of 5-fluorouracil. *Eur J Pharm Sci* 114: 166-174.

MOSMANN T. 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63.

MUTHURAJA P, VEERAMANI V, PRAKASH S, HIMESH M, VENKATASUBRAMANIAN U & MANISANKAR P. 2019. Structure-activity relationship of pyrazolo pyrimidine derivatives as inhibitors of mitotic kinesin Eg5 and anticancer agents. *Bioorg Chem* 84: 493-504.

PÉREZ-HERRERO E & FERNÁNDEZ-MEDARDE A. 2015. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *Eur J Pharm Biopharm* 93: 52-79.

QI L & XU Z. 2006. *In vivo* antitumor activity of chitosan nanoparticles. *Bioorganic Med Chem* 16: 4243-4245.

SANTOS-MAGALHÃES NS, PONTES A, PEREIRA VMW & CAETANO MNP. 2000. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: Nanoemulsions and nanocapsules. *Int J Pharm* 208: 71-80.

SCHAFFAZICK SR & GUTERRES SS. 2003. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim Nova* 26: 726-737.

SUNG H, FERLAY J, SIEGEL RL, LAVERSANNE M, SOERJOMATARAM I, JEMAL A & BRAY F. 2021. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 71(3): 1-41.

VERBITSKIY EV, CHEPRAKOVA EM, SLEPUKHIN PA, KRAVCHENKO MA, SKORNYAKOV SN, RUSINOV GL, CHUPAKHIN ON & CHARUSHIN VN. 2015. Synthesis, and structure-activity relationship for C(4) and/or C(5) thienyl substituted pyrimidines, as a new family of antimycobacterial compounds. *Eur J Med Chem* 97: 225-234.

VODENKOVA S, BUCHLER T, CERVENA K, VESKRNOVA V, VODICKA P & VYMETALKOVA V. 2020. 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. *Pharmacol Ther* 206: 107447.

XIE F, ZHAO H, ZHAO L, LOU L & HU Y. 2009. Synthesis and biological evaluation of novel 2,4,5-substituted pyrimidine derivatives for anticancer activity. *Bioorganic Med Chem Lett* 19: 275-278.

ZARENEZHAD E, FARJAM M & IRAJI A. 2021. Synthesis and biological activity of pyrimidines-containing hybrids: Focusing on pharmacological application. *J Mol Struct* 1230: 129833.

ZHANG C, LI G, WANG Y, CUI F, ZHANG J & HUANG Q. 2012. Preparation and characterization of 5-fluorouracil-loaded PLLA-PEG/PEG nanoparticles by a novel supercritical CO₂ technique. *Int J Pharm* 436: 272-281.

ZHUANG C, PANNECOUQUE C, DE CLERCQ E & CHEN F. 2020. Development of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs): our past twenty years. *Acta Pharm Sin B* 10: 961-978.

How to cite

OLIVEIRA JV, ALMEIDA GC, NOGUEIRA MCB, AGUIAR JÚNIOR FCA, MELO AO, SILVA TDS, SANTOS NPS, MAGALHÃES NSS, MELO SJ & FALCÃO EPS. 2023. 4-amino-2-phenyl-6-(p-fluorophenyl)-5-carbonitrile-pyrimidine-bis-substituted-loaded liposomes as promising system for cancer treatment. *An Acad Bras Cienc* 95: e20211078. DOI: 10.1590/0001-3765202320211078.

*Manuscript received on May 13, 2021;
accepted for publication on November 8, 2022*

JANICE V. OLIVEIRA¹

<https://orcid.org/0000-0002-3779-5009>

GLEYBSON C. ALMEIDA²

<https://orcid.org/0000-0002-3539-1369>

MARIANE C.B.L. NOGUEIRA^{3,7}

<https://orcid.org/0000-0002-7556-4746>

FRANCISCO C.A. AGUIAR JÚNIOR⁴

<https://orcid.org/0000-0001-8676-4826>

AUDENES O. MELO¹

<https://orcid.org/0000-0001-8138-3522>

THIAGO D.S. SILVA⁵

<https://orcid.org/0000-0001-7495-0621>

NOEMIA P.S. SANTOS^{1,3}

<https://orcid.org/0000-0002-0960-6135>

NEREIDE S.S. MAGALHÃES^{2,3}

<https://orcid.org/0000-0002-2576-4213>

SEBASTIÃO J. MELO^{2,6}

<https://orcid.org/0000-0002-4134-6169>

EMERSON P.S. FALCÃO¹

<https://orcid.org/0000-0003-2346-8477>

¹Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana, Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, Rua Alto do Reservatório, s/n, Alto José Leal, 55608-680 Vitória de Santo Antão, PE, Brazil

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Prédio das Pós-Graduações do Centro de Ciências da Saúde, Avenida da Engenharia, s/n, 2º Andar, Cidade Universitária, 50740-600 Recife, PE, Brazil

³Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA), Av. Professor Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 55670-901 Recife, PE, Brazil

⁴Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, Laboratório de Biotecnologia e Fármacos, Rua Alto do Reservatório, s/n, Alto José Leal, 55608-680 Vitória de Santo Antão, PE, Brazil

⁵Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Bioquímica, Laboratório de Produtos Naturais, Rodovia Mário Covas, s/n, Cidade Universitária, 50670-420 Recife, PE, Brazil

⁶Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Antibióticos, Laboratório de Química e Síntese de Produtos Naturais, Avenida Professor Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901 Recife, PE, Brazil

⁷Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, Laboratório de Nanotecnologia, Biotecnologia e Cultura de Células, Rua Alto do Reservatório, s/n, Alto José Leal, 55608-680 Vitória de Santo Antão, PE, Brazil

Correspondence to: **Emerson Peter da Silva Falcão**

E-mail: emerson.sfalcao@ufpe.br

Author contributions

Janice Vasconcelos Oliveira, designed the study and realized the experiments; Gleybson Correia de Almeida, contributed to the chemical experiments; Mariane Cajuba de Brito Lira Nogueira, contributed to the experiments and analyses of liposomes; Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior, was responsible for monitoring the histological analysis; Audenes de Oliveira Melo, assisted in the preparation of experiments *in vivo*; Thiago David dos Santos Silva, contributed in performed the histological analyzes; Noemia Pereira da Silva Santos, supervisor of the *in vitro* studies; Nereide Stela Santos Magalhães was responsible for monitoring experiments and analyses of liposomes; Sebastião José de Melo, supervised all experiments; and Emerson Peter da Silva Falcão, supervisor of the synthesis of the 4-amino-pyrimidine derivative.



Atividade antimicrobiana de derivados fenólicos do líquen *Ramalina sorediosa* (B. de Lesd.) Laundron¹

Emerson P. da Silva Falcão^{1,2}, Nicácio H. da Silva³, Norma B. Gusmão²,
Sheyla Mara Ribeiro³ e Eugênia C. Pereira^{3,4}

Recebido em 06/05/2003. Aceito em 02/06/2004

RESUMO – (Atividade antimicrobiana de derivados fenólicos do líquen *Ramalina sorediosa* (B. de Lesd.) Laundron). A atividade antimicrobiana de extratos brutos de *Ramalina sorediosa* foi detectada pelo método de difusão em disco de papel. Dois metabólitos líquênicos de natureza fenólica foram identificados por meio de técnicas biocromatográficas. Uma dessas substâncias foi identificada por meio de cromatografia em camada delgada como sendo o ácido úsnico. A segunda substância, que se encontra presente em maior concentração em relação aos demais constituintes nos extratos, trata-se do ácido homossequicáico. As análises em cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) revelaram ainda a presença do ácido salazínico. Os dados obtidos tornam possível atribuir a atividade antibiótica observada nesta espécie a uma provável associação sinérgica destas substâncias.

Palavras-chave: atividade antibiótica, *Ramalina sorediosa*, ácido homossequicáico

ABSTRACT – (Antimicrobial activity of phenols actives from the lichen *Ramalina sorediosa* (B. de Lesd.) Laundron). The antimicrobial activity of crude extracts from *Ramalina sorediosa* was detected by the diffusion disc-paper method. Two phenolic compounds from the lichen considered active were detected by using biocromatography technique. Two of those compounds were identified through thin layer chromatographic technique (TLC) as been usnic acid and the second one, wich is present in higher concentration when compared with the other substances, was the homosekikaik acid. The TLC and high-pressure liquid chromatography (HPLC) assays still detected the salazanic acid presence. The obtained data make it possible to attribute the antibiotic activity of this species to a synergic association of those two substances.

Key words: antibiotic activity, *Ramalina sorediosa*, homosekikaik acid

Introdução

Os líquens produzem metabólitos resultantes de rotas secundárias, denominados substâncias líquênicas, também conhecidas como ácidos líquênicos. Atualmente, sabe-se que se tratam de derivados fenólicos e carboidratos exclusivos, sendo que estes metabólitos são os principais responsáveis por grande parte de sua bioatividade (Llano 1951; Vicente 1975; Xavier-Filho & Rizzini 1976; Hale 1983). A origem biossintética das substâncias líquênicas ocorre em quatro vias: via do acetato-polimalonato, onde são sintetizadas a maioria das substâncias típicas, como quinonas, depsídeos, depsídonas e ácidos graxos; via do ácido mevalônico, onde ocorre a formação dos terpenóides e esteróis; via do ácido chiquímico, que origina muitos dos

pigmentos amarelos; (Shibata 1964; Huneck 1973; Hale 1983). Além disso, Xavier-Filho (1989) acrescenta mais uma via: a dos carboidratos, onde se têm os sacarídeos e polióis, produtos da redução de açúcares.

A atividade antibacteriana de líquens, ou de suas substâncias isoladas, tem sido estudada há muitos anos. Os primeiros estudos foram realizados por Burkholder *et al.* (1944). Posteriormente, muitos outros pesquisadores obtiveram resultados interessantes. Por exemplo, foi verificado que extratos brutos de várias espécies líquênicas eram ativos contra bactérias gram-positivas e álcool-ácido-resistentes como o bacilo da tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis* e *M. tuberculosis* var. *hominis*) (Bustinza 1951; Capriotti 1961; Silva *et al.* 1986; Xavier-Filho & Rizzini 1976).

¹ Parte de Dissertação de Mestrado do primeiro Autor

² Departamentos de Bioquímica e Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

³ Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Geográficas, Centro de Filosofia e Ciências Humanas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, CEP 50670-901, Recife, PE, Brasil

⁴ Autor para correspondência: arruda@hotlink.com.br

Via de regra, as substâncias líquênicas são pouco eficientes contra bactérias gram-negativas e eficientes contra as gram-positivas (Hale 1983), inibindo seu crescimento. O ácido úsnico, isolado de *Ramalina reticulata* inibiu o crescimento de várias espécies de *Pneumococcus*, *Staphylococcus* e *Streptococcus*, além de *Mycobacterium tuberculosis* var. *avium*, e outras espécies de *Mycobacterium* patogênicas ao homem (Xavier-Filho & Rizzini 1976; Marshak 1947; Marshak *et al.* 1947; Barry *et al.* 1947; Bustinza 1951). Lauterwein *et al.* (1995) demonstraram que metabólitos secundários de diferentes espécies de líquens eram inativos contra bactérias gram-negativas e fungos, entretanto possuíam atividade inibitória contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* e algumas espécies anaeróbicas como *Bacteroides* e *Clostridium*. Esses autores demonstraram ainda, que a susceptibilidade ao ácido úsnico se mantinha, mesmo em isolados clínicos de *S. aureus*. Ainda em relação a esta substância, Ingólfssdóttir *et al.* (1998) e Muller (2001) a consideraram de menor ação, quando comparada à rifampicina e estreptomicina.

Mais recentemente, Falcão *et al.* (2002) detectaram atividade antimicrobiana em extratos de *Heterodermia leucomela*, atribuindo tal efeito à presença de atranorina nos extratos da citada espécie. Os pesquisadores também relataram ação frente as bactérias gram-positivas. Ribeiro *et al.* (2002) testaram, além da referida atranorina, a leprolomina e os ácidos divaricático, girofórico, rocélico e salazínico, através de ensaios de microdiluição. Os autores constataram que o ácido salazínico foi inativo contra todos os microrganismos testados, enquanto a atranorina e a leprolomina inibiram *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*. O ácido divaricático agiu apenas contra *B. subtilis* e os girofórico e rocélico contra *S. aureus*.

Neste trabalho a atividade antibiótica de extratos orgânicos de *Ramalina sorediosa* foi detectada por meio de ensaios de difusão em disco de papel sendo os componentes ativos identificados por meio de técnicas de cromatografia em camada delgada (CCD), Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e ensaios biocromatográficos.

Material e métodos

Coleta do material líquênico - Amostras de *Ramalina sorediosa* (B. de Lesd.) Lauderon, foram coletadas em Alagoinha, região semi-árida de Pernambuco (caatinga). O material líquênico foi identificado

mediante observação de características morfológicas e químicas do talo pelo Dr. Marcelo Marcelli do Instituto de Botânica de São Paulo. Sua exsicata foi depositada no herbário UFP sob registro número 36.432

Preparação dos Extratos - Os extratos foram obtidos por maceração do talo líquênico e agitação pelo método de esgotamento a frio, seguindo-se a série eluotrópica, a partir dos solventes, éter etílico, clorofórmio e acetona, em grau de pureza analítica, (Santos *et al.* 1997). Os extratos orgânicos foram evaporados em temperatura ambiente ($28 \pm 3^\circ\text{C}$) e mantidos em dessecador, até a realização dos testes de atividade antimicrobiana.

Atividade antimicrobiana - Os ensaios de atividade antibacteriana foram realizados em duplicata pelo método de difusão em disco de papel, em placas de Petri contendo meio de Mueller-Hinton, segundo metodologia descrita por Grove & Randal (1955). O inóculo foi preparado segundo a metodologia de Bauer *et al.* (1966).

Foram selecionados para os ensaios os microrganismos *Staphylococcus aureus* (DAUFPE-01), *Bacillus subtilis* (DAUFPE-16), *Streptococcus faecalis* (DAUFPE-138), como bactérias gram-positivas; *Pseudomonas aeruginosa* (DAUFPE-39), *Klebsiella pneumoniae* (DAUFPE-396), *Escherichia coli* (DAUFPE-224), como bactérias gram-negativas; *Mycobacterium smegmatis* (DAUFPE-71), bactéria álcool-ácido-resistente; e amostras de *Streptococcus β -hemolyticus* dos grupos sorológicos B e C (bactérias gram-positivas) isolados clínicos identificados e cedidos pelo laboratório de Análises Clínicas, Setor de Microbiologia, do Hospital das Clínicas da UFPE. Foram ainda utilizadas cinco espécies de fungos filamentosos (dermatófitos), *Microsporon canis*, *M. gypsum*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton tonsurans*, *T. rubrum*, isolados clínicos cedidos pelo Departamento de Micologia da UFPE, e duas espécies de fungos leveduriformes do gênero *Candida*, sendo quatro cepas de *C. parapsilosis* (URM-3624, 3626, 3621 e 3627) e seis de *C. albicans* (DAUFPE-1007, 4741 e URM 3620, 3622, 3629, 3628). O meio foi inoculado com suspensões de 10^7 UFC.mL⁻¹ de microrganismos.

Os discos foram impregnados com 50 μL^{-1} de soluções a 2,0mg.mL⁻¹ de cada extrato orgânico e então incubados a 37°C por 24h. Discos previamente umedecidos com os solventes orgânicos foram utilizados como controle negativo, enquanto discos impregnados com 50 μL^{-1} de soluções a 2,0mg.mL⁻¹ dos ácidos úsnico, difractáico e atranorina foram

utilizados como controle positivo.

Os resultados foram analisados através da mensuração dos halos de inibição ao redor dos discos, sendo expressos em milímetros (mm).

Análise dos fenóis liquênicos - A análise da fração fenólica foi realizada por meio de técnicas de cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Os ensaios de CCD foram realizados em placas de gel de sílica F₂₅₄₊₃₆₆ Merck. A fase móvel utilizada era constituída de tolueno\dioxano\ácido acético (180:45:5 v/v), de acordo com a metodologia de Culberson (1972).

As manchas foram visualizadas por fluorescência em luz UV (254 e 366nm) e reveladas com ácido sulfúrico a 10% e aquecimento a 100°C, sendo identificadas através de comparação de seus R_fs com aqueles obtidos para as substâncias padrão: ácidos salazínico, úsnico, homossequicáico e norstítico. Os padrões de ácido salazínico e úsnico utilizados foram substâncias puras, enquanto que os ácidos homolsequicaico e norstítico, foram obtidos de *Cladonia signata* e *Cladonia symphylicarpa* (Ach.) Fr., espécies coletadas na Finlândia e gentilmente cedidas e identificadas por T. Ahti e S. Stenros (University of Helsinki).

Os extratos orgânicos (etéreo, clorofórmico e acetônico) foram diluídos em seus respectivos solventes até uma concentração de 2,0mg.mL⁻¹, sendo aplicados à placa 50μL das respectivas soluções e padrões.

Os ensaios em CLAE foram realizados em cromatógrafo HITACHI modelo 655A-11, acoplado a um detector de UV CG, modelo CG437-B. As condições de cromatografia foram, segundo Legaz & Vicente (1983): coluna de fase reversa MicroPack MCH-18 de 300×4mm com volume de 20μL; fase móvel isocrática constituída por (metanol : água : ácido acético 80:19,5:0,5 v/v); pressão de 88 atm e temperatura ambiente de 30°C; detector de UV regulado a 254nm; padrões internos de 0,1mg.mL⁻¹ de atranorina, ácidos úsnico, e salazínico. Os extratos foram diluídos até a concentração de 0,1mg.mL⁻¹ e então injetados no aparelho. Os resultados foram avaliados mediante a determinação do tempo de retenção (TR) das substâncias na coluna e a área dos picos, respectivamente.

Identificação dos componentes ativos através de biocromatografia - A biocromatografia foi realizada por meio da metodologia de Homans e Fuchs (1970), modificada por L.O. Costa-Filho (dados não

publicados). Os extratos ativos nos ensaios de atividade antibacteriana, à concentração de 2,0mg.mL, foram aplicados em placas de gel de sílica F-254nm Merck (5×10cm), segundo a metodologia utilizada para a análise em CCD. As placas foram armazenadas até a completa evaporação dos solventes.

O inóculo foi preparado da mesma forma que os ensaios de atividade antimicrobiana. Os cromatogramas foram colocados dentro de placas-de-Petri (18mm), recebendo então uma fina camada de meio (50mL) pré-inoculado com os microrganismos teste (100μL). As substâncias separadas que apresentaram atividade antibacteriana foram detectadas através da visualização de halos de inibição ao seu redor.

Foram utilizados como microrganismos teste *Staphylococcus aureus* (DAUFPE-01) e o *Bacillus subtilis* (DAUFPE-16); os extratos avaliados foram o clorofórmico e etéreo e o ácido norstítico como padrão.

Resultados e discussão

Atividade Antimicrobiana - Os ensaios foram realizados em duplicata, sendo os resultados apresentados com os respectivos desvios padrão, que se mostraram não significantes.

Os extratos orgânicos mostraram-se inativos frente a todas as bactérias gram-negativas, fungos e os dois *Streptococcus β-hemolyticus* (Tab. 1). Apenas os extratos etéreo e clorofórmico exibiram atividade antibacteriana contra os microrganismos utilizados.

Ao contrário o extrato acetônico não apresentou qualquer atividade inibitória. Estes resultados estão de acordo com Hale (1983) que verificou a baixa eficiência de substâncias liquênicas contra bactérias gram-

Tabela 1. Atividade antimicrobiana dos extratos orgânicos de *Ramalina sorediosa* (B. de Lesd.).

Tratamento	Microorganismos/Zona de inibição (mm)	
	<i>Bacillus subtilis</i> DAUFPE-16 X ± Dp	<i>Staphylococcus aureus</i> DAUFPE-01 X ± Dp
Extrato Etéreo	16,7 ± 0,5	14,7 ± 0,5
Extrato Clorofórmico	16,7 ± 0,5	13,6 ± 0,5
Extrato Acetônico	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Ácido úsnico	19,6 ± 0,5	11,7 ± 0,5
Atranorina	19,3 ± 0,5	8,0 ± 0,0
Ácido difractáico	9,3 ± 0,5	7,7 ± 0,5

N amostral = 2; Desvio Padrão = Dp; Média = X

negativas, e com Bustinza (1951), Capriotti (1961), Silva *et al.* (1986) e Xavier-Filho & Rizzini (1976), que citaram a atividade de várias espécies liquênicas contra bactérias gram-positivas e ácido-álcool-resistentes. Na Tab. 1 são apresentados os dados de atividade inibitória dos extratos orgânicos testados apenas contra os microrganismos que se mostraram sensíveis. Nela verifica-se que os extratos etéreo e clorofórmico foram ativos, apresentando atividades semelhantes.

Análise do Fenóis Liquênicos - A análise em CLAE do extrato etéreo de *R. sorediosa*, revelou oito sinais, três com maiores concentrações, com tempos de retenção de 4,84min; 8,72min e 14,27min, além de dois menores com TR de 3,68min e 9,74 min (Fig. 1A). Destes o que apresentou a maior concentração foi o

de TR = 14,27 min com 55,27% da concentração do extrato (Tab. 2). Este sinal, provavelmente, devido à sua concentração, deve corresponder à mancha de $R_f = 0,68$, que foi observada nos ensaios em CCD dos extratos etéreo e clorofórmico da referida espécie liquênica (Fig. 2). Um dos sinais encontrados tem TR = 3,68min, semelhante ao encontrado para o padrão do ácido salazínico (TR=3,47min) (Fig. 1 D).

A análise em CLAE do extrato clorofórmico de *R. sorediosa* (Fig. 1B) mostrou também oito sinais, sendo três com concentrações maiores e tempos de retenção de 3,70min; 4,92min e 14,98 min, e dois menores com tempos de retenção de 9,05min e 10,14min. Os sinais que apresentaram maior concentração foram os de TR iguais a 4,92min e 14,98 min com 20,50% e 42,28% do extrato (Tab. 2).

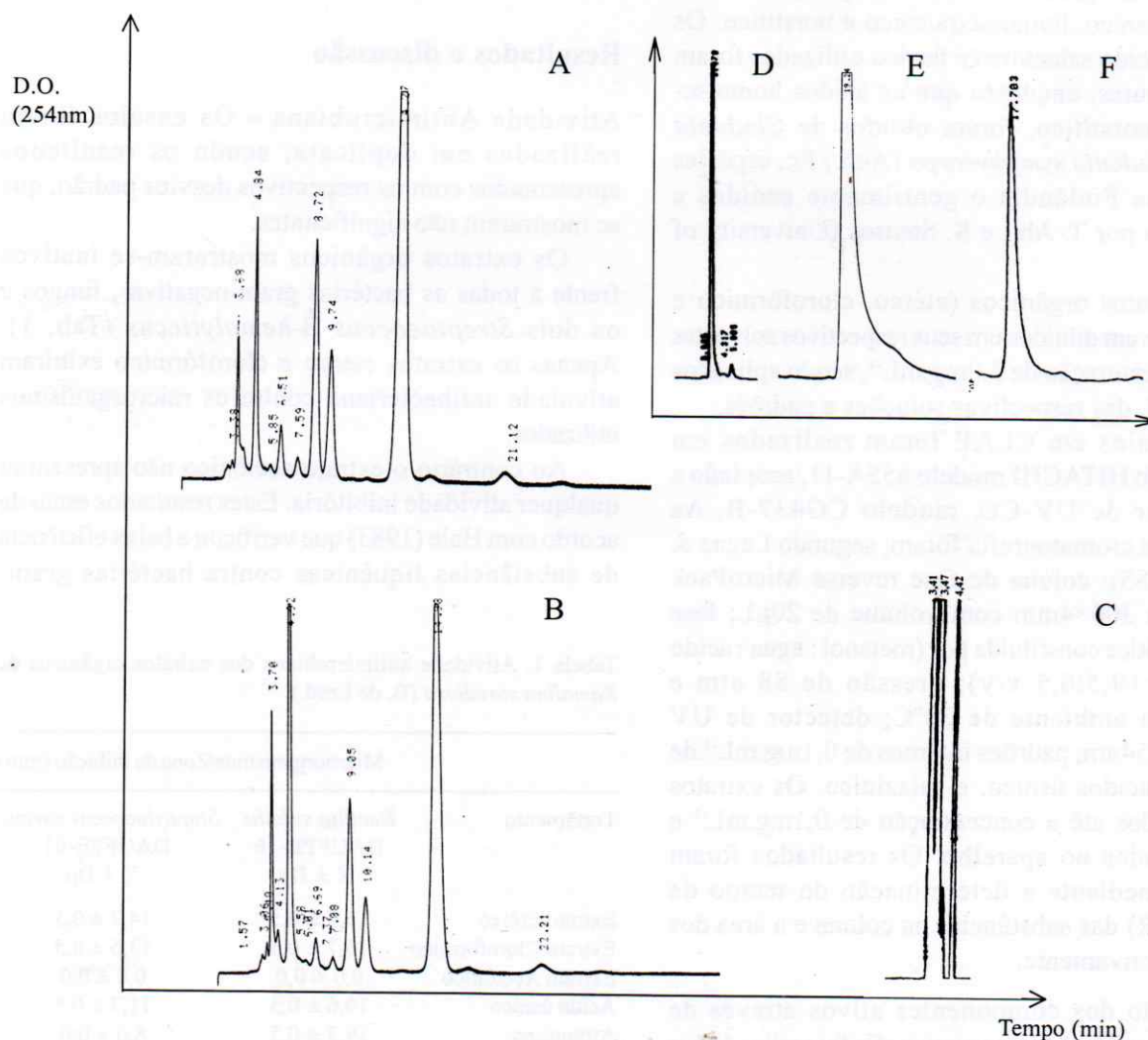


Figura 1. Cromatogramas em CLAE dos extratos etéreo (A), Clorofórmico (B) e Acetônico (C) de *Ramalina sorediosa* (B. de Lesd.) e dos padrões de ácido salazínico (D), úsnico (E) e atranorina (F). D.O. - Densidade Ótica.

Tabela 2. Concentração dos principais componentes do extrato etéreo de *Ramalina sorediosa* (B. de Lesd.).

Padrões	Tempo de retenção (min.)	Substância correspondente	Conc. (%)	µg/mg
	3,68	SAL	5,90	59,0
	4,84		9,28	92,80
	8,72		13,64	136,40
	9,74		9,17	91,70
	14,27		55,27	552,70
	21,12	USN	1,90	19,0
USN	19,24		100	1000
ATR	17,70		100	1000
SAL	3,47		100	1000

O gênero *Ramalina*, no Brasil, foi estudado por Kashiwadani & Kalb (1993). Estes pesquisadores citaram para *R. sorediosa* a presença de quatro componentes principais, que são os ácidos salazínico, sequicaico, homossequicaico e úsnico.

Os ensaios cromatográficos em CCD demonstraram a presença de ácido úsnico, em pequena quantidade nos extratos etéreo e clorofórmico (Fig. 2) de *R. sorediosa*. Os cromatogramas em CLAE demonstraram a presença de um sinal arredondado com TR semelhante ao do ácido úsnico (21,12min.) conforme demonstra a Fig. 1A. Portanto, provavelmente esta substância é co-responsável pela atividade antimicrobiana visualizada, agindo isoladamente, ou sinergicamente com outras substâncias presentes no extrato.

A análise em CLAE do extrato acetônico de *R. sorediosa* mostrou três sinais (Fig. 1C), todos com concentrações elevadas e tempos de retenção de 3,02min.; 3,47min. e 4,42min. Quando somados, estes representam 94,73% do extrato bruto (Tab. 3). Dos sinais principais a substância com maior concentração (62,29%), apresenta um TR correspondente ao do padrão de ácido salazínico (TR = 3,47min.) (Fig. 1D), confirmando os resultados observados em CCD (Fig. 2). Esta depsidona do grupo orcinol foi testada por Shibata & Miura (1948), sendo considerada pouco ativa frente ao *B. subtilis*, quando comparada a outras substâncias líquênicas. É importante lembrar que aqueles pesquisadores utilizaram o ácido puro, em contraste com o extrato orgânico utilizado para os testes de atividade antibacteriana neste trabalho. Por outro lado, a falta de atividade do extrato acetônico abre a perspectiva para investigação complementar no sentido de averiguar se o fato ocorre em função da baixa concentração do princípio ativo no extrato, ou se

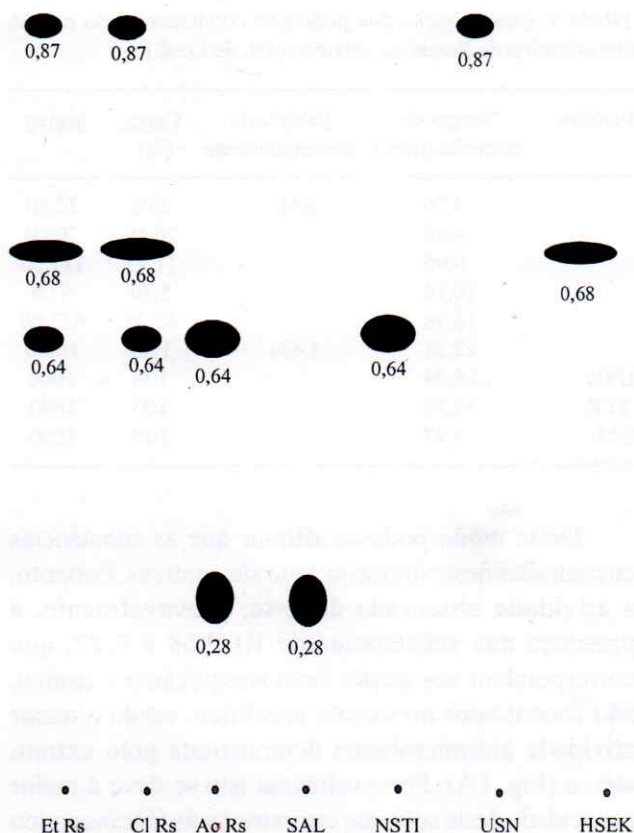


Figura 2. Modelo Esquemático do Cromatograma em camada delgada dos extratos orgânicos de *Ramalina sorediosa* (B. de Lesd.). Et Rs - Extrato etéreo de *R. sorediosa*; Cl Rs - Extrato clorofórmico; Ac Rs - Extrato acetônico; SAL - Ácido salazínico; NSTI - Ácido norstítico; USN - Ácido úsnico; HSEK - Ácido Homossequicaico.

o solvente não é adequado para a extração do mesmo, ou, em outra hipótese, um antagonismo entre as substâncias presentes no citado extrato.

A composição química dos extratos etéreo e clorofórmico diferem daquela observada para o extrato acetônico, sendo constante apenas o ácido norstítico que apresentou concentrações maiores neste último extrato (Fig. 2). Embora não tenham sido encontradas citações na literatura relacionando esta substância à espécie líquênica em estudo, esta mesma substância já foi encontrada em espécies congêneres no Peru (Kashiwadani 1987) e Chile (Kashiwadani 1990). Além disto, estudos em CLAE, de fenóis líquênicos, conduzidos por Huneck e Yoshimura (1996), mostram que o ácido norstítico apresenta um tempo de retenção maior que o ácido salazínico, sendo eluído primeiro, em condições experimentais semelhantes deste trabalho.

Tabela 3. Concentração dos principais componentes do extrato clorofórmico de *Ramalina sorediosa* (B. de Lesd.).

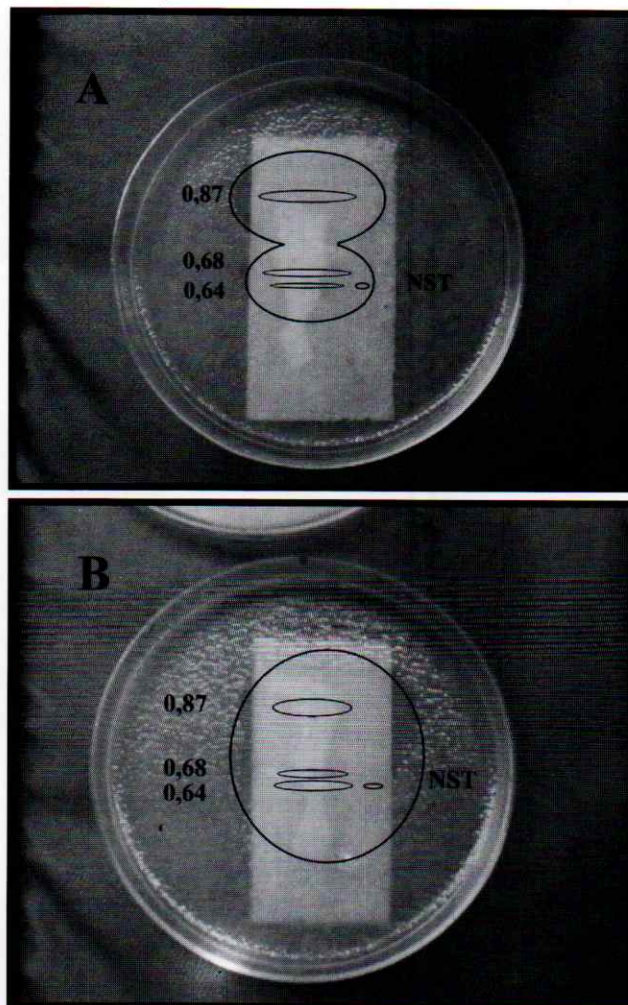
Padrões	Tempo de retenção (min.)	Substância correspondente	Conc. (%)	µg/mg
	3,70	SAL	2,08	20,80
	4,92		20,50	205,0
	9,05		11,15	111,50
	10,14		5,70	57,0
	14,98		42,28	422,80
	22,21	USN	1,60	16,00
USN	19,24		100	1000
ATR	17,70		100	1000
SAL	3,47		100	1000

Deste modo pode-se afirmar que as substâncias encontradas neste último extrato são inativas. Portanto, a atividade observada deve-se, provavelmente, à presença das substâncias de Rf 0,68 e 0,87, que correspondem aos ácidos homosseuicáico e úsnico, não encontrados no extrato acetônico, sendo a maior atividade antimicrobiana demonstrada pelo extrato etéreo (Fig. 1A). Provavelmente isto se deve à maior capacidade deste solvente em extrair substâncias pouco polares, como o ácido úsnico, que possivelmente encontra-se em concentração ligeiramente maior que no extrato clorofórmico.

Os resultados obtidos com os dois primeiros extratos poderiam sugerir que o ácido norstítico, presente nos extratos etéreo e clorofórmico, fosse um dos responsáveis pela atividade antibacteriana, no entanto esta substância, juntamente com o ácido salazínico estão presentes em altas concentrações no extrato acetônico, que foi inativo. As análises em CCD revelaram a presença de duas substâncias majoritárias uma com Rf = 0,68 e outra com Rf = 0,87 (Fig. 2). A substância com Rf = 0,87 foi identificada, por comparação com os padrões como sendo o ácido úsnico. Desde que a concentração do suposto ácido

Tabela 4. Concentração dos principais componentes do extrato acetônico de *Ramalina sorediosa* (B. de Lesd.).

Padrões	Tempo de retenção (min.)	Substância correspondente	Conc. (%)	µg/mg
	3,02	SAL	16,17	161,70
	3,47		62,29	622,90
	4,42		16,27	162,70
USN	19,24		100	1000
ATR	17,70		100	1000
SAL	3,47		100	1000

Figura 3. Biocromatogramas dos extratos Clorofórmico (A) e Etéreo (B) de *Ramalina sorediosa* (B. de Lesd.) contra *Bacillus subtilis* e representação do halo de inibição sobre as manchas cromatográficas (Rf= 0,87; 0,68; 0,64) e o Ácido Norstítico (NST).

úsnico, nos extratos orgânicos, é relativamente baixa e a atividade antibacteriana é muito próxima àquela observada para o padrão mais ativo, o ácido úsnico puro (Tab. 1), a atividade observada é, provavelmente, devida a uma ação sinérgica dos dois constituintes (Rf 0,68 e Rf 0,87).

Biocromatogramas - Com relação aos biocromatogramas observou-se um provável efeito sinérgico entre componentes dos extratos etéreo e clorofórmico de *Ramalina sorediosa* (Fig. 3A e 3B) quando testados contra o *Bacillus subtilis*, sendo observados halos de inibição sobre todas as manchas. Pode-se observar um halo de inibição muito maior no caso do extrato etéreo de *R. sorediosa* em relação ao clorofórmico, para a referida espécie, o que já era previsto devido à sua maior atividade observada nos testes de atividade antibacteriana (Tab. 1).

Os resultados mostraram que os componentes ativos nos extratos de *R. sorediosa* correspondem as manchas de Rf 0,68 e 0,87. Os ensaios biocromatográficos e de CLAE demonstram que correspondem aos ácidos homossequeicáico e úsnico, respectivamente. Por outro lado, verificou-se a inatividade do extrato acetônico e, inclusive o ácido salazínico nele detectado. Além disto, os ensaios biocromatográficos mostram que provavelmente deve haver ação sinérgica entre os componentes ativos nos extratos, contra os microrganismos testados.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Dr. Marcelo Marcelli, pela identificação da espécie; ao apoio financeiro do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e pelo suporte técnico do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA). Um dos autores (E.C. Pereira) é bolsista de Produtividade em Pesquisa (CNPq).

Referências bibliográficas

- Burkholder, P.R.; Evans, A.W.; Macveigh, I. & Thornton, H.R. 1944. Antibiotic activity of lichens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of Washington** 30(9): 250-255.
- Bauer, A.W.; Kirby, W.M.M.; Sherris, J.C. & Truck, M. 1966. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. **The American Journal of Clinical Pathology** 45(4): 493-496.
- Barry, V.C.; O'Rourke, L. & Twomey, D. 1947. Antitubercular activity of diphenil ether and related compounds. **Nature** 160: 800.
- Bustanza, F. 1951. Contribucion al estudio de las propiedades antibacterianas y antifungicas del acido usnico y algunos de sus derivados. **Annales del Instituto Botanico A.J. Cavanilles** 10: 157-175.
- Capriotti, A. 1961. The effect of Usno on Yeast isolated from the excretion of tuberculosis patients. **Antibiotic and Chemotherapy** 11(6): 409-410.
- Culberson, C.F. 1972. Improved conditions and new data for the identification of lichen products by standardized thin layer-cromatografic method. **Journal of Chromatography** 72: 113-125.
- Falcão, E.P.S.; Silva, N.H.; Pereira, E.C.; Gusmão, N.B. & Ribeiro, S.M. 2002. Atividade antimicrobiana de Compostos Fenólicos do Líquen *Heterodermia leucomela* (L.) Poelt. **Acta Farmaceutica Bonarense** 21(1): 43-49.
- Grove, D.C. & Randal, W.A. 1955. Assay Methods, Antibiotic Activity: A laboratory Manual. New York, Medical Encyclopedia.
- Hale Jr., M.E. 1983. **The Biology of lichens**. 3 ed. London Edward Arnold Pub.
- Homans, A.L. & Fuchs, A. 1970. Direct bioautography on thin layer, Cromatograms as method for detecting fungitoxic substances. **Journal of Chromatography** 51: 327-329.
- Huneck, S. 1973. Nature of Lichens Substances. V. Ahmajadajin & M.E. Hale. **The Lichens**. London, Academic Press.
- Ingolfssdottir, K.; Chung, G.A.C.; Skulason, V.G.; Gissurason, S.R. & Vilhelmsdottir, M. 1998. Antimycobacterial activity of lichen metabolites *in vitro*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** 6: 141-144.
- Huneck, S. & Yoshimura, I. 1996. **Identification of lichen substances**. Springer Verlag, Berlin.
- Kashiwadani, H. 1987. Peruvian Species of *Ramalina* (Lichens) Reprinted from: H. Inoue (ed.). **Studies on Criptogams in Southern Peru**. p. 1992 Tokio, Tokai University Press.
- Kashiwadani, H. 1990. Some Chilean Species of the Genus *Ramalina* (Lichens), Tokio. **Bulletin of the National Science Museum, Ser. B** 16(1):1-12.
- Kashiwadani, H. & Kalb, K. 1993. The genus *Ramalina* in Brazil, **The Lichenologist** 25(1): 1-1.
- Lauterwein, M.; Oethinger, M.; Belsner, K.; Peters, T. & Marre, R. 1995. *In vitro* activities of lichen secondary metabolites vulpinic acid (+)-úsnic acid, and (-)-úsnic acid against aerobic and anaerobic microorganisms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 2541-2543.
- Llano, G.A. 1951. Economic Use of Lichens. **Smithsonian Institute Publ.** 4040: 385-422.
- Legaz, M.E.E. & Vicente, C. 1983. Endogenous inactivators of arginase, arginine decarboxilase and agmatine amidinohydrolase in *Evernia prusnatri* thallus. **Plant Physiology** 71: 300-302.
- Marshak, A. 1947. A cristaline antibacterial substance from the lichen *Ramalina reticulata*. **Public Health Reports** 62: 3-19.
- Marshak, A.; Barry, G.T. & Graig, L.G. 1947. Antibiotic compound isolated from the lichen *Ramalina reticulata*. **Science** 106: 394-395.
- Muller, R. 2001. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. **Applied Microbiology and Biotecnology** 56: 9-16.
- Ribeiro, S.M.; Pereira, E.C.; Nicácio, S.; Falcão, E.P.; Gusmão, N.B.; Honda, N. & Quilhot, W. 2002. **Mitteinlunger aus dem Institute für Allgemeine Botanik Hamburg** 30-32: 187-194.
- Santos, P.N.; Pereira, E.C.G.; Lima, R.C.; Honda, K.N.; Silva, M.P.C. & Silva, N.H. 1997. Efeito da sazonalidade na produção de metabólitos com ação antitumoral em *Cladonia verticillaris* (Líquen). **Revista da Universidade do Amazonas, Série Ciências Biológicas**, Manaus, v.2, n.2.
- Shibata, S. 1964. Biogenetical and chemotaxonomical aspects of lichen substances. In: **Beitrag zur Biochemie und Physiologie von Naturstoffen** 30: 451-465.
- Shibata, S. & Miura, Y. 1948. Antibacterial effects of lichen substances. II - Studies on didimic acid and related compounds. **Japan Medical Journal of Sciences in Biology** 2: 22-24.

- Silva, J.O.; Leite, J.E.M.; Paulo, M.Q. & Xavier-Filho, L. 1986. Atividade antimicrobiana de líquens brasileiros I. **Boletim da Sociedade Broteriana** 59(2): 87-96.
- Vicente, C. 1975. **Fisiologia de las Substancias Liquênicas**. Madrid, Alhambra.

- Xavier-Filho, L. & Rizzini, C.T. 1976. **Manual de Liqueologia Brasileiro**. Recife, Universidade Federal de Pernambuco.
- Xavier-Filho, L. 1989. Inibição Fotooxidativa de b-Caroteno por Cloroatranorina de *Parmelia tinctorum* Nyl. João Pessoa: UFPB. **Tese de Titular** - Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, UFPB.

Synthesis of New 1,2,4-Oxadiazoles Carrying (1'S,2'S)-*t*-Butyloxycarbonyl-1-amino-2-methyl-1-butyl and (1'S)-*t*-Butyloxycarbonyl-1'-amino-1'-ethyl Groups at C-5

Vanildo Martins L. Braga^a, Sebastião J. de Melo^{*a}, Rajendra M. Srivastava^{*b} and Emerson Peter da S. Falcão^a

^aDepartamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50670-901 Recife-PE, Brazil

^bDepartamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Luiz Freire, Cidade Universitária, 50740-540 Recife-PE, Brazil

Uma síntese fácil e eficiente de 3-aryl-5-[(1*S*)-*t*-butiloxycarbonil-1-amino-(2*S*)-metil-1-butil]-1,2,4-oxadiazóis **4a-f** e 3-fenil-5-[(1*S*)-*t*-butiloxycarbonil-1-amino-1-etil]-1,2,4-oxadiazol **6** partindo de arilamidoximas, *N*-*t*-Boc-L-isoleucina e *N*-*t*-Boc-L-alanina é descrita. As estruturados intermediários e compostos finais foram determinadas a partir dos dados espectroscópicos.

A facile and efficient synthesis of 3-aryl-5-[(1*S*)-*t*-butyloxycarbonyl-1-amino-(2*S*)-methyl-1-butyl]-1,2,4-oxadiazoles **4a-f** and 3-phenyl-5-[(1*S*)-*t*-butyloxycarbonyl-1-amino-1-ethyl]-1,2,4-oxadiazole **6** starting from arylamidoximes, *N*-*t*-Boc-L-isoleucine and *N*-*t*-Boc-L-alanine is described. The structures of the intermediates and final compounds have been deduced from spectroscopic data.

Keywords: chiral drugs, 1,2,4-oxadiazoles, arylamidoximes, isoleucine, alanine, antiinflammatory, antipyretic

Introduction

It is known that stereoisomers of chiral drugs often exhibit pronounced differences in their pharmacokinetic and pharmacodynamic properties both in quantitative and qualitative terms.¹ So, it is extremely necessary to study each stereoisomer separately. With the correct therapeutic information it is possible to maximize the properties of the drug by taking the most potent enantiomer, the eutomer,² or eliminating the enantiomer that may cause side effects, the distomer. The latter can be linked to a secondary molecular target.³ The pharmaceutical market has converged strongly to this idea of single enantiomers as substitutes for their racemates. The change to chiral technologies offers many advantages to the pharmaceutical industry, including fewer toxicological tests, lower costs for liberation and less metabolites. These advantages are also beneficial for the patient's health.⁴ In the not too distant future, chiral drugs in single enantiomeric forms will probably substitute most of the existing racemates and will eventually touch every area of clinical medicine.⁷

Only in a few situations that are not common at all, it is more appropriate to use the racemate instead of the eutomer, for example with ibuprofen, a nonsteroidal antiinflammatory drug (NSAID) commercially available in the market. In this particular case, there is an enzymatic inversion of the *R*(-) distomer to the eutomer (*S*) responsible for the activity.⁵ In any event, it is a single enantiomer (*S*) which is important. However, in other NSAIDs such as flurbiprofen⁶ and ketoprofen,⁷ this inversion is insignificant in humans, and so the application of the chiral technology for the use of the eutomer is more appropriate.

In view of the great importance of single enantiomers, our current research is focused on synthesizing new 1,2,4-oxadiazoles containing asymmetric centers in their C-5 side chain. Our main goal was to synthesize compounds possessing an amino group in the C-5 side chain. It is well known that a tertiary amine function attached to the C-5 alkyl chain of 1,2,4-oxadiazoles possess antiinflammatory as well as other interesting pharmacological activities.^{8,9} With this idea in mind, we synthesized seven *Boc* protected amines. In fact, two of these new compounds **4d** and **4e** showed antiinflammatory activity. These are very significant in the sense that they can be deprotected easily to remove the *Boc* group followed by their transformation

* e-mail: melosj@ibest.com.br

into *N,N*-dialkyl amino compounds. These compounds will be potential candidates for analgesic, antiinflammatory and antipyretic activity. Therefore, this communication describes some biologically active 1,2,4-oxadiazoles with one or two asymmetric centers in their side chain. Such compounds have not been cited in the literature before.

Results and Discussion

The strategy used to achieve our goals explored known protected amino acids as starting materials. We have already published one paper relating to the synthesis of 3-aryl-1,2,4-oxadiazoles carrying a protected L-alanine side chain, starting from arylamidoximes and protected aspartic acid,¹⁰ and it has been established that the products obtained from the condensation of arylamidoximes and an appropriately protected amino acid didn't lead to isomerization. Applying a similar strategy, but using Boc-protected L-isoleucine or L-alanine and arylamidoximes, we synthesized seven 1,2,4-oxadiazoles, six containing two asymmetric centers **4a-f** and one oxadiazole having only one asymmetric center **6**, as shown below (Scheme 1). Earlier, another group has observed that even in pyridine as reaction solvent, no significant racemization occurs in the case of 1,2,4-oxadiazoles having an asymmetric carbon attached to C-5.¹¹

Since the reaction conditions in the present work are mild and similar to the one reported earlier,¹⁰ it is assumed that no racemization occurred during the synthesis of these 1,2,4-oxadiazoles. This conclusion is supported by the ¹H NMR spectra, which showed the presence of only one H-3 absorption for **3a-f**; had there been racemization, one would

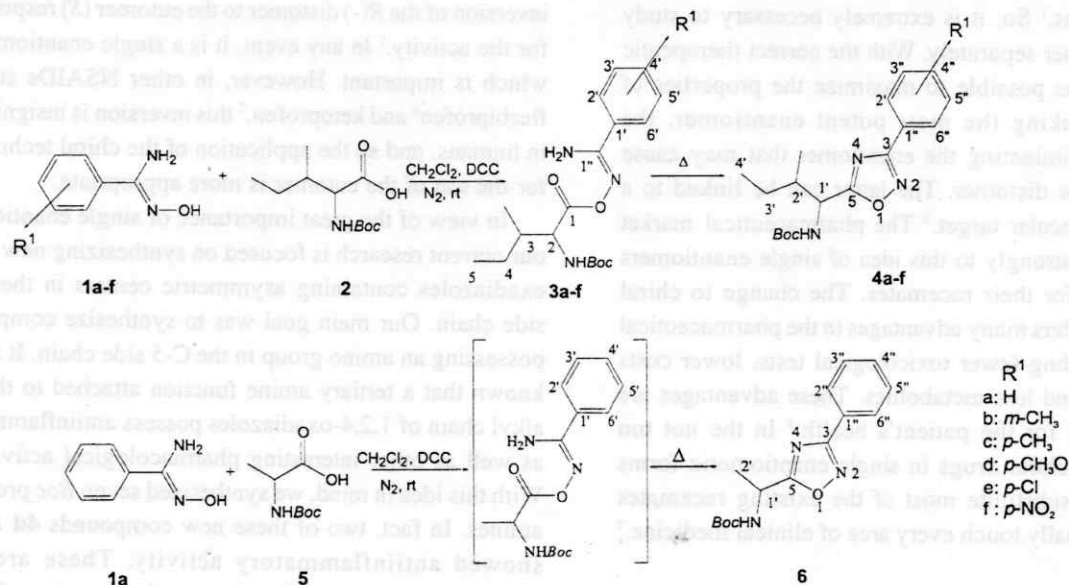
expect two diastereomers hence more than one absorption. The 300 MHz ¹H NMR spectra of compounds **3a-f** showed a triplet at δ 0.95 ppm and a doublet at δ 1.02 ppm for the terminal and C-3 methyl groups. In compounds **4a-f**, the doublet due to methyl group shifted to higher field and generally overlapped with the triplet of the other methyl group. This shift is attributed to the ring current effect causing C-3 methyl group signals to move upfield.

The mass analyses agreed with the proposed structures. However the compounds **4d, e** and **f**, show a sequence of fragmentations which occurs during the decomposition of M⁺. These include the loss of *t*-butoxide radical (73 mass units), the extrusion of carbon monoxide (28 mass units), rearrangement and finally the elimination of butene-2 molecule (56 mass units) to provide the major fragments a', at *m/z* 204 (**4d**), b' *m/z* 208 (**4e**) and c', *m/z* 219 for the compound **4f**. These are depicted in Scheme 2.

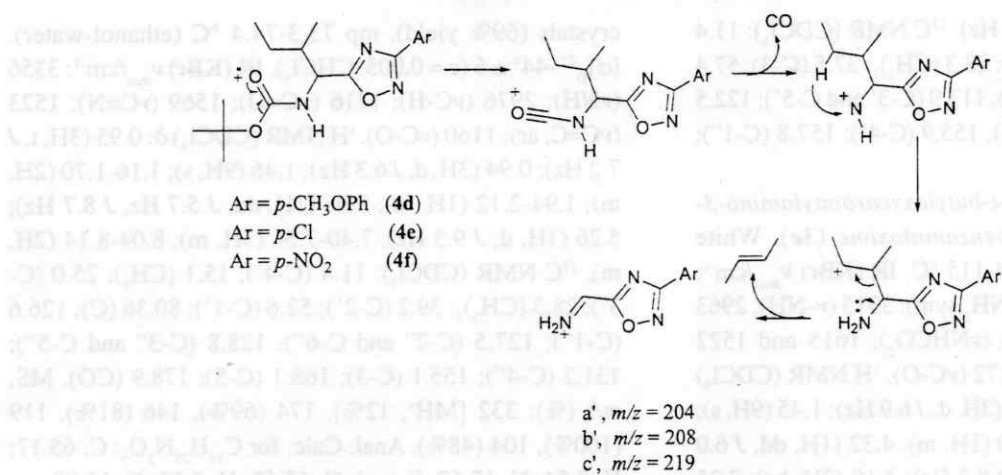
The synthesis of compound **6** was carried out with the aim to shorten the side-chain containing the amino group and consequently reduce the lipophilicity.

Experimental

Melting points were determined with a Thomas Hoover apparatus and are uncorrected. Elemental analyses of compounds **4a-f** were performed in the Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco. Infrared spectra were recorded on a Bruker spectrophotometer Model IFS66. 300 MHz ¹H-NMR and 75 MHz ¹³C NMR spectra were recorded on a Varian Unity plus instrument, using CDCl₃ as solvent and TMS as internal reference. Thin-layer chromatography (tlc) was done



Scheme 1.



Scheme 2.

on plates coated with silica gel having a fluorescent indicator P₂₅₄ (Merck) and the spots were detected under ultraviolet light. Arylamidoximes were obtained following the methodology reported in the literature.¹²

General Procedure for the Synthesis of *O*-[(2*S*, 3*S*)-2-*t*-Butyloxycarbonylamino-3-methylpentanoyl]arylamidoximes (3a-f). The appropriate arylamidoxime **1a-f** (3.7 mmol) was allowed to react with *N*-*t*-Boc-*L*-isoleucine **2** (3.7 mmol) and *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (4.1 mmol) in dry CH₂Cl₂ 10 mL under N₂ atmosphere at room temperature for periods varying from 3 to 5 hours. The completion of the reaction was monitored by TLC. Generally, the products were purified by column chromatography on silica gel using *n*-hexane-ethyl acetate (7.0:3.0) as eluent. The same solvent system was employed for developing the TLC plates. An ultraviolet lamp was used for the detection of the spots.

Data for *O*-[(2*S*, 3*S*)-2-*t*-butyloxycarbonylamino-3-methylpentanoyl]benzamidoxime (3a). White crystals (69% yield), mp 110–111 °C. IR (KBr) ν_{max} /cm⁻¹: 3483 (ν NH₂, asym); 3347 (ν NH₂, sym; ν NH); 2966 (ν C-H); 1740 (ν CO₂); 1688 (ν NHCO₂); 1614 and 1519 (ν C=C, ar); 1586 (ν C=N); 1519 (ν C=C band); 1172 (ν C-O). ¹H NMR (CDCl₃) δ : 0.95 (3H, t, *J* 7.5 Hz); 1.02 (3H, d, *J* 6.9 Hz); 1.44 (9H, s); 1.14–1.68 (2H, m); 1.84–2.00 (1H, m); 4.31 (1H, dd, *J* 8.7 Hz, *J* 6.3 Hz); 5.16 (1H, d, *J* 8.7 Hz); 5.37 (2H, bs); 7.35–7.52 (3H, m); 7.67–7.75 (2H, m). ¹³C NMR (CDCl₃) δ : 11.4 (C-5); 15.3 (CH₃); 25.0 (C-4); 28.3 (CH₃); 37.8 (C-3); 57.3 (C-2); 80.1 (C); 130.8 (C-1'); 128.1 (C-2' and C-6'); 128.7 (C-3' and C-5'); 131.1 (C-4'); 155.9 (C1''); 157.8 (CONH); 170.1 (C-1).

Data for *O*-[(2*S*, 3*S*)-2-*t*-butyloxycarbonylamino-3-methylpentanoyl]*m*-tolylamidoxime (3b). White crystals (73% yield, mp 118–119 °C. IR (KBr) ν_{max} /cm⁻¹: 3494 (ν NH₂, asym); 3343 (ν NH₂, sym; ν NH); 2967 (ν C-H); 1742

(ν CO₂); 1691 (ν NHCO₂); 1621 and 1522 (ν C=C, ar); 1587 (ν C=N); 1168 (ν C-O). ¹H NMR (CDCl₃) δ : 0.93 (3H, t, *J* 7.4 Hz); 1.00 (3H, d, *J* 6.9 Hz); 1.43 (9H, s); 1.10–1.70 (2H, m); 1.82–2.00 (1H, m); 2.36 (3H, s); 4.30 (1H, dd, *J* 6.0 Hz, *J* 8.7 Hz); 5.19 (1H, d, *J* 8.7 Hz); 5.29 (2H, bs); 7.62 (2H, d, *J* 9.3 Hz); 8.00 (2H, m). ¹³C NMR (CDCl₃) δ : 11.4 (C-5); 15.5 (CH₃); 21.4 (Ar-CH₃); 25.0 (C-4); 28.3 (CH₃); 37.6 (C-3); 57.5 (C-2); 80.0 (C); 123.8 (C-6'); 127.6 (C-1'); 128.6 (C-2'); 130.2 (C-5'); 132.1 (C-4'); 138.6 (C-3'); 156.0 (C1''); 158.3 (CONH); 170 (C-1).

Data for *O*-[(2*S*, 3*S*)-2-*t*-butyloxycarbonylamino-3-methylpentanoyl]*p*-tolylamidoxime (3c). White crystals (65% yield), mp 105–106 °C. IR (KBr) ν_{max} /cm⁻¹: 3500 (ν NH₂, asym); 3358 (ν NH₂, sym); 3333 (ν NH); 2965 (ν C-H); 1746 (ν CO₂); 1693 (ν NHCO₂); 1614 and 1521 (ν C=C, ar); 1587 (ν C=N); 1175 (ν C-O). ¹H NMR (CDCl₃) δ : 0.94 (3H, t, *J* 7.4 Hz); 1.01 (3H, d, *J* 6.6 Hz); 1.44 (9H, s); 1.14–1.68 (2H, m); 1.82–2.00 (1H, m); 2.38 (3H, s); 4.30 (1H, dd, *J* 6.3 Hz, *J* 8.1 Hz); 5.21 (1H, d, *J* 8.4 Hz); 5.44 (2H, bs); 7.35 (2H, d, *J* 8.7 Hz); 7.61 (2H, d, *J* 8.4 Hz). ¹³C NMR (CDCl₃) δ : 11.4 (C-5); 15.5 (CH₃); 21.2 (Ar-CH₃); 25.1 (C-4); 28.3 (CH₃); 37.5 (C-3); 57.4 (C-2); 80.1 (C); 123.8 (C-1'); 127.4 (C-4' and C-6'); 129.5 (C-3' and C-5'); 141.5 (C-4''); 155.9 (C-1''); 158.3 (CONH); 170.0 (C-1).

Data for *O*-[(2*S*, 3*S*)-2-*t*-butyloxycarbonylamino-3-methylpentanoyl]*p*-anisylamidoxime (3d). Yellow crystals (80% yield), mp = 112–113 °C. IR (KBr) ν_{max} /cm⁻¹: 3493 (ν NH₂, asym); 3344 (ν NH₂, sym; ν NH); 2970 (ν C-H); 1744 (ν CO₂); 1692 (ν NHCO₂); 1615 and 1520 (ν C=C, ar); 1565 (ν C=N); 1165 (ν C-O). ¹H NMR (CDCl₃) δ : 0.96 (3H, t, *J* 7.4 Hz); 1.04 (3H, d, *J* 6.9 Hz); 1.45 (9H, s); 1.16–1.70 (2H, m); 1.86–2.00 (1H, m); 3.81 (3H, s); 4.30 (1H, dd, *J* 6.3 Hz, *J* 8.1 Hz); 5.13 (1H, d, *J* 8.4 Hz); 5.49 (2H, bs); 7.91 (2H, d,

J 9.0 Hz); 8.27 (2H, d, J 9.0 Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3): 11.4 (C-5); 15.4 (CH_3); 25.1 (C-4); 28.3 (CH_3); 37.5 (C-3); 57.4 (C-2); 55.3 (O- CH_2); 80.1 (C); 113.9 (C-3' and C-5'); 122.5 (C-1'); 128.4 (C-2' and C-6'); 155.9 (C-4'); 157.8 (C-1''); 161.9 (CONH); 170.1 (C-1).

Data for *O*-[(2*S*, 3*S*)-2-*t*-butyloxycarbonylamino-3-methylpentanoyl]*p*-chlorobenzamidoxime (**3e**). White crystals (80% yield), mp 114-115 °C. IR (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3500 ($\nu\text{-NH}_2$, asym); 3358 ($\nu\text{-NH}_2$, sym); 3315 ($\nu\text{-NH}$); 2963 ($\nu\text{-C-H}$); 1751 ($\nu\text{-CO}_2$); 1692 ($\nu\text{-NHCO}_2$); 1615 and 1522 ($\nu\text{-C=C}$, ar); 1587 ($\nu\text{-C=N}$); 1172 ($\nu\text{-C-O}$). ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.95 (3H, t, J 7.5 Hz); 1.02 (3H, d, J 6.9 Hz); 1.45 (9H, s); 1.16-1.70 (2H, m); 1.80-2.00 (1H, m); 4.32 (1H, dd, J 6.0 Hz, J 8.9 Hz); 5.13 (1H, d, J 8.7 Hz); 5.19 (2H, bs); 7.25 (2H, d, J 9 Hz); 7.60 (2H, d, J 8.1 Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3): 11.4 (C-5); 15.6 (CH_3); 25.1 (C-4); 28.4 (CH_3); 37.6 (C-3); 57.5 (C-2); 80.2 (C); 128.3 (C-2' and C-6'); 128.9 (C-3' and C-5'); 129.2 (C-1'); 137.2 (C-4'); 155.1 (C-1''); 157.1 (CONH); 170.3 (C-1).

Data for *O*-[(2*S*, 3*S*)-2-*t*-butyloxycarbonylamino-3-methylpentanoyl]*p*-nitrobenzamidoxime (**3f**). White crystals (75% yield), mp 110-112 °C. IR (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3477 ($\nu\text{-NH}_2$, asym); 3341 ($\nu\text{-NH}_2$, sym; $\nu\text{-NH}$); 2967 ($\nu\text{-C-H}$); 1755 ($\nu\text{-CO}_2$); 1691 ($\nu\text{-NHC}_2\text{O}_2$); 1639 and 1522 ($\nu\text{-C=C}$, ar); 1585 ($\nu\text{-C=N}$); 1168 ($\nu\text{-C-O}$). ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.94 (3H, t, J 7.5 Hz); 1.02 (3H, d, J 6.9 Hz); 1.44 (9H, s); 1.10-1.76 (2H, m); 1.80-2.00 (1H, m); 4.31 (1H, dd, J 6.0 Hz, J 8.7 Hz); 5.15 (1H, d, J 9.0 Hz); 5.26 (2H, bs); 7.25-7.30 (2H, m); 7.40-7.50 (2H, m). ^{13}C NMR (CDCl_3): 11.3 (C-5); 15.5 (CH_3); 25.0 (C-4); 28.2 (CH_3); 37.4 (C-3); 57.4 (C-2); 80.3 (C); 123.8 (C-3' and C-5'); 127.9 (C-2' and C-6'); 136.9 (C-1'); 149.3 (C-4'); 155.9 (C-1''); 156.1 (CONH); 169.9 (C-1).

General Procedure for the Synthesis of 5-[(1'*S*, 2'*S*)-1-*t*-Butyloxycarbonylamino-2-methylbutyl]-3-aryl-1,2,4-oxadiazoles **4a-f** and 5-[(2*S*)-1-*t*-Butyloxycarbonyl-1-aminoethyl-yl]-3-phenyl-1,2,4-oxadiazole (**6**)

The intermediates **3** were heated at temperatures that varied from 100 to 120 °C. The reactions were accompanied by TLC and discontinued when the TLC plate showed the disappearance of the starting compound, in three to five hours. In the case of the compound starting from *N*-*t*-Boc-L-alanine **5**, it was not possible to isolate the intermediate. The compounds obtained **4a-f** initially had a pasty appearance, but after some days in a dry atmosphere under vacuum the compounds started to crystallize. Conversion of intermediates **3 a-f** to **4 a-f** were quantitative; however, the yields of the pure and crystalline products are given below.

Data for 5-[(1'*S*, 2'*S*)-1-*t*-Butyloxycarbonylamino-2'-methylbutyl]-3-phenyl-1,2,4-oxadiazole (**4a**). Colorless

crystals (69% yield), mp 73.3-74.4 °C (ethanol-water). $[\alpha]_D^{22}$ -44° $\pm$ 6 (c = 0.005, CHCl_3). IR (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3356 ($\nu\text{-NH}$); 2976 ($\nu\text{-C-H}$); 1716 ($\nu\text{-C=O}$); 1569 ($\nu\text{-C=N}$); 1523 ($\nu\text{-C=C}$, ar); 1160 ($\nu\text{-C-O}$). ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.95 (3H, t, J 7.2 Hz); 0.94 (3H, d, J 6.3 Hz); 1.46 (9H, s); 1.16-1.70 (2H, m); 1.94-2.12 (1H, m); 5.06 (1H, dd, J 5.7 Hz, J 8.7 Hz); 5.26 (1H, d, J 9.3 Hz); 7.40-7.56 (3H, m); 8.04-8.14 (2H, m). ^{13}C NMR (CDCl_3): 11.4 (C-4'); 15.1 (CH_3); 25.0 (C-3'); 28.3 (CH_3); 39.2 (C-2'); 52.6 (C-1'); 80.36 (C); 126.6 (C-1''); 127.5 (C-2'' and C-6''); 128.8 (C-3'' and C-5''); 131.2 (C-4''); 155.1 (C-3); 168.1 (C-5); 178.9 (CO). MS, m/z (%): 332 [MH^+ , 12%], 174 (69%), 146 (81%), 119 (100%), 104 (48%). Anal. Calc. for $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_3$: C, 65.17; H, 7.54; N, 12.67. Found: C, 65.52; H, 7.53; N, 12.98.

Data for 5-[(1'*S*, 2'*S*)-1-*t*-Butyloxycarbonylamino-2'-methylbutyl]-3-*m*-tolyl-1,2,4-oxadiazole (**4b**). Colorless crystals (80% yield), mp 59.6-60.2 °C (ethanol-water). IR (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3360 ($\nu\text{-NH}$); 2982 ($\nu\text{-C-H}$); 1685 ($\nu\text{-C=O}$); 1564 ($\nu\text{-C=N}$); 1527 ($\nu\text{-C=C}$, ar); 1176 ($\nu\text{-C-O}$). ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.94 (3H, t, J 7.4 Hz); 0.93 (3H, d, J 6.3 Hz); 1.45 (9H, s); 1.14-1.82 (2H, m); 1.94-2.12 (1H, m); 2.40 (3H, s); 5.04 (1H, dd, J 6.0 Hz, J 8.9 Hz); 5.28 (1H, d, J 8.7 Hz); 7.27 (2H, d, J 8.1 Hz); 7.96 (2H, d, J 8.4 Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3): 11.4 (C-4'); 15.1 (CH_3); 21.3 (Ar- CH_3); 25.1 (C-3'); 28.3 (CH_3); 39.3 (C-2'); 52.7 (C-1'); 80.3 (C); 123.8 (C-6''); 127.6 (C-1''); 128.6 (C-2''); 130.2 (C-5''); 132.0 (C-4''); 138.6 (C-3''); 155.2 (C-3); 168.2 (C-5); 178.9 (CO). MS, m/z (%): 345 [M^+ , 8%], 289 (53%), 233 (71%), 188 (100%), 160 (52%), 133 (86%), 118 (37%). Anal. Calc. for $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_3$: C, 66.00; H, 7.82; N, 12.16. Found: C, 66.52; H, 7.63; N, 12.28.

Data for 5-[(1'*S*, 2'*S*)-1-*t*-Butyloxycarbonylamino-2'-methylbutyl]-3-*p*-tolyl-1,2,4-oxadiazole (**4c**). Colorless crystals (75% yield), mp 65.4-66.8 °C (ethanol-water). $[\alpha]_D^{22}$ -58° $\pm$ 3 (c = 0.01, CHCl_3). IR (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3357 ($\nu\text{-NH}$); 2970 ($\nu\text{-C-H}$); 1687 ($\nu\text{-C=O}$); 1569 ($\nu\text{-C=N}$); 1510 ($\nu\text{-C=C}$, ar); 1159 ($\nu\text{-C-O}$). ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.93 (3H, d, J 6.3 Hz); 0.94 (3H, t, J 7.2 Hz); 1.45 (9H, s); 1.15-1.90 (2H, m); 1.94-2.12 (1H, m); 2.41 (3H, s); 5.05 (1H, dd, J 5.4 Hz, J 8.9 Hz); 5.29 (1H, d, J 9.3 Hz); 7.27-7.40 (2H, m); 7.84-7.92 (2H, m). ^{13}C NMR (CDCl_3): 11.4 (C-4'); 15.1 (CH_3); 21.5 (Ar- CH_3); 25.0 (C-3'); 28.3 (CH_3); 39.2 (C-2'); 52.7 (C-1'); 80.3 (C); 123.8 (C-1''); 127.4 (C-2'' and C-6''); 129.5 (C-3'' and C-5''); 141.5 (C-4''); 155.1 (C-3); 168.1 (C-5); 178.7 (CO). MS, m/z (%): 345 [M^+ , 6%], 289 (71%), 188 (98%), 160 (48%), 133 (100%), 118 (44%). Anal. Calc. for $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_3$: C, 66.00; H, 7.82; N, 12.16. Found: C, 65.93; H, 8.11; N, 12.73.

Data for 5-[(1'*S*, 2'*S*)-1-*t*-Butyloxycarbonylamino-2'-methylbutyl]-3-*p*-anisyl-1,2,4-oxadiazole (**4d**). Colorless crystals (73% yield), mp 70.3-71.2 °C (ethanol-water). IR (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3349 ($\nu\text{-NH}$); 2968 ($\nu\text{-C-H}$); 1689 ($\nu\text{-C=O}$);

1568 ($\nu\text{C}=\text{N}$); 1529 ($\nu\text{C}=\text{C}$, ar); 1173 ($\nu\text{C}-\text{O}$). ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.93 (3H, d, J 6.3 Hz); 0.94 (3H, t, J 6.6 Hz); 1.16-1.70 (2H, m); 1.45 (9H, s); 1.90-2.10 (1H, m); 3.85 (3H, s); 5.03 (1H, dd, J 5.7 Hz, J 9.0 Hz); 5.28 (1H, d, J 9.3 Hz); 6.97 (2H, d, J 9.0 Hz); 8.01 (2H, d, J 9.0 Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 11.4 (C-4'); 15.1 (CH_3); 25.1 (C-3'); 28.3 (CH_3); 34.9 (O- CH_3); 39.3 (C-2'); 52.7 (C-1'); 80.4 (C); 114.2 (C-3'' and C-5''); 119.1 (C-1''); 129.1 (C-2'' and C-6''); 155.1 (C-3); 161.9 (C-4''); 167.8 (C-5); 178.7 (CO). MS, m/z (%): 204 (100%), 176 (47%), 149 (70%), 133 (11%). Anal. Calc. for $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_4$: C, 63.15; H, 7.47; N, 11.63. Found: C, 63.35; H, 7.27; N, 12.22.

Data for 5-[(1'S, 2'S)-1'-*t*-Butyloxycarbonylamino-2'-methylbutyl]-3-*p*-chlorophenyl-1,2,4-oxadiazole (**4e**). Colorless crystals (65% yield), mp 68.2-68.8 °C (ethanol-water). $[\alpha]_D^{22} = -60 \pm 4$ ($c = 0.01$, CHCl_3). IR (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3364 ($\nu\text{-NH}$); 2968 ($\nu\text{C-H}$); 1685 ($\nu\text{C=O}$); 1562 ($\nu\text{C=N}$); 1518 ($\nu\text{C=C}$, ar); 1174 ($\nu\text{C-O}$). ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.93 (3H, d, J 6.0 Hz); 0.95 (3H, t, J 7.5 Hz); 1.14-1.80 (2H, m); 1.45 (9H, s); 1.92-2.12 (1H, m); 5.05 (1H, dd, J 5.7 Hz, J 8.7 Hz); 5.25 (1H, d, J 8.7 Hz); 7.45 (2H, d, J 9.0 Hz); 8.02 (2H, d, J 9.0 Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 11.4 (C-4'); 15.1 (CH_3); 25.0 (C-3'); 28.2 (CH_3); 39.1 (C-2'); 52.6 (C-1'); 80.4 (C); 125.1 (C-1''); 126.8 (C-2'' and C-6''); 129.1 (C-3'' and C-5''); 137.4 (C-4''); 155.1 (C-3); 167.3 (C-5); 179.0 (CO). MS, m/z (%): 208 (100%), 180 (47%), 153 (89%), 138, 20%. Anal. Calc. for $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_3\text{Cl}$: C, 59.10; H, 6.57; N, 11.49. Found: C, 59.39; H, 6.77; N, 11.14.

Data for 5-[(1'S, 2'S)-1'-*t*-Butyloxycarbonylamino-2'-methylbutyl]-3-*p*-nitrophenyl-1,2,4-oxadiazole (**4f**). Yellow crystals (80% yield), mp 76.1-77.2 °C (ethanol-water). IR (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3337 (νNH); 2969 ($\nu\text{C-H}$); 1690 ($\nu\text{C=O}$); 1575 ($\nu\text{C=N}$); 1528 ($\nu\text{C=C}$, ar); 1172 ($\nu\text{C-O}$). ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.97 (3H, t, J 7.4 Hz); 0.97 (3H, d, J 6.6 Hz); 1.47 (9H, s); 1.16-1.80 (2H, m); 1.96-2.12 (1H, m); 5.08 (1H, dd, J 6.0 Hz, J 9.0 Hz); 5.25 (1H, d, J 9.0 Hz); 8.29 (2H, d, J 9.0 Hz); 8.35 (2H, d, J 9.3 Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 11.22 (C-4'); 15.18 (CH_3); 25.08 (C-3'); 28.25 (CH_3); 39.07 (C-2'); 52.81 (C-1'); 80.63 (C); 124.0 (C-3'' and C-5''); 126.5 (C-2'' and C-6''); 132.5 (C-1''); 149.6 (C-4''); 155.1 (C-3); 166.6 (C-5); 179.9 (CO). MS, m/z (%): 219 (100%), 191 (35%), 164 (52%). Anal. Calc. for $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_5$: C, 57.44; H, 6.43. Found: C, 57.51; H, 6.72.

Data for 5-[(1'S)-*t*-Butyloxycarbonylaminoethyl-1'-yl]-3-phenyl-1,2,4-oxadiazole (**6**). White crystals (70% yield), mp 89.3-90.3 °C (ethanol-water). $[\alpha]_D^{22} = -70 \pm 2$ ($c = 0.02$, CHCl_3). IR (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3370 (νNH); 2983 ($\nu\text{C-H}$); 1687 ($\nu\text{C=O}$); 1571 ($\nu\text{C=N}$); 1518 ($\nu\text{C=C}$, ar); 1164 ($\nu\text{C-O}$). ^1H NMR (CDCl_3) δ : 1.43 (9H, s); 1.60 (3H, d, J 6.9 Hz); 5.06-5.24 (1H, m); 5.44 (1H, d, J 7.8 Hz); 7.38-7.52 (3H, m); 8.00-8.10 (2H, m). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 20.1 (C-2'); 28.3

(CH_3); 44.8 (C-1'); 80.0 (C); 126.5 (C-1''); 127.5 (C-2'' and C-6''); 128.8 (C-3'' and C-5''); 131.2 (C-4''); 168.3 (C-3); 173.7 (C-5); 180.1 (CO). MS, m/z (%): 289 [M^+ , 8%], 234 (51%), 174 (72%), 160 (100%), 119 (98%), 104 (80%). Anal. Calc. for $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_3$: C, 62.49; H, 6.30; N, 14.57. Found: C, 62.58; H, 6.27; N, 14.87.

Conclusion

In conclusion, we have been able to synthesize and prove the structures of seven new 1,2,4-oxadiazoles as well as six of their intermediates **3a-f** derived from L-(+)-isoleucine.

Acknowledgments

We are grateful to Conselho Nacional Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support and to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for a fellowship to V.M.L.B.

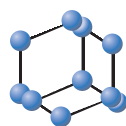
References

- Lin, J. H.; Lu, A. Y. H.; *Pharmacol. Rev.* **1997**, *49*, 403.
- Lehmann, P. A.; Rodrigues de Miranda, J. F.; Ariens, E.; *J. Prog. Drug. Res.* **1976**, *20*, 101.
- Eliel, E. L.; Wilen, S. H.; Mander, L. N.; *Stereochemistry of Organic Compounds*; Wiley-Interscience: New York, 1994, p. 207.
- Barreiro, E. J.; Ferreira, V. F.; Costa, P. R. R.; *Quim. Nova*, **1997**, *20*, 6.
- Caldwell, J.; *Hum. Psychopharm. Clin.*, **2001**, *16-Suppl. 2*, S67-S71.
- Scheuerer, S.; Williams, K. M.; Brugger, R.; McLachlan, A. J.; Brune, K.; Day, O. R.; Geisslinger, G.; *J. Pharmacol. Exptl. Ther. J.P.E.T.* **1998**, *284*, 1132.
- Jamali, F.; Berry, B. W.; Tehrani, M. R.; Russel, S. A.; *J. Pharm. Sci.* **1988**, *77*, 666.
- Silvestrini, B.; Pozzatti, C.; *Brit. J. Pharmacol.* **1961**, *16*, 200.
- Silvestrini, B.; Pozzatti, C.; *Arch. Intern. Pharmacodynamie* **1960**, *129*, 240.
- Melo, S. J.; Sobral, A. D.; Lopes, H. L.; Srivastava, R. M.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1998**, *9*, 465.
- Börg, S.; Estenne-Bouhtou, G.; Luthmau, K.; Csöreg, I.; Hesselink, W.; Hacksell, U.; *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 3112.
- Srivastava, R. M.; Brinn, I. M.; Machuca-Herrera, J. O.; Faria, H. B.; Carpenter, G. B.; Andrade, D.; Venkatesh, C. G.; de Moraes, L. P. F.; *J. Mol. Struct.* **1997**, *206*, 159.

Received: March 24, 2003

Published on the web: May 17, 2004

RESEARCH ARTICLE

BENTHAM
SCIENCEAssessment of Cytotoxic/Antitumour Potential and *in silico* Study of Salazinic Acid Isolated from *Parmotrema concurrens*

Maria Aparecida da Conceição de Lira¹, Marllyn Marques da Silva², Tamiris Alves Rocha³, Danielle Feijó de Moura¹, Erick Caique Santos Costa¹, Mayara dos Santos Maia⁴, Luciana Scotti⁴, Marcus Tullius Scotti⁴, Maria de Lourdes Lacerda Buril⁵, Eugênia Cristina Pereira⁵, Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior⁶, Mariane Cajubá de Britto Lira Nogueira³, Noemia Pereira da Silva Santos³, Emerson Peter da Silva Falcão^{7,*} and Sebastião José de Melo¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil;

²Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brazil; ³Laboratório de Tecnologia de Biomateriais, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brazil;

⁴Laboratório de Quiminformática, Programa de Pós-Graduação em Produtos Bioativos Naturais e Sintéticos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil; ⁵Departamento de Ciências Geográficas, Laboratório de Geografia Ambiental, Centro de Filosofia e Ciências Humanas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brazil; ⁶Laboratório de Biotecnologia e Fármacos, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brazil; ⁷Laboratório de Síntese e Isolamento Molecular, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brazil

Abstract: Introduction: Despite numerous scientific advances, cancer continues to be one of the main causes of death in the world. This situation has driven the search for promising molecules. Lichen substances have been widely described for their pharmacological potential.

Objective: The present study evaluated the antitumour potential of a depsidone isolated from *Parmotrema concurrens* – salazinic acid (SAL) – through *in vitro*, *in vivo* and *in silico* studies.

Methods: The molecule was isolated from the acetonic extract of the lichen and recrystallized in acetone. The macrophage J774, sarcoma-180 and MDA-MB-231 cell lines were used for the MTT cytotoxicity assay. The antitumor assay used a murine model (Swiss albino mice) with sarcoma-180. The animals were treated for seven consecutive days with doses of SAL (25 and 50 mg/kg) and 5-fluorouracil (20 mg/kg).

Results: Its purity was determined using high-performance liquid chromatography (94%), and its structure was confirmed by ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance. SAL was not considered toxic to cancer cell lines, showing cell viability rates of 79.49 ± 4.15% and 86.88 ± 1.02% for sarcoma-180 and MDA-MB-231, respectively. The tumour inhibition rate was greater than 80% in the animals treated with SAL and 65% for those that received 5-fluorouracil. Simulations of molecular dynamics to estimate the flexibility of the interactions between human thymidylate synthase and derivatives of SAL and 5-fluorouracil revealed that SAL exhibited greater enzymatic interaction capacity, with highly favourable energy, compared to 5-fluorouracil.

Conclusion: The present results demonstrate the potential of salazinic acid as a tumour inhibition agent.

Keywords: Cancer, lichen, molecular docking, Parmeliaceae, sarcoma-180, thymidylate synthase.

1. INTRODUCTION

Despite advances in science, malignant tumours still pose a considerable public health problem worldwide, and the adverse effects of therapies constitute a barrier regarding adherence to treatment [1]. While it is necessary to outline a complete therapeutic plan for a good prognosis, strategies that offer a greater quality of life to the patient should be considered when it is not possible to maintain the disease in a subclinical state [2], considering the negative effects of traditional methods used for combating neoplasms.

Selecting effective therapeutic methods with a lower cost and fewer side effects is a considerable challenge [1, 3]. Phytochemical

compounds are among the most promising candidates for combating malignant tumours [4]. Studies have reported the effectiveness of these molecules at inhibiting angiogenesis [5-8], which is fundamental to tumour development, and numerous medications of a natural or semi-synthetic origin have saved thousands of lives [9].

Lichenised fungi are organisms formed by an association between a fungus (mycobiont) and algae or cyanobacterium (photobiont) [10]. These organisms produce a variety of secondary metabolites characterised by a broad structural diversity and high complexity. Such metabolites have a phenolic nature and are known as lichen substances or phenols, which are reported to have anticancer [11-15], anti-inflammatory [16], antiproliferative, antibacterial, antifungal [17], leishmanicidal [18], larvicidal (*Aedes aegypti*) [19, 20] and antioxidant properties [21].

Considering the potential and bioactivity demonstrated by lichen metabolites and the enormous impact of different forms of

*Address correspondence to this author at the Laboratório de Síntese e Isolamento Molecular, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brazil; Tel: 55 81 996049584; E-mail: emerson.sfalcao@ufpe.br

cancer on public health, the study of novel therapeutic agents from natural sources is of extreme importance. Such studies could reveal novel agents and promising molecules that could assist in treating and lessening these diseases' impact on healthcare systems.

Therefore, the present study aimed to isolate salazinic acid (SAL) from the acetonic extract of *Parmotrema concurrens*, assess its potential cytotoxicity to cancer cells and its antitumour activity in mice exposed to sarcoma-180 (S-180) and analyse behavioural changes, biochemical characteristics and possible histopathological changes in the liver, spleen and kidney of the animals studied. Additionally, the possible association between SAL and human thymidylate synthase (a validated enzyme target for antiproliferative drugs) was investigated to determine a probable active site for the substance analysed.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Collection and Identification of Species

The species *P. concurrens* was collected from the municipality of Taquaritinga do Norte in the state of Pernambuco, northeast Brazil (altitude: 785 m; coordinates: 07° 54' 11" S and 36° 02' 39" W). The *in natura* material was identified by Dr. Maria de Lourdes Lacerda Buril of the environmental geography lab of the department of geographic sciences of Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). A voucher was deposited at the Geraldo Mariz herbarium of the UFPE botany department (deposit number: UFP84254).

2.2. Extraction and Isolation of Salazinic Acid

The extract was obtained through the exhaustion method in a soxhlet apparatus using acetone (200 mL) at boiling temperature. The solvent was then evaporated in a rotary evaporator at 40°C. The acetonic extract (2 g) was submitted to recrystallisation to obtain SAL. For such, the acetone precipitation method was performed [22] with some modifications. Vacuum filtering of the extract was performed in a G4 porous bottom-funnel using acetone as the washing solvent. The resulting solid was centrifuged in 20 mL of acetone at 1500 rpm for 10 min. The supernatant was aspirated, and the compound was placed in a desiccator for the complete evaporation of the solvent.

2.3. Chromatographic Analyses

2.3.1. Thin-layer Chromatography – TLC

The analysis by TLC of the acetonic extract was carried out [23]. The extract was diluted to a concentration of 0.01 mg.mL⁻¹, and 10 µL of the solution was placed on silica gel F₂₅₄mm chromatoplates (Merck). The elution system was a mixture of toluene:dioxane:acetic acid (180:45:5, v/v/v). The bands were viewed under UV light (254 and 366 nm) and developed with 10% sulphuric acid, followed by heating at 100 °C for 5 minutes on a hot plate.

2.3.2. High-performance Liquid Chromatography – HPLC

Analysis was performed by HPLC [24] on SAL, using a Hitachi Chromatograph (655 A-11, Tokyo, Japan) coupled to a UV CG437-B detector adjusted to 254 nm coupled to a micro pack MCH-18 reverse phase column measuring 250 x 4.6 mm and 5 mm (Merck® KGaA, Darmstadt, Germany). The sample was injected at a concentration of 1.0 mg.mL⁻¹ dissolved in chloroform (Merck®). The mobile phase consisted of methanol:deionised water:acetic acid (80:19.5:0.5, v/v/v) in an isocratic system with a pressure of 88 atm at room temperature (27 ± 3°C). The results were evaluated by determining the retention time (RT), comparison to the SAL standard and calculating the area of the peaks.

2.4. Proton and Carbon Nuclear Magnetic Resonance – NMR

The SAL's chemical structure was confirmed using H¹ and C¹³ Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectrometry. The NMR spectra were obtained using a Varian Spectrophotometer (Unity Plus-300 MHz) with DMSO- d₆ as the solvent. Chemical shifts (δ) were expressed as ppm, and coupling constants (j) are presented in hz.

2.5. Cytotoxic Activity

Cytotoxic activity was determined using the MTT method (3-(4, 5-dimethylthiazolyl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) [25] on the cancer cell lines sarcoma-180 (acquired from the cell bank of the UFPE department of antibiotics) and human breast adenocarcinoma (MDA-MB-231), beyond the macrophage J774 cell line, both acquired from the Rio de Janeiro cell bank. The cells were kept in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) supplemented with 10% foetal bovine serum and a 1% antibiotic solution (penicillin [10000 IU] and streptomycin [10 mg.mL⁻¹]) and incubated at 37°C. S-180 and macrophage J774 cells were incubated in a 5% CO₂ atmosphere. The cells (10⁵ cells/mL) were cultured in 96-well plates and incubated for 24 h. Next, SAL was dissolved in 1% dimethyl sulfoxide (DMSO) and added to wells at concentrations of 200, 100, 50, 25 and 12.5 µg/mL. After 24 h of incubation, 25 µL of MTT (5 mg.mL⁻¹) were added to each well, and the cells were further incubated for 3 h. The culture medium with MTT was aspirated, and 100 µL of DMSO was added to each well to solubilise the Formazan crystals. A group with only DMSO was used as the negative control. Absorbance was obtained at a wavelength of 630 nm in a microplate reader (Biotek ELX808). The experiments were performed in triplicate. Cytotoxicity values were expressed as cell viability: (A_{bs} of treated cell population x 100/A_{bs} untreated cell population) [26].

2.6. Experimental Animals

The *in vivo* study was conducted with male swiss albino mice (*Mus musculus*) 60 days of age (weight: 35 to 45 g). The animals fasted for eight hours before each experiment. The protocols received approval from the UFPE Animal Experimentation Ethics committee (certificate no. 23076.012019/2018.58). They were conducted in compliance with the norms stipulated by the National Animal Experimentation Board (CONCEA) and international norms (National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals).

2.6.1. Antitumour Activity

The S-180 experimental tumour was maintained in the mice in ascitic form with a seven-day maintenance frequency. The ascitic tumour cells (5.0 x 10⁶ cells/mL) were inoculated subcutaneously in the right axillary region to develop a solid tumour.

Treatment began 24 h after the inoculation of the tumour cells and was performed for seven consecutive days. Injections of the SAL solutions were administered intraperitoneally at 25 and 50 mg/kg doses, corresponding to 1.25 and 2.5% of the maximum dose of acute toxicity, respectively (data not presented). The animals in the negative control group were treated with saline solution + 5% tween 80. Those in the positive control group were treated with 5-fluorouracil (5-FU) (20 mg/kg). Ten animals were used in each group.

One day after the end of treatment, the animals were anaesthetised with a solution of ketamine (1.25 g/kg) and xylazine (0.62 g/kg). Blood samples for the biochemical analysis were collected through heart puncture, and the animals were then sacrificed with an overdose of the anaesthetic solution.

Tumour inhibition (TI) was determined based on the mean weight of the tumours from the groups that received treatment in comparison to the untreated group: $TI\% = (C - T)/C \times 100\%$, in which C is mean tumour weight in the negative control group, and T is mean tumour weight in the treated groups. For the calculation of mean weight, tumours weighing 0.39 g or less (denominated “no-takes”) were not considered [27].

2.6.2. Histomorphometric Analysis

Tumours and organs (spleen, kidney and liver) were dissected and fixed in buffered formol solution (10%) for 48 h. The samples were then dehydrated in increasing concentrations of ethyl alcohol, cleared with xylol and embedded in paraffin.

Slices measuring 4 μm in thickness were cut on a microtome and mounted on slides. The slides were kept at a temperature of 60°C for 24 h and then stained with haematoxylin and eosin (H&E). The histological images of these slides were captured with a MotiCam 2300 digital camera coupled to a microscope. Twenty fields per slide were captured at magnification 100x for the spleen samples and 400x for the liver, kidney and tumour samples. Version 1.51 (Research Services Branch, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

For the liver samples, counts were made of hepatocytes and endothelial cells. Kidney structures were evaluated by measuring the area of the glomerulus and renal corpuscle. Spleen tissue was evaluated by the percentage of areas of the white and red pulp. The tumour tissue evaluation consisted of counts of cells in mitotic phases.

2.7. In silico Study of Coupling of SAL and Human Thymidylate Synthase – hTS

2.7.1. Preparation of Ligands

The chemical structure of SAL was drawn using the Biovia Discovery Studio [28]. The structures of 5-FU and its active derivative 5-fluoro-2'-deoxyuridine 5'-monophosphate (FDUMP) were obtained from the PubChem Databank [29]. All structural energies were minimised using the Avogadro program [30]. The respective protonation states of the structures were considered to be pH 7 and were saved in sdf* format.

2.7.2. Obtainment of Metabolites

The metabolised SAL structures related to reactions mediated by the enzyme monooxygenase were predicted using the Metasite Program of Moldiscovery [31] through enzyme-substrate recognition. The five best-ranked structures were selected and drawn, and their energies were minimised using the Biovia Discovery Studio [28].

2.7.3. Preparation of Macromolecule

Human Thymidylate Synthase (hTS) (PDB: 1HVV) was retrieved from the Protein Data Bank (PDB). All water ligands, ions and molecules were manually excluded from the original structure, and hydrogen atoms were added using the Biovia Discovery Studio [28].

2.7.4. Anchorage

The AutoDock Vina, AutoDock 4 and Molegro Virtual Docker programs were used for anchorage. The active site was designated based on existing molecular interactions between amino acid residues of the enzyme substrate as well as the enzyme and co-crystallised ligand. The grid box was adjusted and fixed at a radius of 25 Å to encompass all amino acids of the active site and the interactions between the enzyme and ligand of the x-ray crystal structure. The results of the calculations were obtained in bond energy

values for each structural configuration of the ligands coupled to the target enzyme.

2.7.5. Consensus Docking

Consensus analysis was performed using the average of auto-scaled scores (AASS) [32]. Normalisation was first performed of each score obtained with the different docking programs to values between 0 and 1 by dividing the score of each molecule by the smallest score obtained. The final score of each molecule and the ranking were established by the average of all normalised scores.

2.7.6. Anchorage Validation

To validate the anchorage process, re-docking was performed of the structure of the co-crystallised ligand extracted from the enzyme by the original PDB file and interpreted in terms of root mean square deviation (RMSD) (1st structural configuration) of the atoms of the refit crystallographic ligand [33].

2.7.7. Analyses and Illustrations

The Molegro Virtual Docker program was used to analyze the interactions between the hTS amino acid residues and ligands as well as the illustrations.

2.7.8. Molecular Dynamics

Molecular Dynamics (MD) simulations were performed to estimate the flexibility of the interactions between the hTS protein and ligands using the GROMACS 5.0 program [34, 35]. The topology of the ligands was prepared using the ATB topology generator [36], applying the GROMOS96 54a7 force field. The topology of the protein was also prepared using the GROMOS96 54a7 force field in GROMACS. The MD simulation was performed using the SPC simple point-charge water model in a cubic box [37]. The system was neutralised by adding ions (Cl^- and Na^+) and minimised to remove bad contacts between complex molecules and the solvent. The system was also equilibrated at 300 K using the v-rescale algorithm in 100 ps, represented by the constant number of particles, volume and temperature (NVT), followed by equilibrium at 1 atm of pressure using the Parrinello-Rahman algorithm as the constant number of particles, pressure and temperature (NPT) up to 100 ps. The MD simulations were performed in 5.000.000 steps at 10 ns. To determine the flexibility of the structure and whether the complex was stable close to the experimental structure, the RMSD of all Ca atoms was calculated in relation to the starting structures. Root mean square fluctuations (RMSF) were also analysed to understand the role of residues close to the bonding site of the receptor. The RMSD and RMSF graphs were generated in the Grace Software program and the protein and ligands were viewed in the UCSF Chimera program [38].

2.8. Statistical Analysis

The cytotoxicity results were expressed as the mean and standard deviation (SD) of the repetitions. Analysis of variance (ANOVA) was performed with Tukey's test for multiple comparisons. A p -value < 0.05 was considered indicative of statistical significance. The Kolmogorov-Smirnov test was used to determine the normality of the histomorphometric data. The nonparametric Mann-Whitney U test was used with the statistical package for the social sciences (SPSS 15.0) to analyse these data. The data were expressed as mean $\pm$ SD, with a p -value < 0.05 compared to the control considered significant.

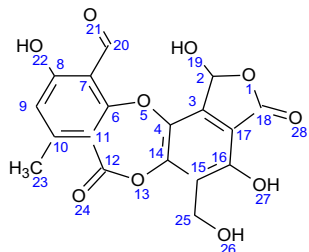
3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Obtainment of SAL

SAL isolated from the acetonetic extract of *P. concurrens* was identified by TLC (retention factor = 0.15) and HPLC (RT = 2.97

min) (Fig. 1), with data compatible with those described by Falcão *et al.* [39] and Manojlović *et al.* [40] for the substance (RT of 3.47 and 3.01 min, respectively).

The chemical structure of SAL was confirmed by the ^1H and ^{13}C NMR results, which were compatible with data described by Huneck & Yoshimura [41], Eifler-Lima *et al.* [42] and Micheletti *et al.* [22].



Salazinic acid: ^1H NMR (DMSO - d_6 , 400MHz / ppm): δ 2.379 (3H, s, CH_3); δ 4.618 (2H, s, CH_2); δ 6.779 (2H, s, H2, H9); δ 10.381 (1H, s, H_2O , CHO). ^{13}C (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 94.89 (C-2), 137.30 (C-3), 138.09 (C-4), 165.89 (C-6), 110.67 (C-7), 163.56 (C-8), 117.42 (C-9), 152.28 (C-10), 111.95 (C-11), 160.29 (C-12), 148.13 (C-14), 123.45 (C-15), 152.83 (C-16), 109.66 (C-17), 164.01 (C-18), 192.75 (C-20), 21.43 (C-23), 52.69 (C-25). Yield: 10.36%.

3.2. Cytotoxic Assay

The lowest cell viability rates in the presence of SAL were 86.54 ± 3.33 (%) and 86.88 ± 1.02 (%) at doses of 25 and 50 $\mu\text{g/mL}$, respectively, for the MDA-MB-231 cell line and 79.49 ± 4.15 (%) at a dose of 200 $\mu\text{g/mL}$ for S-180 after 24 h of incubation.

The SAL was not toxic to macrophage J774 cells at the lowest doses, 12.5 and 25 $\mu\text{g/mL}$ (100.5 ± 2.66 and 91.48 ± 2.90 %, respectively) (Fig. 2).

Paluszczak *et al.* [43] also evaluated SAL in cell viability assays using colorectal carcinoma cell lines (HCT116 and DLD-1). They found a viability rate of approximately 60% when exposed to SAL at a 100 $\mu\text{g/mL}$ dose. Micheletti *et al.* [22] found a cell viability rate of 85.31% for the human breast cancer cell line MDA-MB-435 exposed to SAL at a dose of 25 $\mu\text{g/mL}$. These data are compatible with the cell viability rates found in the present investigation.

The present results are also compatible with cytotoxic data reported by Manojlović *et al.* [40], who evaluated the FemX (human melanoma) and LS174 (human colon carcinoma) cell lines in the presence of SAL and found viability rates of approximately 65%. Thus, the available data suggest that SAL does not exhibit high toxicity to cancer cell lines.

3.3. Effect of SAL in Mice with S-180 Tumour

3.3.1. Assessment of Biochemical Variables

No significant difference was found between the treated and control groups regarding plasma levels of albumin, total proteins or alanine aminotransferase (ALT).

However, a reduction in aspartate aminotransferase (AST) was found in the group that received SAL25, and a reduction in triglycerides was found in all treated groups compared to the negative control. Moreover, an increase in glucose was found in the groups exposed to SAL25 and 5-FU, and an increase in cholesterol levels was found in the group exposed to SAL25 (Table 1).

ALT and AST are specific biomarkers of hepatotoxicity used in early clinical trials to monitor acute harm caused by ingesting

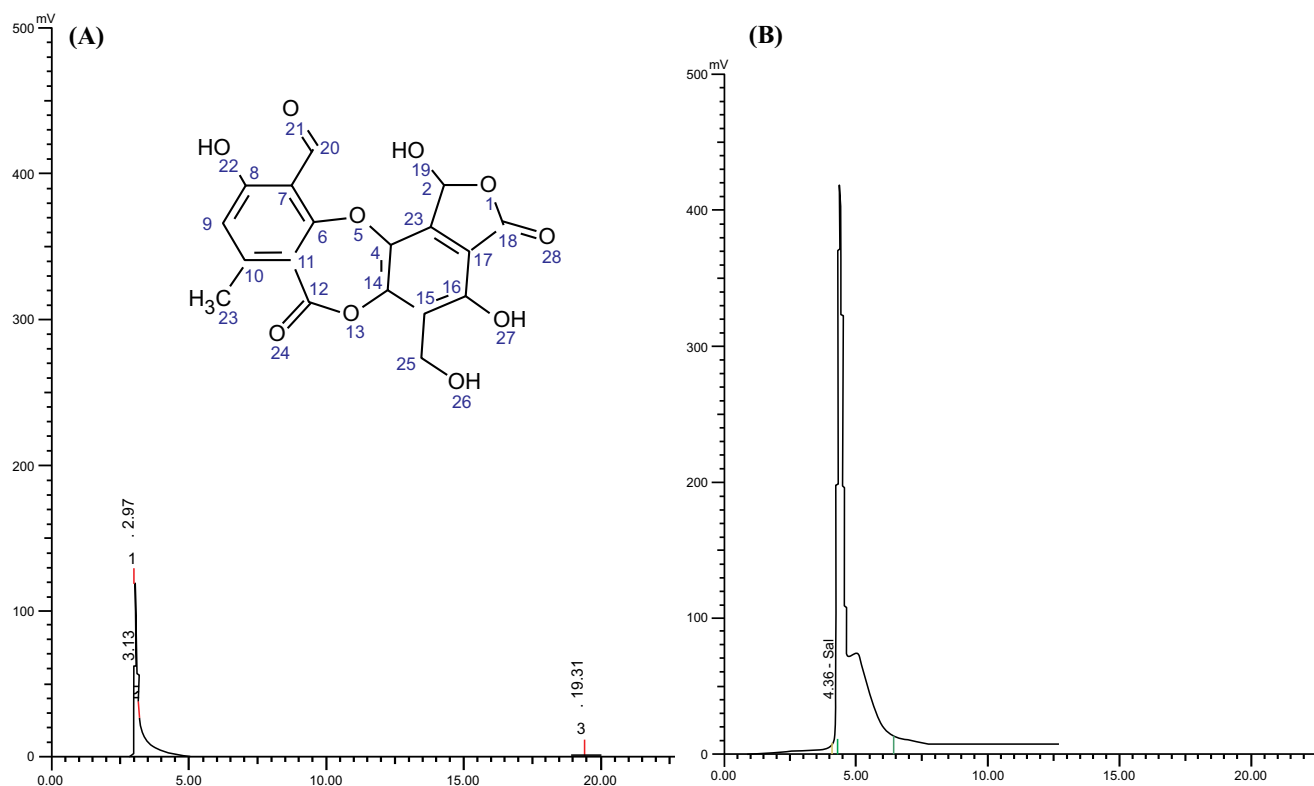


Fig. (1). HPLC chromatograms of salazinic acid isolated from *P. concurrens* (A); salazinic acid standard (B). (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

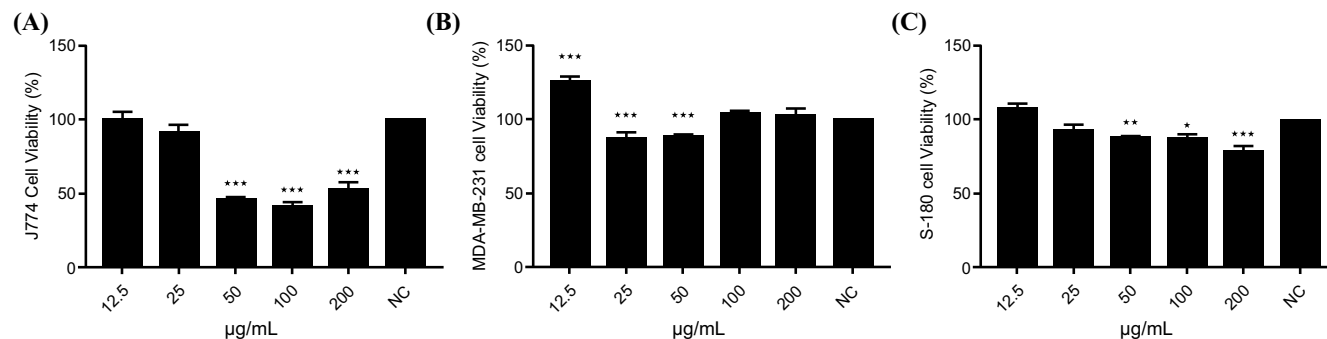


Fig. (2). Cell viability of macrophage J774 (A), MDA-MB-231 (B) and S-180 (C) cell lines in the presence of SAL. Data expressed as mean $\pm$ SD. * p < 0.05, ** p < 0.01; *** p < 0.001 vs. negative control. Statistically significant differences were determined by ANOVA followed by Tukey's test. NC = negative control (saline solution + 5% Tween 80). (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

Table 1. Biochemical variables were analysed in mice exposed to S-180 and treated with SAL and 5-FU.

Groups	ALT (U/L)	AST (U/L)	Albumin (g/dL)	Triglycerides (mg/dL)	Total Proteins (g/dL)	Glucose (mg/dL)	Cholesterol (mg/dL)
NC	59.70 $\pm$ 9.94	246.30 $\pm$ 42.86	2.87 $\pm$ 0.10	213.43 $\pm$ 30.10	4.74 $\pm$ 0.14	68.60 $\pm$ 20.40	127.72 $\pm$ 6.43
5-FU	45.73 $\pm$ 8.56	230.77 $\pm$ 43.72	2.99 $\pm$ 0.10	149.66 $\pm$ 22.68***	4.93 $\pm$ 0.27	132.06 $\pm$ 9.32***	120.95 $\pm$ 8.97
SAL25	60.89 $\pm$ 15.55	229.46 $\pm$ 32.77	2.91 $\pm$ 0.26	189.01 $\pm$ 35.69**	4.88 $\pm$ 0.27	105.65 $\pm$ 13.87***	142.13 $\pm$ 9.44*
SAL50	53.39 $\pm$ 14.68	178.90 $\pm$ 44.71*	2.94 $\pm$ 0.18	155.73 $\pm$ 19.50***	4.85 $\pm$ 0.23	72.48 $\pm$ 10.51	121.37 $\pm$ 12.95

Note: Data expressed as mean $\pm$ SD; (N = 10); Significant differences determined by ANOVA followed by Tukey's test, * p < 0.05, ** p < 0.01; *** p < 0.001 vs. NC = negative control; 5-FU = 5-fluorouracil; SAL = salazinic acid 25/50 mg/kg; ALT = alanine aminotransferase; AST = aspartate aminotransferase.

therapeutic drugs. ALT is a more specific hepatic marker than AST. This enzyme is found in the heart, skeletal muscle, brain and liver. Thus, it is not possible to confirm liver damage based on AST levels in the bloodstream [44].

The significant reduction in triglycerides found in the treated animals and the increase in glucose levels in the mice treated with SAL25 and 5-FU indicate harmful effects on the organism due to metabolic imbalance [45].

3.3.2. Tumour Growth and Inhibition

A significant difference in tumour weight was found in all treated groups compared to the negative control (5.2 $\pm$ 1.91 g). Tumour weight was significantly lower in the animals exposed to SAL at concentrations of 25 and 50 mg/kg (1.03 $\pm$ 0.39 and 0.73 $\pm$ 0.35 g, respectively). The mean tumour weight in the positive control group (treated with 5-FU) was 1.79 $\pm$ 0.56 g (Fig. 3). All animals survived to the end of treatment with no behavioural changes.

The different doses of SAL presented promising results in terms of the percentage of inhibition of the S-180 tumour. The greatest inhibition rate (86%) was found in the group treated with a dose of 50 mg/kg, and the inhibition rate was 80.23% in the group treated with a dose of 25 mg/kg. The 5-FU group's inhibition rate was 65.46% (Fig. 3).

S-180 is considered valid for determining antitumour activity due to its versatility in the form of an ascetic or solid tumour, depending on the injection site, as well as its aggressivity to the organism. Therefore, this cell line is suitable for preclinical studies of natural or synthetic substances. The use of S-180 *in vitro* and *in vivo* is sufficient to prove the antitumour potential of the molecule being tested [46]. An agent with anticancer potential is considered

valid when it can slow the cell proliferation process and trigger the signalling of mechanisms that initiate the cell death process [47].

The present results are in agreement with data described by Alexandrino *et al.* [8], who evaluated the potential of SAL (33.3 mg/kg) in mice with the B16-F10 tumour (murine melanoma) and found an 83% reduction in tumour growth. However, the authors used a higher concentration of SAL than that employed in the present study (25 mg/kg), with which tumour inhibition was around 80%.

Geng *et al.* [15] also found an anticancer effect of another lichen phenol - usnic acid. Despite not being a depsidone-like SAL, similarities are found in its chemical structure and biosynthetic origin. The authors evaluated the effect of usnic acid (100 mg/kg) and 5-FU (25 mg/kg) in BALB/C mice with gastric cancer. They found that the lichen substance was significantly more effective at suppressing tumour growth than the commercial drug 5-FU. This finding agrees with the present study's results and shows that some lichen acids are more effective than 5-FU.

The 5-FU is widely used in chemotherapy. This drug belongs to the group of antimetabolite agents and functions by blocking the synthesis of DNA and inhibiting the metabolism of folic acid coenzymes. 5-FU is a fluorinated pyrimidine analogue with a 10 to 30% single-agent response rate. However, its continuous use can have serious side effects, such as myelosuppression and immunosuppression, due to its low selectivity for tumour cells in relation to healthy cells [48, 49].

The cellular toxicity mechanism of 5-FU is attributed to the negative incorporation of fluoronucleotides in DNA and RNA and the inhibition of thymidylate synthase (TS), a nucleotide enzyme. The enzymatic activity of TS is considerably enhanced in neoplastic cells and is directly linked to the tumour proliferation rate [50].

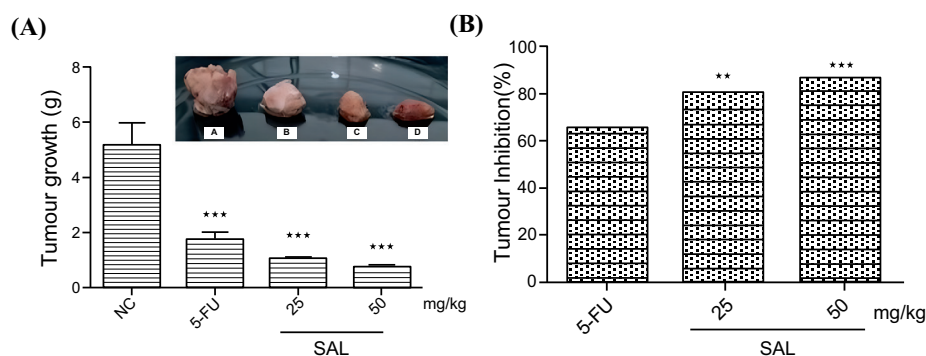


Fig. (3). Tumour growth (mg/kg) (A) and Tumour inhibition (%) (B) in mice exposed to S-180 and treated with SAL and 5-FU. Data expressed as mean $\pm$ SD. (N = 10). Significant differences were determined by ANOVA followed by Tukey's test. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. NC. Tumour photography (inserted in figure A): NC = negative control (A); 5-FU = 5-fluorouracil (B); SAL = salazinic acid 25 mg/kg (C) and 50 mg/kg (D). (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

However, chemotherapy remains one of the most efficient and widely used methods for anticancer therapy [51]. Moreover, studies have shown that bioactive molecules of a natural origin are promising candidates for this purpose [4].

Due to the production of different classes of metabolites, lichens are considered promising organisms in the search for therapeutic agents for combating neoplastic diseases. Moreover, the antitumour effect of these metabolites can be mediated by the indirect induction of cell apoptosis as well as antiproliferative activity [13].

3.3.3. Histomorphometric Analysis of S-180 Tumour

The histopathological analysis of the S-180 tumours in the treated and negative control groups revealed pleomorphic cells, anaplasia, hyperchromatic nuclei, and degrees of pleomorphism. Areas of muscle invasion, unilocular adipose tissue invasion and the infiltration of blood vessels were also observed. These results are compatible with findings described by Santos *et al.* [7], who highlight the infiltrative potential of S-180 in adjacent tissues, such as nerves, fat and muscle fibres. All groups exhibited tissue necrosis, with a greater area extension in the treated groups (Fig. 4). Cell proliferation was also found, with high numbers of cells in mitotic phases.

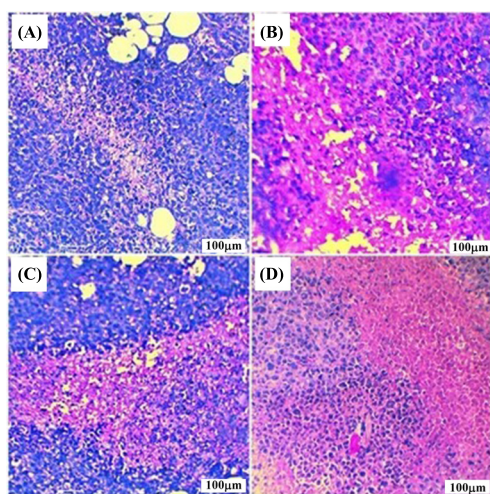


Fig. (4). Representative photomicrographs of tumours in mice exposed to S-180 and treated with SAL and 5-FU. Negative control group (A); treated with 5-FU (B); treated with SAL at doses of 25 (C) or 50 mg/kg (D). H&E staining (magnification: 100X). (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

Atypical mitosis was found in all groups. No significant differences were found regarding the quantity of mitoses in the negative control group and experimental groups: 10.63 ± 2.48 , 10.06 ± 2.69 , 10.43 ± 3.99 and 10.69 ± 3.34 in the negative control, 5-FU, SAL 25 and SAL 50 mg/kg groups, respectively.

According to Cireşan *et al.* [52] and Veta *et al.* [53], the quantity of visible mitoses in histological slices is an important indicator for the screening and assessment of neoplasms as well as the determination of the aggressivity of the tumour cells, furnishing a reproducible prognosis regarding invasive tumours [54, 55].

3.3.4. Histomorphometric Analysis of Kidney, Spleen and Liver

The histomorphometric analysis of the liver revealed a significant increase in the number of hepatocytes and endothelial cells in the groups exposed to the different doses of SAL compared to the negative control (Table 2). These findings may be related to the increase in the organ found in the experimental animals.

For the spleen, a reduction in white pulp was found in the groups treated with SAL, and an increase in red pulp was found in the group exposed to SAL50 compared to the negative control (Table 2).

A significant reduction was found in the glomerulus in the group that received SAL50 compared to the negative control for the kidney. No significant difference in the size of the renal corpuscle was found between the treated groups and the negative control (Table 2).

The liver tissue is very sensitive to lesions induced by synthetic and natural compounds due to its central role in the metabolism of these substances [56]. Indeed, hepatotoxicity is one of the main aspects to study during the verification of the action of a drug in the organism, especially during prolonged periods of therapeutic use [57]. The detoxification process occurs in the liver as the metabolic products of many chemotherapeutic drugs accumulate in this tissue, causing harm due to toxicity [47].

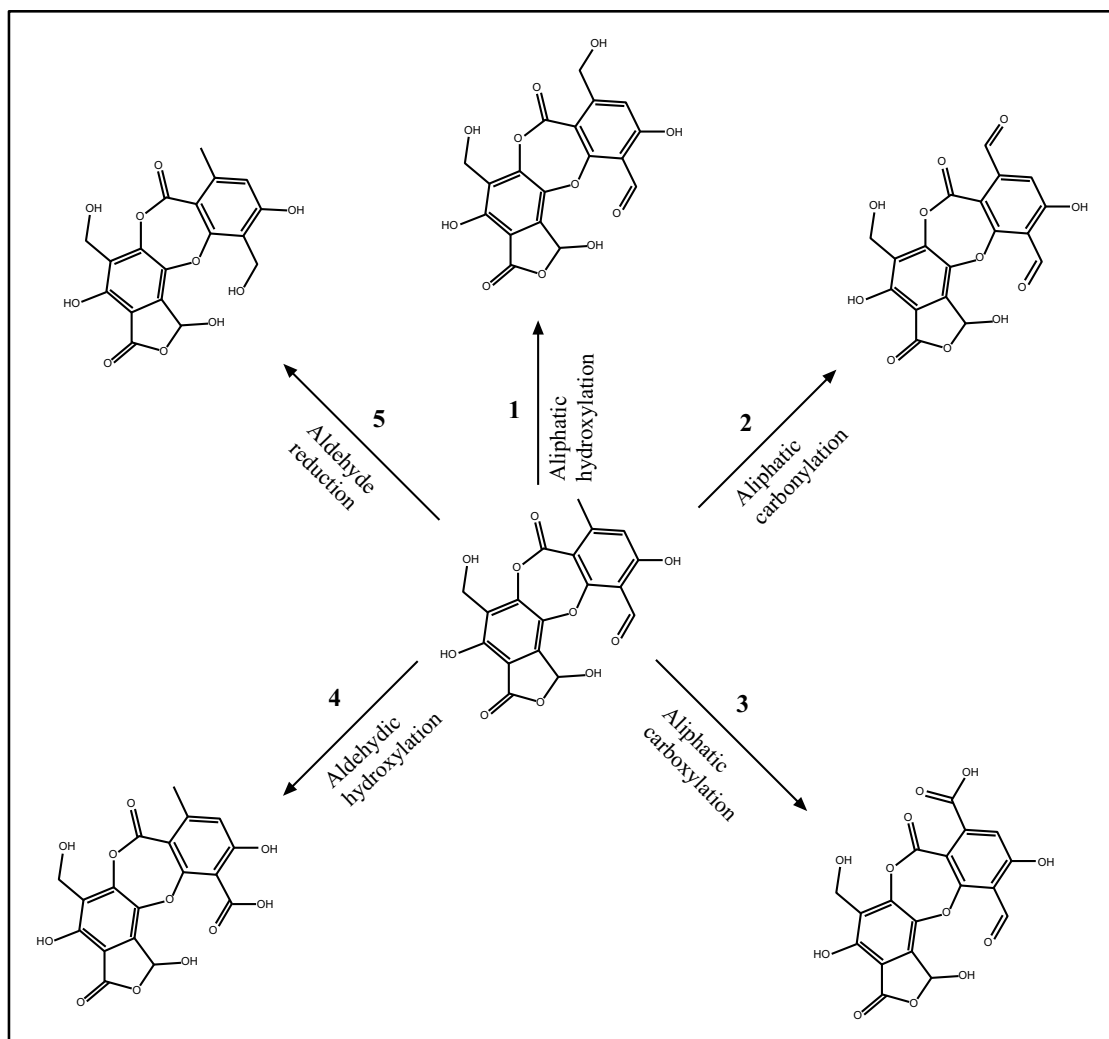
An increase in the number of liver cells may indicate tissue damage. Hepatocytes have an important metabolic function. Their abnormal proliferation may indicate possible tissue regeneration to compensate for adverse conditions influenced by different factors, such as the administration of therapeutic drugs [58].

Endothelial cells play an important role in maintaining liver function under adverse conditions caused by external agents. The increase in the quantity of these cells may be related to exposure to toxins, chemical products and pharmacological agents [59].

Table 2. Histomorphometric analysis of liver, kidney and spleen of mice exposed to S-180 and treated with SAL and 5-FU.

Groups	Liver (Mean No of Cells per Photomicrograph)		Kidney (μm^2)		Spleen (% per Photomicrograph)	
-	Hepatocytes	Endothelial cells	Corpuscle	Glomerulus	White pulp	Red pulp
NC	39.35 $\pm$ 6.87	13.07 $\pm$ 3.71	4455.25 $\pm$ 1600.6	2912.597 $\pm$ 971.7	23.28 $\pm$ 8.01	74.01 $\pm$ 7.37
5-FU	38.41 $\pm$ 9.05	12.69 $\pm$ 3.57	4034.84 $\pm$ 1218.3	2614.538 $\pm$ 784.1	22.46 $\pm$ 7.90	74.53 $\pm$ 7.61
SAL25	54.74 $\pm$ 11.87***	18.95 $\pm$ 5.55***	4570.97 $\pm$ 2064.9	2939.502 $\pm$ 1434.3	15.58 $\pm$ 3.00**	81.97 $\pm$ 2.41**
SAL50	56.74 $\pm$ 14.45***	20.30 $\pm$ 5.93***	4410.087 $\pm$ 1619.7	2602.429 $\pm$ 954.7*	18.96 $\pm$ 6.44*	78.38 $\pm$ 6.66

Note: Mann-Whitney test. Data expressed as mean $\pm$ SD. (N = 10). * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001 vs. NC = negative control; 5-FU = 5-fluorouracil; SAL = salazinic acid 25 / 50 mg/kg.

**Fig. (5).** Metabolites of SAL (D1-5) and respective reactions.

Renal tissue is also very sensitive to harm caused by foreign agents in the bloodstream. The cells of this tissue have the function of the resorption and concentration of solutes, making metabolised compounds interact with their organelles, which can alter the cell signalling pathway and even cause tissue damage [60].

The spleen can also undergo ultrastructural changes, which emerge not only due to the negative effect of the substance but also due to the reaction of the tissue, increasing the activity of defence cells [61], which indicates the protection of the organ from a possible harmful reaction caused by the compound [62].

3.4. In silico Analysis

3.4.1. Obtainment of Metabolites

Five structures of the most probable metabolites of SAL with a higher contribution score (D1-5) were selected. The contribution score results from the probability function for the metabolism site (P_{MS}), which is correlated with the free energy of the overall enzyme-substrate coupling process [63]. Fig. (5) illustrates the SAL transformations with the greatest probability and respective reactions.

The first three metabolites generated (D1-3) are the result of aliphatic hydroxylation and carbonylation reactions in the carbon of the methyl group of SAL and have the highest contribution scores (100%). Metabolites D4-5 are from aldehydic hydroxylation reactions and the reduction of aldehydes, with contribution percentages of 50%. The other metabolites had contribution scores lower than 33.33% and were disregarded (data not shown).

3.4.2. Active Site of Human Thymidylate Synthase (hTS)

Thymidylate synthase is a valid target for antiproliferative drugs that has a catalysing function in the reductive methylation process of 2'-deoxyuridine-5'-monophosphate (dUMP) into 2'-deoxythymidine-5'-monophosphate (dTTP) through the cofactors N⁵, N¹⁰-methylenetetrahydrofolate (mTHF). Moreover, it is extremely important for the replication of DNA and impedes rapid cell division processes through cellular apoptosis [64].

Structurally, hTS is an obligatory homodimer with residues of the two subunits -A and B (Fig. 6) -as contributors to the coupling of the substrate. Besides the amino acid residues Arg 50, Phe 80, Ile 108, Trp 109, Asn 112, Arg175', Arg176', Arg215, Gln 214, Asp 218, Gly 222, Phe 225, Asn 226, His 256, Tyr 258 and Met 311, the target site also has residues (181-197) and Cys 195 of the catalytic loop, which is exposed only in the active conformation [64-66].

The scores obtained in the coupling of all ligands were energetically favourable. However, consensus docking was performed to obtain a greater success rate in the screening of the compounds.

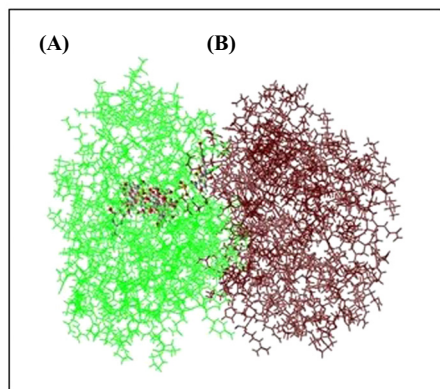


Fig. (6). Cluster of ligands and hTS highlighting (A) and (B) subunits. (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

Studies have shown that combining different molecular docking programs increases the probability of hits [67]. Thus, a ranking was established among the means of the consensus of SAL, its possible metabolites (D1-5), FdUMP and the co-crystallised ligand (Table 3).

As shown in Table 3, D3 was the compound with the best coupling mean (0.98), followed by D5 (0.95). SAL and D2 had the same coupling mean (0.94). The co-crystallised ligand and o FdUMP had coupling means of 0.88 and 0.84, respectively.

To determine what interactions may be determinants for the inhibition, the three compounds with the best coupling mean and the standard compounds (co-crystallised ligand and FdUMP) were analysed regarding their interactions with the amino acid residues of hTS (Fig. 7).

All compounds interacted with amino acid residues of the active site of hTS with hydrogen bond interactions. D3 had hydrogen bond interactions with the residues Glu 87, Ile 108, Arg 175, His 196, Gln 214, Ser 216, Asp 218, Asn 226 and His 256. Moreover, two Arg residues (Arg 50 and Arg 175) had two electrostatic interactions with the carboxyl group in the aromatic ring (Fig. 7A). D5 had similar interactions as D3 with Arg 50, Arg 175, His 196, Gln 214, Ser 216, Asp 218, Asn 226, His 256, Tyr 258 and Ala 312 (Fig. 7B).

In its non-metabolised form, SAL interacted with four residues (Ile 108, Gln 214, Ser 216 and Asp 218). Ser 216 was the residue consistently found in all interactions with the other compounds (Fig. 7C).

Amino acid residues Arg 50, Ile 108, Gln 214, Ser 216, Asp 218 and Tyr 258 interacted with the co-crystallised ligand (Fig. 7D). The main difference found between the interactions of the co-crystallised ligand and the other compounds was the absence of Arg 175. FdUMP interacted with seven amino acid residues (Arg 50, Asn 171, Asp 173, Arg 175, Arg 176, Arg 215 and Ser 216) (Fig. 7E).

Electrostatic interactions with important residues of the active site of hTS (Arg 50 and Arg 175) did not occur in all compounds. Hence, this is a peculiarity of D3 that may be related to its first position in the ranking of coupling means. However, hydrogen interactions with residues such as Arg 50, Arg 175 and Ser 216 were found in all compounds and are important to inhibiting hTS.

3.4.3. Molecular Dynamics

The molecular dynamics simulations were performed to investigate whether the three compounds with the best coupling means in

Table 3. Ranking of compounds based on consensus docking means.

ID	Binding Energies ¹			Consensus			
	Vina	Auto Dock 4	Molegro	Vina	Auto Dock 4	Molegro	Mean
D3	-10.1	-7.01	-145.85*	1.00	0.94	1.00	0.98
D5	-9.7	-7.48*	-127.858	0.96	1.00	0.88	0.95
D2	-9.9	-7.37	-124.887	0.98	0.99	0.86	0.94
SAL	-10.1*	-7.26	-122.718	1.00	0.97	0.84	0.94
D1	-9.7	-6.81	-133.029	0.96	0.91	0.91	0.93
D4	-9.3	-6.95	-137.75	0.92	0.93	0.94	0.93
Ligand	-9	-6.22	-135.325	0.89	0.83	0.93	0.88
FdUMP	-8.5	-6.66	-115.548	0.84	0.89	0.79	0.84
5-FU	-4.9	-4.51	-74.4245	0.49	0.60	0.51	0.53

Note: D1-5 = metabolite derivatives of SAL; SAL = salazinic acid; FdUMP = 5-fluoro-2'-deoxyuridine 5'-monophosphato; 5-FU = 5-fluorouracil. *lowest bond energies. ¹Binding energies in kcal/mol for Vina and Autodock 4 and kJ/mol for Molegro.

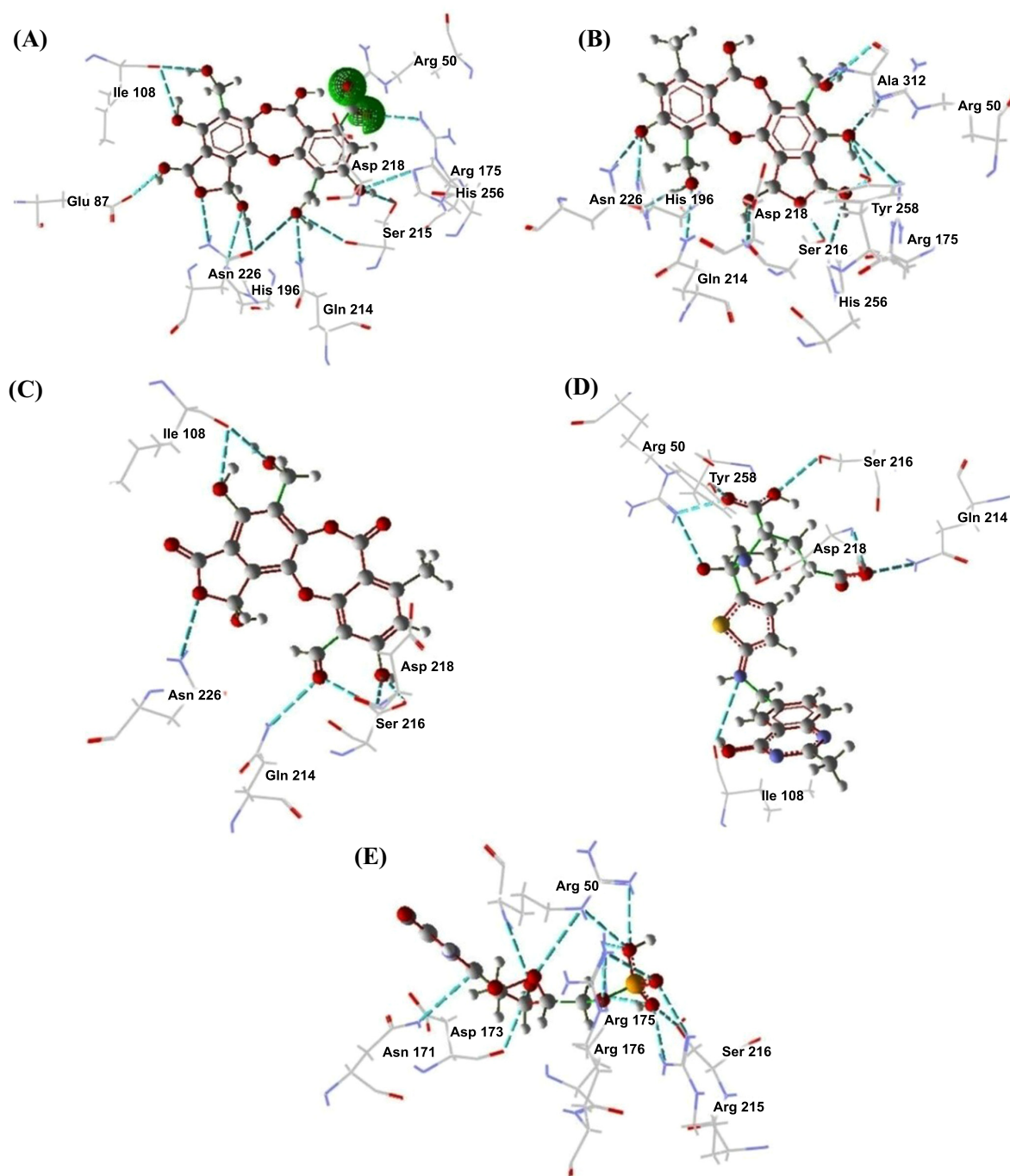


Fig. (7). Interactions between amino acid residues of the active site of hTS and metabolite derivatives of SAL. D3 (A), D5 (B), SAL (C), co-crystallised ligand (D) and FdUMP (E). D3-5= metabolite derivatives of SAL; SAL= salazinic acid; FdUMP= active derivative of 5-fluorouracil. (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

the molecular docking and the two standard compounds can bond to hTS under the influence of the water solvent, ions, temperature and pressure.

Flexibility and conformational changes in the structure of hTS were also investigated to analyse the influence of structural changes in the bonds and interactions with the compounds. For such, the root mean square deviation (RMSD) was calculated for C α atoms of the protein and compounds separately.

The RMSD analysis of hTS revealed that the protein reached fluctuations ranging from 0.2 to 0.4 nm at 10 ns, exhibiting greater stability throughout practically all the dynamics, with some peaks at 7 and 9 ns. The complexed protein exhibited greater stability along the 10 ns than the non-complexed protein. Thus, hTS complexed with the compounds is more stable than the non-complexed protein, enabling the compounds analysed to remain strongly bonded to the target site.

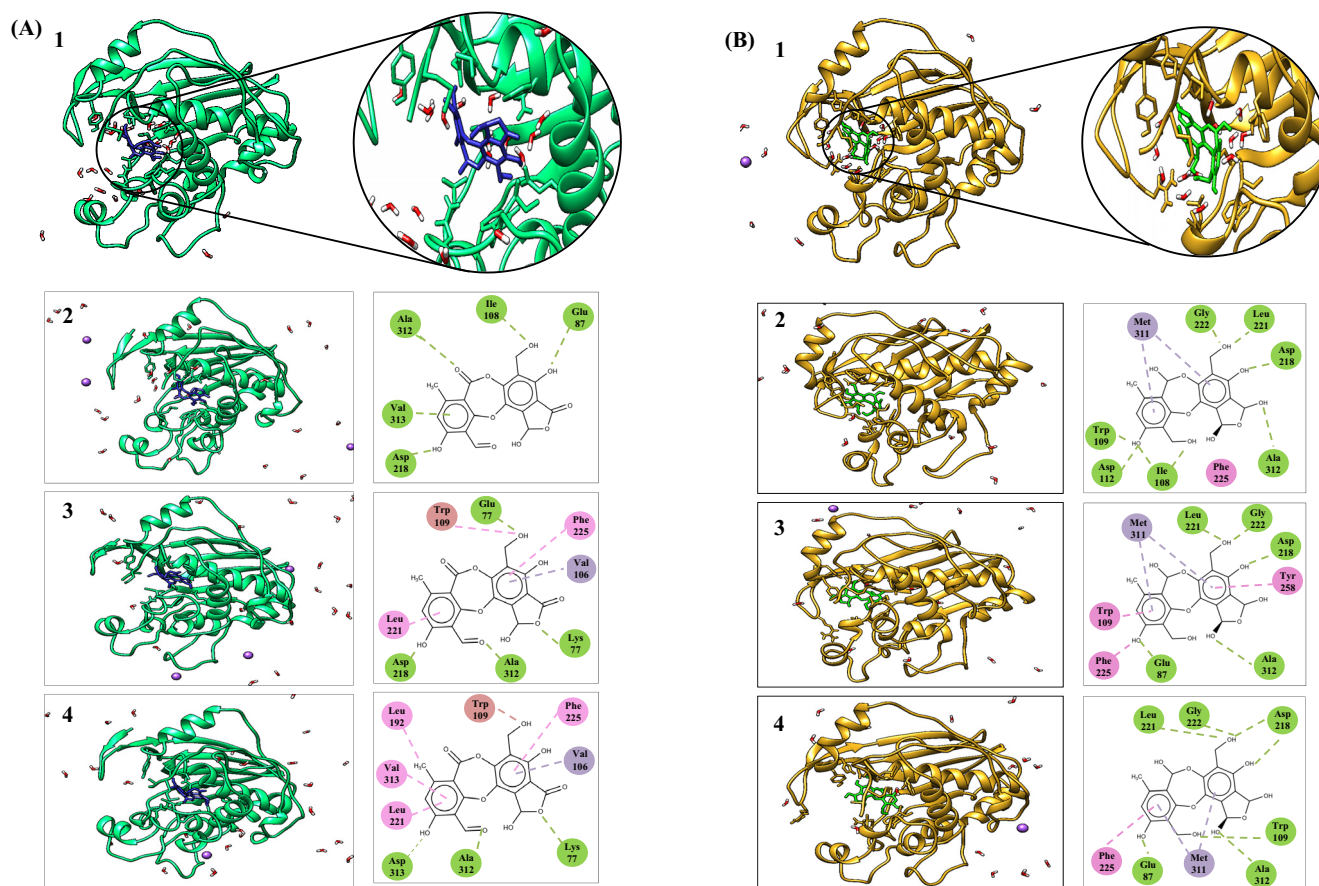


Fig. (8). Simulations of molecular dynamics during 1000 ps and 2D and 3D interactions at different times. **A1-** Structure of hTS+SAL complex and its active site; 3D and 2D interactions at **A2-** 200 ps; **A3-** 600 ps and **A4-** 1000 ps. **B1-** Structure of hTS+D5 complex and its active site; 3D and 2D interactions at **B2-** 200ps, **B3-** 600 ps and **B4-** 1000 ps. Hydrogen bonds with solvent (SOL) and different amino acids are highlighted in green. Hydrophobic and steric interactions are highlighted in violet and red, respectively. (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

The RMSD of the compounds revealed stability beginning at 3 ns. All compounds analysed, except the ligand, exhibited stability. The findings suggest that the SAL, D3, D5 and FdUMP molecules remain at the protein's active site even in the presence of factors such as temperature, pressure, solvent and ions. The root mean square fluctuations (RMSF) were calculated for each protein amino acid to understand the flexibility of the residues and amino acids that contribute to the conformational change in hTS. Residues with high RMSF values suggest greater flexibility.

As amino acids with fluctuations greater than 0.3 nm contribute to the flexibility of the protein structure, we found that only amino acids 44, 46, 48-51, 175 and 310-313 of the 313 amino acids present in the protein contributed to the conformational change of the complexed protein. We found the same fluctuations with these amino acids in the non-complexed protein. Moreover, we found that the majority of amino acids responsible for the conformational change in hTS were not part of the active site, except Arg175, Met311 and Ala312 [68]. Therefore, the active site was considered stable.

When analysed using graphic programs, we found that hTS complexes with the SAL molecule exhibited small conformational changes, as identified by the RMSD values. Some bonds observed in the docking were lost. However, the bond with the residue of Arg 175, which is important to the inhibition of hTS, was maintained. Moreover, other strong bonds were formed with the amino acids Gly 44, Trp 182 (of the catalytic loop) and Gln 270 (Fig. 8A).

Analysing the RMSD and RMSF graphs, D5 exhibited considerable stability throughout the dynamic's entire time. Fig. (8B)

shows some interactions between D5 and hTS. D5 maintained an important interaction with the residue of Arg175 and exhibited new interactions compared to those observed in the docking. Two new interactions were formed with the residues Trp182 (present in the catalytic loop) and Arg215, which, together with Arg 50, Arg 175' and Arg 176', form a cluster of four arginine residues of fundamental importance to the anchoring of the substrate (dUMP) at the active site [64].

CONCLUSION

Salazinic acid did not exhibit toxicity to the cancer cell lines but demonstrated *in vivo* antitumour activity to sarcoma-180 without causing significant harm to the kidney, liver or spleen.

SAL exhibited interaction capacity with human thymidylate synthase, with highly favourable energy (better than that of 5-FU) and was also capable of forming bonds with critical residues of the active site of the enzyme analysed. Thus, the present findings demonstrate that salazinic acid is a strong candidate as an anti-cancer agent.

LIST OF ABBREVIATIONS

AASS	=	Average of Auto-scaled Scores
ALT	=	Alanine Aminotransferase
DMEM	=	Dulbecco's Modified Eagle Medium
MD	=	Molecular Dynamics

NMR = Nuclear Magnetic Resonance
 RMSF = Root Mean Square Fluctuations
 TI = Tumour Inhibition
 TS = Thymidylate Synthase

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

The protocols received approval from the UFPE Animal Experimentation Ethics Committee (Certificate No. 23076.012019/2018.58).

HUMAN AND ANIMAL RIGHTS

No humans were involved that are the basis of this research. The study was conducted in compliance with the norms stipulated by the National Animal Experimentation Board (CONCEA) as well as international norms (National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals).

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

AVAILABILITY OF DATA AND MATERIALS

The authors confirm that the data supporting the findings of this study are available within the article.

FUNDING

This work was supported by *coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior* [coordination for the advancement of higher education personnel] (grant number 88882.379866/2019-01) and [ufpe dean's office of research and postgraduation programs].

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

Declared none.

REFERENCES

- [1] Mun, E.J.; Babiker, H.M.; Weinberg, U.; Kirson, E.D.; Von Hoff, D.D. Tumor-treating fields: A fourth modality in cancer treatment. *Clin. Cancer Res.*, **2018**, *24*(2), 266-275. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-1117> PMID: 28765323
- [2] Wang, J.J.; Lei, K.F.; Han, F. Tumor microenvironment: Recent advances in various cancer treatments. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, **2018**, *22*(12), 3855-3864. <http://dx.doi.org/10.26355/eurrev201806-15270> PMID: 29949179
- [3] Abotaleb, M.; Kubatka, P.; Caprnda, M.; Varghese, E.; Zolakov, B.; Zubor, P.; Opatrilova, R.; Kruzliak, P.; Stefanicka, P.; Büßelberg, D. Chemotherapeutic agents for the treatment of metastatic breast cancer: An update. *Biomed. Pharmacother.*, **2018**, *101*, 458-477. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.108> PMID: 29501768
- [4] Kapinova, A.; Kubatka, P.; Golubnitschaja, O.; Kello, M.; Zubor, P.; Solar, P.; Pec, M. Dietary phytochemicals in breast cancer research: Anticancer effects and potential utility for effective chemoprevention. *Environ. Health Prev. Med.*, **2018**, *23*(1), 36. <http://dx.doi.org/10.1186/s12199-018-0724-1> PMID: 30092754
- [5] Song, Y.; Dai, F.; Zhai, D.; Dong, Y.; Zhang, J.; Lu, B.; Luo, J.; Liu, M.; Yi, Z. Usmic acid inhibits breast tumor angiogenesis and growth by suppressing VEGFR2-mediated AKT and ERK1/2 signaling pathways. *Angiogenesis*, **2012**, *15*(3), 421-432. <http://dx.doi.org/10.1007/s10456-012-9270-4> PMID: 22669534
- [6] Barroso, M.M.C.; Alves, R.T.; Santos, S.T.D.; Pacifico Cavalcanti-Neto, M.; Pereira da Silva Santos, N.; Gonçalves da Silva, T.; Amanajás Aguiar-Junior, F.C.; da Silva Falcão, E.P.; Pereira, E.C.; da Silva, N.H. *In vitro* and *in vivo* antineoplastic activity of barbatic acid. *Int. Arch. Med.*, **2016**, 1-9. <http://dx.doi.org/10.3823/1934>
- [7] Santos, G.J.L.; Oliveira, E.S.; Pinheiro, A.D.N.; da Costa, P.M.; de Freitas, J.C.C.; de Araújo, S.F.G.; Maia, F.M.M.; de Moraes, S.M.; Nunes-Pinheiro, D.C.S. *Himatanthus drasticus* (Apocynaceae) latex reduces oxidative stress and modulates CD4⁺, CD8⁺, FoxP3⁺ and HSP-60⁺ expressions in Sarcoma 180-bearing mice. *J. Ethnopharmacol.*, **2018**, *220*, 159-168. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2017.09.043> PMID: 29079220
- [8] Alexandrino, C.A.F.; Honda, N.K.; Matos, M.F.C.; Portugal, L.C.; Souza, P.R.B.; Perdomo, R.T.; Guimarães, R.C.A.; Kadri, M.C.T.; Silva, M.C.B.L.; Bogo, D. Antitumor effect of depsidones from lichens on tumor cell lines and experimental murine melanoma. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **2019**, *29*(4), 449-456. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2019.04.005>
- [9] Souza, M.V.N.; Pinheiro, A.C.; Ferreira, M.L.; Gonçalves, R.S.B. Lima, CHC natural products in advance clinical trials applied to cancer. *Rev. Fit.*, **2007**, *3*, 25-42. <http://dx.doi.org/10.32712/2446-4775.2007.72>
- [10] Hale- JR, M.E *The Biology of Lichens*, 3rd Ed; Edward Arnold Pub.: London, **1983**.
- [11] Ebrahim, H.Y.; Elsayed, H.E.; Mohyeldin, M.M.; Akl, M.R.; Bhattacharjee, J.; Egbert, S.; El Sayed, K.A. Norstictic acid inhibits breast cancer cell proliferation, migration, invasion, and *in vivo* invasive growth through targeting C-Met. *Phytother. Res.*, **2016**, *30*(4), 557-566. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.5551> PMID: 26744260
- [12] Zuo, S.; Wang, L.; Zhang, Y.; Zhao, D.; Li, Q.; Shao, D.; Fang, X. Usmic acid induces apoptosis via an ROS-dependent mitochondrial pathway in human breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *RSC Advances*, **2015**, *5*(1), 153-162. <http://dx.doi.org/10.1039/C4RA12340A>
- [13] Solár, P.; Hřrková, G.; Koptášiková, L.; Velebný, S.; Solárová, Z.; Bačkor, M. Murine breast carcinoma 4T1 cells are more sensitive to atranorin than normal epithelial NMuMG cells *in vitro*: Anti-cancer and hepatoprotective effects of atranorin *in vivo*. *Chem. Biol. Interact.*, **2016**, *250*, 27-37. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2016.03.012> PMID: 26969521
- [14] Zhou, R.; Yang, Y.; Park, S.Y.; Nguyen, T.T.; Seo, Y.W.; Lee, K.H.; Lee, J.H.; Kim, K.K.; Hur, J.S.; Kim, H. The lichen secondary metabolite atranorin suppresses lung cancer cell motility and tumorigenesis. *Sci. Rep.*, **2017**, *7*(1), 8136. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-08225-1> PMID: 28811522
- [15] Geng, X.; Zhang, X.; Zhou, B.; Zhang, C.; Tu, J.; Chen, X.; Wang, J.; Gao, H.; Qin, G.; Pan, W. Usmic acid induces cycle arrest, apoptosis, and autophagy in gastric cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Med. Sci. Monit.*, **2018**, *24*, 556-566. <http://dx.doi.org/10.12659/MSM.908568> PMID: 29374767
- [16] Jain, A.P.; Bhearkar, S.; Rai, G.; Yadav, A.K. Evaluation of *Par-motrema reticulatum* taylor for antibacterial and antiinflammatory activities. *Ind J. Pharm. Sci.*, **2016**, *7*, 94-102.
- [17] Basile, A.; Rigano, D.; Loppi, S.; Di Santi, A.; Nebbioso, A.; Sorbo, S.; Conte, B.; Paoli, L.; De Ruberto, F.; Molinari, A.; Altucci, L.; Bontempo, P. Antiproliferative, antibacterial and antifungal activity of the lichen *Xanthoria parietina* and its secondary metabolite parietin. *Int. J. Mol. Sci.*, **2015**, *16*(12), 7861-7875. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms16047861> PMID: 25860944
- [18] da Luz, J.S.B.; de Oliveira, E.B.; Martins, M.C.B.; Silva, N.H.; Alves, L.C.; dos Santos, F.A.B.; da Silva, L.L.S.; Silva, E.C.; de Medeiros, P.L. Ultrastructural analysis of *Leishmania infantum* chagasi promastigotes forms treated *in vitro* with usmic acid. *Scien. W. J.*, **2015**, *2015*, 1-7. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/617401> PMID: 25767824
- [19] Moreira, A.S.N.; Fernandes, R.O.S.; Lemos, F.J.A.; Braz-Filho, R.; Vieira, I.J.C. Larvicidal activity of *Ramalina usnea* lichen against *Aedes aegypti*. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **2016**, *26*(4), 530-532. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2016.03.006>
- [20] Khader, S.Z.A.; Ahmed, S.S.Z.; Venkatesh, K.P.; Chinnaperumal, K.; Nayaka, S. Larvicidal potential of selected indigenous lichens against three mosquito species—*Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. *Chin. Herb. Med.*, **2018**, *10*(2), 152-156. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chmed.2018.03.002>

- [21] Jain, P.K.; Jain, A.P. Effect of *Parmotrema reticulatum* lichens on dermal wound healing with possible antioxidant and antibacterial mechanism. *Asian J. Pharm. Pharmacol.*, **2016**, 10-14.
- [22] Micheletti, A.C.; Beatriz, A.; Lima, D.P.; Honda, N.K.; Pessoa, C.O.; Moraes, M.O.; Lotufo, L.V.; Magalhães, H.I.F.; Carvalho, N.C.P. Chemical constituents of *Parmotrema lichexanthonicum* Eliasaro & Adler: Isolation, structural modifications and evaluation of antibiotic and cytotoxic activities. *Quim. Nova*, **2009**, 32(1), 12-20.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000100003>
- [23] Culberson, C.F. Improved conditions and new data for identification of lichen products by standardized thin-layer chromatographic method. *J. Chromatogr. A*, **1972**, 72(1), 113-125.
[http://dx.doi.org/10.1016/0021-9673\(72\)80013-X](http://dx.doi.org/10.1016/0021-9673(72)80013-X) PMID: 5072880
- [24] Legaz, M.E.; Vicente, C. Endogenous inactivators of arginase, arginine decarboxylase e agmatine amidinohydrolase in *Evernia prunastri thallus*. *Plant Physiol.*, **1983**, 71(2), 300-302.
<http://dx.doi.org/10.1104/pp.71.2.300> PMID: 16662821
- [25] Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, **1983**, 65(1-2), 55-63.
[http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4) PMID: 6606682
- [26] da Silva, M.M.; Rocha, T.A.; de Moura, D.F.; Chagas, C.A.; de Aguiar Júnior, F.C.A.; da Silva Santos, N.P.; Da Silva Sobral, R.V.; do Nascimento, J.M.; Lima Leite, A.C.; Pastrana, L.; Costa, R.M.P.B.; Nascimento, T.P.; Porto, A.L.F. Effect of acute exposure in swiss mice (*Mus musculus*) to a fibrinolytic protease produced by *Mucor subtilissimus* UCP 1262: An histomorphometric, genotoxic and cytological approach. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **2019**, 103, 282-291.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2019.02.009> PMID: 30790607
- [27] Geran, R.I.; Greenberg, H.M.; McDonald, M.; Abbott, B.J. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. *Cancer Chemother. Rep.*, **1972**, 33, 1-17.
- [28] BIOVIA discovery studio visualizer. **2020**. Available from: <https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>
- [29] PubChem databank. **2020**. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- [30] Avogadro program. **2020**. Available from: <https://avogadro.cc/>
- [31] MetaSite program of Moldiscovery. **2020**. Available from: <https://www.moldiscovery.com/software/metasite/>
- [32] Oda, A.; Tsuchida, K.; Takakura, T.; Yamaotsu, N.; Hirono, S. Comparison of consensus scoring strategies for evaluating computational models of protein-ligand complexes. *J. Chem. Inf. Model.*, **2006**, 46(1), 380-391.
<http://dx.doi.org/10.1021/ci050283k> PMID: 16426072
- [33] da Silva-Junior, E.F.; Barcellos, F.P.H.; Ribeiro, F.F.; Bezerra Mendonca-Junior, F.J.; Scotti, L.; Scotti, M.T.; de Aquino, T.M.; de Araujo-Junior, J.X. Molecular docking studies applied to a dataset of cruzain inhibitors. *Curr. Computeraided Drug Des.*, **2018**, 14(1), 68-78.
<http://dx.doi.org/10.2174/1573409913666170519112758> PMID: 28523999
- [34] Abraham, M.J.; Murtola, T.; Schulz, R.; Páll, S.; Smith, J.C.; Hess, B.; Lindahl, E. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, **2015**, 1-2, 19-25.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>
- [35] Berendsen, H.J.C.; van der Spoel, D.; van Drunen, R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Comput. Phys. Commun.*, **1995**, 91(1-3), 43-56.
[http://dx.doi.org/10.1016/0010-4655\(95\)00042-E](http://dx.doi.org/10.1016/0010-4655(95)00042-E)
- [36] Malde, A.K.; Zuo, L.; Breeze, M.; Stroet, M.; Poger, D.; Nair, P.C.; Oostenbrink, C.; Mark, A.E. An Automated force field Topology Builder (ATB) and repository: Version 1.0. *J. Chem. Theory Comput.*, **2011**, 7(12), 4026-4037.
<http://dx.doi.org/10.1021/ct200196m> PMID: 26598349
- [37] Bondi, A. Van der Waals Volumes and Radii. *J. Phys. Chem.*, **1964**, (3), 441-451.
- [38] Pettersen, E.F.; Goddard, T.D.; Huang, C.C.; Couch, G.S.; Greenblatt, D.M.; Meng, E.C.; Ferrin, T.E. UCSF Chimera? A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.*, **2004**, 25(13), 1605-1612.
<http://dx.doi.org/10.1002/jcc.20084> PMID: 15264254
- [39] Falcão, E.P.S.; Silva, N.H.; Gusmão, N.B.; Ribeiro, S.M.; Pereira, E.C. Antimicrobial activity of phenolic derivatives of lichen. *Acta Bot. Bras.*, **2004**, 18, 911-918.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062004000400022>
- [40] Manojlović, N.; Ranković, B.; Kosanić, M.; Vasiljević, P.; Stanojković, T. Chemical composition of three *Parmelia* lichens and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of some their major metabolites. *Phytomedicine*, **2012**, 19(13), 1166-1172.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2012.07.012> PMID: 22921748
- [41] Huneck, S.; Yoshimura, I. *Identification of lichen substances*; Springer: New York, **1996**.
<http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-85243-5>
- [42] Eifler-Lima, V.L.; Sperry, A.; Sinbandhit, S.; Boustie, J.; Tomasi, S.; Schenkel, E. NMR spectral data of salazinic acid isolated from some species of *Parmotrema*. *Magn. Reson. Chem.*, **2000**, 38(6), 472-474.
[http://dx.doi.org/10.1002/1097-458X\(200006\)38:6<472::AID-MRC658>3.0.CO;2-P](http://dx.doi.org/10.1002/1097-458X(200006)38:6<472::AID-MRC658>3.0.CO;2-P)
- [43] Paluszczak, J.; Kleszcz, R.; Studzińska-Sroka, E.; Krajka-Kuźniak, V. Lichen-derived caperatic acid and physodic acid inhibit Wnt signaling in colorectal cancer cells. *Mol. Cell. Biochem.*, **2018**, 441(1-2), 109-124.
<http://dx.doi.org/10.1007/s11010-017-3178-7> PMID: 28887754
- [44] Liu, X.; Zheng, L.; Zhang, R.; Liu, G.; Xiao, S.; Qiao, X.; Wu, Y.; Gong, Z. Toxicological evaluation of advanced glycation end product Nε-(carboxymethyl)lysine: Acute and subacute oral toxicity studies. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **2016**, 77, 65-74.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.02.013> PMID: 26921796
- [45] Aniagu, S.O.; Nwinyi, F.C.; Akumka, D.D.; Ajoku, G.A.; Dzarma, S.; Izebe, K.S.; Ditse, M.; Nwaneri, P.E.C.; Wambebe, C.; Gamaniel, K. Toxicity studies in rats fed nature cure bitters. *Afr. J. Biotechnol.*, **2005**, 4, 72-78.
- [46] Silva, M.M.; Nascimento, T.P.; Porto, A.L.F. The importance of Sarcoma-180 as valid model to determine the toxicity and antitumor activity of molecules extracts. *Int. J. Recent Acad. Res.*, **2019**, 01, 433-437.
- [47] Debnath, S.; Karan, S.; Debnath, M.; Dash, J.; Chatterjee, T.K. Poly-L-lysine inhibits tumor angiogenesis and induces apoptosis in Ehrlich ascites carcinoma and in sarcoma S-180 tumor. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, **2017**, 18(8), 2255-2268.
<http://dx.doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.8.2255> PMID: 28843265
- [48] Longley, D.B.; Allen, W.L.; McDermott, U.; Wilson, T.R.; Latif, T.; Boyer, J.; Lynch, M.; Johnston, P.G. The roles of thymidylate synthase and p53 in regulating Fas-mediated apoptosis in response to antimetabolites. *Clin. Cancer Res.*, **2004**, 10(10), 3562-3571.
<http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0532> PMID: 15161716
- [49] Almeida, V.L.; Leitão, A.; Reina, L.C.B.; Montanari, C.A.; Donnici, C.L.; Lopes, M.T.P. Cancer and cell-cycle-specific and cell-cycle non-specific DNA-interacting antineoplastic agents: An introduction. *Quim. Nova*, **2005**, 28(1), 118-129.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422005000100021>
- [50] Longley, D.B.; Harkin, D.P.; Johnston, P.G. 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer*, **2003**, 3(5), 330-338.
<http://dx.doi.org/10.1038/nrc1074> PMID: 12724731
- [51] Zhao, T.; Mao, G.; Zhang, M.; Zou, Y.; Feng, W.; Gu, X.; Zhu, Y.; Mao, R.; Yang, L.; Wu, X. Enhanced antitumor and reduced toxicity effect of Schisanreae polysaccharide in 5-Fu treated Hep-bearing mice. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2014**, 63, 114-8.
- [52] Cireşan, D.C.; Giusti, A.; Gambardella, L.M.; Schmidhuber, J. Mitosis detection in breast cancer histology images with deep neural networks. *Med. Image Comput. Comput. Assist. Interv.*, **2013**, 16(2), 411-418.
http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-40763-5_51
- [53] Veta, M.; van Diest, P.J.; Pluim, J.P.W. Detecting mitotic figures in breast cancer histopathology images. *Med Imaging: Digit Pathol.*, **2013**, 8676, 867607.
<http://dx.doi.org/10.1117/12.2006626>
- [54] van Diest, P.J.; van der Wall, E.; Baak, J.P.A. Prognostic value of proliferation in invasive breast cancer: A review. *J. Clin. Pathol.*, **2004**, 57(7), 675-681.
<http://dx.doi.org/10.1136/jcp.2003.010777> PMID: 15220356
- [55] Ludovic, R.; Daniel, R.; Nicolas, L.; Maria, K.; Humayun, I.; Jacques, K.; Frédérique, C.; Catherine, G.; Gilles, L.N.; Metin N,

- G. Mitosis detection in breast cancer histological images An ICPR 2012 contest. *J. Pathol. Inform.*, **2013**, 4(1), 8.
<http://dx.doi.org/10.4103/2153-3539.112693> PMID: 23858383
- [56] Singh, D.; Cho, W.C.; Upadhyay, G. Drug-induced liver toxicity and prevention by herbal antioxidants: An overview. *Front. Physiol.*, **2016**, 6, 363.
<http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2015.00363> PMID: 26858648
- [57] Mukesh K, S.; Ganesh, N.S.; Vishal, V.; Ranjan, B. Hepatotoxicity: A major complication with critical treatment. *MOJ Toxicol.*, **2015**, 1(3), 114-120.
<http://dx.doi.org/10.15406/mojt.2015.01.00016>
- [58] Marinho, K.S.N.; Antonio, E.A.; Silva, C.V.N.S.; Silva, K.T.; Teixeira, V.W.; Aguiar-Júnior, F.C.A.; Santos, K.R.R.P.; Silva, N.H. Hepatic toxicity caused by PLGA-microspheres containing usnic acid from the lichen *C. ladonia substellata* (AHTI) during pregnancy in Wistar rats. *An Acad Bras Cienc*, **2017**, 89(2), 1073-1084.
- [59] Arii, S.; Imamura, M. Physiological role of sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells and their implication in the pathogenesis of liver injury. *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.*, **2000**, 7(1), 40-48.
<http://dx.doi.org/10.1007/s005340050152> PMID: 10982590
- [60] Barnett, L.M.A.; Cummings, B.S. Cellular and molecular mechanisms of kidney toxicity. *Semin. Nephrol.*, **2019**, 39(2), 141-151.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.semnephrol.2018.12.004> PMID: 30827337
- [61] El-Shenawy, N.S.; Hamza, R.Z.; Khaled, H.E. Protective effect of α -lipoic acid against spleen toxicity of dimethylnitrosamine in male mice: Antioxidant and ultrastructure approaches. *Biomed. Pharmacother.*, **2017**, 96, 459-465.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.010> PMID: 29031205
- [62] Crăciunaș, C.; Crăciun, C.; Crăciun, V.; Dordea, M.; Toader-Radu, M. Ultrastructural effects of certain cytostatics on rat spleen. *Curr. Probl. Techn. Cell. Mole. Biol.*, **1996**, 1, 311-317.
- [63] Cruciani, G.; Carosati, E.; De Boeck, B.; Ethirajulu, K.; Mackie, C.; Howe, T.; Vianello, R. MetaSite: Understanding metabolism in human cytochromes from the perspective of the chemist. *J. Med. Chem.*, **2005**, 48(22), 6970-6979.
<http://dx.doi.org/10.1021/jm050529c> PMID: 16250655
- [64] Pozzi, C.; Ferrari, S.; Luciani, R.; Costi, M.; Mangani, S. Structural and functional characterization of the Human Thymidylate Synthase (hTS) Interface Variant R175C, new perspectives for the development of hTS inhibitors. *Molecules*, **2019**, 24(7), 1362.
<http://dx.doi.org/10.3390/molecules24071362> PMID: 30959951
- [65] Choi, Y.M.; Yeo, H.K.; Park, Y.W.; Lee, J.Y. Structural analysis of thymidylate synthase from Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus with the anticancer drug raltitrexed. *PLoS One*, **2016**, 11(12), e0168019.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0168019> PMID: 27936107
- [66] Chen, D.; Jansson, A.; Sim, D.; Larsson, A.; Nordlund, P. Structural analyses of human thymidylate synthase reveal a site that may control conformational switching between active and inactive states. *J. Biol. Chem.*, **2017**, 292(32), 13449-13458.
<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M117.787267> PMID: 28634233
- [67] Kukol, A. Consensus virtual screening approaches to predict protein ligands. *Eur. J. Med. Chem.*, **2011**, 46(9), 4661-4664.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.05.026> PMID: 21640444
- [68] Phan, J.; Koli, S.; Minor, W.; Dunlap, R.B.; Berger, S.H.; Lebioda, L. Human thymidylate synthase is in the closed conformation when complexed with dUMP and raltitrexed, an antifolate drug. *Biochemistry*, **2001**, 40(7), 1897-1902.
<http://dx.doi.org/10.1021/bi002413i> PMID: 11329255

In Silico Studies on the Antileishmania, Cytotoxicity and Anticancer Activities of Pyrimidine Analogs

Zenaide S. MONTE ^{1,2}, Silvia M. SOUZA ³, Natali T.C. COSTA ⁴, Aline C.S. SANTOS ⁵,
Gardenia C.G. MILITÃO ³, Marcelo Z. HERNANDES ⁴, Valéria R.A. PEREIRA ⁵,
Ricardo O. SILVA ⁶, Emerson P.S. FALCÃO ⁷ & Sebastião J. MELO ^{1,2} *

¹ Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences-50740-560, Recife, PE, Brazil

² Postgraduate Program in Biological Sciences, ³ Department of Physiology and Pharmacology,

⁶ Department of Fundamental Chemistry, Federal University of Pernambuco,
CEP, 50740-560, Recife, PE, Brazil

⁴ Department of Pharmaceutical Sciences and Health Sciences Center, CEP, 50740-560 Recife, PE, Brazil

⁵ Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, CEP, 50670-420 Recife, PE, Brazil

⁷ Department of Nucleus of Nutrition, Federal University of Pernambuco, Vitória Academic Center (CAV),
CEP, 55608-680, Vitoria de Santo Antão, PE, Brazil

SUMMARY. This paper describes *in silico* studies of pyrimidine derivatives. Cytotoxic activity of compounds was evaluated on cell lines MCF-7, HCT-116, HL-60 and NCI- H292. In parallel, leishmanicidal activity against both intracellular promastigote and amastigotes forms of *Leishmania amazonensis* and *L. infantum* was determined. The compounds presented IC₅₀ low of 25 µg/mL were **3b**, **3f-g**, **3l-m**, **3p**, **3s**, **5b**, and **6g** for cell HCT-116, and compounds **3d, 3f**, **3n-p**, **5b**, **5c**, **5f**, and **6i** for cell MCF-7. Compounds **3b**, **3f**, **3h**, **5b**, and **6h** presented the most promising results, showing antileishmanial activity. Furthermore, the values for several physicochemical parameters were obtained, such as molecular weight, the number of heavy atoms, the number of aromatic heavy atoms, the number of rotatable bonds, the number of H-bond acceptors, the number of H-bond donors, the fraction of carbon bond saturation (Csp³), the number of sp³ hybridized carbons/total carbon count, the solubility (S), the lipophilicity parameter (LogP) predicted and the molar refractivity, and were given for each molecule by the online SwissADME web tool. The pyrimidine derivatives **3a-s**, **5a-f** and **6g-i** do not violate the Lipinski rule, being very good candidates for oral administration.

RESUMEN. Este artículo describe estudios *in silico* de derivados de pirimidina. La actividad citotóxica de los compuestos se evaluó en las líneas celulares MCF-7, HCT-116, HL-60 y NCI-H292. Paralelamente, se determinó la actividad leishmanicida contra las formas promastigotes intracelulares y amastigotes de *Leishmania amazonensis* y *L. infantum*. Los compuestos que presentaron una CI₅₀ baja de 25 µg/mL fueron **3b**, **3f-g**, **3l-m**, **3p**, **3s**, **5b** y **6g** para las células HCT-116, y los compuestos **3d**, **3f**, **3n-p**, **5b**, **5c**, **5f** y **6i** para las células MCF-7. Los compuestos **3b**, **3f**, **3h**, **5b** y **6h** presentaron los resultados más prometedores, mostrando actividad antileishmaniana. Además, se obtuvieron los valores para varios parámetros fisicoquímicos, como el peso molecular, el número de átomos pesados, el número de átomos pesados aromáticos, el número de enlaces rotativos, el número de aceptores de enlaces H, el número de donantes de enlaces H-, la fracción de saturación de enlace de carbono (Csp³), el número de carbonos sp³ hibridados/recuento total de carbono, la solubilidad (S), el parámetro de lipofilia (LogP) predicho y la refractividad molar, y fueron dados para cada molécula por la herramienta web el SwissADME en línea. Los derivados de pirimidina **3a-s**, **5a-f** y **6g-i** no violan la regla de Lipinski, siendo muy buenos candidatos para la administración oral.

INTRODUCTION

Leishmaniasis is a protozoan parasitic human disease of *Leishmania* genus, the disease is caused by more than 20 species of protozoan and transmitted by the bite of female phlebotomine sandflies ¹. Leishmaniasis affects more than 12 million people worldwide, it is estimated that 2 million people of whom develop

symptomatic disease annually ². In developing countries, it is a serious illness, which if untreated, can reach a 90% mortality rate ²⁻⁴. Leishmaniasis is classified into three major clinical forms: visceral leishmaniasis (VL), cutaneous leishmaniasis (CL) and mucocutaneous leishmaniasis (MCL), the VL caused by *Leishmania donovani* is the most severe form and is usually

KEY WORDS: anticancer activity, cytotoxicity activity, *in silico* studies, leishmanicidal activity, pyrimidine derivatives.

* Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: melosebastiao@yahoo.com.br

morbidity and mortality in the absence of treatment ⁵. Current treatment are expensive and cause severe side effects and emerging drug resistance ⁶, the most of the first line drugs such as sodium stibogluconate, meglumine antimoniate, pentamidine, amphotericin B, and miltefosine, cause serious side effects and toxicity ⁷. Resistance is well described for antimonials whereas resistance to amphotericin B and miltefosine is at risk, and only the latter can be administered orally ⁸.

Ergo, there is a great need for more effective and less toxic drug options. As pyrimidine derivatives have played an important role in the medicinal chemistry because possess a broad spectrum of biological activities ⁹, we decided realized an new study biological properties of 28 pyrimidine analogues with synthesis reported in the recent scientific literature, see spectral data presented in supplementary material ⁹⁻¹¹ to investigate for their antileishmania, cytotoxicity and anticancer agents with respect to cell lines MCF-7, HCT-116, HL60, and NCI-H292. Besides, we conducted prediction of physicochemical descriptors, to predict ADME parameters and pharmacokinetic properties, these analogues in discussion.

MATERIAL AND METHODS

Cytotoxicity on macrophages

RAW 264.7 macrophages were used to assess cell cytotoxicity by MTT assay. Cells (1x10⁵ cells/well) were plated in 96 well plates and incubated for 24h (37 °C, 5% CO₂) for adhesion. Compounds were added, in six concentrations (6.2 to 200 µg/mL) and incubated for 48 h. Were used DMSO and miltefosine as negative and positive control, respectively. After incubation with compounds, MTT (5mg/mL in PBS) was added. Two h later, cell culture medium and excess of MTT not reduced were aspirated and 100 µL of DMSO was added for formazan crystals solubilization. Absorbance was measured at 570 nm. Cytotoxic concentration for 50% inhibition of viability (CC₅₀) was calculated by regression analysis using GraphPad Prism software 5.0 ¹². Assays were done in triplicate.

Promastigote assay

Promastigotes of *L. amazonensis* or *L. infantum* (1 × 10⁶ cells/mL, Schneider's medium with 10% fetal bovine serum) were incubated in a 96 well plate with compounds in eight different concentrations (1,5 to 200 µg/mL) for 72 h at 26

°C. Miltefosine was used as a reference drug. Cells without treatment were used as negative controls. Cell growth was assessed and IC₅₀/72 h was determined by regression analyses. Assays were conducted in triplicate.

Amastigote assay

For amastigotes obtainment, RAW 264.7 macrophages were plated (3 x 10⁵ cell/mL, RPMI supplemented with 10% Fetal Bovine Serum) in a 24-well plate with a 13 mm glass cover slip and allowed to adhere for 24h, at 37°C in 5% CO₂. Adhered macrophages were then infected with promastigotes of *L. amazonensis* or *L. infantum* in the stationary growth phase using a ratio 1:15 at 37° C for 6 h. Afterward, non-interiorized parasites were removed by washing and infected culture were incubated with compounds for 24 h (12.5 to 400 µg/mL). Only RPMI 1640 medium was used as negative control. The cover slips were collected and stained using Panótico staining kit (Laborclin, PR, Brazil). Percentage of infected macrophages was determined by counting 100 cells and its intracellular amastigotes, in triplicate. Leishmanial activity was assessed by decrease of infected macrophages and intracellular amastigotes in cultures treated (T) and non-treated (NT), described by formula: % amastigotes = T x NT/100. IC₅₀ was determined by regression analyses.

In vitro anticancer activity

Material

Tumor lines used, MCF-7 (breast cancer), HCT-116 (colorectal cancer), HL-60 (promyelocytic leukemia), and NCI-H292 (lung cancer) were obtained from the Cell Bank of Rio de Janeiro, having been grown in medium RPMI 1640, supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotics, kept in an oven at 37 °C and atmosphere containing 5% CO₂. The samples were diluted in pure sterile DMSO.

Method

Anticancer analysis by the MTT method has been used in the screening of USA National Cancer Institute (NCI), which tests more than 10.000 samples each year ¹³. It is a fast, sensible and cheap method. It was first described by Mosmann ¹⁴, having the ability to analyze the viability and metabolic state of the cell. It is a colorimetric analysis based on the conversion of the salt 3-(4,5-dimethyl-2-thiazole) -2,5-diphenyl-2-H-bromide of tetrazolium (MTT) in

formazan blue, from mitochondrial enzymes present only in metabolically active cells. The anticancer study by the MTT allows us to easily define cytotoxicity, but not the mechanism of action¹⁵. The lineages MCF-7 (breast cancer), HCT-116 (colorectal cancer), HL-60 (promyelocytic leukemia) e NCI-H292 (lung cancer) were plated at 1.10⁵ or 3.10⁵ cells/mL previously dissolved in DMSO were serially diluted in the medium RPMI to obtain final concentrations and added to a 96-well plate. The plates were incubated for 72 h in the greenhouse 5% of CO₂ at 37 °C. Thereafter, 25 µL of the solution of MTT (tetrazolium salt), and the plates were incubated for 3 h. The absorbance was read after dissolution of the precipitate with pure DMSO in plate spectrophotometer at 595 nm.

Analysis method

For single concentration, an intensity scale was used to evaluate the anticancer potential of the samples tested. Samples without activity, with little activity (inhibition of cell growth ranging from 1 to 50%), with moderate activity (inhibition of cell growth ranging from 50 to 75%) and very active (inhibition of growth ranging from 75 to 100%). Samples with more than 75% inhibition will be calculated at CI₅₀, was calculated by non-linear in the program *Graph-Pad Prism*¹². Each sample was tested in duplicate.

In silico studies

The SMILE (Simplified Molecular Input Line Entry System) code for all the structures was obtained and used as input in order to run the online SwissADME web tool¹⁶ for generating a prediction of physicochemical descriptors, as well as to predict ADME parameters and pharmacokinetic properties.

RESULTS AND DISCUSSION

Chemistry

In our synthetic approach, the pyrimidine derivatives were the compounds **3a-s**, **5a-f** and **6g-i** already reported in the literature for conventional synthesis our research group⁹⁻¹¹. Spectral data compounds **3a-s**, **5a-f** and **6g-i** are given in Fig 1.

4-Amino-5-cyano-2-phenyl-6-(*m*-nitrophenyl)-pyrimidine (3a)

This compound was obtained as colorless crystals from MeOH in 98% yield, m.p. 221-222, R_f = 0.41; n-hexane-ethyl acetate 7:3; IR, KBr, γ_{max} cm⁻¹: 3494 (NH₂_{asym}), 3388 (NH₂_{sym}),

2214 (C≡N), 1621 (C=N); ¹H-NMR (DMSO-d₆ 300 MHz), δ: 8.78 (t, 1H, H2", J 1.60 Hz); 8.46 (t, 2H, H4" and H6", J 8.4 Hz); 8.43(d, 2H, H2' and H6', J 8.4 Hz); 7.95-8.55 (b, 2H, C2-NH₂); 7.91 (t, 1H, H5") and 7.57-7.54 (3H, H3', H4' and H5'); ¹³C-NMR (DMSO-dd₆ 300 MHz), δ: 166.0 (1C, C5"); 164.4 (1C, C1"); 164.2 (1C, C2); 147.8 (1C, C6); 138.0 (1C, C4'); 136.3 (1C, C6"); 135.0 (1C, C4"); 131.8 (1C,C1"); 130.3 (1C, C2"); 128.6 (2C, C2' and C6'); 128.4 (1C, C3"); 125.5 (1C, C1'); 123.3(1C,C4); 116.0 (2C, C3' and C5') and 85.0 (1C, C5). MS (MALDI TOF MS: m/z molecular mass found = 318.0946; calculated for C₁₇H₁₂N₅O₂ [M+1]⁺, mass = 318.0984.

4-Amino-5-cyano-2-*p*-phenyl-6-(*p*-nitrophenyl)-pyrimidine (3b)

This compound was obtained as colorless crystals from MeOH in 98% yield, m.p. 220-221, R_f = 0.42; (n-hexane-ethyl acetate, 7:3); IR, KBr, γ_{max} cm⁻¹: 3436 (NH₂_{asym}), 3326 (NH₂_{sym}), 2227 (C≡N), 1647 (C=N); ¹H-NMR δ: (DMSO-d₆ 400 MHz), δ: 8.47 (d, 2H, J 1.8 e 11.2 Hz, H2' and H6'); 8.59 (s, 2H, C2-NH₂); 8.05 (d, J 11.2 Hz H2" and H6"); 7.58 (d, 2H, J 11.2 Hz, H3" and H5") and 7.50 -7.40 (m, 3H, H3', H4' and H5'); ¹³C-NMR (DMSO-d₆ 400 MHz), δ: 166.3 (1C, C6) and 164.2 (1C, C1"); 163.9 (1C, C2); 162.3 (1C,C1"); 148.5 (1C,C4"); 135.9 (2C, C2" and C6"); 131.2 (2C, C3" and C5"); 127.9 (2C, C2' and C6'); 124.9 (1C, C1'); 112.6 (2C, C3' and C5'); 113.6 (1C, C4); 84.9 (1C, C5). MS MALDI TOF MS: m/z (molecular mass found = 318.1087; calculated for C₁₇H₁₂N₅O₂ [M+1]⁺, mass = 318.0984.

4-Amino-5-cyano-2-(*p*-anisyl)-6-(*m*-nitrophenyl)-pyrimidine (3c)

This compound was obtained as colorless crystals from ACN in 89% yield, m.p. 226-227, R_f =0,4 (n-hexane-ethyl acetate 7:3); IR, KBr, γ_{max} cm⁻¹: 3439 (NH₂_{asym}), 3327 (NH₂_{sym}), 2227 (C≡N), 1647 (C=N); ¹H-NMR δ: (DMSO-d₆ 400 MHz), δ: 8.61 (s,1H, H2"); 8.43-8.34 (m, 4H, H2' and H6'; H4" and H6"); 8.22-8.20 (d, 1H, H3"); 8.20-8.09 (b, 2H, C2-NH₂) 7.91-7.87 (t, 1H, H5"); 7.55-7.54 (d, 2H, J = 5.7 H3'and H5') and δ 3.84 (s, 3H); ¹³C-NMR (DMSO-d₆ 400 MHz), δ: 166.2 (1C, C6); 164.2 (1C, C1"); 163.9 (1C, C2); 162.3 (1C, C4'); 148.7 (1C, C3"); 142.6 (1C,C1"); 135.0 (1C,C4"); 131.8 (1C, C5"); 130.1 (1C, C6"); 130.3 (2C, C2' and C6'); 128.6 (1C, C1'); 123.6 (1C, C2"); 113.90 (2C, C3' and C5'); 116.0 (1C, C4); 84.3 (1C, C5) and 55.4 (1C,C1"). MS (MALDI

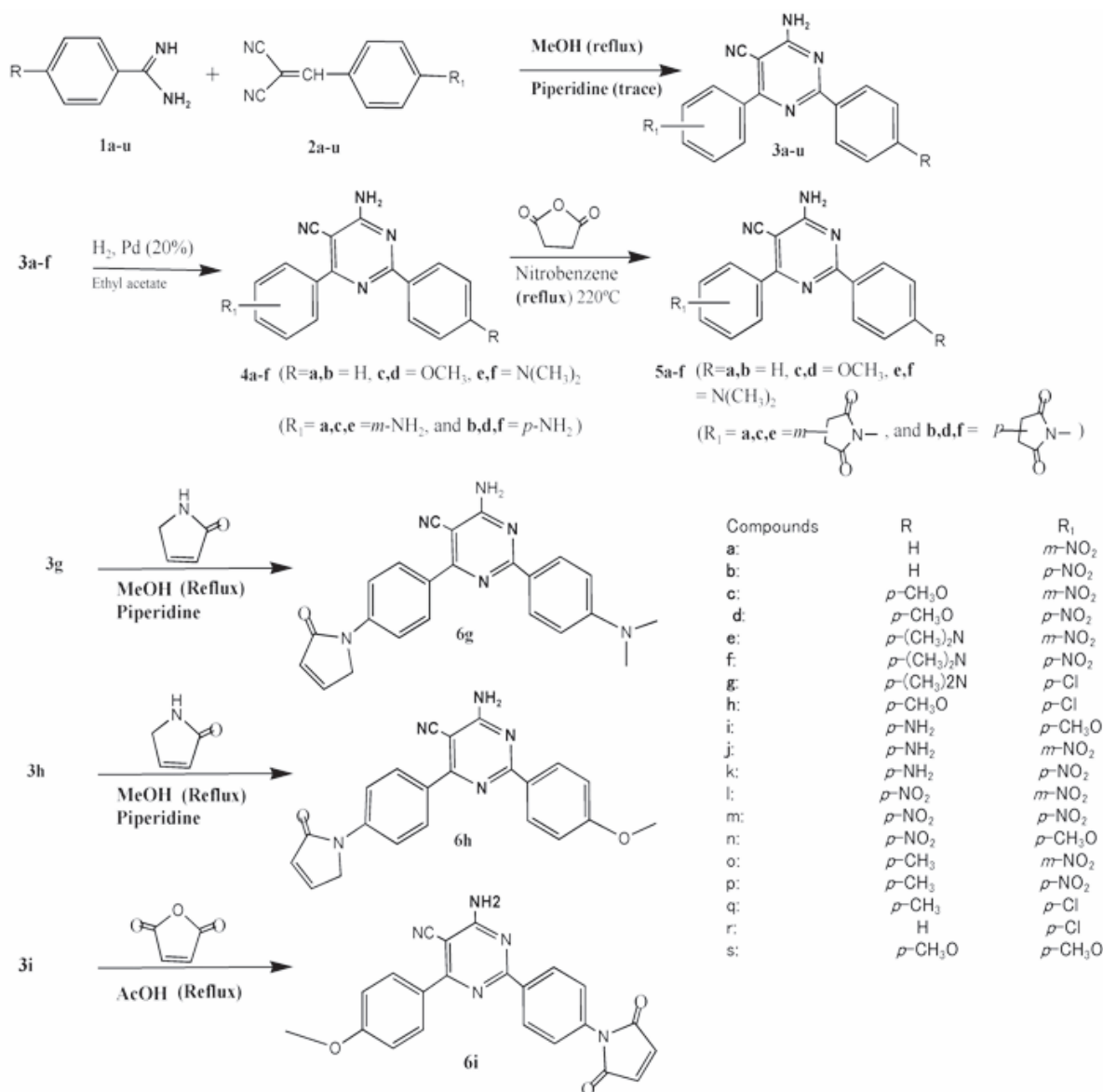


Figure 1. Synthesis of pyrimidine analogs 3a-s, 5a-f and 6g-i.

TOF MS: *m/z* molecular mass found = 348.1148; calculated for C₁₈H₁₄N₅O₃ [M+1]⁺, mass = 348.1018.

4-Amino-5-cyano-2-(*p*-anisyl)-6-(*p*-nitrophenyl)-pyrimidine (3d)

This compound was obtained as colorless crystals from ACN in 91% yield, m.p. 221-222, *R_f* = 0.45 (n-hexane-ethyl acetate 7:3); IR, KBr, $\gamma_{\max}$ cm⁻¹: 3109 (NH₂_{asym}), 3033 (NH₂_{sym}), 2227 (C≡N), 1601 (C=N); ¹H-NMR δ : (DMSO-*d*₆ 400 MHz), δ : 8.38 (d, 2H, *J* 8.8 Hz, H2" and H6"); 8.32 (d, 2H, *J* 8.8 Hz, H2' and H6'); 8.16 (d, 2H, *J* 6.6 Hz, H3" and H5"); 7.92 (b, 2H, C2-NH₂); 7.04 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, H3' and H5'); and δ 3.81 (s, 3H); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆ 400 MHz), δ : 166.2

(1C, C4"); 163.9 (1C, C2) 164.2 (1C, C1"); 148.6 (1C, C6); 142.6 (1C, C1"); 130.3 (2C, C2' and C6'); 130.0 (2C, C2" and C6"); 128.6 (1C, C1'); 123.6 (2C, C3" and C5"); 55.3 (1C, C1"); 116.0 (1C, C4); 113.9 (2C, C3' and C5'); and 84.3 (1C, C5). MS MALDI TOF MS: *m/z* molecular mass found = 348.1148; calculated for C₁₈H₁₄N₅O₃ [M+1]⁺, mass = 348.1018.

4-Amino-5-cyano-2-(*p*-diethylaminophenyl)-6-(*m*-nitrophenyl)-pyrimidine (3e)

This compound was obtained as colorless crystals from MeOH in 90% yield, m.p. 236-237, *R_f* = 0.7 (n-hexane-ethyl acetate 6:4); IR, KBr, $\gamma_{\max}$ cm⁻¹: 3123 (NH₂_{asym}), 3033 (NH₂_{sym}), 2228 (C≡N), 1685 (C=N); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆ 300

MHz); δ : 8.61 (s, 1H, H2"); 8.43-8.35 (m, 4H, H2' and H6', H4", H6"); 8.32-8.28 (b, 2H, C2-NH₂); 8.23-8.20 (d, *J* 8.0 Hz, 2H, H3' and H5"); 7.58-7.52 (m, 1H, H5") and 3.03 (s, 6H); ¹³C-NMR (DMSO-d₆ 300 MHz), δ : 165.9 (1C, C6) and 164.4 (1C, C1"); 164.1 (1C, C2); 147.7 (1C, C3"); 137.8 (1C, C4'); 136.2 (1C, C1"); 135.0 (1C, C4"); 131.7 (1C, C5"); 130.3 (2C, C2' and C6'); 128.6 (1C, C6"); 128.4 (1C, C1'); 125.4 (1C, C2"); 123.3 (2C, C3' and C5"); 115.9 (1C, C4); 84.9 (1C, C5) and 39.6 (2C, C1"). MS (MALDI TOF MS: *m/z* molecular mass found = 360.1383; calculated for C₁₉H₁₆N₆O₃ M⁺, mass = 360.1335.

4-Amino-5-cyano-2-(*p*-diethylaminophenyl)-6-(*p*-nitrophenyl)-pyrimidine (3f)

This compound was obtained as colorless crystals from MeOH in 92% yield, m.p. 222-223, *R_f* = 0.75 (n-hexane-ethyl acetate 6:4); IR, KBr, $\gamma_{\max}$ cm⁻¹: 3117 (NH₂asym.), 3039 (NH₂sym.), 2230 (C≡N), 1602 (C=N); ¹H-NMR (DMSO-d₆ 300 MHz), δ : 8.24 (d, 2H, *J* 9.3 Hz, H2' and H6'); 7.97 (d, 2H, *J* 9.3 Hz, H2" and H6"); 7.73 (b, 2H, C2-NH₂); 7.64 (d, 2H, *J* = 9.3 Hz, H3" and H5"); 6.77 (d, 2H, *J* = 9.3 Hz, H3' and H5') and δ 3.10 (s, 6H); ¹³C-NMR (DMSO-d₆ 300 MHz), δ : 166.50 (1C, C6); 164.3 (1C, C1"); 164.2 (1C, C2); 152.6 (1C, C4'); 135.7 (1C, C1"); 135.5 (1C, C4"); 130.4 (2C, C2" and C6"); 130.1 (2C, C2' and C6'); 128.5 (2C, C3" and C5"); 123.1 (1C, C1'); 116.8 (1C, C4); 111.1 (2C, C3' and C5"); 82.4 (1C, C5); and δ 39.7 (2C, C1"). MS MALDI TOF MS: *m/z* molecular mass found = 360.3219; calculated for C₁₉H₁₆N₆O₃ M⁺, mass = 360.1335.

4-Amino-5-cyano-2-(*p*-anisyl)-6-(*p*-chlorophenyl)-pyrimidine (3h)

This compound was obtained as colorless crystals from in 87.76% yield, m.p. 221-223 °C, *R_f* = 0.3; (n-hexane-ethyl acetate, 7:3); IR, KBr, $\gamma_{\max}$ cm⁻¹: 3422 (NH₂asym.), 3237 (NH₂sym.), 2218 (C≡N), 1640 (C=N); ¹H-NMR (DMSO-d₆ 400 MHz), δ : 8.42 (d, 2H, *J* 8.0 Hz, H2' and H6'); 8.35 (d, 2H, *J* 8.0 Hz, H2" and H6"); 8.02 (b, 2H, C2-NH₂); 8.19 (d, 2H, *J* 8.0 Hz, H3" and H5"); 7.08 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz, H3' and H5') and δ 3.84 (s, 3H); ¹³C-NMR (DMSO-d₆ 300 MHz), δ : 166.3 (1C, C6); 164.2 (1C, C1"); 163.9 (1C, C2); 162.3 (1C, C4'); 148.7 (1C, C4"); 142.6 (1C, C1"); 130.3 (2C, C2' and C6'); 130.0 (2C, C2" and C6"); 128.6 (1C, C1'); 123.6 (2C, C3' and C5"); 116.0 (1C, C4); 114.0 (2C, C3" and C5"); 84.3 (1C, C5); and δ 55.3 (1C, C1"). LCMS-IT-TOF: *m/z* (molecular mass found 336.0992; calculated for for C₁₉H₁₆N₆O₃ M⁺, mass = 336.0778.

4-Amino-5-cyano-2-(*p*-aminophenyl)-6-(*m*-nitrophenyl)-pyrimidine (3j)

This compound was obtained as colorless crystals from MeOH in 97% yield, m.p. 243-245, *R_f* = 0.2 (ethyl acetate-methanol 9.7:0.3); IR, KBr, $\gamma_{\max}$ cm⁻¹: 3451 (NH₂asym.), 3338 (NH₂sym.), 2299 (C≡N), 1654 (C=N); ¹H-NMR (DMSO-d₆ 400 MHz), δ : 8.77 (s, 1H, H2"); 8.59 (d, *J* 8.8 Hz, 2H, H2' and H6'); 8.48-8.42 (m, 2H, H4" and H6"); 8.39 (d, *J* 8.8 Hz, 2H, H3' and H5"); 8.30-8.00 (b, 2H, C2-NH₂); and 7.91 (t, *J* 16.0 Hz, 1H, H5"); ¹³C-NMR (DMSO-d₆ 300 MHz), δ : 166.2 (1C, C6) and 164.4 (1C, C1"); 162.3 (1C, C2); 149.3 (1C, C4'); 147.8 (1C, C3"); 142.0 (1C, C1'); 137.6 (1C, C1"); 135.1 (1C, C6"); 130.4 (1C, C5"); 129.6 (2C, C2' and C6'); 125.6 (1C, C4"); 123.4 (1C, C2"); 123.3 (2C, C3' and C5"); 115.6 (1C, C4) and 86.1 (1C, C5). LCMS-MALDI-TOF: *m/z* molecular mass found = 334.9344; calculated for C₁₇H₁₂N₆O₂ [M+2]⁺, mass = 334.1022.

4-Amino-5-cyano-2-(*p*-nitrophenyl)-6-(*m*-nitrophenyl)-pyrimidine (3l)

This compound was obtained as colorless crystals from MeOH in 91% yield, m.p. 260-262, *R_f* = 0.7 (n-hexane-ethyl acetate 7:3); IR, KBr, $\gamma_{\max}$ cm⁻¹: 3092 (NH₂asym.), 3003 (NH₂sym.), 2225 (C≡N), 1699 (C=N); ¹H-NMR (DMSO-d₆ 400 MHz), δ : 8.77 (t, *J* 2.0 Hz, 1H, H2"); 8.47-8.43 (m, *J* 9.2 Hz, 2H, H2" and H6"); 8.40 (d, *J* 9.2 Hz, 2H, H2' and H6"); 8.28-8.10 (b, 2H, C2-NH₂); 7.92 (t, *J* 7.6 Hz, 1H, H5") and 7.54 (d, *J* 9.2 Hz, 2H, H3' and H5"); ¹³C-NMR (DMSO-d₆ 300 MHz), δ : 166.0 (1C, C6) and 164.4 (1C, C1"); 164.2 (1C, C2); 148.7 (1C, C4'); 147.8 (1C, C3"); 138.0 (1C, C1"); 136.3 (1C, C1'); 131.8 (1C, C6"); 130.3 (1C, C5"); 128.6 (2C, C3' and C5"); 128.4 (1C, C4"); 125.5 (2C, C2' and C6'); 123.3 (1C, C2"); 116.0 (1C, C4) and 85.0 (1C, C5). MALDI - TOF: *m/z* molecular mass found = 363.1696; calculated for C₁₇H₁₇N₆O₄ [M+1]⁺, mass = 363.0794.

4-Amino-5-cyano-2-(*p*-nitrophenyl)-6-(*p*-nitrophenyl)-pyrimidine (3m)

This compound was obtained as colorless crystals from MeOH in 90% yield, m.p. 237-239, *R_f* = 0.65 (n-hexane-ethyl acetate 7:3); IR, KBr, $\gamma_{\max}$ cm⁻¹: 3107 (NH₂asym.), 3019 (NH₂sym.), 2230 (C≡N), 1602 (C=N); ¹H-NMR (DMSO-d₆ 400 MHz), δ : 8.37 (d, 2H, *J* 8.4 Hz, H2' and H6'); 8.37 (d, 2H, *J* 8.4 Hz, H2" and H6"); 8.37-8.17 (b, 2H, C2-NH₂); 8.17 (d, 2H, *J* 8.4 Hz, H3" and H5") and 8.17 (d, 2H, *J* 8.4 Hz, H3' and H5"); ¹³C-NMR (DMSO-d₆ 300 MHz), δ : 165.9 (1C, C6);

164.4 (1C, C1''); 164.2 (1C, C2); 150.0 (2C, C4' and C4''); 138.0 (2C, C2' and C6'); 137.0 (1C, C1''); 136.3 (1C, C1'); 136.0 (2C, C2'' and C6''); 124.4 (4C, C3' and C5'; C3'' and C5''); 115.6 (1C, C4) and 86.1 (1C, C5). MS MALDI TOF MS: m/z (molecular mass found = 362.3434; calculated for $C_{17}H_{11}N_6O_4$ M⁺, mass = 362.0764.

4-Amino-5-cyano-2-(*p*-methylphenyl)-6-(*m*-nitrophenyl)-pyrimidine (3o)

This compound was obtained as colorless crystals from MeOH in 95% yield, m.p. 241-243, R_f = 0.55 (n-hexane-ethyl acetate-methanol 6:3:1); IR, KBr, $\gamma_{\max}$ cm⁻¹: 3443 (NH₂asym.), 3352 (NH₂sym.), 2167 (C≡N), 1606 (C=N); ¹H-NMR (DMSO-d₆ 400 MHz), δ : 8.75 (t, *J* 2.10 Hz, 1H, H2''); 8.47-8.39 (m, 2H, H4'' and H6''); 8.29 (d, *J* 8.10 Hz, 2H, H2' and H6'); 8.06 (b, 2H, C2-NH₂); 7.89 (t, *J* 8.10 Hz, 1H, H5'') 7.34 (d, *J* 8.10 Hz, 2H, H3' and H5'); and 2.38 (s, 3H); ¹³C-NMR (DMSO-d₆ 300 MHz), δ : 166.0 (1C, C6) and 164.4 (1C, C1''); 164.3 (1C, C2); 147.8 (1C, C3''); 141.9 (1C, C4'); 135.1 (1C, C4''); 133.6 (1C, C1'); 130.4 (1C, C5''); 129.3 (2C, C3' and C5'); 128.5 (2C, C2' and C6'); 125.5 (1C, C6''); 125.4 (1C, C2''); 123.4 (1C, C1''); 116.1 (1C, C4); 84.7 (1C, C5) and 21.2 (1C, C1'). MS MALDI TOF MS: m/z (molecular mass found = 332.3184; calculated for $C_{18}H_{14}N_5O_2$ M⁺, mass = 332.1069.

4-Amino-5-cyano-2-(*p*-methylphenyl)-6-(*p*-nitrophenyl)-pyrimidine (3p)

This compound was obtained as colorless crystals from MeOH in 96% yield, m.p. 289-291, R_f = 0.65 (n-hexane-ethyl acetate-methanol 6:3:1); IR, KBr, $\gamma_{\max}$ cm⁻¹: 3480 (NH₂asym.), 3348 (NH₂sym.), 2217 (C≡N), 1638 (C=N); ¹H-NMR (DMSO-d₆ 300 MHz), δ : 8.31 (d, 2H, *J* 8.0 Hz, H2' and H6'); 8.29 (d, 2H, *J* 8.0 Hz, H2'' and H6''); 7.90 (d, 2H, *J* 8.0 Hz, H3'' and H5''); 7.65-7.30 (b, 2H, C2-NH₂); 7.00 (d, 2H, *J* 8.0 Hz, H3' and H5') and δ 3.10 (s, 6H); ¹³C-NMR (DMSO-d₆ 300 MHz), δ : 165.9 (1C, C6); 164.4 (1C, C1''); 164.2 (1C, C2); 159.3 (1C, C4'); 148.0 (1C, C4''); 138.00 (1C, C1''); 131.2 (2C, C2'' and C6''); 130.3 (2C, C2' and C6'); 130.2 (1C, C1'); 128.5 (2C, C3'' and C5''); 127.9 (2C, C3' and C5'); 116.1 (1C, C4); 84.7 (1C, C5); and δ 21.1 (1C, C1'). MS (MALDI TOF MS: m/z molecular mass found = 331.1184; calculated for $C_{18}H_{13}N_5O_2$ M⁺, mass = 331.1068.

4-Amino-5-cyano-2-phenyl-6-(*p*-chlorophenyl)-pyrimidine (3r)

This compound was obtained as colorless

crystals from MeOH in 88% yield, m.p. 210-211, R_f = 0.36; (n-hexane-ethyl acetate, 7:3); IR, KBr, $\gamma_{\max}$ cm⁻¹: 3334 (NH₂asym.), 3226 (NH₂sym.), 2217 (C≡N), 1627 (C=N); ¹H-NMR (DMSO-d₆ 300 MHz), δ : 8.39 (d, 2H, *J* 1.8 e 11.2 Hz, H2' and H6'); 8.01 (d, *J* 11.2 Hz, H2'' and H6''); 7.57 (d, 2H, *J* 11.2 Hz, H3'' and H5'') and 7.57-7.50 (m, 3H, H3', H4' and H5'); 7.56 (s, 2H, C2-NH₂). ¹³C-NMR (DMSO-d₆ 300 MHz), δ : 166.9 (1C, C6) and 164.5 (1C, C1''); 164.0 (1C, C2); 163.4 (1C, C1''); 136.4 (1C, C4''); 135.8 (2C, C2'' and C6''); 135.3 (2C, C3'' and C5''); 131.6 (2C, C2' and C6'); 130.4 (1C, C1'); 128.6 (2C, C3' and C5'); 116.2 (1C, C4); 84.2 (1C, C5). MALDI-IT-TOF: m/z molecular mass found = 306.9344; calculated for $C_{17}H_{11}ClN_4$ M⁺, mass = 306.0672.

4-Amino-5-cyano-2-(*p*-anisyl)-6-(*p*-anisyl)-pyrimidine (3s)

This compound was obtained as colorless crystals from ACN in 91% yield, m.p. 194-195, R_f = 0.45 (n-hexane-ethyl acetate 7:3); IR, KBr, $\gamma_{\max}$ cm⁻¹: 3109 (NH₂asym.), 3033 (NH₂sym.), 2227 (C≡N), 1601 (C=N); ¹H-NMR (DMSO-d₆ 400 MHz), δ : 8.42 (d, 2H, *J* 8.7 Hz, H2' and H6'); 8.35 (d, 2H, *J* 8.7 Hz, H2'' and H6''); 8.19 (d, 2H, *J* 8.7 Hz, H3'' and H5''); 8.02 (b, 2H, C2-NH₂); 7.01 (d, 2H, *J* 8.7 Hz, H3' and H5'); and δ 3.81 (s, 6H); ¹³C-NMR (DMSO-d₆ 400 MHz), MS (MALDI TOF MS: m/z molecular mass found = 334.1664; calculated for $C_{18}H_{14}N_5O_3$ [M+2]⁺, mass = 334.1273.

4-Amino-5-cyano-2-*p*-phenyl-6-(*m*-succinimidephenyl)-pyrimidine (5a)

This compound was obtained as colorless crystals in cyclohexane and ethyl acetate (6:4) yield. 89%. m.p. 220-222. R_f = 0.15; IR, KBr, $\gamma_{\max}$ cm⁻¹: 3404 (NH₂asym.); 3343 (NH₂sim.); 2265 (C≡N). 1797 (C=O); 1601 (C=N); ¹H-NMR (DMSO-d₆ 300 MHz), δ : 8.78 (s, 1H, H2''); 8.46 (t, 2H, H4'' and H6'', *J* 8.4 Hz); 8.43 (d, 2H, H2' and H6', *J* 8.4 Hz); 8.01 (b, 2H, C2-NH₂); 7.91 (t, 1H, H5'') and 7.57-7.54 (3H, H3', H4' and H5'); 2.82 (s, 2H, 3''' and 4'''); ¹³C-NMR (DMSO-d₆ 300 MHz), δ : 191.0 (2C, C2'''' and C5'''); 165.6 (1C, C5''); 164.4 (1C, C1''); 164.2 (1C, C2); 147.8 (1C, C6); 138.0 (1C, C4'); 136.3 (1C, C6''); 135.0 (1C, C4''); 131.8 (1C, C1''); 130.3 (1C, C2''); 128.6 (2C, C2' and C6'); 128.4 (1C, C3''); 125.5 (1C, C1'); 123.3 (1C, C4); 116.0 (2C, C3' and C5') and 85.0 (1C, C5); 23.7 (2C, C3''' and C4'''). LCMS-IT-TOF: m/z molecular mass found = 369.1224; calculated for $C_{21}H_{15}N_5O_2$ M⁺, mass = 369.1226.

4-Amino-5-cyano-2-(*p*-phenyl)-6-(*p*-succinimidephenyl)-pyrimidine (5b)

This compound was obtained as colorless crystals in cyclohexane and ethyl acetate (6:4) yield. 98%. m.p. 220-221. $R_f = 0.12$; IV, KBr, $\gamma_{\max}$ cm^{-1} : 3436 ($\text{NH}_{2\text{assim.}}$); 3326 ($\text{NH}_{2\text{sim.}}$); 2227 ($\text{C}\equiv\text{N}$); 1647 ($\text{C}=\text{N}$); ^1H -NMR (DMSO- d_6 300 MHz), δ : 8.41 (d, 2H, J 1.2 and 9.3 Hz, H2' and H6'); 8.0 (d, 2H, J 9 Hz H2'' and H6''); 7.9 (b, 2H, C2-NH₂); 7.78 (d, 2H, J 9 Hz, H3'' and H5'') and 7.57-7.48 (m, 3H, H3', H4' and H5') 2.75 (s, 2H, H3''' and H4'''); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 300 MHz), δ : 173.8 (2C, C2''' and C4'''); 166.3 (1C, C6) and 164.2 (1C, C1''); 163.9 (1C, C2); 162.3 (1C, C1'); 148.5 (1C, C4'); 135.9 (2C, C2'' and C6''); 131.2 (2C, C3'' and C5''); 127.9 (2C, C2' and C6'); 124.9 (1C, C1'); 112.6 (2C, C3' and C5'); 113.6 (1C, C4); 84.9 (1C, C5); 31.1 (2C, C3''' and C4'''). LCMS-IT-TOF: m/z (molecular mass found = 368.9627; calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_2$ [M-1]⁻, mass = 368.1226.

4-Amino-5-cyano-2-(*p*-anisyl)-6-(*m*-succinimidephenyl)-pyrimidine (5c)

This compound was obtained as colorless crystals in cyclohexane and ethyl acetate (6:4) yield. 78%. m.p. 224-226. $R_f = 0.8$ IV. KBr. $\gamma_{\max}$ cm^{-1} : 3467 ($\text{NH}_{2\text{assim.}}$); 3345 ($\text{NH}_{2\text{sim.}}$); 2217 ($\text{C}\equiv\text{N}$). 1798 ($\text{C}=\text{O}$); 1647 ($\text{C}=\text{N}$); ^1H -NMR (DMSO- d_6 300 MHz), δ : 8.77 (s, 1H, H2''); 8.47-8.38 (m, 4H, H2' and H6'; H4'' and H6''); 8.40 (d, 2H, H3''); 8.36-8.34 (b, 2H, C2-NH₂); 7.92-7.84 (t, 1H, H5''); 7.58-7.52 (m, 2H, J 5.7 Hz H3' and H5'); 2.90 (s, 2H, 3''' and 4'''); and 3.85 (s, 3H); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 300 MHz), δ : 174.0 (2C, C2''' and C5'''); 166.2 (1C, C6); 164.2 (1C, C1''); 163.9 (1C, C2); 162.3 (1C, C4'); 148.7 (1C, C3''); 142.6 (1C, C1''); 135.0 (1C, C4''); 131.8 (1C, C5''); 130.1 (1C, C6''); 130.3 (2C, C2' and C6'); 128.6 (1C, C1'); 123.6 (1C, C2''); 113.9 (2C, C3' and C5'); 116.0 (1C, C4); 82.3 (1C, C5); 55.3 (1C, C1''); 32.0 (2C, C3''' and C4'''). LCMS-IT-TOF: m/z molecular mass found = 398.9311; calculated for $\text{C}_{23}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_3$ [M-1]⁻, mass = 398.1331.

4-Amino-5-cyano-2-(*p*-anisyl)-6-(*p*-succinimidephenyl)-pyrimidine (5d)

This compound was obtained as colorless crystals in cyclohexane ethyl acetate (6:4) yield 94%. m.p. 224-226. $R_f = 0.75$; IV, KBr, $\gamma_{\max}$ cm^{-1} : 3109 ($\text{NH}_{2\text{asim.}}$). 3033 ($\text{NH}_{2\text{sim.}}$). 2227 ($\text{C}\equiv\text{N}$). 1601 ($\text{C}=\text{N}$); ^1H -NMR (DMSO- d_6 400 MHz), δ : 8.37 (d, 2H, J 8.7 Hz, H2' and H6'); 7.98 (d, 2H, J 8.7 Hz, H2'' and H6''); 7.78 (b, 2H, C2-NH₂);

7.68 (d, 2H, J 8.7 Hz, H3'' and H5''); 7.08 (d, 2H, J 8.7 Hz, H3' and H5'); 3.84 (s, 3H) and 2.89 (s, 2H, H3''' and H4'''); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 400 MHz), δ : 173.6 (2C, C2''' and C5'''); 166.2 (1C, C4'); 163.9 (1C, C2) 164.2 (1C, C1''); 148.6 (1C, C6); 142.6 (1C, C1''); 130.3 (2C, C2' and C6''); 130.0 (2C, C2'' and C6''); 128.6 (1C, C1'); 123.6 (2C, C3'' and C5''); 55.3 (1C, C1''); 116.0 (1C, C4); 113.9 (2C, C3' and C5'); 84.3 (1C, C5); and 32.6 (2C, C3''' and C4'''). LCMS-IT-TOF: m/z molecular mass found = 401.0958; calculated for $\text{C}_{23}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_3$ [M+2]⁺, mass = 401.9311.

4-Amino-5-cyano-2-(*p*-diethylaminophenyl)-6-(*m*-succinimidephenyl)-pyrimidine (5e)

This compound was obtained as colorless crystals in cyclohexane ethyl acetate (6:4) yield. 93%. m.p. 223-225. $R_f = 0.7$; IV, KBr, $\gamma_{\max}$ cm^{-1} : 3423 ($\text{NH}_{2\text{assim.}}$), 3433 ($\text{NH}_{2\text{sim.}}$), 2288 ($\text{C}\equiv\text{N}$), 1807 ($\text{C}=\text{O}$), 1685 ($\text{C}=\text{N}$); ^1H -NMR (DMSO- d_6 300 MHz), δ : 8.91 (t, 1H, H2''); 8.52-8.44 (m, 4H, H2', H6', H4'' and H6''); 7.62-7.38 (b, 2H, C2-NH₂); 8.59-8.40 (m, J 8.0 Hz, 2H, H3' and H5''); 7.98-7.82 (t, 1H, H5''); 3.23 (s, 6H) and 2.67 (s, 4H, H3''' and H5'''). ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 300 MHz), δ : 170.6 (2C, C2''' and C5'''); 166.0 (1C, C6); 164.4 (1C, C1''); 164.1 (1C, C2); 147.7 (1C, C3''); 137.9 (1C, C4'); 136.2 (1C, C1''); 135.0 (1C, C4''); 131.7 (1C, C5''); 129.3 (2C, C2' and C6''); 128.6 (1C, C6''); 128.4 (1C, C1'); 125.4 (1C, C2''); 123.3 (2C, C3' and C5'); 116.6 (1C, C4); 83.5 (1C, C5); 39.33 (2C, C1'') and 31.1 (2C, C3''' and C4'''). LCMS-IT-TOF: m/z molecular mass found = 414.3064; calculated for $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_2$ [M+2]⁺, mass = 414.1638.

4-Amino-5-cyano-2-(*p*-diethylaminophenyl)-6-(*p*-succinimidephenyl)-pyrimidine (5f)

This compound was obtained as colorless crystals in cyclohexane ethyl acetate (6:4) yield. 89%. m.p. 220-222. $R_f = 0.8$; IV, KBr, $\gamma_{\max}$ cm^{-1} : 3457 ($\text{NH}_{2\text{assim.}}$). 3369 ($\text{NH}_{2\text{sim.}}$). 2336 ($\text{C}\equiv\text{N}$). 1756 ($\text{C}=\text{O}$); 1602 ($\text{C}=\text{N}$); ^1H -NMR (DMSO- d_6 300 MHz), δ : 8.24 (d, 2H, J 6.9 Hz, H2' and H6'); 7.98 (d, 2H, J 6.9 Hz, H2'' and H6''); 7.68 (b, 2H, C2-NH₂); 7.58 (d, 2H, J 6.9 Hz, H3'' and H5''); 6.75 (d, 2H, J 6.9 Hz, H3' and H5'); 3.04 (s, 4H, H3''' and H4'''); and 2.08 (s, 6H) ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 300 MHz), δ : 170.4 (2C, C2''' and C5'''); 166.7 (1C, C6); 164.3 (1C, C1''); 164.2 (1C, C2); 152.5 (1C, C4'); 135.7 (1C, C1''); 135.5 (1C, C4''); 130.4 (2C, C2'' and C6''); 130.1 (2C, C2' and C6'); 128.5 (2C, C3'' and C5''); 123.1

(1C, C1'); 116.8 (1C, C4); 111.1 (2C, C3' and C5'); 82.3 (1C, C5); 39.7 (2C, C1'') and 28.7 (2C, C3''' and C4'''). LCMS-IT-TOF: m/z (molecular mass found = 414.3096; calculated for $C_{23}H_{20}N_6O_2$ [M+2]⁺, mass = 414.1638).

4-Amino-5-cyano-2-(p-diethylaminophenyl)-6-(p-pyrrol-2-onophenyl)-pyrimidine (6g)

This compound was obtained as yellow crystals from MeOH in 82.9% yield, m.p. 234.7-235.5 °C, R_f = 0.56 (n-hexane-ethyl acetate 7:3); IR, KBr, γ_{max} cm⁻¹: 3334 (NH_{2asym.}), 3270 (NH_{2sym.}), 2219, (C≡N), 1587 (C=N); ¹H-NMR (DMSO-d₆ 400 MHz), δ : 8.20 (d, 2H, J 9.2 Hz, H2' and H6'); 8.02 (d, 2H, J 9.2 Hz, H2'' and H6''); 7.70 (b, 2H, C2-NH₂); 7.63 (d, 2H, J = 9.2 Hz, H3'' and H5''); 6.76 (d, 2H, J = 9.2 Hz, H3' and H5'); 6.52 (m, 1H, J = 6.2 Hz, H3'''); 6.38 (m, 1H, J = 6.2 Hz, H4'''); 3.30 (s, 2H, H5'''); and 2.99 (s, 6H); ¹³C-NMR (DMSO-d₆ 300 MHz), δ : 164.5 (1C, C6); 164.2 (1C, C1''); 164.1 (1C, C2); 161.4 (1C, C2'''); 153.8 (1C, C4'); 152.6 (1C, C4'''); 138.0 (1C, C4''); 135.0 (1C, C1'); 130.4 (2C, C2'' and C6''); 130.3 (2C, C2' and C6'); 128.6 (1C, C3'''); 125.4 (1C, C1'); 123.3 (2C, C3'' and C5''); 116.2 (1C, C4); 114.0 (2C, C3' and C5'); 84.1 (1C, C5); 52.8 (1C, C5'''); and δ 39.4 (2C, C1''). LCMS-IT-TOF: m/z molecular mass found 396.0357; calculated for $C_{23}H_{20}N_6O_3$ M⁺, mass = 396.1699.

4-Amino-5-cyano-2-(p-anisyl)-6-(p-pyrrol-2-onophenyl)-pyrimidine (6h)

This compound was obtained as brown crystals from MeOH in 87.45% yield, m.p. 344.3-345.1, R_f = 0.2 (ethyl acetate-methanol 9.7:0.3); IR, KBr, γ_{max} cm⁻¹: 3487 (NH_{2asym.}), 3186 (NH_{2sym.}), 2210 (C≡N), 1697 (C=N); ¹H-NMR (DMSO-d₆ 400 MHz), δ : 8.20 (d, 2H, J = 12 Hz, H2' and H6'); 8.02 (d, 2H, J = 11.6 Hz, H2'' and H6''); 7.80 (b, 2H, C2-NH₂); 7.67 (d, 2H, J = 11.6 Hz, H3'' and H5''); 7.08 (d, 2H, J = 12 Hz, H3' and H5'); 6.80 (m, 1H, J = 6.6, H3'''); 6.72 (m, 1H, J = 6.6, H4'''); 3.84 (s, 3H) and 3.30 (s, 3H, H5'''); ¹³C-NMR (DMSO-d₆ 300 MHz), δ : 165.5 (1C, C6); 164.5 (1C, C1''); 164.3 (1C, C6); 162.3 (1C, C2'''); 153.8 (1C, C4'''); 152.5 (1C, C1'); 130.3 (1C, C4''); 130.1 (1C, C3'''); 129.5 (2C, C2' and C6'); 125.3 (2C, C2'' and C6''); 123.2 (1C, C1'); 122.9 (2C, C3'' and C5''); 116.5 (1C, C4); 112.1 (2C, C3' and C5'); 82.8 (1C, C5); 55.9 (1C, C1'') and 47.3 (1C, C5'''). LCMS-IT-TOF: m/z molecular mass found 384.9397; calculated for $C_{22}H_{17}N_5O_2$ [M+1]⁺, mass = 384.4027.

4-Amino-5-cyano-2-(p-maleimidephenyl)-6-(p-anisyl)-pyrimidine (6i)

This compound was obtained as yellow crystals from MeOH in 79.5% yield, m.p. 236.4-236.9, R_f = 0.7 (n-hexane-ethyl acetate 6:4); IR, KBr, γ_{max} cm⁻¹: 3476 (NH_{2asym.}), 3212 (NH_{2sym.}), 2213 (C≡N), 1621 (C=N); ¹H-NMR (DMSO-d₆ 400 MHz), δ : 8.40 (b, 2H, C2-NH₂); 7.98 (d, 2H, J = 11.6 Hz, H2' and H6'); 7.79 (s, 2H, H1'') and H2'''); 7.37 (d, 2H, J = 7.6 Hz, H2'' and H6''); 7.20 (d, 2H, J = 7.6 Hz, H3'' and H5''); 7.11 (d, 2H, J = 11.6 Hz, H3' and H5') and δ 3.88 (s, 3H'''); ¹³C-NMR (DMSO-d₆ 300 MHz), δ : 166.9 (1C, C6); 164.6 (1C, C1''); 164.2 (1C, C1'); 164.1 (2C, C1'' and C2''); 164.0 (1C, C2); 134.9 (1C, C1'); 130.9 (1C, C1''); 130.2 (2C, C2' and C6'); 128.5 (2C, C2'' and C6''); 124.0 (2C, C3' and C5''); 113.8 (1C, C4); 113.7 (2C, C3'' and C5''); 84.4 (1C, C5); and δ 55.4 (2C, C1''). LCMS-IT-TOF: m/z molecular mass found 398.0965; calculated for $C_{22}H_{17}N_5O_2$ [M+1]⁺, mass = 398.3862.

Antileishmanial and cytotoxic activities

According to the results shown in Table 1, pyrimidine derivatives **3(a-f)**, **3h**, **3l**, **3r**, **3s**, **5a**, **5b**, **5f** and **6(g-i)** showed activity against both intracellular promastigote and amastigotes forms of *L. amazonensis* and *L. infantum*. However, compounds **3g**, **3i**, **3j**, **3k**, **3(m-p)** and **5(c-e)** did not show activity. The derivatives active showed significant antileishmanial activity, the most active compounds for promastigotes of *L. amazonensis* were **3c**, **3h** and **5f**, and for *L. infantum*, **3b**, **5b** and **6h** the best IC₅₀ values found for amastigotes forms of *L. amazonensis* were **3b**, **3e** and **3f** and for *L. infantum*, **3a** and **3f**. However, although leishmanicidal activity was determined. The other active compounds presented reasonable results.

We evaluated activity antileishmanial in parallel the toxicity of compounds on mammalian cells, using the murine macrophages RAW 264.7. A variation in the activity of the pyrimidines was observed. Three, of 27 pyrimidines in Table 1, showed lower cytotoxicity, with high CC₅₀ values, above 100 μ M. Crossing the results obtained in the evaluation of Antileishmanial and mammalian cells toxicity, pyrimidines which showed the best results, *i.e.*, low toxicity in macrophages and high mortality rate at the concentration of 100 μ g/mL were: forms promastigote (*L. infantum*) **3b** and amastigote (*L. infantum*) **3a**, **3b** and **3f**. We note that compound **3b** was active for the two forms in *L. infantum*.

Pyrimidine derivatives	Cytotoxicity CC ₅₀ ^a	<i>Leishmania</i> sp.							
		Promastigote				Amastigote			
		IC ₅₀ [μM] ^b <i>L. amazonensis</i>	SI ^c	IC ₅₀ [μM] ^b <i>L. infantum</i>	SI ^c	IC ₅₀ [μM] ^b <i>L. amazonensis</i>	SI ^c	IC ₅₀ [μM] ^b <i>L. infantum</i>	SI ^c
3a	112.1	>630	0.11	70.81	0.33	141.5	0.16	50.58	0.46
3b	124.55	>630	0.11	31.46	0.73	88.96	0.26	129.0	0.18
3c	88.56	49.41	0.74	272.31	0.24	327	0.20	564	0.12
3d	16.37	117.1	0.57	278	0.24	>1.152	0.06	>1.152	0.06
3e	33.29	325	0.20	146.6	0.44	267	0.24	345	0.18
3f	203.56	>554	0.11	185	0.35	156	0.41	226	0.28
3g	31.07	Inactive	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3h	57.06	35.51	1.78	162.2	0.42	518	0.13	550.2	0.12
3i	82.69	Inactive	ND	Inactive	ND	Inactive	ND	Inactive	ND
3j	188.06	Inactive	ND	Inactive	ND	Inactive	ND	Inactive	ND
3k	264.78	Inactive	ND	Inactive	ND	Inactive	ND	Inactive	ND
3l	49.81	442.7	0.40	194.5	0.81	945.1	0.18	1.236	0.13
3m	131.47	Inactive	ND	Inactive	ND	Inactive	ND	Inactive	ND
3n	46.89	Inactive	ND	Inactive	ND	Inactive	ND	Inactive	ND
3o	175.85	Inactive	ND	Inactive	ND	Inactive	ND	Inactive	ND
3p	30.02	Inactive	ND	Inactive	ND	Inactive	ND	Inactive	ND
3q	17.39	Inactive	ND	Inactive	ND	Inactive	ND	Inactive	ND
3r	87.8	84.46	0.90	76.65	0.98	417.5	0.18	322	0.23
3s	56.8	56.08	1.22	71.09	0.98	627.8	0.11	>1.204	0.06
5a	136.1	2.886	0.20	133.5	0.45	527.4	0.11	>1.041	0.06
5b	52.36	69.24	0.87	49.46	1.21	>1.041	0.06	>1.041	0.06
5c	17.32	Inactive	ND	Inactive	ND	Inactive	ND	Inactive	ND
5d	128.85	Inactive	ND	Inactive	ND	Inactive	ND	Inactive	ND
5e	99.3	Inactive	ND	Inactive	ND	Inactive	ND	Inactive	ND
5f	84.4	39.18	1.43	234.2	0.24	>970	0.06	>970	0.06
6g	60.94	289.0	0.20	>504.8	0.11	554.6	0.10	605.0	0.10
6h	56.03	101.1	0.60	54.56	1.10	>1.044	0.06	>1.044	0.06
6i	37.2	142.8	0.40	170.9	0.34	>1.007	0.06	511.9	0.11
Miltefosine ^d	56.7	15.8	3.6	18.0	3.15	7.06	8.0	1.7	33.3

Table 1. Antileishmanial activity (IC₅₀), cytotoxicity profile (CC₅₀) and selectivity index (SI) of compounds **3(a-s)**, **5(a-f)** and **6(g-i)**. ^aCC₅₀: 50% cytotoxicity concentration on macrophages; ^bIC₅₀: 50% inhibitory concentration on *L. amazonensis* promastigotes; ^cSI: selectivity index (CC₅₀/IC₅₀); ^dMiltefosine, positive control; ND= not determined.

Pyrimidine Derivatives	HCT 116, SD	MCF-7, SD
3a	75.89299, ± 6.067729	68.77627, ± 3.593525
3b	18.66996, ± 0.094736	0
3c	47.43217, ± 0.300981	17.77286, ± 2.651725
3d	32.46395, ± 0.451082	0
3e	28.82544, ± 0.214583	0
3f	12.06678, ± 0.057381	0
3g	25.93754, ± 0.159224	0
3h	6.062659, ± 0.93421	0
3i	68.89632, ± 6.992866	45.67615, ± 4.746421
3j	44.99831, ± 2.430969	24.73332, ± 1.137158
3k	NT	NT
3l	21.47656, ± 3.772754	46.70941, ± 11.65046
3m	4.251545, ± 1.551534	53.21094, ± 9.395792
3n	6.631995, ± 1.152128	10.01312, ± 2.630914
3o	0	12.65945, ± 6.801657
3p	0.162689, ± 0.010641	16.96454, ± 4.157411
3q	0	75.80805, ± 7.247705
3r	0	60.49854, ± 4.36229
3s	19.62953, ± 2.600476	33.06087, ± 7.278725
5a	0	51.16712, ± 1.372398
5b	13.5079, ± 3.292948	4.767468, ± 0.105401
5c	29.02085, ± 0.790107	21.77861, ± 1.058768
5d	2.595609, ± 0.180113	31.66241, ± 2.009119
5e	30.41046, ± 0.668505	68.5059, ± 0.367039
5f	0	3.94053, ± 0.656797
5g	20.68623, ± 1.152382	30.63052, ± 1.684528
5h	44.30412, ± 4.087427	29.05951, ± 0.454447
5i	0	4.632688, ± 0.292455

Table 2. Percent inhibition at single concentration (10 $\mu\text{g/mL}$) of growth of compounds **3(a-s)**, **5(a-f)** and **6(g-i)**. SD: Standard deviation.

Anticancer evaluation

The cellular cytotoxicity of the compounds **3(a-s)**, **5(a-f)** and **6(g-i)** was verified by the MTT assay. In the MTT assay, the samples were considered non-toxic at a concentration of IC_{50} low of 25 $\mu\text{g/mL}$ (Table 2). The compounds presented concentration of IC_{50} low of 25 $\mu\text{g/mL}$ were **3b**, **3f-g**, **3l-m**, **3p**, **3s**, **5b** and **6g** for cell HCT-116, and compounds **3d** and **3f**, **3n-p**, **5b**, **5c**, **5f** and **6i** for cell MCF-7.

Compounds **3a** and **3i** (Table 3) have inhibition close to 75% and thus will be selected to determine the Concentration which inhibits 50% growth.

In silico studies

The values for several physicochemical parameters were obtained, such as molecular

weight, the number of heavy atoms, the number of aromatic heavy atoms, the number of rotatable bonds, the number of H-bond acceptors, the number of H-bond donors, the fraction of carbon bond saturation (Csp³), the number of sp³ hybridized carbons/total carbon count, the solubility (S), the lipophilicity parameter (LogP) predicted and the molar refractivity, and were given for each molecule by the online SwissADME web tool.

The prediction of the partition coefficient between n-octanol and water ($\log P_{\text{o/w}}$), that is the classical descriptor for lipophilicity, was obtained for all the structures and can be observed at Fig. 2. The SwissADME gives access to five freely available predictive models, in order to increase the prediction accuracy through consensus $\log P_{\text{o/w}}$.

Pyrimidine derivatives	^a MCF-7 IC ₅₀ (CI)	^b HCT-116 IC ₅₀ (CI)	^c NCI-H292 IC ₅₀ (CI)	^d HL-60
3a	17.36 (11.6-25.9)	12.39 (9.5-16.6)	11.31 (5.9-21.6)	Not active
3i	Not active	28.02 (19.96-39.87)	Not active	Not active
^e Dox	0.3 (0.21-0.43)	1.2 (0.6-2.2)	0.2 (0.1-0.5)	0.02 (0.01-0.03)

Table 3. Cytotoxic effect on tumor cell lines. Inhibitory concentration by 50% (IC₅₀) and confidence interval (CI) of the compounds **3a** and **3i** in three tumor lines in µg/mL. DOx: doxorubicin positive control. ^aIC₅₀: 50% inhibitory concentration on cell MCF-7; ^bIC₅₀: 50% inhibitory concentration on cell HCT-116; ^cIC₅₀: 50% inhibitory concentration on cell NCI-H292; ^dIC₅₀: 50% inhibitory concentration on cell HL-60; ^e Dox, positive control.

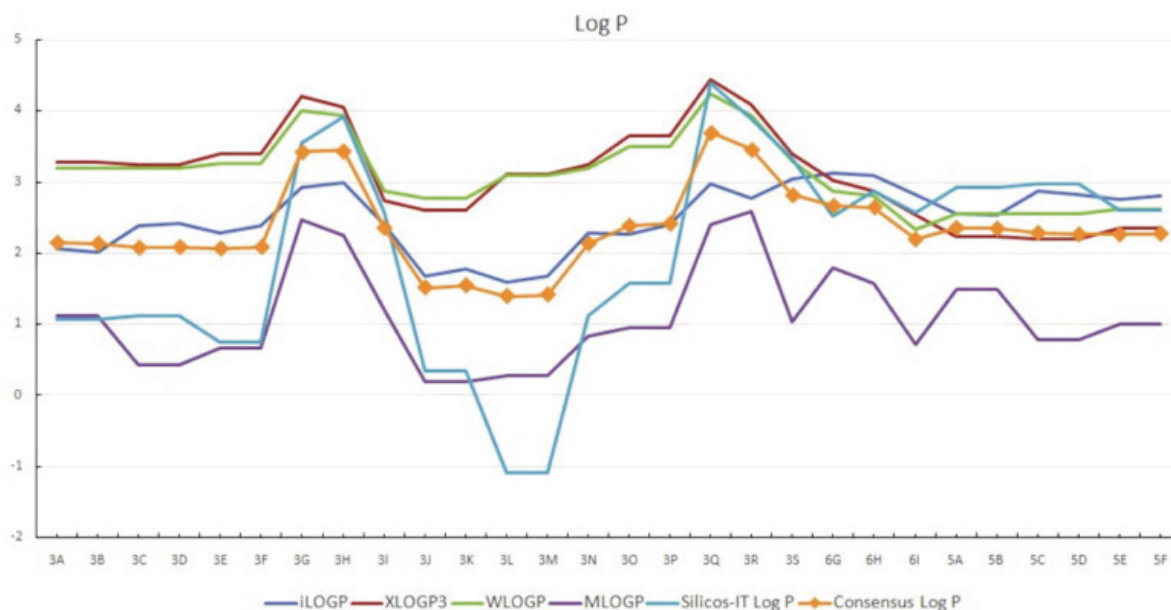


Figure 2. Graphical representation for predicted partition coefficient between n-octanol and water (log P_{o/w}).

From the analysis of the graph at Fig. 2, it is possible to observe that the predictive models XLOGP3¹⁷ and WLOGP¹⁸ demonstrate similar results for all structures, which can be observed because both models are based on atomistic methods. The models MLOGP¹⁹. Comparison of reliability of log P values for drugs calculated by several methods²⁰ and Silicos-IT²¹ Log P [http://silicos-it.be.s3-website-eu-west-1.amazonaws.com/software/filter-it/1.0.2/filter-it.html, accessed april 2019] showed a high diversity in all the results obtained, because both are topological methods. The ILOGP method relies on free energies of solvation in n-octanol and water, calculated by the Generalized-Born and solvent accessible surface area (GB/SA) mode, and showed similar results with the consensus Log P, which is the arithmetic mean of the values predicted by the five proposed methods¹⁶.

Another physicochemical parameter which is

very important is the solubility in water, that facilitates many drug development activities, primarily the ease of handling and formulation²². The SwissADME tool uses three different methods to predict the water solubility of the compounds, the ESOL model²³, Ali model²⁴ and SILICOS-IT²¹ model [website-eu-west-1.amazonaws.com/software/filter-it/1.0.2/filter-it.html, accessed april 2019]. The results can be observed in Fig. 3. The values of solubility presented large unconformity each other so that's not possible to predict, with high precision, the solubility in water for this class of compounds, by this methodology.

The predictions for intestinal absorption and brain permeation were determined using the tP-SA/WLogP-based graphical (BOILED-Egg method), included at the SwissADME tool. The results show that only the molecules **3j**, **3k**, **3l** and **3m** seems to have low intestinal absorption,

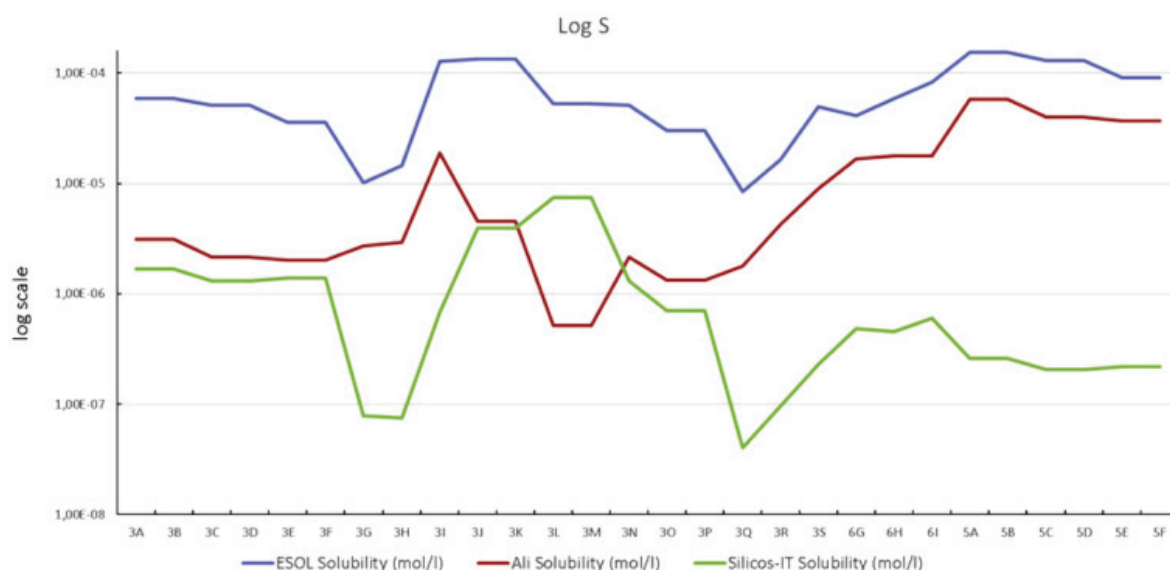


Figure 3. Graphical representation for predicted water solubility (log S).

while all the rest have predicted high absorption. Also, only the compound **3r** seems to be permeable to the brain (BBB). Overall, the compounds do not violate the Lipinski rule, soon very good candidates for oral administration^{25,26}.

CONCLUSION

The biological activities and *in silico* studies of pyrimidine derivatives cell lines (MCF-7, HCT 116, HL60 and NCI H292) and leishmanicidal activity in forms promastigote (*L. infantum*) **3b** and amastigote (*L. infantum*) **3a**, **3b** and **3f** are active. The compounds **3b** and **3i** have inhibition close to 75% and thus will be selected to determine the Concentration which inhibits 50% growth. We prediction of physicochemical descriptors compounds **3j**, **3k**, **3l** and **3m** seems to have low intestinal absorption, while all the rest have predicted high absorption. Also, only the compound **3r** seems to be permeable to the brain (BBB). Overall, the compounds do not violate the Lipinski rule, soon very good candidates for oral administration.

Acknowledgments. The authors gratefully acknowledge the Brazilian Agencies FACEPE, CNPq, and CAPES, for providing financial support under grant: FACEPE/BFP-0094-4.03/17, Z.S. do Monte and FACEPE/ CNPq /APQ APQ-0377-2.11/17, A.C.S. Santos thanks to the Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Postgraduate Program in Biological Sciences Chemistry Graduate Program and Aggeu Magalhães Research Center at UFPE fellowships.

REFERENCES

- Méndez-Arriaga, J.M., I. Oyarzabal, G. Escolano, A. Rodríguez-Diéguez, M. Sánchez-Moreno & J.M. Salas (2018) *J. Inorg. Biochem.* **180**: 26-32.
- World Health Organization (2019) *Leishmaniasis*. Available at: <<https://www.afro.who.int/health-topics/Leishmaniasis>>.
- Cavalcante, L.J. & M.R. Vale (2014) *Rev. Bras. Epidemiol.* **17**: 911-24.
- Maia-Elkhoury, A.N.S., W.A. Alves, M.L. Sousa-Gomes & E.A. Luna (2008) *Cad. Saúde Pública* **24**: 2941-7.
- Suryawanshi, S.N., S. Kumar, R. Shivahare, S. Pandey, A. Tiwari & S. Gupta (2013) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15**: 5235-8.
- Mohapatra, S. (2014) *Trop. Parasitol.* **4**: 4-9.
- Pimentel, M.I.F., C. Baptista, E.F. Rubin, E.C.F. Vasconcellos, M.R. Lyra & M.M. Salgueiro (2011) *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **44**: 254-6.
- Ponte-Sucre, A., F. Gamarro, J.C. Dujardin, M.P. Barrett, R. López-Vélez, R. García-Hernández, *et al.* (2017) *PLoS Negl. Trop. Dis.* **14**: e0006052.
- Do Monte, Z.S., M.R.L. Monteiro, C.B.A. Borba, N.B. De Gusmão, E.P. Falcão, R.O. Silva, *et al.* (2016) *Synth. Commun.* **46**: 983-91.
- De Melo, S.J., Z.S. Do Monte, A.C. Da Silva Santos, A.C.C. Silva, L.F.G.R. Ferreira, M.Z. Hernandez, *et al.* (2018) *Med. Chem. Res.* **27**: 2512-22.
- Melo, S.J., Z.S. Monte, R.M. Srivastava, E.P.S. Falcão & R.O. Silva (2017) *Heterociclos pirimídínicos potencialmente bioativos e respective*

- processo de obtenção e elucidação estrutural*. BR 10 2017 0151280. Instituto Nacional de Propriedade Intelectual, Universidade Federal de Pernambuco. Patente de Invenção (PI) 14 Jun 2017.
12. GraphPad Prism version 5.00 for Windows (2019) GraphPad Software, La Jolla California USA. Available at: <<http://www.graphpad.com>>.
 13. Skehan, P., R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, *et al.* (1990) *J. Natl. Cancer Inst.* **82**: 1107-12.
 14. Mosmann, T. (1983) *J. Immunol. Methods* **65**: 55-63.
 15. Berridge, M.V., A.S. Tan, K.D. McCoy & R. Wang (1996) *Biochemica* **4**: 14-9.
 16. Daina, A., O. Michielin & V. Zoete (2017) *Sci. Rep.* **3**: 42717.
 17. Cheng, T., Y. Zhao, X. Li, F. Lin, Y. Xu, Y. Zhang, *et al.* (2007) *J. Chem. Inf. Model.* **47**: 2140-8.
 18. Scott, A.W & M.C. Gordon (1999) *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **39**: 868-73.
 19. Moriguchi, I., S. Hirano, Q. Liu, I. Nakagome & Y. Mastushita (1992) *Chem. Pharm. Bull.* **40**: 127-30.
 20. Moriguchi, I., S. Hirano, I. Nakagome & H. Hirano (1994) *Chem. Pharm. Bull.* **42**: 976-8.
 21. SILICOS-IT LOG P (2019) Available at: <<http://silicos-it.be.s3-website-eu-west-1.amazonaws.com/software/filter-it/1.0.2/filter-it.html>>.
 22. Ritchie, T.J., S.J.F Macdonald, S. Peace, S.D. Pickett & C.N. Luscombe (2013) *Med. Chem. Comm.* **4**: 673-80.
 23. Delaney, J.S. (2004) *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **44**: 1000-5.
 24. Ali, J., P. Camilleri, M.B. Brown, A.J. Hutt & S.B. Kirton (2012) *J. Chem. Inf. Model.* **27**: 420-8.
 25. Ghose, A.K., V.N. Viswanadhan & J.J. Wendoloski (1999) *J. Comb. Chem.* **1**: 55-68.
 26. Veber, D.F., S.R. Johnson, H.Y. Cheng, B.R. Smith, K.W. Ward & K.D. Kopple (2002) *J. Med. Chem.* **6**: 2615-23.



Insecticidal activity of the ether extract from the lichen *Ramalina complanata* and an isolated metabolite (divaricatic acid) against *Sitophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae)

André Severino da Silva^{a,b}, Camila Soledade de Lira Pimentel^b,
Fábio Henrique Galdino dos Santos^b, Hallysson Douglas Andrade de Araújo^c,
Patrícia Maria Guedes Paiva^c, Nicácio Henrique da Silva^c, Eugênia Cristina Pereira^d,
Mônica Cristina Barroso Martins^e, Maria de Lourdes Lacerda Buril^d,
Thiago Henrique Napoleão^{c,*}, Emerson Peter Silva Falcão^a,
Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro^{b,**}

^a Laboratório de Síntese e Isolamento Molecular, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brazil

^b Departamento de Química Fundamental, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

^c Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

^d Departamento de Ciências Geográficas, Centro de Filosofia e Ciências Humanas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

^e Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Bioinsecticide

Maize weevil

Lichen metabolite

Ramalina complanata

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the insecticidal activity of ether extract from the lichen *Ramalina complanata*, and an isolated metabolite (divaricatic acid), against the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. The evaluation of ingestion toxicity was performed using an artificial diet composed of the extract or compound (4 mg/g, 8 mg/g, or 12 mg/g) mixed with wheat flour. After 7 days of incubation, we determined the mortality rates and nutritional parameters. In the fumigation assay, the insects were incubated for 7 days in sealed chambers containing either the extract or divaricatic acid in 0.195–3.125 mg/L of air. The ingestion of the extract led to a maximum mortality rate of 33.33% (12 mg/g) and the extract had a deterrent effect ranging from weak (feeding deterrent index, FDI: 50%) at 4 mg/g to strong (FDI: 71%) at 12 mg/g. The mortality rate of the insects that ingested divaricatic acid reached 52.50% (12 mg/g) and the insects were also unable to convert the food into biomass. A moderate deterrent effect (FDI: 51%) of the divaricatic acid was found at a concentration of 12 mg/g. In the fumigation test, the mortality rates with the extract and divaricatic acid were 43.33–50.00% and 33.33–63.33%, respectively. An LC₅₀ of 1.658 mg/L of air was determined for divaricatic acid. The results highlight the need for further studies on these kinds of compounds for the control of this insect, as well as for the investigation of the mechanisms by which lichen preparations work.

1. Introduction

The maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera, Curculionidae), is considered the main pest of stored corn, causing significant losses in production across the world by rendering the corn unviable for consumption. This problem is particularly important in tropical countries, such as Brazil, where the climate favors the development of the insect (Corrêa et al., 2017). Phosphine is the most widely used fumigant in combating stored grain pests; other insecticides used against *S. zeamais* include the organophosphate chlorpyrifos (Pimentel et al., 2009; Brito et al., 2021) and the pyrethroid deltamethrin (Vélez et al., 2018). However, there have been descriptions of insect resistance to some of these products, and their use is linked to concerns regarding environmental and human health (Pimentel et al., 2009; Cordeiro et al., 2017; Wakil et al., 2021). Therefore, the development of novel control strategies, such as using natural products, is needed.

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: thiago.napoleao@ufpe.br (T.H. Napoleão), daniela.navarro@ufpe.br (D.M.d.A.F. Navarro).

<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102049>

Received 21 January 2021; Received in revised form 26 April 2021; Accepted 25 May 2021

Available online 28 May 2021

1878-8181/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Plant-based substances with an insecticidal effect on pests of stored products have been studied as promising alternatives to synthetic insecticides because they are less hazardous to non-target species and show a higher degree of degradability, thereby being less harmful to the environment (Camaroti et al., 2017; Braga, 2019). For instance, essential oils have proved efficient in the control of *S. zeamais* because of their repellent and/or toxic effects. These include oils obtained from *Alpinia purpurata*, *Croton rudolphianus*, *Cymbopogon winterianus*, *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus staigeriana*, *Foeniculum vulgare*, *Ocimum basilicum*, *Ocimum gratissimum*, *Elletaria cardamomum*, and *Piper hispidinervum* (Estrela et al., 2006; Cosimi et al., 2009; Nerio et al., 2010; Lira et al., 2015; Araújo et al., 2019; Ribeiro et al., 2020). The essential oil from peppermint (*Mentha piperita*), studied in a fumigation test against two stored-product pests (*Sitophilus oryzae* and *Tribolium castaneum*), achieved a 100% mortality rate among adult individuals exposed to 24 h of treatment at concentrations of 75.0 µL/L of air and 100.0 µL/L of air (Rajkumar et al., 2019). Studies involving the methanol extract from the *Agave americana* leaf have demonstrated repellent action and toxicity upon contact against *S. oryzae* (Maazoun et al., 2019). Additionally, aqueous extracts obtained from the plants *Myracrodruon urundeuva*, *Schinus terebinthifolia*, and *Moringa oleifera* exhibited antifeedant activity and toxicity to *S. zeamais* (Napoleão et al., 2013; Camaroti et al., 2018; Oliveira et al., 2020).

Compounds derived from lichens have also displayed insecticidal activity (Sachin et al., 2018). Extracts from *Lecanora muralis*, *Letharia vulpina*, and *Peltigera rufescens* obtained using n-hexane, diethyl ether, acetone, and methanol solvents were toxic to *Sitophilus granarius* adults upon ingestion, causing mortality rates of 100%, 100%, and 86.86%, respectively, at a concentration of 20 mg/mL (Emsen et al., 2015). Martins et al. (2018) described the termiticidal effect of usnic, fumarprotocetraric, and barbatic acids, which were isolated from the lichens *Cladonia substellata*, *Cladonia verticillaris*, and *Cladia aggregata*, respectively, in a study involving the termite *Nasutitermes corniger*. Divaricatic acid belongs to the class of depsides, which constitutes a group of phenolic compounds often found in lichens but can also be isolated from plants (Hillebrand et al., 2004; Reynertson et al., 2006). This compound has exhibited molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata*, as well as an antiparasitic effect against *Schistosoma mansoni* (Silva et al., 2018). However, the insecticidal effects of this compound have not been reported until now.

Ramalina complanata (Sw.) Ach. is a corticolous, fruticose, and shrubby lichen found in Brazil. It is also characterized by the production of divaricatic (race 1), salazinic (races 1 and 2), and usnic (race 2) acids (Kashiwadani and Kalb, 1993). The aim of the present study was to evaluate toxicity via fumigation and ingestion of the ether extract from the lichen *Ramalina complanata*, and the divaricatic acid that was isolated from this extract, against *S. zeamais*.

2. Materials and methods

2.1. Acquisition of lichen material

The lichen *R. complanata* was collected from the municipality of São João in the state of Pernambuco, Brazil (09°01.399' S, 36°47.565' W) at an altitude of 1052 m in winter (June). The thallus was identified by one of the authors (M.L.L. Buril) based on morphological characteristics and a voucher (n° 54299) was deposited in the Geraldo Mariz Herbarium of the Universidade Federal de Pernambuco.

2.2. Preparation of extract and isolation of divaricatic acid

The dried lichen material (30 g) was placed in a Soxhlet extractor, with 100 mL of diethyl ether, at a temperature of 40 °C. The solvent was then eliminated in a rotary evaporator under low pressure and the material was placed in a desiccator until a constant weight was ob-

tained. The isolation of divaricatic acid was performed using the method described by Asahina and Shibata (1954), in which the ether extract was dissolved in absolute ethanol, left under reflux in a water bath at 40 °C for 20 min, and then placed in the desiccator.

2.3. Physicochemical analysis of divaricatic acid

Divaricatic acid was subjected to thin layer chromatography (TLC) with F254 silica gel plates (Merck®) (Culberson, 1969). The elution system comprised toluene/dioxane/acetic acid (45:12.5:2 v/v/v). The bands were viewed under UV light at 254/312 nm, and then the plate was subjected to 10% sulfuric acid (v/v) with heating at 100 °C for color reaction.

The purity of the divaricatic acid was determined using high performance liquid chromatography (HPLC) in a Hitachi chromatograph (model 655-11) coupled to a UV detector (CG, model 437) operating at 254 nm. An RP18 column was used. The mobile phase consisted of methanol/water/acetic acid (80:19.5:0.5 v/v/v) in an isocratic system and the injection volume was 20 µL. Divaricatic acid previously obtained at the Laboratório de Produtos Naturais of the Universidade Federal de Pernambuco was used as the standard. The samples (0.1 mg/mL) were dissolved in ether. The identification of the compound was performed by comparing the retention time (RT) and the area of the peak, to the profile obtained from the standard (Huneke and Yoshimura, 1996). The molecular structure was confirmed by proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR) in a Varian Unity Plus spectrophotometer at 400 MHz, using CDCl₃ as the solvent.

2.4. Insects

The colony of *S. zeamais* is maintained at the Laboratório de Bioquímica de Proteínas of the Universidade Federal de Pernambuco with authorization (no. 36301) from the Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade of the Brazilian Ministry of Environment. The insects were reared in glass pots containing pesticide-free kernels of corn and kept in a BOD chamber at 25 °C with a relative humidity of 70% and a 12-h light/dark photoperiod. Insects 30–40 days of age were used in the assays. Colonies with individuals of uniformized ages were separated according to Khan et al. (2014).

2.5. Evaluation of ingestion toxicity

The evaluation of ingestion toxicity was performed using an adaptation of the method by Xie et al. (1996) as described by Napoleão et al. (2013). For each bioassay, an artificial diet was prepared by mixing 1.0 g of autoclaved wheat flour with the extract or compound diluted in 2.0 mL of distilled acetone. This formed a solution of the samples from which we obtained the final concentrations of 4 mg, 8 mg, and 12 mg of extract/pure compound per gram of wheat flour (mg/g). A control group was also formed and the individuals of which were fed a mixture of wheat flour with acetone alone. After homogenization and incubation for 24 h at 37 °C, aliquots (100 µL) of the suspension were transferred to sterile Petri dishes (90 × 100 mm) to form disks (five disks per dish). Dishes with dry disks were weighed. Next, 10 insects were weighed in plastic pots and transferred to the Petri dishes with the disks. The dishes were incubated for 7 days at 28 °C. Two independent assays were performed in quadruplicate. The mass of flour disks and insects was recorded again on the seventh day after the start of the experiment, along with the mortality rate. Insects were considered dead when their abdominal appendages were not moving, and no reaction was observed when touched with tweezers.

The data obtained were used to calculate the feeding deterrence index (FDI) and nutritional variables. The FDI was calculated as follows: $FDI (\%) = 100 \times [(A-B)/(A)]$, where A is the mass ingested by the insects in the control group and B is the mass ingested by the test insects

(Isman et al., 1990). Based on the FDI data, the treatments were classified as non-deterrent (FDI < 20%), or they were classified as having a weak deterrent effect (50% > FDI ≥ 20%), a moderate deterrent effect (70% > FDI ≥ 50%), or a strong deterrent effect (FDI ≥ 70%) (Liu et al., 2007). The following nutritional indices were calculated based on Xie et al. (1996): the relative consumption rate = $C/(D \times \text{days})$, where C is the mass (mg) ingested and D is the initial biomass (mg) of the insects; the relative biomass gain rate = $E/(D \times \text{days})$, where E is the biomass (mg) acquired or lost by the insects; as well as the efficiency of the conversion of ingested food (ECIF) = $E/(C \times 100)$.

2.6. Evaluation of fumigation toxicity

The fumigation toxicity test was based on work done by Chu et al. (2010) and was conducted in plastic containers (2.5 cm in width × 5.5 cm in length; volume: 24 mL), the lids of which were covered internally with filter paper (2 cm in diameter). To these we added 20 µL of solution (ether extract or divaricatic acid) diluted in distilled acetone to achieve concentrations of 0.195 mg/L, 0.390 mg/L, 0.781 mg/L, 1.562 mg/L, and 3.125 mg/L of air. Distilled acetone alone was used for the control group. After 1 min had passed to allow for the evaporation of the solvent, 20 insects were placed into each container and the lids were firmly closed to form a sealed chamber. After 24 h of exposure, the insects were transferred to new containers that had no sample and the mortality rate was recorded after 7 days. Three independent assays were performed in quadruplicate.

2.7. Statistical analysis

The results were expressed as the mean ± standard error of the mean (SEM). Significant differences between groups were evaluated by analysis of variance (ANOVA). This was followed by the mean separation of the treatments using Tukey's test ($p < 0.05$) with the aid of GraphPad Prism version 4.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA). The LC_{50} (lethal concentration required to cause 50% mortality) for divaricatic acid in the fumigation assay was determined using the program MedCalc version 19.8 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium).

3. Results and discussion

Divaricatic acid was obtained from the ether extract of *R. complanata*. The analysis performed with thin-layer chromatography revealed a spot with $R_f = 0.56$, confirming the presence of divaricatic acid when compared to the standard. The HPLC analysis confirmed the presence of this component with the highest concentration found in the ether extract. In the HPLC analysis of the purity of the compound, a peak with a retention time of 16.47 min was detected, which is similar to the standard and the compound at a 99% degree of purity.

The 1H NMR data confirmed the structure of the divaricatic acid and is as follows: (400 MHz, $CDCl_3$) δ 0.98 (6H, t, 5.4 Hz, Me, C18, 27); 1.68 (4H, m, $CH_2 - C-16$ and 26); 2.97 (4H, m, CH_2 , C-17, 25); 2.93 (3H, s, OCH_3 , C-20); 6.38 (2H, d, 2.4 Hz, C4, 11); 6.64 (1H, d, 2.4 Hz, C15); 6.76 (1H, d, 2.4 Hz, C-6); and 10.65 (2H, s, OH, C7, 22).

The results of the ingestion test are displayed in Table 1. The ether extract caused the death of 33.33% of *S. zeamais* adults and the divaricatic acid caused the death of 52.5% of adults at the highest concentrations tested. Camaroti et al. (2018) demonstrated that the saline extract from the leaves of *Schinus terebinthifolius* influenced the survival of *S. zeamais* 7 days after treatment that caused the death of 51% of the insects at a concentration of 250 mg/g. The saline extract from the leaves of *Myracrodruon urundeuva* caused the death of *S. zeamais* adults, with an LC_{50} of 72.4 mg/g (Napoleão et al., 2013). The present data show that the ether extract from *R. complanata* was more active than both extracts investigated in the studies cited.

Table 1

Mortality rate of *Sitophilus zeamais* adults after being submitted to diet containing ether extract from *Ramalina complanata* or isolated divaricatic acid.

Concentration (mg/g)	Mortality rate (%)	
	Extract	Divaricatic acid
Control	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
4	5.00 ± 10.00	0.00 ± 0.00
8	22.50 ± 5.57	35.00 ± 5.77
12	33.33 ± 11.55	52.50 ± 9.57

Mean ± standard deviation. Data obtained seven days after treatment. Distilled acetone was used in the control group.

We evaluated the nutritional status of the insects after exposure to the extract and divaricatic acid. Fig. 1A shows that, compared to the control, there was a significant loss of biomass in the insects exposed to the extract at concentrations of 8 mg/g and 12 mg/g ($F_{3,28} = 31.69$; $p < 0.0001$), while the relative consumption rate (Fig. 1B) was significantly lower in all the treatments with the extract ($F_{3,28} = 21.61$; $p < 0.0001$). The extract exhibited a weak deterrent effect at a concentration of 4 mg/g (FDI: 50%), a moderate effect at a concentration of 8 mg/g (FDI: 67%), and a strong effect at a concentration of 12 mg/g (FDI: 71%). No conversion of the ingested food occurred in the treatments with the extract, as demonstrated by the negative ECIF values ($F_{3,28} = 77.08$; $p < 0.0001$) shown in Fig. 1C. These results indicate that the insects had needed to metabolize their energy reserves.

Regarding the isolated compound (divaricatic acid), there was also a significant ($F_{3,28} = 49.71$; $p = 0.0029$) loss of biomass in the insects exposed to concentrations of 8 mg/g and 12 mg/g (Fig. 2A). The relative consumption rate (Fig. 2B) was significantly lower ($F_{3,28} = 15.82$; $p = 0.0471$) than the control but this was only in the treatment with the concentration of 12 mg/g. Divaricatic acid had no deterrent effect at concentrations of 4 mg/g and 8 mg/g (FDI: 5% and 16%, respectively), and a moderate deterrent effect at the concentration of 12 mg/g (FDI: 51%). However, even with the insects feeding on this compound, the biomass conversion efficiency rate was negative in the treatments with 8 mg/g and 12 mg/g (Fig. 2C), demonstrating a significant ($F_{3,28} = 40.14$; $p = 0.0083$) anti-nutritional effect, which may explain the mortality induced by the lichen compound.

Similar to our results, Camaroti et al. (2018) reported that the saline extract from the leaves of *S. terebinthifolius* had a strong feeding deterrent effect (FDI: 100% at all tested doses) on *S. zeamais*, whereas a compound isolated from it (in this case a lectin called SteLL) had no deterrent effect. Similar to what was seen for divaricatic acid, the insects fed on the diet containing SteLL, but there was no conversion of the food ingested into biomass, which indicates a post-ingestion toxic effect. Studying a water extract from *M. oleifera* seeds, Oliveira et al. (2020) found an LC_{50} (concentration required to kill 50% of insects) of 214.6 mg/g for *S. zeamais* adults after ingesting the extract, which also did not show a feeding deterrent effect.

Emsen et al. (2015) demonstrated that extracts from the lichens *Lecanora muralis*, *Letharia vulpina*, and *Peltigera rufescens* caused death when ingested by *S. granarius* adults. The extracts from *L. muralis*, *L. vulpina*, and *P. rufescens* caused mortality rates of 100%, 100%, and 86%, respectively, at the concentration of 20 mg/mL. Moreover, compounds isolated from lichens have been found to exhibit insecticidal activity via ingestion against other pests. For example, usnic, fumarprotocetraric, and barbatric acids obtained from Cladoniaceae, exhibited 100% mortality rates on the termite *N. corniger* at all concentrations tested (5 mg/mL, 7 mg/mL, and 10 mg/mL) (Martins et al., 2018). Yildirim et al. (2012) reported that extracts from the lichens *L. vulpina* and *P. rufescens* (20 mg/mL), as well as the diffractaic and usnic acids (10 mg/mL) isolated from *Usnea longissima*, showed insecticidal effects on *S. zeamais* adults when mixed (0.8 mL) in maize grains, with mortality rates of 96.97%, 95.96%, 96.97%, and 76.77%, respectively.

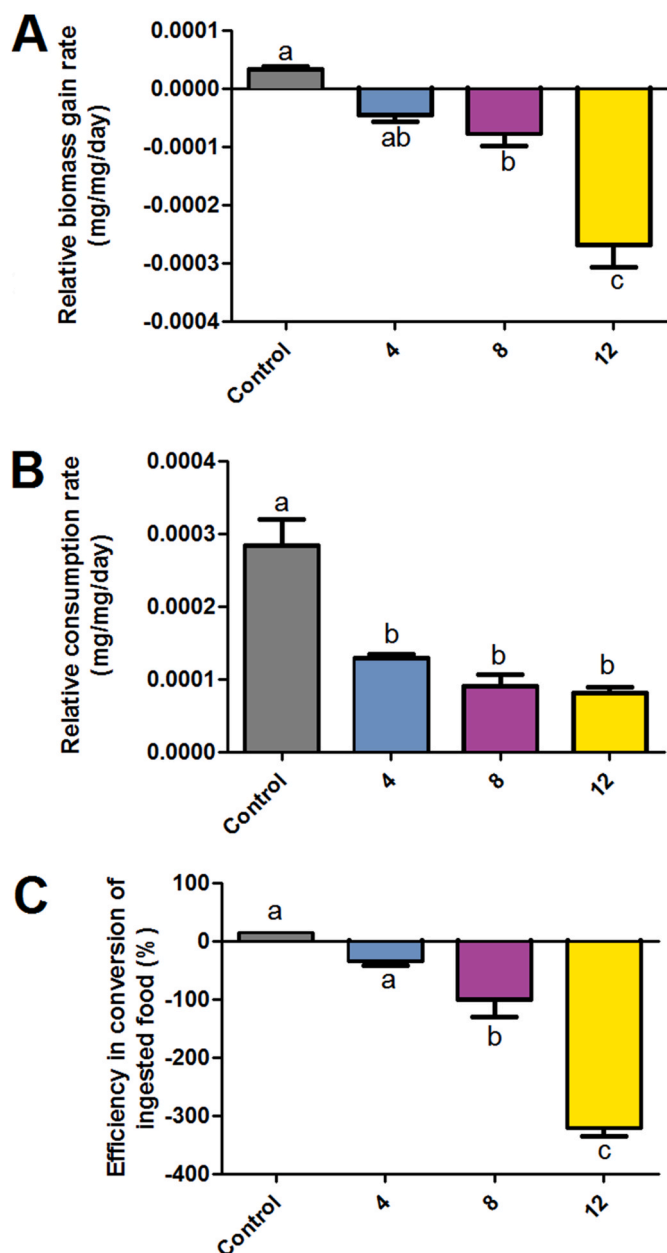


Fig. 1. Effect of ether extract from *Ramalina complanata* (4 mg/g, 8 mg/g, and 12 mg/g) on nutritional variables in *Sitophilus zeamais* adults. (A) Relative biomass gain rate; (B) Relative consumption rate; (C) Efficiency of the conversion of ingested food. Different letters indicate significant differences between treatments by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test ($p < 0.05$). Each bar corresponds to the mean $\pm$ SEM of eight replicates.

The results of the fumigation test reveal a significantly higher mortality rate in the treatments involving the extract (Fig. 3A; $F_{5,66} = 14.42$; $p < 0.0001$), or the divaricatic acid (Fig. 3B; $F_{5,66} = 199.7$; $p < 0.0001$), when compared to the control group. This demonstrates toxicity via inhalation of the extract and the isolated compound. The effect was dose-dependent for divaricatic acid, being determined an LC_{50} of 1.658 [1.248–2.068] mg/L of air ($\chi^2 = 53.694$; $p < 0.0001$). The mortality rates between the assays with the extract and the isolated compound has similar values, indicating that divaricatic acid is one of the active compounds in the extract from *R. complanata*.

The fumigant property against insect pests has been described for essential oils. Lira et al. (2015) reported the fumigation toxicity of the essential oil from *A. purpurata*, with an LC_{50} of 41.4 μ L/L of air. Simi-

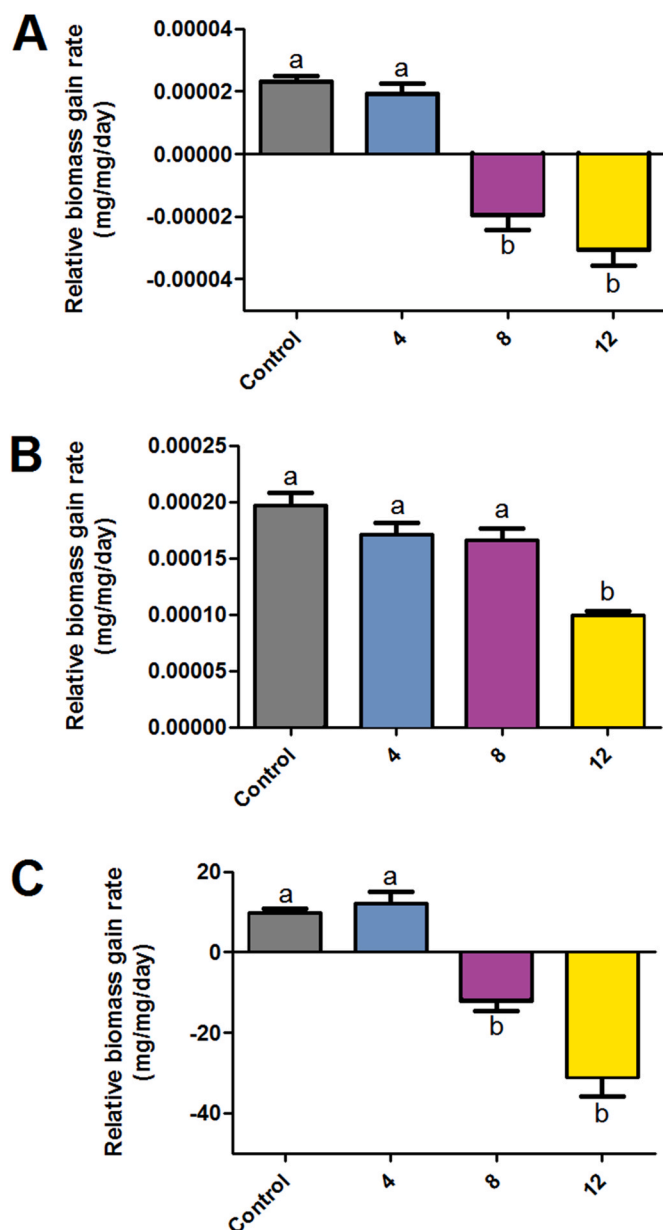


Fig. 2. Effect of divaricatic acid (4 mg/g, 8 mg/g, and 12 mg/g) on nutritional variables in *Sitophilus zeamais* adults. (A) Relative biomass gain rate; (B) Relative consumption rate; (C) Efficiency of the conversion of ingested food. Different letters indicate significant differences between treatments by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test ($p < 0.05$). Each bar corresponds to the mean $\pm$ SEM of eight replicates.

larly, the essential oil from *Artemisia vestita* caused the death to 50% of *S. zeamais* adults that were exposed to a concentration of 13.42 mg/L of air (Chu et al., 2010). The essential oil from the flowers of *Dipsacus japonicus* exhibited fumigant action against the pests *S. zeamais* ($LC_{50} = 10.11$ mg/L of air) and *Tribolium castaneum* ($LC_{50} = 5.26$ mg/L of air) (Li et al., 2013). Kim et al. (2016) demonstrated the fumigation toxicity of essential oils from *Hyssopus officinalis*, *Origanum majorana*, and *Thymus zygis* against *Sitophilus oryzae* adults at concentrations of 25 mg/L of air.

There are few studies on the use of lichens and their secondary metabolites for pest control. The present study is the first in the literature to describe the fumigant effect of an extract and compound obtained from a lichen on *S. zeamais*. This could stimulate further studies

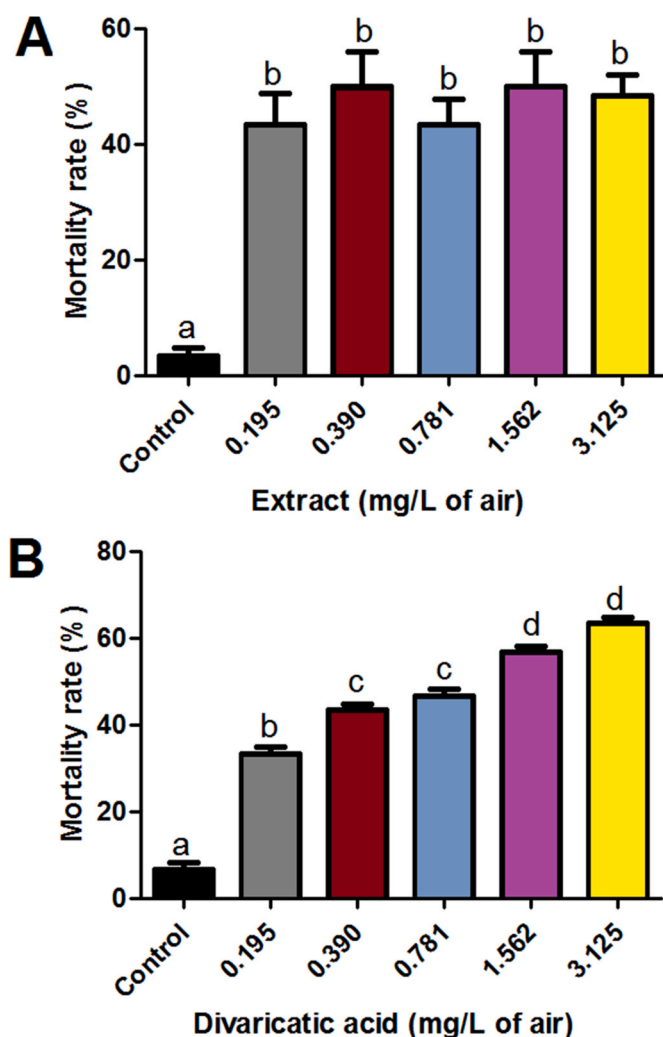


Fig. 3. Evaluation of the fumigant activity of ether extract from *Ramalina complanata* and divaricatic acid on *Sitophilus zeamais* adults. Different letters indicate significant differences between treatments by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test ($p < 0.05$). Each bar corresponds to the mean $\pm$ SEM of eight replicates.

on these kinds of compounds on the control of this insect, as well as an investigation of the mechanisms by which lichen preparations work.

4. Conclusions

The ether extract from *R. complanata*, and divaricatic acid isolated from this extract, exhibited toxicity via fumigation and ingestion to the adult forms of *S. zeamais*. Divaricatic acid exhibited greater toxicity than the extract in both cases. Moreover, toxicity by ingestion was found to have anti-nutritional effects, which exerted a negative impact on the conversion of food into biomass by the insects.

Declaration of competing interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors express their gratitude to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; 303404/2019-1; 309701/2019-8; 306544/2019-9; 422233/2018-8), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; Finance Code 001) and

the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE; APQ-0443-1.06/15). H.D.A. Araújo thanks FACEPE for Researcher Fixation Scholarship (BFP-0080-2.08/20).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102049>.

References

- Araújo, A.M.N., Oliveira, J.V., França, S.M., Navarro, D.M.A.F., Barbosa, D.R.S., Dutra, K. A., 2019. Toxicity and repellency of essential oils in the management of *Sitophilus zeamais*. Rev. Bras. Eng. Agrícola Ambient. 23, 372–377.
- Asahina, Y., Shibata, S., 1954. Chemistry of Lichen Substances. Japan Society for the Promotion of Science, Tokyo.
- Braga, S., Silva, M.E., Raga, A., 2019. Uso de extratos naturais no controle de insetos, com ênfase em moscas-das-frutas (Diptera: tephritidae). Biológico 81, 1–30.
- Brito, V.D., Achimón, F., Pizzolitto, R.P., Sánchez, A.R., Torres, E.A.G., Zygodlo, J.A., Zunini, M.P., 2021. An alternative to reduce the use of the synthetic insecticide against the maize weevil *Sitophilus zeamais* through the synergistic action of *Pimenta racemosa* and *Citrus sinensis* essential oils with chlorpyrifos. J. Pest. Sci. 94, 409–421.
- Camaroti, J.R.S.L., Oliveira, A.P.S., Paiva, P.M.G., Pontual, E.V., Napoleão, T.H., 2017. Phytoinsecticides for controlling pests and mosquito vectors of diseases. In: Green, V. (Ed.), Biocontrol Agents: Types, Applications and Research Insights. Nova Science Publishers Inc., New York, pp. 147–188.
- Camaroti, J.R.S.L., Almeida, W.A., Belmonte, B.R., Oliveira, A.P.S., Lima, T.A., Ferreira, M.R.A., Paiva, P.M.G., Soares, L.A., Pontual, E.V., Napoleão, T.H., 2018. *Sitophilus zeamais* adults have survival and nutrition affected by *Schinus terebinthifolius* leaf extract and its lectin (SteLL). Ind. Crop. Prod. 116, 81–89.
- Chu, S.S., Liu, Q.R., Liu, Z.L., 2010. Insecticidal activity and chemical composition of the essential oil of *Artemisia vestita* from China against *Sitophilus zeamais*. Biochem. Systemat. Ecol. 38, 489–492.
- Cordeiro, E.M.G., Corrêa, A.S., Rosi-Denadai, C.A., Tomé, H.V.V., Guedes, R.N.C., 2017. Insecticide resistance and size assortative mating in females of the maize weevil (*Sitophilus zeamais*). Pest Manag. Sci. 73, 823–829.
- Corrêa, A.S., Vinson, C.C., Braga, L.S., Guedes, R.N.C., Oliveira, L.O., 2017. Ancient origin and recent range expansion of the maize weevil *Sitophilus zeamais*, and its genealogical relationship to the rice weevil *S. oryzae*. Bull. Entomol. Res. 107, 9–20.
- Cosimi, S., Rossi, E., Cioni, P.L., Canale, A., 2009. Bioactivity and qualitative analysis of some essential oils from Mediterranean plants against stored-product pests: evaluation of repellency against *Sitophilus zeamais* Motschulsky, *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) and *Tenebrio molitor* (L.). J. Stored Prod. Res. 45, 125–132.
- Culbertson, C.F., 1969. Chemical and Botanical Guide to Lichen Products. The University of North Carolina Press, Chapel Hill.
- Emsen, B., Yildirim, E., Aslan, A., 2015. Insecticidal activities of extracts of three lichen species on *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). Plant Protect. Sci. 51, 155–161.
- Estrela, J.L.V., Fazolin, M., Catani, V., Alécio, M.R., Lima, M.S., 2006. Toxicidade de óleos essenciais de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* em *Sitophilus zeamais*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.41, n.2. pp. 217–222.
- Hillenbrand, M., Zapp, J., Becker, H., 2004. Depsides from the petals of *Papaver rhoeas*. Planta Med. 70, 380–382.
- Huneck, S., Yoshimura, 1996. Identification of Lichen Substances. Springer, Verlag, Berlin.
- Isman, M.B., Koul, O., Luczynski, A., Kaminski, J., 1990. Insecticidal and antifeedant bioactivities of neem oils and their relationship to azadirachtin content. J. Agric. Food Chem. 38, 1406–1411.
- Kashiwadani, H., Kalb, K., 1993. The genus *Ramalina* in Brazil. Lichenologist 25, 1–31.
- Khan, K., Khan, G.D., Din, S.U., Khan, S.A., Ullah, W., 2014. Evaluation of different wheat genotypes against rice weevil (*Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). J. Biol. Agric. Healthcare 4, 85–89.
- Kim, S.W., Lee, H.R., Jang, M.J., Jung, C.S., Park, I.K., 2016. Fumigant toxicity of Lamiaceae plant essential oils and blends of their constituents against adult rice weevil *Sitophilus oryzae*. Molecules 21, 361.
- Li, S.-G., Huang, Y.-Z., Hua, R.-M., Lin, H.-F., He, Y.-J., Wei, L.-L., Liu, Z.-Q., 2013. Fumigant activity of *Illicium verum* fruit extracts and their effects on the acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activities in adult *Sitophilus zeamais*. J. Pest. Sci. 86, 677–683.
- Lira, C.S., Pontual, E.V., Albuquerque, L.P., Paiva, L.M.P., Paiva, P.M.G., Oliveira, J.V., Napoleão, T.H., Navarro, D.M.A.F., 2015. Evaluation of the toxicity of essential oil from *Alpinia purpurata* inflorescences to *Sitophilus zeamais* (maize weevil). Crop Protect. 71, 95–100.
- Liu, Z.L., Goh, S.H., Ho, S.H., 2007. Screening of Chinese medicinal herbs for bioactivity against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium castaneum* (Herbst). J. Stored Prod. Res. 43, 290–296.
- Maazoun, A.M., Hamdi, S.H., Belhadj, F., Jemâa, J.M.B., Messaoud, C., Marzouki, M.N., 2019. Phytochemical profile and insecticidal activity of *Agave americana* leaf extract towards *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). Environ. Sci. Pollut. Res. 26, 19468–19480.
- Martins, M.C.B., Lopes, R.S., Tejero, R.S., Rodrigues, B.R.M., Lima, V.L.M., Pereira, E.C., Silva, N.H., 2018. Effects of usnic, barbatic and fumarprotocetraric acids on survival of *Nasutitermes corniger* (Isoptera: termitidae: Nasutitermitinae). Sociobiology 65,

- 79–87.
- Napoleão, T.H., Belmonte, B.R., Pontual, E.V., Albuquerque, L.P., Sa, R.A., Paiva, L.M., Coelho, L.C.B.B., Paiva, P.M.G., 2013. Deleterious effects of *Myracrodruon urundeuva* leaf extract and lectin on the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae). J. Stored Prod. Res. 54, 26–33.
- Nerio, L.S., Oliveira-Verbel, J., Stashenko, E.E., 2010. Repellent activity of essential oils: a review. Bioresour. Technol. 101, 372–378.
- Oliveira, A.P.S., Agra-Neto, A.C., Pontual, E.V., Lima, T.A., Cruz, K.C.V., Melo, K.R., Oliveira, A.S., Coelho, L.C.B.B., Ferreira, M.R.A., Soares, L.A.L., Napoleão, T.H., Paiva, P.M.G., 2020. Evaluation of the insecticidal activity of *Moringa oleifera* seed extract and lectin (WSMoL) against *Sitophilus zeamais*. J. Stored Prod. Res. 87, 101615.
- Pimentel, M.A.G., Faroni, L.R.D., 'A., Guedes, R.N.C., Sousa, A.H., Tótola, M.R., 2009. Phosphine resistance in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). J. Stored Prod. Res. 45, 71–74.
- Rajkumar, V., Gunasekaran, C., Christy, I.K., Dharmaraj, J., Chinnaraj, P., Paul, C.A., 2019. Toxicity, antifeedant and biochemical efficacy of *Mentha piperita* L. essential oil and their major constituents against stored grain pest. Pestic. Biochem. Physiol. 156, 138–144.
- Reynertson, K.A., Wallace, A.M., Adachi, S., Gil, R.R., Yang, H., Basile, M.J., D'Armiento, J., Weinstein, I.B., Kennelly, E.J., 2006. Bioactive depsides and anthocyanins from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). J. Nat. Prod. 69, 1228–1230.
- Ribeiro, I.A.T.A., Silva, R., Silva, A.G., Milet-Pinheiro, P., Paiva, P.M.G., Navarro, D.M.A. F., Silva, M.V., Napoleão, T.H., Correia, M.T.S., 2020. Chemical characterization and insecticidal effect against *Sitophilus zeamais* (maize weevil) of essential oil from *Croton rudolphianus* leaves. Crop Protect. 129, 105043.
- Sachin, M.B., Mahalakshmi, T.R., 2018. Insecticidal efficacy of lichens and their metabolites - a mini review. J. Appl. Pharmaceut. Sci. 8, 159–164.
- Silva, H.A.M.F., Siqueira, W.N., Sá, J.L.F., Silva, L.R.S., Martins, M.C.B., Aires, A.L., Amâncio, F.F., Pereira, E.C., Albuquerque, M.C.P., Melo, A.M.M.A., Silva, N.H., 2018. Laboratory assessment of divaricatic acid against *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni* cercariae. Acta Trop. 178, 97–102.
- Vélez, M., Botina, L.L., Turchen, L.M., Barbosa, W.F., Guedes, R.N.C., 2018. Spinosad- and deltamethrin-induced impact on mating and reproductive output of the maize weevil *Sitophilus zeamais*. J. Econ. Entomol. 111, 950–958.
- Wakil, W., Kavallieratos, N.G., Usman, M., Gulzar, S., El-Shafie, H.A.F., 2021. Detection of phosphine resistance in field populations of four key stored-grain insect pests in Pakistan. Insects 12, 288.
- Yildirim, E., Emsen, B., Aslan, A., Bulak, Y., Ercisli, S., 2012. Insecticidal activity of lichens against the maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). Egypt. J. Biol. Pest Control 22, 151–156.



CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY

Histological evaluation of the liver of mice with sarcoma-180 treated with salazinic acid

MARIA APARECIDA DA C. DE LIRA, MARLLYN M. DA SILVA, WANESSA K.M. SILVA, EMERSON P.S. FALCÃO, FRANCISCO C.A. DE AGUIAR JÚNIOR & SEBASTIÃO J. DE MELO

Abstract: Many of the drugs used to fight cancer cells induce various damage causing hepatotoxic effects which are characterized by tissue changes. The aim of the study is to know the possible effects of salazinic acid on livers of mice exposed to Sacoma-180. The tumor was grown in the animals in ascitic form and inoculated subcutaneously in the axillary region of the mouse developing the solid tumor. Treatment with salazinic acid (25 and 50 mg/kg) and 5-Fluorouracil (20 mg/kg) started 24-hours after inoculation and was performed for 7 days. To verify these effects, the qualitative method of histological criteria investigated in liver tissue was used. It was observed that all treated groups showed an increase of pyknotic nuclei in relation to the negative control. There was an increase in steatosis in all groups compared to the negative control but there was a decrease in the groups treated with salazinic acid in the 5-Fluorouracil. There was no necrosis in the salazinic acid treated groups. However, this effect was seen in 20% of the positive control group. Therefore, it can be concluded that salazinic acid did not show hepatoprotective action on mice but demonstrated a decrease in steatosis and absence of tissue necrosis.

Key words: cancer, hepatotoxicity, lichen, sarcoma-180.

INTRODUCTION

Cancer is the term used to describe a set of more than 100 diseases that have in common the disordered growth of altered cells, that invade organs and tissues. The different types of cancer correspond to the various types of cells in the body. When cancer cells grow in epithelial tissues, such as skin or mucous membranes, they are called carcinomas. If the starting point are connective tissues, such as bone, muscle or cartilage, this is referred to as a sarcoma. It is called metastasis, when cancer cells in disarray spread to other regions of the body through the blood stream (INCA 2019).

These cancer groups of disease as a public health issue are the second leading cause of

death in the United States. Therefore, cancer has become a major challenge for research in the search for definitive solutions, such as healing through a drug (Siegel et al. 2019). Thus, experimental animal models are important and essential to determine the antitumor potential of molecules and extracts for healing, as well as understand their action and effects throughout treatment. One such experimental model / method, is the use of tumors in mice and specifically, Sarcoma-180 (S-180), which is widely accepted due to its characteristic of forming ascitic, or solid tumors (Cai et al. 2012, Debnath et al. 2017, Ramos et al. 2019).

However, it is not enough to only determine the antitumor potential according to tumor

weight or ascitic volume. In addition, it is important to verify the effects of the drug, whether isolated or not, on the organs of potential animals, through histological and/or histomorphometric analysis. This is in order that a new drug to be developed for use, a greater safety path and possible adverse effects and achievements to be considered by the competent agencies such as ANVISA (National Health Surveillance Agency) in the case of Brazil, and the Food and Drug Administration (FDA) which is a federal agency in the United States Department of Health and Human Services responsible for oversight of drug development, manufacturing and use (Silva et al. 2012, 2019).

One of the main organs responsible for maximum activity, right after feeding, is the liver, so it is the target of every drug, especially when administered orally. In addition, in cancer patients, the liver is often reached, through metastases for example. For these reasons, the liver is often the first, to be investigated for possible changes or adverse effects such as hepatotoxicity (disease caused by toxins), followed by the spleen and kidney's (Saad-Hossne et al. 2004, Marinho et al. 2017).

In view of the great challenge of curing cancer, lichen are part of an extremely diverse group of fungi found in nature, symbiotically associated with algae and/or cyanobacteria which have been studied for a long time, as they produce secondary metabolites with large pharmaceutical properties. Uric acid for example, abundant in *Alectoria*, *Cladonia*, *Usnea*, *Lecanora*, *Ramalina* and *Evernia*, are examples of metabolites widely studied for having anti-proliferative activity (Ingólfssdóttir 2002). Kupchan & Kopperman (1975) first presented his antitumor activity against Lewis lung carcinoma in rats. Some extracts of *Cladonia convoluta*, *Cladonia rangiformis*, *Parmelia caperata*, *Platismatia glauca* and *Ramalina*

cuspidata demonstrated activities against various strains of human cancer cells (Bézivin et al. 2003).

In addition to uric acid, salazinic acid (SAL) is also a secondary lichen metabolite, present in some species of the Parmeliaceae Family, such as *Parmotrema lichexanthonicum*, and presents antibiotic and cytotoxic activity against human tumor cells (Micheletti et al. 2009) and *P. cetratum* have antitumor action against neoplastic cells of mice (Alexandrino et al. 2019).

Considering the importance of qualitatively characterizing the possible effects caused by SAL in relevant organs such as the liver, this study's main objective was to histologically evaluate the liver tissue of mice exposed to S-180 and treated with SAL, as well as to analyze the activities of transaminases Aspartate Aminotransferase (AST) and Alanine Aminotransferase (ALT). This is the first study that aims to determine probable reversals, promoted by SAL, to possible liver damage of mice with malignant tumors.

MATERIALS AND METHODS

Obtaining salazinic acid

SAL was provided by the Laboratório de Síntese e Isolamento Molecular, do Centro Acadêmico de Vitória, coordinated by Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão. The lichenic compound was isolated from the acetonic extract of the lichen *Parmotrema concurrens*, with more than 90% of purity level.

Experimental animals

Male Swiss albino mice (*Mus musculus*) (35-45g) were used, at 60 days of age. The animals were fasted for 8 hours before each experiment. The experimentation protocols were approved by the Animal Experimentation Ethics Commission (CEEa) of Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) (Nº 23076.012019/2018.58), with as

standards proposed by the Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) and by international standards established by the Guia do Instituto Nacional de Saúde para Cuidados e Uso de Animais de Laboratório.

Tumor assay

The experimental tumor, S-180 was kept in Swiss Albino mice, males, in the ascetic form with maintenance frequency of 7 days. Ascitic tumor cells ($5.0 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ cells) were inoculated subcutaneously in the right axillary region of the mouse developing the solid tumor.

Treatment started 24 hours after inoculation and was performed for 7 consecutive days. Injections of SAL were administered intraperitoneally at doses of 25 and 50 mg/kg of live weight of the animal. The animals in the negative control group were treated with saline solution + tween 80 to 5 %, as well as the animals of the positive control group treated with 5-Fluorouracil (20mg/kg of body weight). Fifty animals per group were used for the experimental model.

At the end of treatment, the animals were anesthetized with ketamine (1.25 g/kg) and xylazine (0.62 g/kg), and the liver was removed, dissected and fixed in formaldehyde solution (10 %) buffered and then submitted to histopathological analyses (Martins et al. 2016).

Qualitative study of liver histopathology

The organs were packed in a 10% buffered formaldehyde solution, remaining in this solution for a period of 48 hours. After this procedure, the samples were dehydrated in Ethyl alcohol at increasing concentrations, diaphanized by Xilol, impregnated and included in paraffin.

Tissue cuts, 4 μm thick, were submitted to the staining technique by Hematoxylin-Eosin. Histological images were captured by digital camera Moticam 2300, coupled under optical

microscope, under fixed focus and field clarity, using the 40x lens and obtaining 20 fields per blade.

Histological findings were interpreted according to qualitative criteria on the appearance of pyknotic nuclei, microvesicular steatosis, tissue necrosis, hepatic fibrosis and micro hemorrhages with erythrocytes extravasation (Fontes et al. 2004).

Statistical analysis

The results of animal and liver weight analyses, together with liver enzyme activity, are expressed as the means of repetitions $\pm$ standard deviation. For variance analysis (ANOVA) the Tukey test was performed for multiple comparisons. A value of $p < 0.05$ was adopted as a significance level.

RESULTS AND DISCUSSION

All animals exposed to ascitic S-180 presented solid tumor growth in the right axillary region during the 7 days of treatment, death was not observed among the groups undergoing treatment.

On the last day of treatment, the weight of the animals was verified and no significant differences were observed in the weight of the treated groups in relation to those of the negative control group. The mice were euthanized for organ removal. In macroscopic analysis of the collected livers, no apparent damage was seen. Overall, the organs seemed healthy, with no morphological changes or macroscopic lesions. In the analysis of liver weight, there were no significant differences between those exposed to treatment and those who only received the vehicle. Data in the Table I.

For enzymatic analysis of AST and ALT transaminases, serum samples were collected from mice. There were no significant differences

Table I. Analysis of the weight of livers and animals exposed to treatment with salazinic acid and enzymatic activity of transaminases.

Groups	Weight (g)		Enzymatic activity (U/L)	
	Animal	Liver	ALT	AST
Negative control	52,02±4,69	3,25±0,57	64,04±5,95	218,12±36,70
Positive control	50,80±5,84	3,26±0,36	47,94±8,07	216,07±38,80
SAL (25mg/Kg)	48,92±6,11	3,26±0,46	50,64±12,89	205,82±31,78
SAL (50mg/Kg)	48,34±5,07	3,51±0,28	44,87±6,37	184,11±46,93

Data expressed as mean ± SD. The statistical differences determined by ANOVA followed by the Tukey test. N= 5. p <0.05 vs. Negative control. N= number of animals per group. AST= Aspartate aminotransferase; ALT= Alanine aminotransferase; SAL= salazinic acid.

between the groups exposed to SAL treatment and the negative control group for the ALT and AST activities, Table I. These enzymes are considered markers sensitive to liver lesions (Liu et al. 2016). However, it can be confirmed that treatment with SAL did not cause lesions in the liver tissue.

The histological evaluation showed that the negative control group presented liver tissue in good condition, with well-defined nuclei and visible presence of Kupffer and endothelial cells, but 20% of the animals presented Pyknotic nuclei and 10% microvesicular steatosis.

In the group treated with 5-Fluorouracil, the presence of pyknotic nuclei, microvesicular steatosis and small regions of tissue necrosis were verified. The animals treated with salazinic acid (25 and 50 mg/kg) presented pyknotic nuclei, microvesicular steatosis and only at the dose of 50 mg/Kg were observed some regions of hepatic fibrosis. These lesions are presented in Figures 1 and 2. The presence of micro haemorrhages was not seen in analyzed groups (Table II).

It was also seen that the negative control group presented, preserved hepatic parenchyma and without severe cellular damage, hepatocytes with round central nucleus and homogeneous cytoplasm. Regarding

histomorphology of hepatocytes and Kupffer cells, no cell differences were observed compared to the negative control group. The results of this study are in accordance with those evaluated by Alexandrino et al. (2019) who analyzed the acute toxicity of SAL (100 mg/Kg) and verified the low toxicity of this substance in liver histopathology.

However, Araujo et al. (2019) observed that uric acid (2000 mg/Kg), a lichenic compound, caused liver tissue lesions. The pyknotic nucleus present in hepatocytes indicates a destructive fragmentation of the nucleus, which is characterized by irregular distribution of chromatin, causing programmed cell death (apoptosis), promoting future damage, such as tissue necrosis (Kumar et al. 2010).

Hepatic steatosis is defined as an accumulation of lipids in the cytoplasm of hepatocytes, especially triglycerides. Nicotinamide adenine dinucleotide present in hepatocytes leads to disturbance of β -oxidation of fatty acids in mitochondria, which leads to lipid changes in the tissue. The excess of these free fatty acids in hepatocytes exceeds the ability of it to process and re-export them (Baraona & Lieber 1979). These changes lead to cell death and cause elevation of serum marker enzymes that are released by the liver into the bloodstream (Lowry et al. 1951).

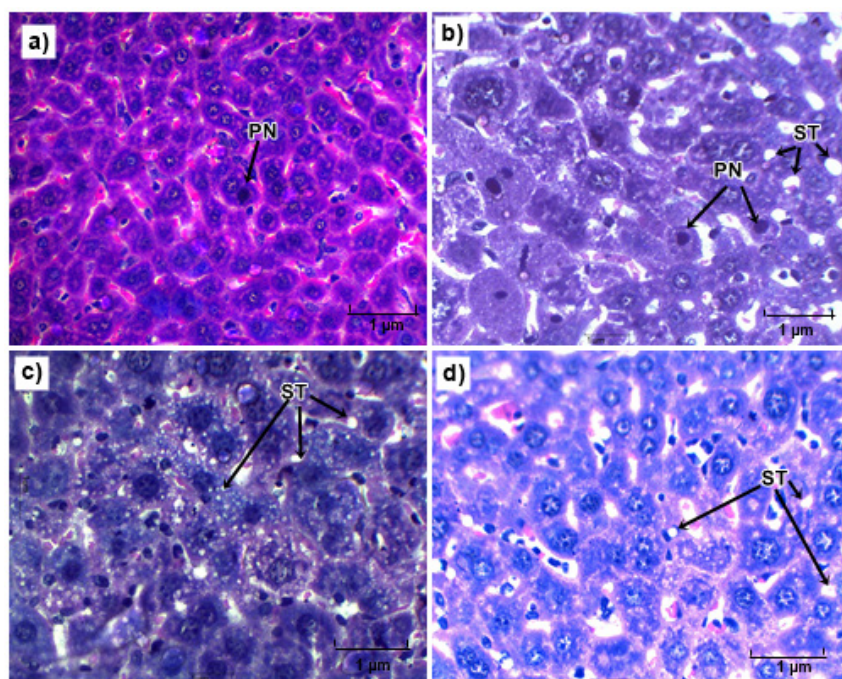


Figure 1. Photomicrograph of the histological section of the liver of mice exposed to S-180. (N=5). a) Negative control; b) 5-Fluorouracil treatment; c) and d) Treatment with SAL (25 and 50 mg / kg); PN- Pyknotic nucleus and ST- microvesicular steatosis. HE staining with 40X magnification.

However, it was considered that there is an interrelationship between metabolic processes, such as oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, insulin resistance and inflammatory response at the hepatic level with the triggering of hepatic steatosis and its progression of chronic diseases such as inflammation, fibrosis and cirrhosis (steatohepatitis) commonly associated with non-alcoholic fatty liver disease – NAFLD (Valenzuela & Videla 2011).

NAFLD is caused by the excess of triglycerides accumulated in liver cells resulting from increased lipogenesis, which can be caused by the ingestion of various drugs and multiple defects in energy metabolism (Rolo et al. 2012). NAFLD can cause inflammation causing negative regulation of PPAR- α (Peroxisome proliferator-activated- α), causing an increase in the activation of the pro-inflammatory nuclear transcription factor, Nuclear factor-kB (NF-kB) (Valenzuela & Videla 2011).

PPARs are transcription factors of nuclear receptors that have the function of regulating energy homeostasis, lipid metabolism and

inflammation (Tavares et al. 2007). They are considered sensors for fatty acids acting on gene expression controlling metabolic pathways that act in the maintenance of energy balance (Viswakarma et al. 2010). Its activation may decrease the activity of other transcription factors, such as NF-kB, thus acting directly in inflammatory processes (Wang et al. 2002).

Activation of NF-kB can result in oxidative stress and inflammatory processes. To minimize these causing damage in the body, the transcription factors PPAR- α and Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2) come into action, acting in the inhibition of NF-kB, thus causing a decrease of metabolic disorders in the tissue, reducing the pro-inflammatory, pro-lipogenic and oxidative stress effects (Hernández-Rodas et al. 2017, Valenzuela et al. 2017, Barbosa et al. 2019). It is known that damage to liver tissue can be caused mainly by oxidative stress and inflammatory response (Rolo et al. 2012, Valenzuela et al. 2017).

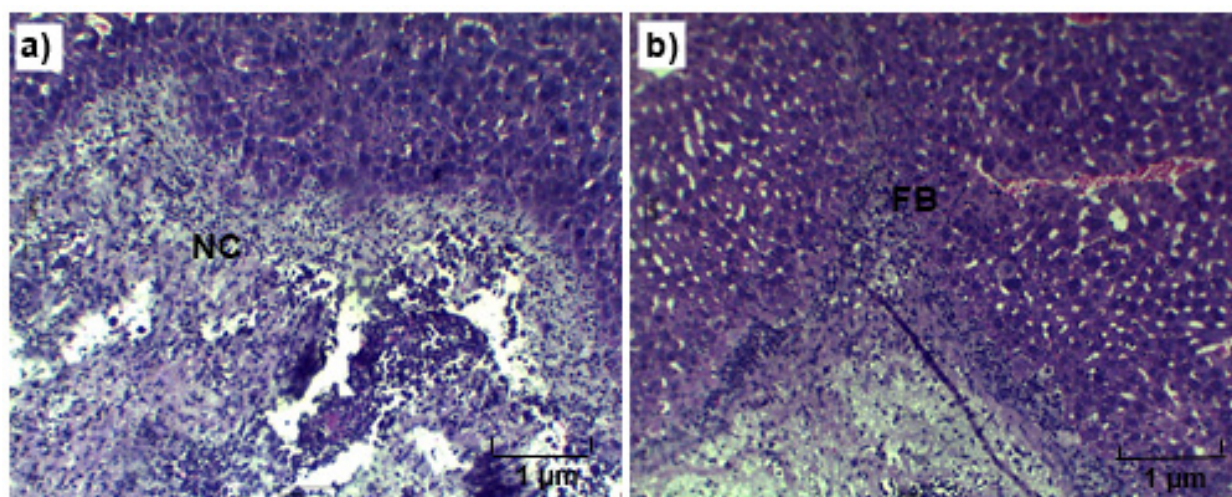


Figure 2. Photomicrograph of histological section of the liver of mice exposed to S-180. (N=5). **a)** treatment with 5-Fluorouracil and **b)** treatment with SAL (50 mg / kg). NC-Liver necrosis and FB- liver fibrosis. HE staining with 10X magnification.

Table II. Qualitative histopathological analysis of the liver of mice exposed to S-180.

Groups	Qualitative analysis criteria (%)				
	Pyknotic nuclei	Steatosis	Necrosis	Fibrosis	Micro hemorrhage
Negative control	40 (2)	20 (1)	0	0	0
Positive control	80 (4)	100 (5)	40 (2)	0	0
SAL (25 mg/Kg)	100 (5)	80 (4)	0	0	0
SAL (50 mg/Kg)	80 (4)	60 (3)	0	20 (1)	0

Data expressed as a percentage in number of animals. N=5. N= number of animals per group. Negative control= saline + tween 80 to 5 %; Positive control= 5-Fluorouracil (20 mg/Kg); SAL= salazinic acid (doses of 25 and 50 mg/Kg).

Liver damage is also associated with the use of ethanol, obesity, viral infection and the use of synthetic and natural medicines (Hewawasam et al. 2003). It is very important to understand the mechanisms of action caused by the side effects of antineoplastic agent in different organs, thus having a considerable significant role in establishing the treatment strategy. Thus, there is an adaptation to the body's response in relation to the action of anti-tumor agents and tolerance of different tissues regarding immunosuppressive state

induced by chemotherapy (Crăciun & Pașca 2014).

Further, liver tissue is very sensitive to lesions induced by synthetic compounds and of natural origin. This is due to its central role in the metabolism of these substances and it is possible to induce some degree of tissue damage during this experimentation and many of these compounds are involved in the mechanisms that lead to liver cell damage. For example, disorders in vital cellular organelles result in impairment of homeostatic balance, thus resulting in intracellular oxidative stress with

excessive formation of reactive oxygen species and suppressed immune response (Singh et al. 2016).

Studies have evidenced that hepatotoxicity is one of the main reasons for the withdrawal of Cancer medicines from the market. Natural products have already shown themselves to be promising in combating the toxicity of several commonly used drugs. In addition, many of these natural substances, such as resveratrol and curcumin, are now used as widely accepted chemo-preventive agents. It is known that compounds of natural origin not only reduce the risk of liver damage caused by medication, but also provide an alternative solution to remedy drug-induced hepatotoxicity response (Singh et al. 2016).

CONCLUSIONS

In conclusion, the main finding of this study is that the treatment with SAL in mice with S-180 caused apparent lesions in the liver tissue, however, at the enzymatic level no damage was seen. However, treatment with SAL caused a noticeable decrease in microvesicular steatosis compared to the positive control group. Tissue necrosis was not observed in the groups treated with lichenic acid.

Acknowledgments

Lira gratefully acknowledge the support by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, Brazil.

REFERENCES

ALEXANDRINO CAF, HONDA NK, MATOS MFC, PORTUGAL LC, SOUZA PRB, PERDOMO RT, GUIMARÃES RCA, KADRI MCT, SILVA MCBL & BOGO D. 2019. Antitumor effect of depsidones from lichens on tumor cell lines and experimental murine melanoma. *Braz J Pharmacog* 29: 449-456.

ARAUJO HDA ET AL. 2019. Usnic acid potassium salt: Evaluation of the acute toxicity and antinociceptive effect in murine model. *Molecules* 24: 1-17.

BARAONA E & LIEBER CS. 1979. Effects of ethanol on lipid metabolism. *J Lipid Res* 20: 289-315.

BARBOSA JE, STOCKLER-PINTO MB, CRUZ BO, SILVA ACT, ANJOS JS, MESQUITA CT, MAFRA D & CARDOZO LFMF. 2019. Nrf2, NF- κ B and PPAR β/δ mRNA Expression Profile in Patients with Coronary Artery Disease. *Arq Bras Cardiol* 113: 1121-1127.

BÉZIVIN C, TOMASI S, LOHÉZIC-LE DÉVÉHAT F & BOUSTIE J. 2003. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomedicine* 10(6-7): 499-503.

CAI Z, LI W, WANG H, YAN W, ZHOU Y, WANG G, CUI J & WANG F. 2012. Antitumor effects of a purified polysaccharide from *Rhodiola rosea* and its action mechanism. *Carbohydr Polym* 90: 296-300.

CRĂCIUN C & PAȘCA C. 2014. Structural and ultrastructural data on side effects of cisplatin in spleen, kidney and liver of rats. *Acta Metall* 1: 9-22.

DEBNATH S, KARAN S, DEBNATH M, DASH J & CHATTERJEE TK. 2017. Poly-L-Lysine Inhibits Tumor Angiogenesis and Induces Apoptosis in Ehrlich Ascites Carcinoma and in Sarcoma S-180 Tumor. *Asian Pac J Cancer Prev* 18: 2255-2268.

FONTES CER, TAHA MO, FAGUNDES DJ, FERREIRA MV, FILHO ORP & MARDEGAN MJ. 2004. Estudo comparativo do uso de cola de fibrina e cianoacrilato em ferimento de fígado de rato. *Acta Cir Bras* 19: 37-42.

HERNÁNDEZ-RODAS MC ET AL. 2017. Supplementation with docosahexaenoic acid and extra virgin olive oil prevents liver steatosis induced by a high-fat diet in mice through PPAR- α and Nrf2 upregulation with concomitant SREBP-1c and NF- κ B downregulation. *Mol Nutr Food Res* 61(12): 1-35.

HEWAWASAM RP, JAYATILAKA KAPW, PATHIRANA C & MUDDUWA LKB. 2003. Protective effect of *Asteracantha longifolia* extract in mouse liver injury induced by carbon tetrachloride and paracetamol. *J Pharm Pharmacol* 55(10): 1413-1418.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. 2019. Ministério da Saúde, Instituto Nacional de Câncer. <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>. Acesso em 27 de Julho de 2019.

INGÓLFSDÓTTIR K. 2002. Usnic acid. *Phytochem* 61: 729-736.

KUMAR V ET AL. 2010. Robbins E Cotran, Bases Patológicas Das Doenças. Elsevier. Brasil: Rio de Janeiro, p. 1-1479.

KUPCHAN SM & KOPPERMAN HL. 1975. Usnic Acid: Tumor Inhibitor Isolated from Lichens. *Experientia* 31(6): 625-752.

LIU X, ZHENG L, ZHANG R, LIU G, XIAO S, QIAO X, WU Y & GONG Z. 2016. Toxicological evaluation of advanced glycation end product Nε-(carboxymethyl) lysine: Acute and subacute oral toxicity studies. *Regul Toxicol Pharmacol* 77: 65-74.

LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL & RANDALL RJ. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.

MARINHO KSN, ANTONIO EA, SILVA CVNS, DA SILVA KT, TEIXEIRA VÊW, DE AGUIAR JÚNIOR FCA, DOS SANTOS KRRP, DA SILVA NH & SANTOS NPS. 2017. Hepatic toxicity caused by PLGA-microspheres containing usnic acid from the lichen *Cladonia substellata* (AHTI) during pregnancy in Wistar rats. *An Acad Bras Cienc* 89: 1073-1084.

MARTINS MCB, ROCHA TA, SILVA TDS, NETO MPC, SANTOS NPS, SILVA TG, AGUIAR-JUNIOR FCA, FALCÃO EPS, PEREIRA EC & SILVA NH. 2016. *In Vitro* and *in Vivo* Antineoplastic Activity of Barbatic Acid. *Int Arch Med* 9: 1-9.

MICHELETTI AC, BEATRIZ A, DE LIMA DP, HONDA NK, PESSOA CDÓ, MORAES MO, LOTUFO LV, MAGALHÃES HIF & CARVALHO NCP. 2009. Constituintes químicos de *Parmotrema lichexanthonicum* Eliasaro & Adler - Isolamento, modificações estruturais e avaliação das atividades antibiótica e citotóxica. *Quim Nova* 32: 12-20.

RAMOS DBM ET AL. 2019. Evaluation of antitumor activity and toxicity of *Schinus terebinthifolia* leaf extract and lectin (Stell) in sarcoma 180-bearing mice. *J Ethnopharmacol* 233: 148-157.

ROLO AP, TEODORO JS & PALMEIRA CM. 2012. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med* 52: 59-69.

SAAD-HOSSNE R, PRADO RG & HOSSNE WS. 2004. Effect of acetylsalicylic acid and acetic acid solutions in liver of rabbits. *Acta Cir Bras* 19: 677-686.

SIEGEL RL, MILLER KD & JEMAL A. 2019. Cancer statistics. *Cancer J Clin* 69: 7-34.

SILVA DC ET AL. 2012. Polysaccharide isolated from *Passiflora edulis*: Characterization and antitumor properties. *Carbohydr Polym* 87: 139-145.

SILVA MM ET AL. 2019. Effect of acute exposure in swiss mice (*Mus musculus*) to a fibrinolytic protease produced by *Mucor subtilissimus* UCP 1262: An histomorphometric, genotoxic and cytological approach. *Regul Toxicol Pharmacol* 103: 282-291.

SINGH D, CHO WC & UPADHYAY G. 2016. Drug-induced liver toxicity and prevention by herbal antioxidants: An Overview. *Front Physiol* 6: 1-18.

TAVARES V, HIRATA MH & HIRATA RDC. 2007. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARγ): molecular study in glucose homeostasis, lipid metabolism and therapeutic approach. *Arq Bras Endocrinol Metab* 51: 526-533.

VALENZUELA R, ILLESCA P, ECHEVERRÍA F, ESPINOSA A, RINCÓN-CERVERA MA, ORTIZ M, HERNÁNDEZ-RODASMC, VALENZUELA A & VIDELA L. 2017. Molecular adaptations underlying the beneficial effects of hydroxytyrosol in the pathogenic alterations induced by a high-fat diet in mouse liver: PPAR-α and Nrf2 activation, and NF-κB down-regulation. *Food Funct* 7: 1-35.

VALENZUELA R & VIDELA LA. 2011. The importance of the long chain polyunsaturated fatty acid n-6/n-3 ratio in development of non-alcoholic fatty liver associated with obesity. *Food Funct* 2: 644-648.

VISWAKARMA N, JIA Y, BAI L, VLUGGENS A, BORENSZTAJN J, XU J & REDDY JK. 2010. Coactivators in PPAR-Regulated Gene Expression. *PPAR Res* 2010: 250126.

WANG N, VERNA L, CHEN NG, CHEN J, LI H, FORMAN BM & STEMERMAN MB. 2002. Constitutive activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma suppresses pro-inflammatory adhesion molecules in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 277: 34176-34181.

How to cite

DE LIRA MAC, DA SILVA MM, SILVA WKM, FALCÃO EPS, DE AGUIAR JÚNIOR FCA & DE MELO SJ. 2023. Histological evaluation of the liver of mice with sarcoma-180 treated with salazinic acid. *An Acad Bras Cienc* 95: e20200455. DOI 10.1590/0001-3765202320200455.

*Manuscript received on April 8, 2020
accepted for publication on May 28, 2020*

MARIA APARECIDA DA C. DE LIRA¹
<https://orcid.org/0000-0002-2662-1003>

MARLLYN M. DA SILVA²
<https://orcid.org/0000-0002-1768-9831>

WANEISSA K.M. SILVA³
<https://orcid.org/0000-0001-7802-1854>

EMERSON P.S. FALCÃO¹
<https://orcid.org/0000-0003-2346-8477>

FRANCISCO C.A. DE AGUIAR JÚNIOR³

<https://orcid.org/0000-0001-8676-4826>

SEBASTIÃO J. DE MELO⁴

<https://orcid.org/0000-0002-4134-6169>

¹Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, Laboratório de Síntese e Isolamento Molecular, Rua Alto do Reservatório, s/n, 55608-680 Vitória de Santo Antão, PE, Brazil

²Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, Laboratório de Nanotecnologia, Biotecnologia e Cultura de Células, Rua Alto do Reservatório, s/n, 55608-680 Vitória de Santo Antão, PE, Brazil

³Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, Laboratório de Biotecnologia e Fármacos, Rua Alto do Reservatório, s/n, 55608-680 Vitória de Santo Antão, PE, Brazil

⁴Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Antibióticos, Avenida Prof. Moraes Rego, 1235, 50740-560 Recife, PE, Brazil

Correspondence to: **Maria Aparecida da Conceição de Lira**

E-mail: lira.macbio@gmail.com

Author contributions

Maria Aparecida da Conceição de Lira, designed the study and realized the experiments; Marllyn Marques da Silva, contributed in performed the histological analyses; Wanessa Karina de Moura Silva, assisted in the preparation of experiments; Emerson Peter da Silva Falcão, supervised the lichenic acid isolation technique; Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior, was responsible for monitoring the histological analysis and Sebastião José de Melo, supervised all experiments.



Laboratory note

Synthesis and antiinflammatory activity of 4-amino-2-aryl-5-cyano-6-{3- and 4-(*N*-phthalimidophenyl)} pyrimidines¹Emerson Peter da S. Falcão^a, Sebastião J. de Melo^{a,*}, Rajendra M. Srivastava^b,
Maria Tereza Jansen de A. Catanho^c, Silene Carneiro Do Nascimento^a^a Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, 50.670-901 Recife, PE, Brazil^b Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, 50.670-901 Recife, PE, Brazil^c Departamento de Biofísica, Universidade Federal de Pernambuco, 50.670-901 Recife, PE, Brazil

Received 4 November 2004; received in revised form 9 September 2005; accepted 14 September 2005

Available online 18 January 2006

Abstract

Six new 4-amino-5-cyano-2,6-diarylpyrimidines **5a–h** has been synthesized in a facile manner by reacting the appropriate arylamidines **4a–d** with bisnitriles **3a–e**. Reduction of the nitro group of **5a–e** using Pd in ethyl acetate furnished **6a–e** in good yields. Reaction of **6a–e** individually with phthalic anhydride yielded **7a–e** in good to excellent yields. The newly synthesized heterocycles were characterized by IR, ¹H-NMR and mass spectral data. Compounds **5f–h** and **7a–e** were also evaluated against inflammation. Pyrimidines **5g, h** exhibited better antiinflammatory activity when compared with acetylsalicylic acid (ASA). Phthalimide derivatives **7a–e** also presented antiinflammatory activity, and three of them, viz., **7a–c** have been found to be twice more active than aspirin. Cytotoxic evaluations of compounds **7a–e** using neoplastic cells (NCI-H₂₉₂ and Hep-2) presented 41% of growth inhibition of neoplastic cells NCI-H₂₉₂.

© 2006 Elsevier SAS. All rights reserved.

Keywords: Pyrimidines; Bisnitriles; Antiinflammatory activity

1. Introduction

Pyrimidine derivatives comprise a diverse and interesting group of drugs [1]. The subject has been discussed recently [2]. Earlier, a comprehensive review concerning pyrimidines has been published by Brown [3]. Pyrimidines in general are extremely important for their biological activities. For example, some are antiviral agents [4], the others are selective cholecystokinin subtype 1 (CCK1) receptor antagonists [5], and a few are antiinflammatory [6,7]. In fact, there are so many pyrimidine derivatives with pharmacological activities that it is difficult to describe much about them in the present paper.

In our continuing work on pyrimidines [8,9], we became interested to incorporate a phthalimido group in one of the phenyl rings. The reason for this is that phthalimide derivatives are

gaining importance due to their different and significant biological activities [10]. Thalidomide is one of them, which was once prohibited in the market is again being considered important due to its activity as an antiinflammatory agent [10]. This drug has been found to reduce tumor growth by blocking angiogenesis both in model systems and in clinical studies [11–14]. Thalidomide and its analogs also slow down the replication rate of HIV-1 in vitro [15].

Since many phthalimide derivatives have presented hypolipidemic activity [16] and antiinflammatory activities [loc. cit.], we perceived that when two moieties, like phthalimide and pyrimidine are joined the molecules might exhibit superior antiinflammatory activity. It is with this idea in mind that the present work was undertaken. Therefore, this paper describes the synthesis of eight pyrimidine derivatives **5a–h** where six of them **5a–e, h** have not yet been reported in the literature. Compounds **5f–h** and **7a–e** have been tested for antiinflammatory property with impressive results. In fact, **7a–e** turned out to be very active against inflammation.

^{*} Corresponding author. Fax: +55 81 3271 8346.E-mail address: melosj@ibest.com.br (S.J. de Melo).¹ Taken in part from the Ph.D. thesis (2003) of Emerson Peter da S. Falcão

2. Chemistry

The starting benzaldehyde and 3- and 4- substituted benzaldehydes **1a–e** were allowed to react with malononitrile **2** to give unsaturated bisnitriles **3a–e**. Condensation of these with arylamidines **4a–d** in the presence of piperidine furnished 4-amino-5-cyano-2,6-diarylpyrimidines **5a'–h'** in good yields [8, 17]. Reduction of compounds **5a–e** using Pd/C provided their respective amines **6a–e**. Reaction of **6a–e** individually with phthalic anhydride yielded **7a–e** in good to excellent yields. It may be worthwhile to comment that only the amino group either at *meta* or *para* positions of the phenyl ring suffered selective reaction while the 4-amino group of the pyrimidine ring did not take part in the reaction at all. The formation of phthalimido-2-yl function at the *meta* and *para* positions in the C-6 phenyl ring of the substituted pyrimidines **7a–e** was verified by the ¹H-NMR, infrared (IR) and mass spectral data. The synthetic maneuvering leading to **7a–e** has been presented in Scheme 1.

3. Results and discussion

All substituted pyrimidines are crystalline and stable compounds with high melting points. These can be recrystallized and are homogeneous by thin layer chromatography.

3.1. Spectroscopy

The IR and mass spectra of all compounds agreed with the proposed structures. The series **5a'–h'** have the correct chemical shifts for the protons in the ¹H-NMR spectra and it was easy to characterize them. Similarly, the amines **6a–e** obtained by the reduction of the nitro groups presented the expected chemical shifts. The target compounds could also be characterized by ¹H-NMR without any problem and the chemical shifts of one of them, i.e. **7a** are given: H_{2'} and H_{6'} (δ = 8.43 and J = 9.0 Hz); H₃ and H₅ (δ = 8.12 and J = 8.7 Hz); δ 7.9 (b, 2H, NH₂) H₂ and H₆ (δ = 7.69 and J = 8.1 Hz); H_{3'} and H_{5'} (δ = 7.61 and J = 8.4 Hz); H_{1'} and H_{4'} (δ = 8.02 m); H_{2'} and H_{3'} (δ = 7.94 m). δ 3.82 (s, 3H, CH₃O) the chemical shifts of all other compounds are given in Section 5.

4. Pharmacology

4.1. Preliminary toxicity and antiinflammatory tests of 4-amino-5-cyano-2,6-diarylpyrimidines **5f'–h'** and **7a–e**

The antiinflammatory assays were preceded by the acute toxicity tests in mice. The pyrimidine derivatives **5f'–h'** were dissolved individually in a 2.5% Tween 80 solution of 0.9% saline water. Administration of this suspension (0.5 ml) intraperitoneally to the animals in doses of 125, 250, 500, 1000 mg kg⁻¹ of body weight followed by the waiting period of 4–72 hours did not show any toxic effects. Pyrimidines containing phthalimido-2-yl group on the C-6 phenyl function in **7a–e** were also subjected to toxicity test which did not show

any toxicity symptoms when evaluated in five groups each containing five animals under the same conditions described above. The doses were from 100, 200, 400, 800, 1600 mg kg⁻¹ of the body weight.

Antiinflammatory tests have been performed for compounds **5f'–h'** and **7a–e** using groups of 10 Swiss albino mice at the dose of 250 mg kg⁻¹. All of them exhibited such property when compared with aspirin (acetylsalicylic acid, ASA) as well as indomethacin (INDO). Both of these commercially available antiinflammatory agents were also tested for comparative purposes employing the same solution as described above. Compound **5h'** showed the highest activity reducing the paw edema by 47.8%. Pyrimidines **5g'** and **5f'** presented 38.7% and 20.7% of inflammation reductions, respectively (Table 1).

Substances **7a–e** also presented antiinflammatory activity, but **7a–c** were much better in terms of inflammation reduction (Table 2). It is well known that INDO is stronger antiinflammatory drug than aspirin. A comparison of these two with compounds **7a–c** clearly demonstrate that compounds **7b** and **7c** are even superior in activity than INDO while **7a** is comparable to INDO (Tables 1 and 2). Figs. 1 and 2 provide the percentage reduction of edema for compounds **5f'–h'** and **7a–e** and their comparison with ASA and INDO.

Figs. 1 and 2 represent the comparative analyses of the anti-inflammatory activity of compounds **5f'–h'** and **7a–e**.

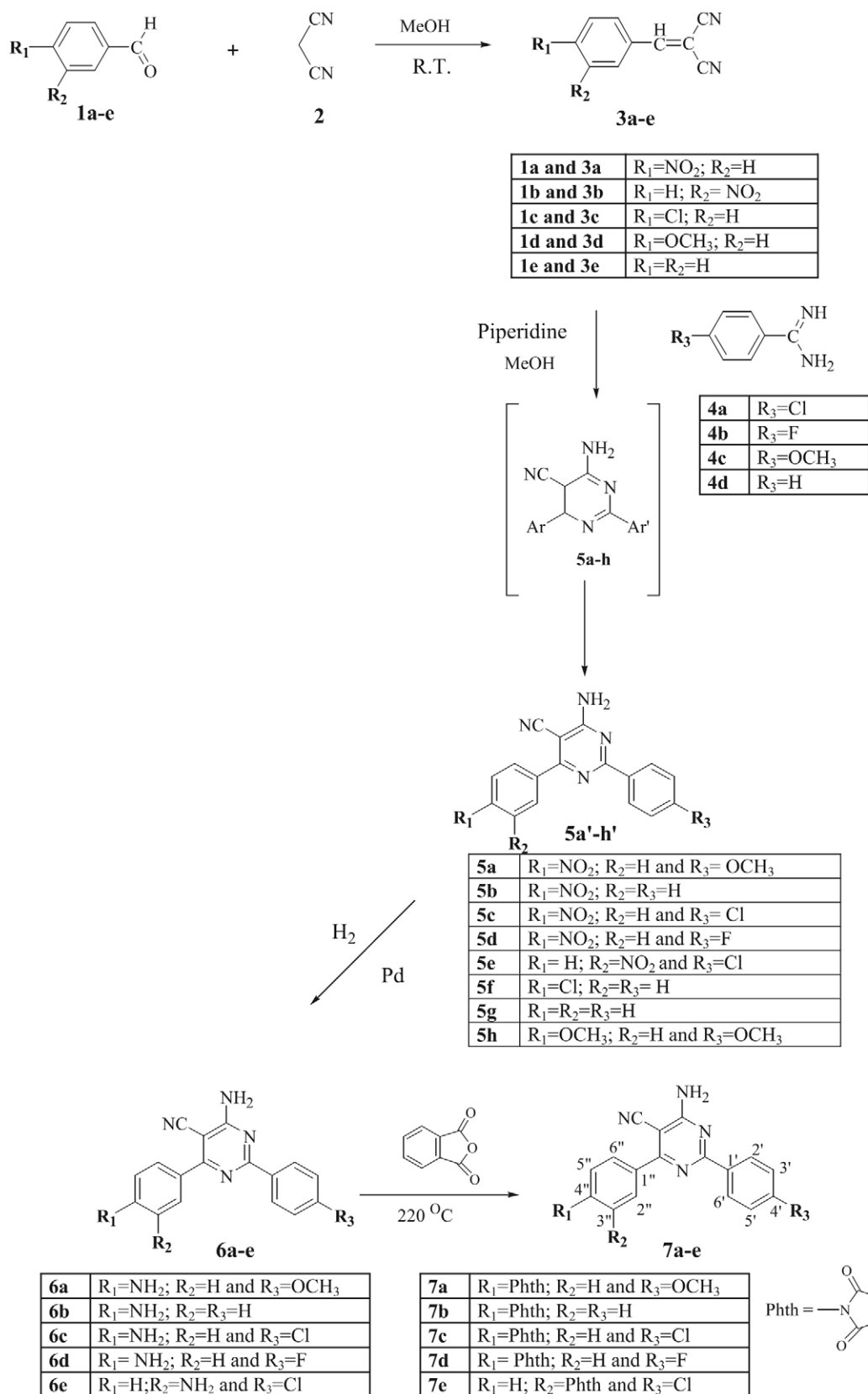
4.2. Cytotoxic test evaluations

Initially, compounds **5g'–h'** were tested for cytotoxic activity but no significant activity was found. Next, phthalimidopyrimidines (**7a–e**) were tested, which did not present cytotoxic activity against HEp-2 in the concentrations tested. All compounds except **7e** inhibited the growth of the neoplastic cells NCI-H292. The most active one was **7d** with 40.03% of inhibition activity at the concentration of 10 μ g mL⁻¹ (Table 3).

5. Experimental protocols

5.1. Chemical analysis

IR spectra were recorded with a Bruker spectrometer, model IFS 66 (Fourier Transform) utilizing KBr pellets. EI mass spectra were obtained with a Delsi-Nermag mass spectrometer, coupled to GC (HP 5890) at an ionization potential of 70 eV. ¹H-NMR spectra were recorded with a 300 MHz Varian spectrophotometer model UNITY plus. Melting points were obtained with an Electrothermal digital melting point apparatus (model 9100) and are uncorrected. Thin-layer chromatography was carried out on plates coated with silica gel containing fluorescent indicator F₂₅₄ and the spots were detected under ultraviolet light. The solvent system was ethyl acetate/hexane (4:1) for compounds **5a–h** and ethyl acetate/hexane (3:1) for compounds **6a–e** and **7a–e**.



Scheme 1.

Table 1
Antiinflammatory test results of compounds **5f–h**, ASA and INDO

Compound	Average difference in paw weights (g); standard deviation (S.D.)	Edema reduction (%)
2.5% Tween 80 in 0.9% aqueous NaCl	0.1045 ± 0.007	0.0
INDO	0.5081 ± 0.012	51.4
ASA	0.06680 ± 0.001	36.5
5f'	0.08280 ± 0.003	20.7
5g'	0.06432 ± 0.002	38.7
5h'	0.05450 ± 0.005	47.8

Table 2
Antiinflammatory test results of compounds **7a–e**

Compound	Average difference in paw weights (g); standard deviation (S.D.)	Edema reduction (%)
2.5% Tween 80 in 0.9% Aqueous NaCl	0.16487 ± 0.005	0.0
INDO	0.05081 ± 0.012	69.2
ASA	0.10436 ± 0.008	36.7
7a	0.08454 ± 0.010	65.7
7b	0.05986 ± 0.010	73.6
7c	0.06066 ± 0.007	73.2
7d	0.11122 ± 0.012115	32.53
7e	0.116120 ± 0.01494	29.54

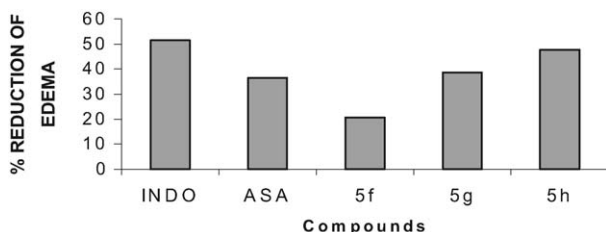


Fig. 1. Comparative analyses of the antiinflammatory activity of compounds **5f–h**, ASA and INDO.

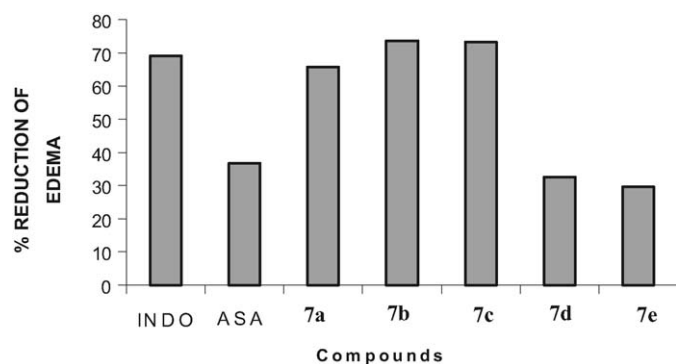


Fig. 2. Comparative analyses of the antiinflammatory activity of compounds **7a–e**, ASA and INDO.

5.2. General method for the preparation of bisnitriles (**3**)

An appropriate aldehyde **1** (24 mmol) and malononitrile **2** (24 mmol) were dissolved in methanol under stirring, and the contents stirred for 4 h at room temperature. The reaction was monitored by thin layer chromatography. Solvent evaporation

left a solid mass, which was chromatographed over a silica gel column. Elution with n-hexane/ethyl acetate (4:1) afforded the desired compounds. The nitriles described in this work are known and their melting points agreed with the literature [18,19].

5.3. General method for the preparation of 4-amino-2,6-diarilpyrimidines-5-cyano (**5a–h**)

Bisnitrile **3** (5.36 mmol) and arylamidine **4** (5.36 mmol) were dissolved in methanol (20 ml) and refluxed for 7 h. The contents were cooled to room temperature and solvent evaporated under reduced pressure to give a solid mass, which was chromatographed over silica gel. The desired compound was eluted using a mixture of n-hexane/ethyl acetate (8:2). The fractions containing **5** were combined, solvent evaporated, and the product crystallized from methanol in every case.

5.3.1. 4-Amino-2-(p-anisyl)-5-cyano-6-(p-nitrophenyl)-pyrimidine (**5a**)

This compound was obtained as colorless crystals in 32% yield, m.p. 238–240 °C; R_f = 0.41 (n-hexane/ethyl acetate, 8:2); IR (KBr, $\gamma_{\max}$ cm^{-1}): 3446 (NH_2), 3356 (NH_2), 2209 (CN), 1648 (C=N); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 300 MHz): δ 8.42 (d, 2H, J = 8.1 Hz, H_2' , H_6'), δ 8.48 (d, 2H, J = 8.7 Hz, H_3'' , H_5''), δ 7.14 (l, 2H, NH_2), δ 8.25 (d, 2H, J = 8.4 Hz, H_2'' , H_6''), δ 7.14 (d, 2H, J = 8.1 Hz, H_3' , H_5'), δ 3.65 (s, 3H, CH_3O), MS: m/z (rel. int.) 347 (M^+ , 100), 214 (35.5). Anal. calculated for $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_2 \cdot 1/4\text{H}_2\text{O}$: C, 61.44%; H, 3.86%; N, 19.90%. Found: C, 61.40%; H, 3.75%; N, 19.96%.

5.3.2. 4-Amino-5-cyano-6-(p-nitrophenyl)-2-(phenyl)-pyrimidine (**5b**)

This compound was obtained as colorless crystals in 33% yield, m.p. 265–266 °C; R_f = 0.45 (n-hexane/ethyl acetate, 8:2); IR (KBr, $\gamma_{\max}$ cm^{-1}): 3421 (NH_2 symm), 3339 (NH_2 asymm), 2218 (CN), 1639 (C=N); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 300 MHz): δ 8.42 (2H, d, J = 8.7 Hz, H_2' and H_6'), δ 8.43 (2H, d, J = 8.7 Hz, H_3'' , H_5''), δ 8.09 (2H, b, NH_2), δ 7.37 (3H), m, H_3' , H_4' and H_5' , δ 8.21 (2H, d, J = 8.7 Hz, H_2'' , H_6''). MS: m/z (rel. int.) 317 (M^+ , 100), 318 (49.66), 214 (25.9), 303 (12.41), 270 (10.44). Anal. calculated for $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_2$: C, 64.35%; H, 3.49%; N, 22.07%. Found: C, 64.24%; H, 3.47%; N, 22.01%.

5.3.3. 4-Amino-2-(p-chlorophenyl)-5-cyano-6-(p-nitrophenyl)-pyrimidine (**5c'**)

This compound was obtained as colorless crystals in a yield of 55%; m.p. 319–320 °C; R_f = 0.17 (n-hexane/ethyl acetate, 8:2); (KBr, $\nu_{\max}$ cm^{-1}): 3469 (NH_2 asymm), 3346 (NH_2 symm), 2220 (CN), 1645 (C=N), $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 300 MHz): δ 8.42 (2H, d, J = 8.7 Hz, H_2' , H_6'), δ 8.39 (2H, d, J = 8.7 Hz, H_3'' , H_5''), δ 8.13 (2H, b, NH_2), δ 8.21 (2H, d, J = 8.7 Hz, H_2'' , H_6''), δ 7.61 (2H, d, J = 8.7 Hz, H_3' , H_5'). Anal. calculated for $\text{C}_{17}\text{H}_{10}\text{N}_5\text{O}_2\text{Cl} \cdot 1/4\text{H}_2\text{O}$: C, 57.31%; H, 2.97%; N, 19.65%. Found: C, 57.54%; H, 2.67%; N, 19.73%.

Table 3

Cytotoxic activity in vitro of 4-amino-2-aryl-5-cyano-6-{3- and 4-(*N*-phthalimidophenyl)} pyrimidines **7a–e**

Concentration ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Growth inhibition (%)			
	NCI-H292			
Compound 7a	1.25	2.50	5.0	10.0
	9.31 $\pm$ 0.023	16.55 $\pm$ 0.011	24.38 $\pm$ 0.042	26.69 $\pm$ 0.020
7b	7.09 $\pm$ 0.006	9.55 $\pm$ 0.032	10.55 $\pm$ 0.016	18.78 $\pm$ 0.029
7c	8.22 $\pm$ 0.016	17.30 $\pm$ 0.034	28.17 $\pm$ 0.035	30.97 $\pm$ 0.036
7d	8.07 $\pm$ 0.016	24.39 $\pm$ 0.034	27.51 $\pm$ 0.035	40.03 $\pm$ 0.036
7e	—	—	—	—

5.3.4. 4-Amino-5-cyano-2-(*p*-fluorophenyl)-6-(*p*-nitrorophenyl)-pyrimidine (**5d'**)

This compound was obtained as colorless crystals in a yield of 44%; m.p. 254–256 °C; R_f = 0.57 (n-hexane/ethyl acetate, 8:2); (KBr, γ_{max} cm^{-1}): 3417 (NH_2 asymm), 3334 (NH_2 symm), 2219 (CN), 1640 (C=N); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 8.42 (4H, d, J = 8.7 Hz, H_2' , H_6' , H_3 , H_5), δ 8.16 (2H, b, NH_2), δ 7.36 (2H, t, H_3' , H_5'), δ 8.21 (2H, d, J = 8.7 Hz, H_2 , H_6). Anal. calculated for $\text{C}_{17}\text{H}_{10}\text{N}_5\text{O}_2\text{F}\cdot 1/4\text{H}_2\text{O}$: C, 60.59%; H, 3.00%; N, 20.88%. Found: C, 60.59%; H, 2.94%; N, 20.45%.

5.3.5. 4-Amino-5-cyano-2-(*p*-chlorophenyl)-6-(*m*-nitrophenyl)-pyrimidine (**5e'**)

This compound was obtained as colorless crystals in a yield of 53%; m.p. 295–296 °C; R_f = 0.29 (n-hexane/ethyl acetate, 8:2); (KBr, γ_{max} cm^{-1}): 3486 (NH_2' asymm), 3331 (NH_2 symm), 2216 (CN), 1630 (C=N); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz), δ 8.38 (2H, d, J = 8.7 Hz, H_2' , H_6'), δ 8.42 (1H, d, J = 8.7 Hz, H_2), δ 8.39 (2H, b, NH_2), δ 7.62 (2H, d, J = 8.4 Hz, H_3' , H_5'), δ 8.76 (1H, t, J = 1.8 Hz, J = 2.1 Hz, H_6), δ 8.47 (1H, t, J = 8.7 Hz, J = 1.8 Hz, H_4), δ 7.9 (1H, t, J = 7.8 Hz, J = 8.1 Hz, H_5). Anal. calculated for $\text{C}_{17}\text{H}_{10}\text{N}_5\text{O}_2\text{Cl}\cdot 1/4\text{H}_2\text{O}$: C, 57.47%; H, 2.97%; N, 19.71%. Found: C, 57.68%; H, 2.76%; N, 19.74%.

5f' and 5g': The melting points and spectroscopic data of these compounds agreed with the reported data in [17].

5.3.6. 4-Amino-2-(*p*-anisyl)-6-(*p*-anisyl)-5-cyano-pyrimidine (**5h'**)

This compound was obtained as colorless crystals in a yield of 84%; m.p. 191–192 °C; R_f = 0.28 (n-hexane/ethyl acetate, 8:2); (KBr, γ_{max} cm^{-1}): 3446 (NH_2 asymm), 3356 (NH_2 symm), 2209 (CN), 1648 (C=N); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ 8.37 (2H, d, J = 5.1 Hz, H_2' , H_6'), δ 8.02 (2H, d, J = 5.4 Hz, H_2 , H_6), δ 7.76 (2H, L, NH_2), δ 7.14 (2H, d, J = 5.4 Hz, H_3' , H_5'), δ 7.09 (2H, d, J = 5.4 Hz, H_3 , H_5), δ 3.86 (6H, s, CH_3O), MS: m/z (rel. int.) 332 (M^+ , 100), 331 (65.2), 199 (24.9). Anal. calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_2\cdot 1/4\text{H}_2\text{O}$ C, 68.66%; H, 4.85%; N, 16.86%. Found: C, 68.99%; H, 4.76%; N, 17.19%.

5.4. General method for the preparation of compounds (**6a–e**)

Nitro pyrimidines (**5a'–e'**) (5.36 mmol) were dissolved in ethyl acetate and 5% Pd on charcoal (20% by weight) was

added to it. The contents were stirred at room temperature for 2 h under hydrogen atmosphere, and filtered to remove the catalyst followed by the solvent removal and crystallization from ethyl acetate.

5.4.1. 4-Amino-6-(*p*-aminophenyl)-2-(*p*-anisyl)-5-cyano-pyrimidine (**6a**)

This compound was obtained as yellow crystals in a yield of 90%; m.p. 177–178 °C; R_f = 0.53 (n-hexane/ethyl acetate, 8:2); (KBr, γ_{max} cm^{-1}): 3442 (NH_2 asymm), 3344 (NH_2 symm), 2203 (CN), 1610 (C=N); $^1\text{H-NMR}$: (DMSO- d_6 , 300 MHz), δ 8.34 (d, 2H, J = 9.0 Hz, H_2' , H_6'), δ 7.85 (d, 2H, J = 9.0 Hz, H_2 , H_6), δ 7.75 (b, 2H, $\text{C}_4\text{-NH}_2$), δ 7.04 (d, 2H, J = 9.0 Hz, H_3' , H_5'), δ 6.68 (d, 2H, J = 8.7 Hz, H_3 , H_5), δ 5.65 (s, 2H, 4''- NH_2), the NH_2 signals disappeared after addition of D_2O ; 3.65 (3H, s, CH_3O); MS: m/z (rel. int.) 347 (M^+ , 100), 348 (24.31), 214 (36.43).

5.4.2. 4-Amino-6-(*p*-aminophenyl)-5-cyano-2-(phenyl)-pyrimidine (**6b**)

This compound was obtained as yellow crystals in a yield of 76%; m.p. 185–186 °C; R_f = 0.27 (n-hexane/ethyl acetate, 8:2); (KBr, ν_{max} cm^{-1}): 3323 (NH_2 asymm), 3212 (NH_2 symm), 2201 (CN), 1611 (C=N); $^1\text{H-NMR}$: (DMSO- d_6 , 300 MHz), δ 8.40 (dd, 2H, J = 8.0 Hz; J = 2.0 Hz, H_2' , H_6'), δ 7.90 (d, 2H, J = 8.7 Hz, H_2 , H_6), δ 7.69 (b, 2H, 4''- NH_2), 7.53 (m, 3H, H_3' , H_4' , H_5'); 6.69 (d, 2H, J = 8.7 Hz, H_3 , H_5); δ 5.89 (s, 2H, $\text{C}_6\text{-NH}_2$), the NH_2 signals disappeared after addition of D_2O ; MS: m/z (rel. int.) 317 (M^+ , 100), 318 (49.66), 214 (25.89).

5.4.3. 4-Amino-6-(*p*-aminophenyl)-5-cyano-2-(*p*-chlorophenyl)-pyrimidine (**6c**)

This compound was obtained as yellow crystals in a yield of 55%; m.p. 240–245 °C; R_f = 0.23 (n-hexane/ethyl acetate, 8:2); (KBr, γ_{max} cm^{-1}): 3464 (NH_2), 3418 (NH_2), 2202 (CN), 1618 (C=N); $^1\text{H-NMR}$: (DMSO- d_6 , 300 MHz), δ 8.46 (d, 2H, J = 9.0 Hz; H_2' , H_6'), δ 7.95 (d, 2H, J = 9.0 Hz, H_2 , H_6), δ 7.81 (b, 2H, $\text{C}_4\text{-NH}_2$), 7.66 (d, 2H, J = 9.0 Hz; H_3' , H_5'); 6.75 (d, 2H, J = 9.0 Hz, H_3 , H_5); δ 5.97 (b, 2H, 4''- NH_2), the NH_2 signals disappeared after the addition of D_2O .

5.4.4. 4-Amino-6-(*p*-aminophenyl)-5-cyano-2-(*p*-fluorophenyl)-pyrimidine (**6d**)

This compound was obtained as yellow crystals in a yield of 69%; m.p. 262–263 °C; R_f = 0.22 (n-hexane/ethyl acetate, 8:2); (KBr, γ_{max} cm^{-1}): 3465 (NH_2), 3412 (NH_2), 2203 (CN), 1605

(C=N); $^1\text{H-NMR}$: (DMSO- d_6 , 300 MHz), δ 8.44 (q, 2H, $J=8.7$ Hz; $J=5.0$ Hz, H_2' , H_6'); 7.90 (d, 2H, $J=8.70$ Hz, H_2 , H_6); 7.65 (b, 2H, $\text{C}_4\text{-NH}_2$); 7.34 (m, 2''H, H_3' , H_5'); 6.69 (d, 2H, $J=9.0$ Hz, H_5 , H_3), 5.85 (s, 2H, 4''- NH_2), the NH_2 signals disappeared after addition of D_2O .

5.4.5. 4-Amino-6-(*m*-aminophenyl)-5-cyano-2-(*p*-chlorophenyl)-pyrimidine (**6e**)

This compound was obtained as yellow crystals in a yield of 55%; m.p. 237–238 °C; $R_f=0.21$ (n-hexane/ethyl acetate, 8:2); (KBr, γ_{max} cm^{-1}): 3423 (NH_2), 3342 (NH_2), 2208 (CN), 1650 (C=O); $^1\text{H-NMR}$: (DMSO- d_6 , 300 MHz), δ 8.38 (d, 2H, $J=9.0$ Hz; H_2' , H_6'), δ 7.13 (2H, m, H_2 , H_5), δ 7.07 (d, 1H, $J=9.0$ Hz, H_6), δ 7.88 (b, 2H, 4''- NH_2), 7.60 (d, 2H, $J=9.0$ Hz, H_3' , H_5'); 6.76 (d, 1H, $J=9.0$ Hz, H_4), δ 5.35 (s, 2H, 4''- NH_2) the NH_2 signals disappeared after addition of D_2O .

5.5. General procedure for the synthesis of compounds (**7a–e**)

Compound **6** was dissolved in nitrobenzene with phthalic anhydride. The contents were refluxed and stirred for 30 min. The solid mass was precipitated using cyclohexane and the desired compound **7** was crystallized from acetic acid.

5.5.1. 4-Amino-2-(*p*-anisyl)-5-cyano-6-{4-(*N*-phthalimidophenyl)}pyrimidine (**7a**)

This compound was obtained in a yield of 67%; m.p. 335–340 °C; $R_f=0.60$ (n-hexane/ethyl acetate 8:2); (KBr, γ_{max} cm^{-1}): 3459 (NH_2 *asym*), 3361 (NH_2 *sym*), 2212 (CN), 1750 (C=N), 1644 (C=O); $^1\text{H-NMR}$: (DMSO- d_6 300 MHz/ δ ppm), δ 8.4 (2H, d, $J=9.0$ Hz, H_2' , H_6'), δ 8.11 (d, 2H, $J=8.4$ Hz, H_3 , H_5), δ 8.02 (m, 2H, H_1 , H_4'), δ 7.9 (b, 2H, NH_2 , after addition of D_2O the signal disappeared), δ 7.94 (m, 2H, H_2 , H_3'), δ 7.68 (d, 2H, $J=8.4$ Hz, H_2 , H_6), δ 7.08 (d, 2H, $J=8.7$ Hz, H_3' , H_5'), δ 3.82 (s, 3H, CH_3O); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6): δ 167.41, 166.86, 164.46, 163.84, 162.23, 136.15, 134.85, 134.10, 131.60, 130.41, 129.20, 128.89, 127.22, 123.59, 116.56, 113.94, 83.75, 55.42; MS: m/z (int. rel.) 317 (M^+ , 100), 403 (44.2), 316 (81.6). Anal. calculated for $\text{C}_{26}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_3 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$: C, 68.41%; H, 3.75%; N, 15.34%. Found: C, 68.62%; H, 3.52%; N, 15.30%.

5.5.2. 4-Amino-5-cyano-2-(phenyl)-6-{4-(*N*-phthalimidophenyl)}pyrimidine (**7b**)

This compound was obtained in a yield of 64%; m.p. 327–328 °C; $R_f=0.29$ (n-hexane/ethyl acetate 8:2); (KBr, γ_{max} cm^{-1}): 3404 (NH_2 *asym*), 3355 (NH_2 *sym*), 2210 (CN), 1718 (C=N), 1609 (C=O), $^1\text{H-NMR}$: (DMSO- d_6 300 MHz/ δ ppm), δ 8.44 (2H, d, $J=7.5$ Hz, H_2' , H_6'), δ 8.13 (d, 2H, $J=8.7$ Hz, H_3 , H_5), δ 8.02 (m, 2H, H_1 , H_4'), δ 7.9 (2H, b, NH_2 , after addition of D_2O the signal disappeared), δ 7.94 (m, 2H, H_2 , H_3'), δ 7.76 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H_2 , H_6), δ 7.55 (d, 3H, $J=7.5$ Hz, H_3' , H_4' , H_5'), $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6): δ 167.50, 166.85, 164.61, 164.10, 136.51, 136.01, 134.85, 134.18, 131.57, 129.88, 129.28, 128.58, 127.21, 123.59, 123.34,

116.45, 84.58; MS: m/z (int. rel.) 417 (M^+ , 100), 418 (18.75), 314 (62.13). Anal. calculated for $\text{C}_{26}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_3 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$: C, 68.41%; H, 3.75%; N, 15.34%. Found: C, 68.62%; H, 3.52%; N, 15.30%.

5.5.3. 4-Amino-5-cyano-2-(4-chlorophenyl)-6-{4-(*N*-phthalimidophenyl)}pyrimidine (**7c**)

This compound was obtained in a yield of 61%; m.p. 312–313 °C; $R_f=0.26$ (n-hexane/ethyl acetate 8:2); (KBr, γ_{max} cm^{-1}): 3471 (NH_2 *asym*), 3445 (NH_2 *sym*), 2250 (CN), 1730 (C=N), 1611 (C=O); $^1\text{H-NMR}$: (DMSO- d_6 300 MHz/ δ ppm), δ 8.43 (d, 2H, $J=9.0$ Hz, H_2' , H_6'), δ 8.12 (d, 2H, $J=8.7$ Hz, H_3 , H_5), δ 8.02 (m, 2H, H_1 , H_4'), δ 7.94 (2H, m, H_2 , H_3'), δ 7.69 (d, 2H, $J=8.1$ Hz, H_2 , H_6), δ 7.61 (d, 2H, $J=8.4$ Hz, H_3' , H_5'); It was not possible to locate the - NH_2 protons $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6): δ 167.59, 166.86, 164.56, 163.08, 136.57, 135.86, 135.38, 134.88, 134.24, 131.59, 130.25, 129.28, 128.75, 127.23, 123.61, 116.32, 84.80. Anal. calculated for $\text{C}_{26}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_3 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$: C, 68.41%; H, 3.75%; N, 15.34%. Found: C, 68.62%; H, 3.52%; N, 15.30%.

5.5.4. 4-Amino-5-cyano-2-(4-fluorophenyl)-6-{4-(*N*-phthalimidophenyl)}pyrimidine (**7d**)

This compound was obtained in a yield of 68%; m.p. 314.5–315 °C; $R_f=0.28$ (n-hexane/ethyl acetate 8:2); (KBr, γ_{max} cm^{-1}): 3466 (NH_2 *asym*), 3317 (NH_2 *sym*), 2187 (CN), 1734 (C=N), 1644 (C=O); $^1\text{H-NMR}$: (DMSO- d_6 300 MHz/ δ ppm), δ 8.48 (d, 2H, $J=9.0$ Hz, H_2' , H_6'), δ 8.13 (d, 2H, $J=7.8$ Hz, H_3 , H_5), δ 8.0 (m, 2H, H_1 , H_4'), δ 7.7 (d, 2H, $J=7.8$ Hz, H_2 , H_6), δ 7.94 (m, 2H, H_2 , H_3'), δ 7.35 (t, 2H, $J=8.1$ Hz, $J=8.4$ Hz, H_3' , H_5'); the - NH_2 protons presumably appeared 7.20 ppm $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6): δ 167.53, 166.85, 164.56, 163.11, 135.92, 135.34, 134.87, 134.21, 133.04, 131.56, 131.09, 129.89, 129.28, 127.21, 123.60, 116.38, 84.51. Anal. calculated for $\text{C}_{25}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{FO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$: C, 66.22%; H, 3.56%; N, 15.45%. Found: C, 66.22%; H, 3.31%; N, 15.21%.

5.5.5. 4-Amino-2-(4-chlorophenyl)-5-cyano-6-{3-(*N*-phthalimidophenyl)}pyrimidine (**7e**)

This compound was obtained in a yield of 50%; m.p. 309–310 °C; $R_f=0.34$ (n-hexane/ethyl acetate 8:2); (KBr, γ_{max} cm^{-1}): 3460 (NH_2 *asym*), 3351 (NH_2 *sym*), 2187 (CN), 1727 (C=N), 1642 (C=O); $^1\text{H-NMR}$: (DMSO- d_6 300 MHz/ δ ppm), δ 8.4 (d, 2H, $J=8.7$ Hz, H_2' , H_6'), δ 8.07 (m, 2H, H_4 , H_6), δ 8.01 (m, 2H, H_1 , H_4'), δ 7.93 (m, 2H, H_2 , H_3'), δ 7.74 (d, 1H, $J=8.4$ Hz, H_2), δ 7.72 (bs, 1H, H_5), δ 7.59 (2H, $J=8.4$ Hz, H_3' , H_5'); The - NH_2 protons could not be located $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6): δ 173.06, 167.36, 167.10, 164.71, 163.24, 137.27, 136.74, 135.40, 134.99, 132.46, 131.67, 130.35, 130.04, 129.25, 128.81, 128.33, 127.69, 123.69, 116.21. Anal. calculated for $\text{C}_{25}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{ClO}_2 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$: C, 65.15%; H, 3.28%; N, 15.26%. Found: C, 64.86%; H, 3.33%; N, 15.61%.

5.6. The antiinflammatory activity of the compounds 5 and 7

The antiinflammatory activity was evaluated by the model of carrageenan-induced mouse paw edema following the literature method [20], which was described earlier by Levy [21]. The inflammation was induced by injecting a 1% solution of carrageenan lambda (sigma) dissolved in a 0.5% saline solution containing 2.5% of Tween 80, in the right hind paw of a group of 10 animals (body weight $\approx$ 19–21 g of each animal). After 30 min the compounds were administered to a group of 10 mice intraperitoneally having a dose of 250 mg kg⁻¹. The antiinflammatory drug used as standard was ASA at the dose of 250 mg kg⁻¹. Even with the discovery of many new medicines, aspirin is still the analgesic–antipyretic and antiinflammatory agent more prescribed in the medicine and is standard to the evaluation of new drugs in pharmacological assays [22].

The cytotoxicity assays were performed using the methodology described by Mosman [23] to evaluate the cell proliferation. The drugs were dissolved in DMSO having four concentrations of 10, 5, 2.5 and 1.25 μ l. A suspension at the concentration of 5×10^4 cells ml⁻¹ were prepared and distributed in culture cell plates and incubated at 37 °C over a damp atmosphere. After 24 h the test drugs were added. DMSO was used as control and the test were made in quadruplicate. The cells were incubated for additional 72 h. After this time, a solution of 25 μ l of MTT at a concentration of 5 mg ml⁻¹ [24] was added. The plates were incubated at 37 °C for more than 2 h and the reading were made by an ELISA reader model ELX 800 at 540 nm.

6. Conclusion

We have achieved an efficient and simple synthesis of **5a–h**. The transformation of these to **6a–e** followed by the preparation of phthalimidoyl pyrimidines **7a–e** has also been accomplished. The discovery that these final phthalimidopyrimidines are antiinflammatory without any toxic effects is exciting. This finding is quite satisfactory. Hence, this study has widened the scope for evolving the new and promising antiinflammatory drugs.

Acknowledgments

One of us (E.P.d.S.F.) is thankful to the Ministry of Education (CAPES) for a Research Fellowship from 1999 to 2002. Our thanks are also due to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial help.

References

- [1] B.A. Chabner, W. Wilson, J. Supko, Pharmacology and Toxicity of Anti-neoplastic Drugs, in: E. Beutler, M.A. Lichtman, B.S. Coller, T.J. Kipps, U. Seligsohn (Eds.), Williams Hematology, sixth ed, McGraw-Hill, New York, 2001, pp. 185–200.
- [2] J.G. Hardman, L.E. Limbird, P.B. Molinoff, R.W. Ruddon, A. Goodman Gilman, in: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Tenth International Edition, McGraw-Hill, New York, 2001, pp. 1404–1417.
- [3] D.J. Brown, Pyrimidines and their Benzo Derivatives, in: A.R. Katritzky, C.W. Rees (Eds.), Comprehensive Heterocyclic Chemistry, The Structure, Reactions, Synthesis and Uses of Heterocyclic Compounds, Pergamon Press, Oxford, 1984, pp. 57–155 (3).
- [4] M.N. Nasr, M.M. Gineinah, Arch. Pharm. 335 (2002) 289–295 (Weinheim).
- [5] J.M. Bartolome-Nebreda, M.T. Garcia-Lopez, R. Gonzalez-Muniz, J. Med. Chem. 24 (2001) 4196–4206.
- [6] A. Santagati, G. Granata, M. Santagati, V. Cutuli, M.G. Mangano, A. Caruso, Arznei-Forsch 52 (6) (2002) 448–454.
- [7] C.P. Unangst, D.T. Connor, C.R. Kostlan, G.P. Shrum, J. Heterocycl. Chem. 32 (1995) 1197.
- [8] S.J. Melo, L.C. Santos, E.P.S. Falcão, R.M. Srivastava, C. Luu-Duc, J. Chem. Res. (2002) 216–217 (S).
- [9] F.J.B. Mendonca Jr., J.V. Anjos, E.P.S. Falcão, A.P. Yamamoto, S.J. Melo, R.M. Srivastava, 11(2005) 479–484.
- [10] M. Meyring, J. Muhlbacher, K. Messer, N. Kastner-Pustet, G. Bringmann, A. Mannschreck, G. Blaschke, Anal. Chem. 74 (2002) 3726–3735.
- [11] S. Singhal, I. Mehta, R. Desikan, D. Ayers, P. Roberson, P. Eddleston, N. Munshi, E. Anaisse, C. Wilson, M. Dhodapkar, J. Zeddis, B. Barlogie, N. Engl. J. Med. 341 (1999) 1565–1571.
- [12] G. Juliusson, F. Celsing, I. Turesson, S. Lenhoff, M. Adriansson, C. Malm, Br. J. Haematol. 109 (2000) 89–96.
- [13] Y.Z. Patt, M.M. Hassan, R.D. Lozano, L.M. Ellis, J.A. Peterson, K. A. Waugh, M. J. Clin. Oncol. 23 (2000) 319–321.
- [14] A. Zomas, N. Anagostopoulos, M.A. Dimopoulos, Bone Marrow Transplant. 25 (2000) 1319–1320.
- [15] A.L. Moreira, L.G. Corral, W. Ye, B. Jonhson, D. Stirling, G.W. Muller, V.H. Freedman, G. Kaplan, AIDS Res. Hum. Retroviruses 13 (1997) 857863.
- [16] A.R.K. Murthy, O.T. Wong, D.J. Reynolds, J.R. Hall, Pharmacol. Res. 4 (1987) 21.
- [17] S.M. Hussain, A.M. El-Reedy, S.A. El-Sharabasy, Tetrahedron 44 (1988) 241–246.
- [18] C.I.B.A. Ltda, Fr. 1,517 (cl. A 01n), 19 Feb 1970, Swiss Appl. 21 Mar (1966) 8.
- [19] S. Patai, J. Israeli, J. Chem. Soc. (1960) 2020–2024.
- [20] D. Hadjipavlou-Litina, A. Geronikaki, R. Mgonzo, I. Doytchinova, Drug Dev. Res. 48 (1999) 53–60.
- [21] L. Levy, Life Sci. Part. 1. 11 (1969) 601–606.
- [22] L.S. Goodman, A. Gilman, in: The Pharmacological Basis of Therapeutics, ninth ed, 1996, pp. 450–479.
- [23] T. Mosman, J. Immunol. Methods 65 (1983) 55–63.
- [24] S.C. Nascimento, Recherche de l'activité antitumorale de produits de synthèse ou d'origine naturelle, (1993). Grenoble Thèse (doctorat), Université Joseph Fourier, U.F.R. de Pharmacie.

Biochemical markers in taxonomy of the genus *Cunninghamella*

Ricardo Kenji Shiosaki^{1,4,5}, Kaoru Okada^{1,2}, Norma Buarque de Gusmão⁵, Pragati Nigam¹, Peter S. Falcão⁶, Nicácio Henrique da Silva⁶, Kazutaka Fukushima⁷, Makoto Miyaji⁷ & Galba Maria de Campos-Takaki^{1,3,4}

¹Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, ²Departamento de Biologia, ³Departamento de Química, Universidade Católica de Pernambuco, ⁴Departamento de Micologia, ⁵Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, ⁶Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil, ⁷Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses, Chiba University, Chiba, Japan

Summary

The chemical composition of fatty acids and ubiquinones was studied in 18 strains of *Cunninghamella*, to establish quantitative and qualitative differences within the genus. Fatty acids analysis has shown the presence of four groups. Ubiquinone analysis, through high performance liquid chromatography (HPLC), demonstrated the existence of three different groups based on the ubiquinone type. The average percentage of fatty acids of the species *Cunninghamella elegans* and *Cunninghamella bertholletiae*, show variations in linolenic and stearic acids, suggesting the possibility of differentiation between the two species.

Key words

Chemotaxonomy, Ubiquinone system, Fatty acids, *Cunninghamella*

Marcadores bioquímicos en la taxonomía del género *Cunninghamella*

Resumen

Se estudió la composición química de los ácidos grasos y ubiquinonas en 18 cepas de *Cunninghamella* para conocer y establecer diferencias cuantitativas y cualitativas dentro del género. El análisis de ácidos grasos mostró la presencia de cuatro grupos. El análisis de ubiquinonas, por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), demostró la formación de tres grupos diferentes según el tipo de ubiquinona. El porcentaje medio de ácidos grasos entre las especies *Cunninghamella elegans* y *Cunninghamella bertholletiae* mostró una variación en los ácidos linolénico y esteárico, sugiriendo la posibilidad de diferenciación entre las dos especies.

Palabras clave

Quimiotaxonomía, Ubiquinonas, Ácidos grasos, *Cunninghamella*

The genus *Cunninghamella* contains species of importance in medical mycology and in biotechnological processes. Within medical mycology over seventy cases of infections caused by *Cunninghamella bertholletiae* STADEL 1911, have already been reported, including cases of sinusitis [1], endobronchial zygomycosis [2] and pulmonary infection in cancer patients and in patients with diabetes mellitus [3]. In the biotechnological field, *Cunninghamella* species such as *Cunninghamella bainieri* NAUMOV 1939 have the capacity to metabolize xenobio-

tics, including aromatic compounds and pharmacological drugs [4-6]. *Cunninghamella elegans* has the ability to oxidise polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum compounds and to degrade fluorantene, and the most common polycyclic aromatic hydrocarbon in the environment [7-9], such as the nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons, considered as mutagenic and carcinogenic agents [10].

The taxonomy of *Cunninghamella* is based only upon morphologic and physiological aspects; however *C. elegans* and *C. bertholletiae*, show similar reproductive structures, making their identification difficult [11]. So, other parameters can serve as aids to morphological taxonomy, such as the use of biochemical markers, in the identification of microorganisms. This methodology has contributed substantially to the resolution of several problems related to aspects of classification and phylogenetics [12,13].

Because of the need for a broader knowledge of the biology of the species of the genus *Cunninghamella*, studies were made with the objective of determining the chemical composition of the ubiquinone system and fatty acids of 18 strains. In addition, the value of these parameters as additional tools for the morphologic taxonomy of the species studied, was assessed, with the purpose of establishing the inter and intra-specific relationships especially between the species of *C. elegans* and *C. bertholletiae*.

Dirección para correspondencia:

Dra. Galba Maria Campos Takaki
Universidade Católica de Pernambuco,
Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais
Rua Nunes Machado, 42, Bloco J. Boa Vista
Recife, Pernambuco - BRASIL
CEP 50.050-590
Tel.: + 55 81 216 4017; Fax: + 55 81 216 4043
E-mail: takaki@unicap.br

Aceptado para publicación el 9 de Julio de 2001

©2001 Revista Iberoamericana de Micología
Apdo. 699, E-48080 Bilbao (Spain)
1130-1406/01/10.00 Euros

MATERIALS AND METHODS

The eight strains of the *Cunninghamella* genus used were from the collection of the Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses, Chiba University, Japan (IFM), five isolated samples from Amazônia legal (LIKA) and five strains from UFPE (URM) collection. The strains studied are listed in table 1.

Table 1. Strains used in this investigation.

Species	Strains No
<i>Cunninghamella elegans</i>	IFM 40505 IFM 46109 IFM 47050 LIKA 0017 LIKA 0014 LIKA 0015 LIKA 0016 IFM 47591 URM 2084 URM 3172
<i>Cunninghamella bertholletiae</i>	IFM 46110 IFM 46111 IFM 46114 IFM 46987 LIKA 0013
<i>Cunninghamella blakesleeana</i>	URM 168
<i>Cunninghamella echinulata</i>	URM 2136
<i>Cunninghamella ramosa</i>	URM 1918

Cultural conditions. The culture medium used for maintenance and for obtaining the mycelial mass was the YMB: malt extract (3 g), yeast extract (3 g), peptone, D-glucose, adding distilled water until the final volume was 1.000 ml and pH 5.8, as a solid medium 20 g of agar was added, being denominated YMA.

Extraction and preparation of ubiquinone. The ubiquinone was extracted from saponified cells with hexane, and purified by preparative thin-layer chromatography on a silica-gel plate with pure benzene as solvent [14].

Identification of ubiquinones. The purified ubiquinones were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) and identified by comparison of retention times of the samples with the following standard of ubiquinones: Q6 Coenzyme, Q7 Coenzyme, Q9 Coenzyme, Q10 Coenzyme (obtained from Sigma Chemical Company - USA). The analysis was made using a Cosmosil column 5C18-P (4,6x250mm), on the following conditions: eluent: methanol-isopropanol (2:1, v/v), flow rate: 1.0 ml/min, UV detector: 270nm.

Extraction and methylation of fatty acids. The fatty acids were converted to methyl ester according to Dunlap and Perry's method (1967), described by Durham and Kloos [15].

Gas chromatography The analyses were carried out in a gas chromatograph equipped with capillary column HR-SS-10 (0.125X50M), using helium as carrier gas. The injector and detector (FID) temperature was 250 °C, oven temperature at 130 °C, starting and increasing to 170 °C in 1 °C/min, to 180 °C in 3 °C/min, kept isothermally for 10 min. The fatty acids were identified through the comparison of the retention time of the peaks of the samples with the standard. Relative amounts of methyl esters CFA were calculated through the integration of the areas of the peaks. The standard fatty acids were: myristic acid (C14:0), palmitic acid (C16:0), stearic acid

(C18:0), oleic acid (C18:1), linolenic acid (C18:3) and γ -linolenic acid (C18:3) (obtained from Sigma Chemical Company - USA).

RESULTS

Ubiquinone system analysis. The *Cunninghamella* genus was divided in three groups based on the ubiquinone system. The results are shown in table 2.

It was observed in this study that the isolates of *Cunninghamella* contained Q6 ubiquinone, Q9 ubiquinone and Q10 ubiquinone.

Within the group of isolates studied three groups were recognized based on the ubiquinone type. Group I was distinguished by having Q6 ubiquinone as the main compound, and group II by Q9 ubiquinone. Both of them subdivided in A, with the presence of Q10 ubiquinone and subgroup B differing by the absence of Q10 ubiquinone and group III constituted by a higher percentage of Q9 ubiquinone.

C. bertholletiae (IFM46987, IFM46110 and IFM46111) and *C. elegans* (IFM40505, IFM47050, IFM46109 and IFM47591) species were united into group IA. *Cunninghamella ramosa* (URM1918) and *C. bertholletiae* (IFM46114 and L13) were united into group IB. The *C. bertholletiae* species was characterized into this group as all the strains present the Q6 ubiquinone as the main compound. Group IIA contained only the *C. elegans* isolate URM3172. Group IIB included the *C. elegans* isolates L14, L15, L16, L17 and URM2084 and *Cunninghamella blakesleeana* URM168.

The species *Cunninghamella echinulata* (URM2136) was characterized by its higher Q9 ubiquinone percentage (91,91%) amongst all of the strains studied and constituted group III.

Fatty acids chemical composition analysis. Five fatty acids were found in all of the strains of the studied genus (Table 3). Oleic acid (C18:1) was the main compound, followed by palmitic (C16:0), linolenic (C18:3), γ -linolenic (C18:3), stearic (C18:0), and myristic acids (C14:0). Myristic acid (C14:0) was found in low percentages in all of isolates, except for strain URM 168 of *C. blakesleeana*.

The composition of the fatty acids shows the existence of four groups: Group I has higher concentrations of palmitic, oleic and γ -linolenic acids; group II higher concentrations of palmitic and oleic acids; group III higher concentrations of palmitic, oleic and linolenic acids and group IV only higher concentrations of oleic acid, as shown in table 3.

Three strains of the species *C. elegans* are included within group I (L15, L17 and IFM47591).

Group II was subdivided into: IIA with high levels of linolenic acid and low levels of myristic acid. The species *C. bertholletiae* (L13) and *C. elegans* (L14, L16) are included. IIB has high levels of stearic acid and low levels of linolenic acid. Three representatives of *C. elegans* are included, IIC has high levels of linolenic acid and low levels of stearic acid, and includes *C. bertholletiae* (IFM46114, IFM46111 and IFM46987) and *C. elegans* (40505), and subgroup IID has high levels of γ -linolenic and low levels of stearic acid, and includes *C. blakesleeana* (URM168) and *C. ramosa* (URM1918).

Group III consisted solely of *C. bertholletiae* (IFM46110) isolates but group IV contained *C. echinulata* (URM2136) and *C. elegans* (URM2084).

The *C. bertholletiae* (IFM46987, IFM46110 and IFM46111) isolates could not be separated from *C. elegans* (IFM40505, IFM47050, IFM46109 and IFM47591)

Table 2. Distribution of the groups formed using ubiquinone system as chemotaxonomic marker in *Cunninghamella* strains.

Group I CoQ 6 main		Group II CoQ 9 main		Group III Major percentage
A Presence / CoQ 10	B Absence / CoQ 10	A Presence / CoQ 10	B Absence / CoQ 10	CoQ 9
<i>C. bertholletiae</i> IFM46987	<i>C. ramosa</i> URM1918	<i>C. elegans</i> URM3172	<i>C. elegans</i> L14	<i>C. echinulata</i> URM2136
<i>C. bertholletiae</i> IFM46110	<i>C. bertholletiae</i> IFM46114		<i>C. elegans</i> L15	
<i>C. bertholletiae</i> IFM46111	<i>C. bertholletiae</i> L13		<i>C. elegans</i> L16	
<i>C. elegans</i> IFM40505			<i>C. elegans</i> L17	
<i>C. elegans</i> IFM47050			<i>C. elegans</i> URM2084	
<i>C. elegans</i> IFM46109			<i>C. blakesleeana</i> URM168	
<i>C. elegans</i> IFM47591				

Table 3. Distribution of fatty acids in groups.

Group I C16:0, C18:1, C18:3	Group II C16:0 and C18:1	Group III C16:0, 18:1, C18:3	Group IV C18:1
<i>C. elegans</i> (L17) <i>C. elegans</i> (L15) <i>C. elegans</i> (IFM47591)	IIA C14:0 (low percentage) + C18:3 (high percentage) <i>C. elegans</i> (L14) <i>C. bertholletiae</i> (L13) <i>C. elegans</i> (L16) IIB C18:0 (high percentage) + C18:3 (low percentage) <i>C. elegans</i> (URM3172) <i>C. elegans</i> (IFM47050) <i>C. elegans</i> (IFM46109) IIC C18:0 (low percentage) + C18:3 (high percentage) <i>C. elegans</i> (IFM40505) <i>C. bertholletiae</i> (IFM46114) <i>C. bertholletiae</i> (IFM46987) <i>C. bertholletiae</i> (IFM46111) IID C18:3 g (high percentage) + C18:0 (low percentage) <i>C. blakesleeana</i> (URM168) <i>C. ramosa</i> (URM1918)	<i>C. bertholletiae</i> (IFM46110)	<i>C. echinulata</i> (URM168) <i>C. elegans</i> (URM2084)

Table 4. Fatty acids chemical composition average percentage in *C. elegans* and *C. bertholletiae*.

Species	Average percentage (average $\pm$ error standard)					
	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:3	C18:3 (γ)
<i>C. elegans</i>	1.37 $\pm$ 0.11	23.39 $\pm$ 0.84	11.98 $\pm$ 1.63	36.63 $\pm$ 1.44	13.17 $\pm$ 1.55	13.56 $\pm$ 1.94
<i>C. bertholletiae</i>	1.63 $\pm$ 0.24	24.89 $\pm$ 0.88	8.21 $\pm$ 0.74	36.47 $\pm$ 1.42	18.56 $\pm$ 1.05	10.24 $\pm$ 1.21

as both species are included in ubiquinones Group IA. The same was true for fatty acids, where *C. elegans* belongs to group IIC as well as *C. bertholletiae* (IFM46987 and IFM46111). Although *C. ramosa* (URM1918) and *C. bertholletiae* (IFM46114 and L13) belong to the same ubiquinone group (IB) they can be separated through the fatty acids Group IID. *C. elegans* (URM3172) differed from other strains in being confined to ubiquinone Group IIA. The species in ubiquinone group IIB (*C. blakesleeana* URM168 and *C. elegans* L14, L15, L16, L17 and URM2084), could be separated according to fatty acids group IID. The species *C. echinulata* (URM2136) was separately characterized in ubiquinone group III since it shows the highest percentage of Q9 ubiquinone, in the same way as it has been found in fatty acids of group IV. The average percentage between the isolates of *C. elegans* and *C. bertholletiae* species are shown in table 4.

Through *C. elegans* and *C. bertholletiae* fatty acids chemical composition average percentage, differences in stearic and linolenic acids values have been observed, showing the possibility of its use as an additional parameter to morphophysiological taxonomy in the separation process between the two species; however the *C. elegans* IFM40505 and *C. bertholletiae* IFM46987 species, have shown near values in its chemical composition, suggesting a more detailed analysis of those two species through molecular biology techniques.

DISCUSSION

The ubiquinone system found in this study has already been studied in other fungi [16-19]. Billon-Grand [20,21] discussed the importance of the smaller compounds of ubiquinone on yeast taxonomy and suggested a standard on analysis conditions for an easier reproduction.

Okada *et al.* [22] also found through the smaller compounds, an additional parameter to characterize *Malbranchea* and *Coccidioides*. The smaller ubiquinone peaks within the strains studied were also found in *Cunninghamella*. In higher fungi, Basidiomycetes, Ascomycetes and Deuteromycetes, most of the fungi have shown a system consisting of Q9 or Q10 ubiquinone [18]. Q6 and Q9 ubiquinone were found as the main peaks in species of *Cunninghamella*.

Many authors describe the usage of ubiquinone systems in a generic and intrageneric level in fungi [18,23]. However, Shubert and Kreisel [24], Kuraishi *et al.* [25] and Yagushi *et al.* [26] also obtained satisfactory results at the infrageneric level. The results obtained in the present study allowed the characterization of *C. bertholletiae* species, as it shows Q6 ubiquinone as the main compound. It could not nevertheless suggest a differentiation between *C. elegans* and *C. bertholletiae*.

No fatty acid that has not already been previously found in other Zygomycetes fungi lipids was detected in this study [27-29]. The fatty acids C16:0, C18:0 and C18:1 are universally found in fungi, and were also found in *Cunninghamella*.

Shaw suggested that the γ -linolenic acid is a characteristic of the Zygomycetes. This fatty acid was also found in all of the species studied, in agreement with the other authors [30,31].

Welch [32] comments on the scant diversity of fatty acids in filamentous fungi compared to other microorganisms. In this study, the strains differed only in relative concentration of each fatty acid. Qualitative variations were found only for *C. blakesleeana* URM168. The higher percentages of fatty acids found within *Cunninghamella* strains were of oleic and palmitic acids.

Fatty acid studies in *Mucor* and *Endogone pisiformis* species also showed higher percentages of oleic acid, followed by palmitic acid [33,34]. Martinez [35] reported fatty acid composition of *Ganoderma* (Basidiomycetes) species collected in different countries [35]. The results obtained in the present study with *Cunninghamella* showed similarities in fatty acids chemical compositions of strains collected in different countries, the results being comparable to those obtained by Martinez [35].

The results of the fatty acid composition in *C. elegans* were also in accordance with those of Stahl and Klug [31], who analyzed the chemical composition of the *C. elegans* and five representatives of Zygomycetes. The proportions between the fatty acids were the same as those obtained for the *C. elegans* strains included in this study.

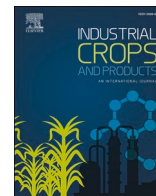
The use of fatty acids as an additional tool in yeast and bacteria taxonomy has been described, but this approach could not be used in some cases [36,32], for example, for strains of *Microsporum* and *Trichophyton* [37]. However, in some cases, the use of both chemical parameters (ubiquinone system and fatty acid) is required for the analysis. The study of ubiquinone chemical composition and fatty acids has already been described by other authors [12]. The fatty acids chemical composition associated with the ubiquinone system and morphophysiological characteristics allow the characterization of the *C. blakesleeana*, *C. ramosa*, *C. echinulata*, *C. bertholletiae* and *C. elegans* species. The results obtained in this study confirm the need for the union of both of those chemical parameters.

The authors are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, PRONEX, AVINA Group.

References

- Ng TTC, Campbell CK, Rothera M, Houghton JB, Hughes D, Denning DW. Successful treatment of sinusitis caused by *Cunninghamella bertholletiae*. Clin Infect Dis 1994; 19:313-316.
- Dermoumi H. A rare zygomycosis due to *Cunninghamella bertholletiae*. Mycoses 1993; 36: 9-10.
- Kontoyannis DP, Vartivarian S, Anaissie EJ, Samonis G, Bodey GP, Rinaldi M. Infections due to *Cunninghamella bertholletiae* in patients with cancer: Report of three cases and review. Clin Infect Dis 1994; 18:925-928.
- Ferris JP, Fasco MJ, Stylianopoulou FL, Jerina DM, Daly JW, Jeffrey AM. Monooxygenase activity in *Cunninghamella bainieri*. Evidence for a fungal system similar to liver microsomes. Arch Biochem Biophys 1973; 156: 97-103.
- Ferris JP, MacDonald LH, Patrie MA, Martin MA. Aryl Hydrocarbon Hydroxylase Activity in the fungus *Cunninghamella bainieri*. Evidence for the presence of cytochrome P-450. Arch Biochem Biophys 1976; 175:443-452.
- Zhang D, Yang Y, Leakey JE, Cerniglia CE. Phase I and phase II enzymes produced by *Cunninghamella elegans* for the metabolism of xenobiotics. FEMS Microbiol Lett 1996; 138: 221-226.
- Cerniglia CE, Gibson DT. Metabolism of naphthalene by *Cunninghamella elegans*. Appl Environ Microbiol 1977; 34: 363-370.
- Cerniglia CE, Gibson DT. Metabolism of naphthalene by cell extracts of *Cunninghamella elegans*. Arch Biochem Biophys 1978; 186: 121-127.
- Jones KC, Stratford JA, Waterhouse KS, Vogt NB. Organic contaminants in Welsh soils: Polynuclear aromatics hydrocarbons. Environ Sci Technol 1989; 23: 540-550.
- Pothuluri JV, Evans FE, Heinze TM, Fu PP, Cerniglia CE. Fungal metabolism of 2-nitrofluorene. J Toxicol Environ Health 1996; 47:587-599.
- Weitzman I. The case for *Cunninghamella elegans*, *C. bertholletiae* and *C. echinulata* as separate species. Trans Br Mycol Soc 1984; 83:527-529.
- Gusmão NB. Estudo com marcadores bioquímicos (Coenzima Q and ácidos graxos) na taxonomia de leveduras do gênero *Candida* (Robin) Berkhout. Recife, 1990. 120p.
- Muller MM, Kantola R, Kitunen V. Combining sterol and fatty acid profiles for the characterization of fungi. Mycol Res 1994; 98:593-603.
- Yamada Y, Kondo K. Coenzyme Q System in the classification of the yeast-like genera *Sporobolomyces* and *Rhodospirillum*. J Gen Appl Microbiol 1973; 19: 59-77.
- Durham DR, Kloos WE. Comparative study of the total cellular fatty acid of *Staphylococcus* species of human origin. Int J Syst Bacteriol 1978; 28:223-228.
- Yamada Y, Nojiri M, Matsuyama M, Kondo K. Coenzyme Q system in the ascosporogenous yeast genera *Debaryomyces*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, and *Endomycopsis*. J Gen Appl Microbiol 1976; 22:325-337.
- Yamada Y, Arimoto M, Kondo K. The coenzyme Q system in the classification of some ascosporogenous yeast genera in the families Saccharomycetaceae and Sporophthoraceae. Antonie van Leeuwenhoek 1977; 43:63-71.
- Kuraishi H, Katayama-Fujimura, Sugiyama J, Yokoyama T. Ubiquinone systems in fungi. I. Distribution of ubiquinones in the major families of Ascomycetes, Basidiomycetes and Deuteromycetes, and their taxonomic implications. Trans Mycol Soc Japan 1985; 26: 383-395.
- Fukushima K, Takeo K, Takizawa K, Nishimura K, Miyaji M. Reevaluation of the teleomorph of the genus *Histoplasma* by ubiquinone systems. Mycopathologia 1991; 116:151-154.
- Billon-Grand G. Minor ubiquinones of the yeast coenzyme Q system: Importance in the taxonomy of the yeasts. J Gen Appl Microbiol 1987; 33: 381-390.
- Billon-Grand G. Influence on minor peaks of coenzymes Q of the glucose concentration in the culture medium, the stage of the growth cycle, and the duration of the coenzyme Q extraction: required conditions for determining the minor coenzymes Q. J Gen Appl Microbiol 1989; 35:216-268.

22. Okada K, Takizawa K, Maebayashi YL, et al. Ubiquinone systems of the genus *Cladosporium* and morphologically similar taxa. FEMS Immunol Med Microbiol 1996; 16:39-43.
23. Takizawa K, Okada K, Maebayashi Y, Nishimura K, Miyaji M, Fukushima K. Ubiquinone system of the form-genus *Chrysosporium*. Mycoscience 1994; 35: 327-330.
24. Schubert M, Kreisel H. Ubiquinones in selected species of *Penicillium* and related teleomorph genera. Persoonia 1991; 14: 341-346.
25. Kuraishi H, Aoki M, Itoh M, Katayama Y. Distribution of ubiquinones in *Penicillium* and related genera. Mycol Res 1991; 95: 705-711.
26. Yaguchi T, Someya A, Udagawa S. A reappraisal of intrageneric classification of *Talaromyces* based on the Ubiquinone systems. Mycoscience 1996; 37: 55-60.
27. Shaw R. The fatty acid of phycornycetes fungi acid the significance of the g-linolenic acid component Comp. Biochem Physiol 1966; 19: 325-331.
28. Wassef MK. Fungal lipids. Advances in lipid research. Paoletti R, Kritchevsky D (Eds.). Academic Press 1977; 15: 159-223.
29. Weete JD. Lipid biochemistry of fungi and other organisms. New York, Plenum Press, 1980.
30. Campos-Takaki GM. Aspectos bioquímicos e ultraestruturais das paredes celulares de fungos da ordem Mucorales (*Zygomycetes*). São Paulo, 1984.
31. Stahl PD, Klug M. Characterization and differentiation of filamentous fungi based on fatty acid composition. Appl Environ Microbiol 1996; 4136-4146.
32. Welch DF. Applications of cellular fatty acid analysis. Clin Microbiol Rev 1991; 4: 422-438.
33. Hammonds P, Smith SN. Lipid composition of a psychrophilic, a mesophilic and a thermophilic *Mucor* species. Trans Br Mycol Soc 1986; 86: 551-560.
34. Jabaji-Hare S. Lipid and fatty acid profiles of some vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi: contribution to taxonomy. Mycologia 1988: 54-62.
35. Martinez AT, Barrasa JM, Prieto A, Blanco MN. Fatty acid composition and taxonomic status of *Ganoderma australe* from Southern Chile. Mycol Res 1991; 95: 782-784.
36. Boekhout T, Golubev WJ. Classification of heterobasidiomycetous yeast: characteristics and affiliation of genera to higher taxa of heterobasidiomycetes. Can J Microbiol 1993; 39: 276-290.
37. Jones MG, Noble WC. A study of fatty acids as a tool for dermatophyte fungi. J Appl Bacteriol 1981; 50: 577-583.



Larvicidal activity and docking study of *Ramalina complanata* and *Cladonia verticillaris* extracts and secondary metabolites against *Aedes aegypti*

André Severino da Silva^{a,b,c}, Júlio César Ribeiro de Oliveira Farias de Aguiar^c,
Jéssica da Silva Nascimento^a, Erick Caíque Santos Costa^b, Fábio Henrique Galdino dos Santos^a,
Hallysson Douglas Andrade de Araújo^d, Nicácio Henrique da Silva^e, Eugênia Cristina Pereira^f,
Mônica Cristina Martins^g, Emerson Peter Silva Falcão^b, Luciana Scotti^c, Marcus Tullius Scotti^c,
Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro^{c,*}

^a Graduate Program in Biotechnology (Renorbio), Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brazil

^b Molecular Synthesis and Isolation Lab, Vitória Academic Center (CAV), Federal Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brazil

^c Chemoinformatics Laboratory - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil

^d Department of Fundamental Chemistry, Center for Exact and Natural Sciences, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

^e Biochemistry Department, Center for Biosciences, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

^f Department of Geography, Center of Philosophy and Human Sciences, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil

^g Postdoctoral researcher, Department of Geography, Center of Philosophy and Human Sciences, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Ramalina complanata
Cladonia verticillaris
Divaricatic acid
Fumarprotocetraric acid
Larvicidal
Docking

ABSTRACT

The *Aedes aegypti* mosquito is the main vector of the arboviruses that cause Zika, Yellow Fever, Dengue, and Chikungunya, incapacitating diseases that may even be fatal. There are still no vaccines for any of these viruses. Therefore, the only way to contain outbreaks is to control the vector that transmits them. In the present study, we investigated the larvicidal activity of lichen extracts (*Ramalina complanata* (Sw.) Ach., 1810 and *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr.), isolating components that were used against larvae of the mosquito *A. aegypti*. The ether extract from *R. complanata* exhibited an $LC_{50} = 5.9 \mu\text{g.ml}^{-1}$, while a compound isolated from this species, divaricatic acid, had an $LC_{50} = 27.1 \mu\text{g.ml}^{-1}$. The acetone extract of *C. verticillaris* exhibited an $LC_{50} = 17.4 \mu\text{g.ml}^{-1}$ and the isolated compound fumarprotocetraric acid (FUM) had an $LC_{50} = 13.6 \mu\text{g.ml}^{-1}$. These results demonstrate that extracts and isolated compounds from the two lichen species have strong larvicidal activities. FUM is the most active compound in our investigation. The molecular docking studies of divaricatic acid and FUM demonstrated that they bind to the active site of AaAChE1 in an energetically favorable manner. The TRP286 residue may have contributed to the more pronounced activity of fumarprotocetraric acid compared to divaricatic acid. Other aspects related to the more pronounced activity of fumarprotocetraric acid are its molecular weight and higher solubility. Our results provide evidence of the importance of studying lichen secondary metabolites as natural sources of insecticides and investigating possible interactions with AaAChE1.

1. Introduction

The mosquito *Aedes aegypti* is a vector of the viruses that cause Zika, dengue, chikungunya and yellow fever, which affect thousands of people in tropical and subtropical regions throughout the world (Musso et al., 2015; World Health Organization, 2016). In Brazil, the number of cases of dengue increased by 48.1% in 2022 compared to 2021 (Brazilian Health Ministry, 2022). The most common way to prevent these diseases is to combat the transmitting mosquito by interrupting its life

cycle with egg traps, larvicides and insecticides (Consoli and Oliveira, 1994). Larvicides are effective for combating larvae, which is one of the aquatic forms in the life cycle of the mosquito. However, synthetic larvicides have led to the development of resistant mosquito populations (Diniz et al., 2014). It is important to emphasize that the use of synthetic larvicides can also affect the environment and human health (Vieira Santos et al., 2017; Aiub et al., 2002).

One alternative is the use of natural larvicides derived from secondary metabolites from plants, which have been widely investigated as

* Corresponding author.

E-mail address: daniela.navarro@ufpe.br (D.M. do Amaral Ferraz Navarro).

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116425>

Received 5 October 2022; Received in revised form 6 February 2023; Accepted 10 February 2023

Available online 15 February 2023

0926-6690/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

a source of promising products for combating mosquitoes and other insect pests (Budiman et al., 2021). An example is the larvicidal activity of 2-hydroxy-4-methoxy-6-propyl-methyl benzoate and (+)-usnic acid isolated from *Ramalina usnea* (lichen); these compounds exhibited significant toxicity to *A. aegypti*, with LC₅₀ values of 4.85 and 4.48 µg.mL⁻¹, respectively (Moreira et al., 2016). The literature offers other examples of natural products with larvicidal activity, such as extracts and essential oils from plants and microalgae (Navarro et al., 2013). Bianco et al. (2013) reported the larvicidal activity of marine macroalgae and found that the substance responsible for the mortality of the larvae was elatol (LC₅₀ = 10.7 µg.mL⁻¹). Essential oils are an effective tool against *Aedes aegypti* mosquito larvae. There is extensive scientific literature on this subject (Budiman et al., 2021).

Lichens are a symbiotic association between fungi and algae or cyanobacteria. There are ca. 17,000 known lichen species and no less than 800 lichen-based products are used in the cosmetic, perfume, and food industries, with further uses as pollution bioindicators, dyes, and drugs. In medicine, it is possible to mention the use of lichens in folk medicine to cure some diseases, such as inflammation of the joints (arthritis), inflammation of the skin (eczema), and pulmonary disease. *Usnea longissima*, a lichen species that is highly sensitive to air pollution, is used to monitor air quality. It can also be used as a hair strengthener and hygiene product, as well as in the treatment of leg injuries, skin eruptions, and as an expectorant (Jayanthi et al., 2012).

Lichens are also rich in secondary metabolites with proven biological properties, such as fumarprotocetraric and lecanoric acid. Fumarprotocetraric acid has demonstrated expectorant and antioxidant activity in rats and lecanoric acid has antioxidant activity as well as antimicrobial activity, with action against Gram-positive bacteria (Gaikwad et al., 2014; Nóbrega et al., 2012; De Barros Alves et al., 2014). Extracts from the lichens *Lecanora muralis*, *Letharia vulpina* and *Peltigera rufescens* exhibited insecticidal activity against adult forms of the grain weevil, *Sitophilus granarius* (Emsen et al., 2015). There are studies on molecular docking of acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and tyrosinase enzymes to molecules isolated from seaweeds (isoamijiol, 14-deoxyamijiol, amijidictyol, dictyodial, and 4α-acetoxydictyodial). They show that these molecules can interact with enzymes and inhibit them, evidencing the mode of action of larvicides in mosquitoes (Kilic et al., 2021). Secondary metabolites confer the protection of lichens from certain types of insects (Pöykkö et al., 2010) and constitute a promising source of compounds with insecticidal activity that could be a good option in the search for bioinsecticides for pest control programs.

Relatively few studies have addressed the insecticidal activity of substances derived from lichens against insects of public health importance. Therefore, the aim of the present study was to investigate the larvicidal activity of extracts from lichens (*Ramalina complanata* (Sw.) Ach., 1810 and *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr.) and isolated components of these extracts against larvae of the mosquito *A. aegypti*.

2. Methods

2.1. Lichen material

The lichen *R. complanata* was collected from the municipalities of Saloá (09° 01.399' S; 36° 47.565' W) in the state of Pernambuco in northeast Brazil in the winter period of the Southern Hemisphere (June 2008). The identification of the thallus was performed by an evaluation of morphological characteristics and a voucher (n° 54299) was deposited in the Geraldo Mariz Herbarium of the Botany Department of Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil.

The lichen *C. verticillaris* was collected from the municipality of Taquaritinga do Norte (09° 01.399' S; 36° 47.565' W) in the state of Pernambuco, Brazil in the winter period of the Southern Hemisphere (June 2017). The identification of the thallus was performed as described above and a voucher (n° 54301) was deposited in the Geraldo Mariz Herbarium of the Botany Department of UFPE, Recife, PE, Brazil.

2.2. Preparation of extracts and isolation of compounds

The isolation of all compounds was performed following the methods described by Asahina and Shibata (1954).

Preparation of ether extract of *R. complanata* and isolation of divaricatic acid: dried and crushed lichen (10 g) was extracted using 100 ml of diethyl ether in a soxhlet apparatus under reflux. The extract was transferred to a vacuum rotary evaporator and subsequently stored in glass vials and placed in a desiccator until constant weight was obtained. A mass of 0.870 g of dry extract was obtained (yield: 8.7%). Around 0.87 g of extract was used to isolate divaricatic acid. The glass vial (10 ml) containing the entire extract was placed in a water bath, followed by the addition of 5 ml of ethanol. A glass rod was used to mix the solid with ethanol in an attempt to dissolve the impurities contained in the divaricatic acid. The mixture was filtered using a filter paper, and the solid obtained was transferred back to the flask. Every time the solid was filtered, a very small sample was used in thin-layer chromatography (TLC) to check the purity of the divaricatic acid. This procedure was repeated until a single spot was obtained on TLC, i.e., highly purified divaricatic acid. TLC: the elution system used was toluene/dioxane/acetic acid (45:12.5:2 v/v/v), reveal in 10% sulfuric acid. The compounds' bands were observed under UV light (254/312 nm). We obtained 0.249 g of divaricatic acid (28% yield).

Preparation of the acetone extract of *C. verticillaris* and isolation of FUM: Lichen thalli (30 g) were submitted to extraction in a shaker at room temperature for 3 h using 100 ml of acetone. The extraction was repeated 3 times and the extracts were combined. The extract was kept in a freezer for 24 h then filtered. The solvent was removed in a vacuum rotary evaporator until a dry extract was obtained (2.4 g; 8% yield). TLC was used to monitor compound bands in extract preparation. Isolation of FUM from *C. verticillaris* acetone extract: 2.4 g of the acetone extract was dissolved in 20 ml of cold acetone and centrifuged at 5000 rpm for 5 min. This centrifugation procedure was repeated 4 times, until the formation of a precipitate could be observed. Then, the acetone solution was separated from the precipitate using a Pasteur pipette. The precipitate was moved to a G4 sintered glass funnel, and very gently washed with drops of ice-cold acetone. A mass of 0.50 g of FUM was obtained (20% yield).

2.3. Identification of compounds in extracts and confirmation of molecular structure

The identification and isolation of compounds was performed using thin-layer chromatography (TLC), high-performance liquid chromatography (HPLC) and proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR).

TLC analyses followed the methods described by Culberson (1969). Chromatography was performed in the ascending direction using Merck® silica gel F254 nm chromatoplates. The solvent system was toluene-dioxane-acetic acid (80:19.5:0.5, v-v:v). After the run, bands corresponding to the compounds were viewed under a UV lamp (254 and 366 nm) and subsequently developed by spraying a 10% sulfuric acid solution and heating to 100°C/10 min. Compounds were identified by comparison with standards of lichen phenols available in the lab.

HPLC analyses were performed in a Hitachi liquid chromatograph coupled to a UV/Vis detector, following the method described by Legaz et al. (1986). An RP18 reverse phase column was used, with pressure of 88 atm and a flow of 1 ml/min. Compounds were identified based on retention time in the column and comparison with standards available in the lab.

¹H NMR analysis was performed in a Varian spectrometer (Unity model) at 300 MHz.

2.4. Maintenance of *Aedes aegypti* colony

Larvae were obtained from the *Aedes aegypti* Linnaeus (Rockefeller strain) colony of the insectarium of the UFPE Chemical Ecology Lab. The

insectarium was kept at a temperature of $27 \pm 1^\circ\text{C}$, average relative humidity of 80% and a photoperiod with 14 h of light and 10 h of darkness. The Rockefeller strain is cultivated and used in entomology as a reference of susceptibility, which enables its use in bioassays for the comparison of resistance with local populations.

2.5. Rearing of *Aedes aegypti* in laboratory

For the hatching of the eggs of *Aedes aegypti*, paper platforms containing eggs were placed in a cup with water from the larval rearing containers in the lab. This procedure is normally performed within 24 h. The newly hatched eggs were distributed and placed in round plastic containers with a 20-cm diameter containing approximately 450 ml of distilled water. Feeding throughout the larval stage was performed with ground Purina® dog ration.

The water in the containers was exchanged every two days until the larvae reached the pupal stage. The pupae were removed from the containers and placed in glasses, which were placed in square cages (35 cm per side) for the emergence of the adults. The adults were fed daily with a 10% sucrose solution. Chicken blood meal was offered to the females, supplied in an artificial glass apparatus at $35\text{--}36^\circ\text{C}$.

2.6. Larvicidal bioassay

The extracts and pure compounds were diluted in distilled water for the preparation of different concentrations. Tween 80 (three drops) was used as co-solvent for better homogenization in 100 ml of distilled water. Twenty *A. aegypti* larvae (L4 instar) were exposed to the treatment in 50-ml beakers containing 20 ml of the test solution. Each test was conducted in triplicate. The negative control was distilled water with Tween 80 (same concentration used to dissolve the extracts and isolated compounds – three drops per 100 ml of water) and 20 larvae (L4 instar). The positive control was Temephos ($\text{LC}_{50} = 0.0033 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), used to kill 20 larvae (L4 instar) (to confirm non-resistant colony). Mortality of the larvae exposed to the treatments was determined after 24 and 48 h. The quantity of dead larvae was recorded on a chart and lethal concentrations (LC_{50} and LC_{90}) were calculated. Larvae with no motor activity 48 h after the onset of the bioassay were considered dead. The calculation of the LC_{50} and LC_{90} for the extract and isolated compounds was performed using Probit – Package Ecotox: Analysis of Ecotoxicity (Wheeler et al., 2006; Hlina et al., 2021; De Carvalho et al., 2017).

2.7. Molecular docking of compounds

Preparation of ligands: For the molecular docking analysis, two standards (Temephos and AL200 co-crystallized ligand) and two lichen compounds were used in the preparation of the ligands. All structures of the compounds were designed, and energies were minimized using the BIOVIA Discovery Studio Visualizer (<https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>).

Preparation of macromolecule: The enzyme acetylcholinesterase 1 from *Aedes aegypti* (AaAChE1) (PDB: 5FUM) was retrieved from the Protein Data Bank (PDB). All ligands, ions and molecules of water were manually removed from the original structure and hydrogen atoms were added using the BIOVIA Discovery Studio.

Docking: The docking process was performed using the Molegro Virtual Docker (MVD) program and the binding site was defined by molecular interactions between amino acid residues and the co-crystallized ligand (AL200). The grid box was set at a radius of 15 Å. The results for each calculation were given by the bond energy ($\text{Kj}\cdot\text{mol}^{-1}$) for each pose of the ligand coupled to the target enzyme.

Consensus docking: The consensus analysis was based on the average auto-scaling scores (Oda et al., 2006). All scores obtained by five methods (GPU Score, Moldock Score, Rerank Score, Docking Score and Similarity Score) for each molecule were divided by the lowest value

among them. The average of the normalized values (consensus) was calculated for each compound and the compounds were subsequently ranked as a function of this average.

Docking validation: Docking validation was performed by the re-dock of the co-crystallized ligand (AL200) extracted from the original PDB file (PDB ID: 5FUM) and interpreted in terms of the root mean square deviation < 2 for overlap of the re-docked ligand and crystallographic pose (Silva-Júnior et al., 2016).

Analyses and illustrations: The analyses of the interactions between the ligands and amino acid residues of AaAChE1 were performed using the BIOVIA Discovery Studio. The same program was used for the illustrations.

3. Results and discussion

3.1. Physicochemical analysis of lichen metabolites

The isolation of the compounds was accompanied by TLC. For FUM, the retention factor (RF) = 0.18 corroborates the data reported in the literature (Martins et al., 2018). The RF for divaricatic acid was 0.56. The purity of the compounds was evaluated using HPLC. The divaricatic acid had 99% purity (Fig. 1) and a retention time of 16.47 min (Figs. 1 and 2).

FUM had a retention time of 2.79 min and 93.79% purity (Fig. 2).

3.1.1. *C. verticillaris*

The spectroscopic analysis was performed using ^1H NMR and the results confirmed data reported by Huneck and Yoshimura (1996):

Divaricatic acid: (400 MHz, CdCl_2) δ 0.98 (6 H, t, 5.4 Hz, Me, C18, 27); 1.68 (4 H, m, CH₂ – C-16 and 26); 2.97 (4 H, m, CH₂, C-17, 25); 2.93 (3 H, s, OCH₃, C-20); 6.38 (2 H, d, 2.4 Hz, C₄, 11); 6.64 (1 H, d, 2.4 Hz, C15); 6.76 (1 H, d, 2.4 Hz, C-6); 10.65 (2 H, s, OH, C7, 22).

Fumarprotocetraric acid (FUM): ^1H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ_{H} (H; mult.; int.): 2.38 (3 H; s; CH₃-9), 2.41 (3 H; s; CH₃-9'). 5.26 (2 H; s; CH₂-8'), 6.60 (2 H; s; CH-2'; CH-3'), 6.80 (1 H; s; CH-5), 10.53 (1 H; s; CH-8), 11.93 (1 H; s; C-4-OH or C-2'-OH).

3.2. Larvicidal activity of compounds

The LC_{50} and LC_{90} of the lichen compounds against the *A. aegypti* larvae are displayed in Table 1. The ether extract from *R. complanata* had 50% lethality at a concentration of $5.9 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, whereas the compound isolated from this lichen (divaricatic acid) had an LC_{50} of $27.1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, demonstrating that the extract had greater larvicidal action compared to the isolated compound. This finding may be due to the synergism between divaricatic acid and other chemical components of the extract that were also active in the larvicidal tests. Further investigation is necessary to identify these active compounds in the extract. The synergistic effect was well discussed by Pavela (2008) in a study in which the authors showed that a mixture of compounds improved the mortality of the insects compared with compounds tested separately.

The acetone extract of *C. verticillaris* had an LC_{50} of $17.4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ and its isolated compound (FUM) had an LC_{50} of $13.6 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Table 1), demonstrating that the isolated compound had greater larvicidal activity than that of the extract. Thus, FUM is the active compound of this extract in terms of larvicidal activity for *Aedes aegypti*.

The insecticidal potential of FUM has been reported in the literature. Martins et al. (2018) demonstrated the insecticidal action of FUM for the development of *Nasutitermes corniger*. Lectin isolated from the lichen *C. verticillaris* also presented insecticidal action against *Nasutitermes corniger* (Silva et al., 2009).

Other compounds isolated from lichens have been described as bio-insecticides. Usnic acid isolated from the lichen *Ramalina usnea* caused 50% mortality of *A. aegypti* larvae exposed to the compound at a concentration of $4.48 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Moreira et al., 2016). Extracts from the lichens *Lecanora muralis*, *Letharia vulpina* and *Peltigera rufescens* caused the

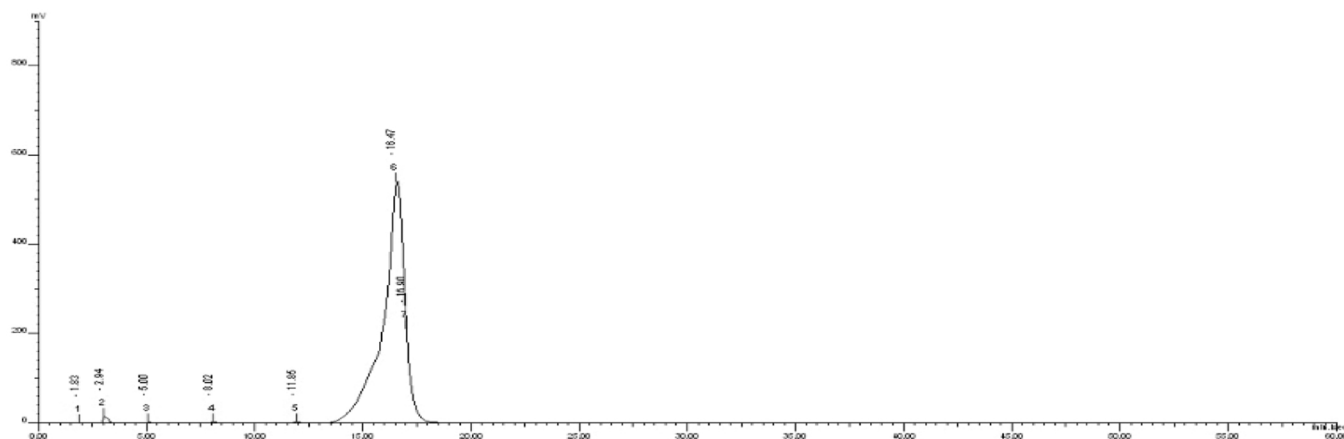


Fig. 1. HPLC chromatogram. Divaricatic acid isolated from *R. complanata*.

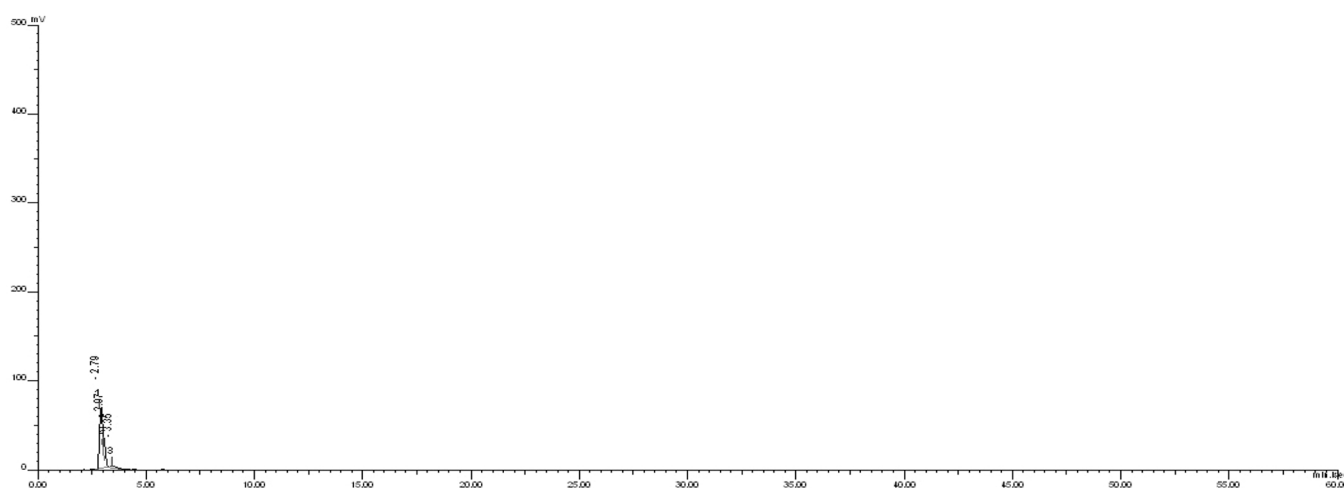


Fig. 2. HPLC chromatogram. Fumarprotocetraric acid (FUM) isolated from.

Table 1

Larvicidal data (LC₅₀ and LC₉₀) for *A. aegypti* exposed to lichen extracts, isolated compounds and Temephos.

Material	N ¹	X ²	Slop (SE)	DF ²	Larvicidal activity*	
					LC ₅₀ ⁴ (95% CI) ^{3*}	LC ₉₀ ⁴ (95% CI) ^{3*}
Temephos	520	0.5687	0.348	4	0.0033 (0.00299–0.00370)	0.0102 (0.00777–0.0158)
Ether extract of <i>R. Complanata</i>	400	0.2091	0.705	3	5.9 (2.92–8.03)	15.0 (12.6–18.3)
Divaricatic acid	350	0.7179	0.403	3	27.1 (19.3–36.1)	60.4 (42.9–162)
Acetone extract of <i>C. verticilaris</i>	300	0.624	0.419	3	17.4 (15.5–19.3)	34.9 (31.0–40.7)
Fumarprotocetraric acid (FUM)	300	0.0814	0.590	3	13.6 (3.36–27.1)	22.1 (19.5–23.5)

¹Number of insects used in test, ²degrees of freedom, ³lethal concentration and confidence interval; ⁴ $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. *LC values are considered significantly different when 95% CI fail to overlap ($P < 0.05$).

death of adult forms of the grain weevil, *Sitophilus granarius* (Emsen et al., 2015).

The results in Table 1 of the larvicidal tests (LC₅₀ and LC₉₀) with *Aedes aegypti* exposed to the lichen extracts and compounds isolated from these extracts are similar to those reported for synthetic compounds derived from thiosemicarbazones by Da Silva et al. (2015). The most active compounds in the study had an LC₅₀ ranging from 5.8 to 28.8 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$.

The present larvicidal data of the lichens against *Aedes aegypti* are similar to data reported in studies using the plant *Piper corcovadensis*. Da Silva et al. (2016) demonstrated that the essential oil from the leaves of this plant had an LC₅₀ of 30.52 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ and the major constituent of the oil (1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene) had an LC₅₀ = 22.1 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. In a larvicidal study involving *Aedes aegypti*, Albuquerque et al. (2022) demonstrated that the hexane extract of the leaves of the same plant had an LC₅₀ = 18.23 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ and the compound beta-germacrene-D-4-ol

isolated from the extract had an $LC_{50} = 6.71 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

The present findings suggest that the lichen extracts and isolated compounds show promising insecticidal potential against *Aedes aegypti* when compared to the results obtained with essential oils compiled in the review by Budiman et al. (2021) and with seaweed extracts compiled by Ali et al. (2013).

The LC_{50} and LC_{90} of *R. complanata* ether extract are comparable to those of several plant extracts and isolated compounds described in the literature (Pavela, and Pavela et al., 2019, 2021). The leaf ethanolic extract of *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees showed an $LC_{50} = 12$ ppm and the petroleum ether leaf extract of *Argemone mexicana* L. an $LC_{50} = 49$ ppm. But there are plant extracts showing even better results, such as the extract of *Artemisia annua* L. with an $LC_{50} = 0.7$ ppm and the root essential oil from *Carlina acaulis* L. with an $LC_{50} = 2$ ppm. The LC_{50} values of compounds isolated from lichens in this study ranged from 13 to 27 ppm. Studies show that compounds isolated from plants have data comparable to ours or even better: beta-sitosterol ($LC_{50} = 11.5$ ppm), emodin ($LC_{50} = 1.9$ ppm), and alpha-mangostin ($LC_{50} = 2.2$ ppm), among others.

In silico molecular docking studies and absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADMET) prediction studies were then performed with the isolated compounds (divaricatic acid and fumarprotocetraric acid) to obtain information on the possible mechanism of the insecticidal action.

3.3. Molecular docking

Molecular docking is an approach that enables the determination of parameters that lead to the best results by enabling a better sampling of conformation at the binding site (Silva-Júnior et al., 2016). Thus, molecular docking was performed with divaricatic acid and fumarprotocetraric acid and the active site of the enzyme acetylcholinesterase 1 from *Aedes aegypti* (AaAChE1). AaAChE1 is an important molecular target for the control of the vector and is responsible for AChE-mediated resistance to insecticides (Engdahl et al., 2016).

All ligands investigated (divaricatic acid, fumarprotocetraric acid and the standard compound temephos) were able to interact with amino acid residues at the active site of AaAChE1 from *Aedes aegypti*, docking in an energetically favorable manner (Table 2).

The consensus averages resulting from the scores for the best pose of each compound enabled establishing a ranking among the molecules studied and the compounds used as standards (Table 2). AL200 (co-crystallized ligand) had the best consensus and, consequently, the most favorable interaction. Divaricatic acid had the second-best average consensus (0.7116), followed by temephos (0.6455). Among the compounds studied, fumarprotocetraric acid (FUM) had the lowest average consensus (0.6455), proving to be the least energetically favorable among the compounds tested.

Although the *in silico* analysis resulted in a different order for the compounds when compared to the experimental LC_{50} results, which demonstrated that fumarprotocetraric acid was more active than divaricatic acid, other factors, such as the type of interactions and ADME parameters are fundamental to the understanding of biological activity. Thus, the aim of this step was to ascertain how many and what types of interaction may be determinant of greater inhibitory activity. The

results are displayed in Table 3.

Few *in silico* studies have investigated interactions between lichen phenols and biological targets. Igoli et al. (2014) evaluated interactions of lichesterinic, protolichesterinic and fumarprotocetraric acids isolated from *Cetraria islandica* with riboflavin kinase, sterol-14 α -demethylase and glutathione synthetase. The authors found that hydrophobic factors were intensely related to the high affinity with the biological targets analyzed. Indeed, a greater number of amino acid residues were found in hydrophobic reactions with the lichen compounds evaluated in the present study. Divaricatic acid presented seven hydrophobic reactions with the amino acid residues ASP74, TRP86, PHE297, TYR337, PHE338, HIS447 and GLY448, whereas fumarprotocetraric acid presented six hydrophobic reactions with the residues TYR72, TRP286, SER293 and PHE295.

Only fumarprotocetraric acid had an interaction in common with the co-crystallized ligand and temephos (TRP286). This interaction may be related to its greater activity in comparison to divaricatic acid. Moreover, an unfavorable interaction was found between divaricatic acid and the residue SER125. The 2D images of the interactions between the compounds and amino acid residues of the active site of AaAChE1 are presented in Fig. 3.

The ADMET parameters of the compounds were predicted *in silico*. The results are presented in Table 4.

The *in silico* ADMET analysis furnishes data that can assist in the understanding of the greater activity of fumarprotocetraric acid compared to divaricatic acid despite the lower interaction capacity with AaAChE1.

The first variable that stands out is molar mass. The standard compounds and fumarprotocetraric acid have a similar molecular weight and greater than 400 g/mol, whereas divaricatic acid has a molecular weight 388.41 g/mol. Studies in the literature report different responses for biological activity as a function of the molecular weight of the ligand (Barbucci et al., 1998; Chen et al., 2015; Jiménez-Rosés et al., 2021). The second point of interest is the cLogP = 1.86, which gives fumarprotocetraric acid greater solubility in an aqueous medium. Lastly, divaricatic acid did not exhibit toxicity for any of the parameters tested, whereas fumarprotocetraric acid demonstrated a low probability of being mutagenic and a low risk to reproduction. However, FUM exhibited a high probability of being an irritant.

4. Conclusions

The extracts from the lichens *R. complanata* and *C. verticilaris* and the compounds isolated from these extracts (divaricatic and fumarprotocetraric acid, respectively) demonstrated larvicidal activity against *A. aegypti*. Fumarprotocetraric acid was the more active compound and was able to eliminate 50% of the larvae in any instar at a lower concentration of $13.6 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. The molecular docking studies demonstrated that the lichen compounds bind to the active site of AaAChE1 in an energetically favorable manner. The greater influence of hydrophobic forces in the interaction with the active site of the receptor is compatible with data in studies found in the literature that relate the hydrophobic

Table 2

Ranking of compounds with best average consensus at active site of AaAChE1.

Compound	Consensus average
AL200*	0.9610
Divaricatic acid	0.7116
Temephos	0.6455
Fumarprotocetraric acid	0.6455

* Co-crystallized ligand at active site of AChE1 (PDB: 5FUM).

Table 3

Ranking of compounds in terms of larvicidal activity (LC_{50}) and amino acid residues involved in interaction between compounds and active site of AaAChE1.

Compound	INTERACTIONS
AL200	TRP86, TRP286, TYR337, PHE338, TYR341, HIS447 and GLY448
Divaricatic acid	ASP74, TRP86, TYR124, SER125, PHE297, TYR337, PHE338, HIS447 and GLY448
Temephos	TYR72, ASP74, TRP86, GLY120, GLY121, GLU202, TRP286, TYR337, TYR341 and HIS447
Fumarprotocetraric acid	TYR72, TYR124, TRP286, SER293, PHE295 and ARG296

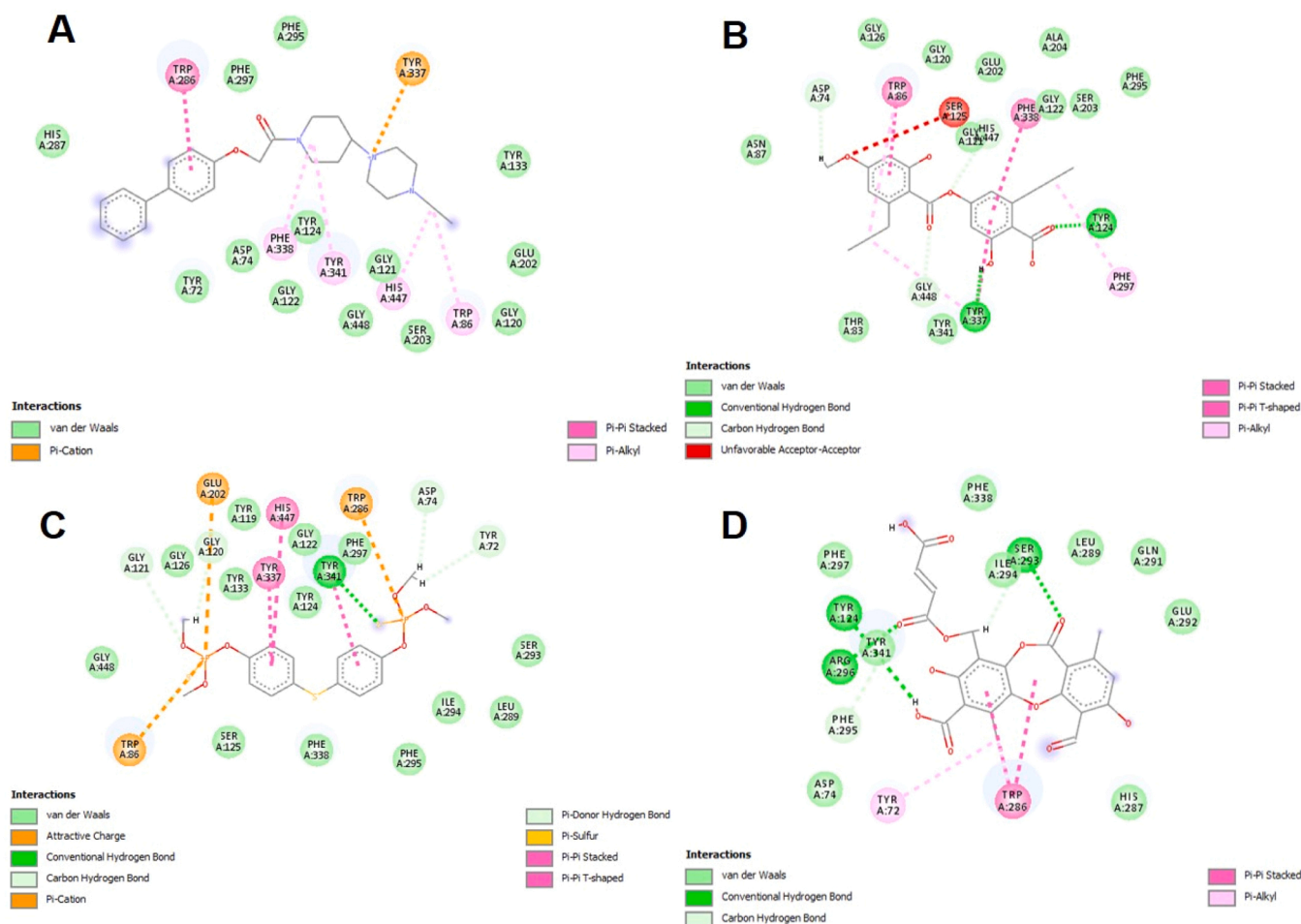


Fig. 3. Interaction with active site of AaAChE1. (A) Interactions between AL200 and amino acid residues of active site of AaAChE1. (B) Interactions between divaricatic acid and amino acid residues of active site of AaAChE1. (C) Interactions between temephos and amino acid residues of active site of AaAChE1. (D) Interactions between fumarprotocetraric acid and amino acid residues of active site of AaAChE1.

Table 4

Pharmacokinetic parameters and toxicity determined *in silico*.

Parameters	Divaricatic acid	Fumarprotocetraric acid	Temephos	AL200
Mol weight	388.41	472.36	466.47	407.36
cLogP	4.24	1.86	5.62	3.58
cLogS	-4.07	-4.81	-6.49	-3.18
H-Acceptors	7	12	6	5
H-Donors	3	4	0	0
PSA	113.29	193.96	164.48	36.02
Druglikeness	-3.42	-5.53	-3.94	8.15
Mutagenic	None	Low	Low	None
Tumorigenic	None	Low	High	None
RE	None	Low	High	None
Irritant	None	High	High	None

*PSA = polar surface area; RE = reproductive effect.

nature of lichen phenols to affinity with other biological targets. Moreover, the TRP286 residue may have contributed to the greater activity of fumarprotocetraric acid compared to divaricatic acid. Other aspects related to the greater activity of fumarprotocetraric acid are its molecular weight and greater solubility. Despite being more active than divaricatic acid, fumarprotocetraric acid has possible toxic effects that need to be investigated further.

The present results demonstrate the importance of studying lichen secondary metabolites as a natural source of insecticides and investigating possible interactions with AaAChE1. The results of the *in silico*

molecular docking and ADMET studies can assist in understanding the mechanism of insecticidal action and the optimization of the activity of these compounds.

CRediT authorship contribution statement

André Severino da Silva: Conceptualization, Investigation, Methodology, Validation, Writing. **Júlio César Ribeiro de Oliveira Farias de Aguiar:** Methodology, Investigation, Supervision. **Jéssica da Silva Nascimento:** Methodology, Investigation. **Erick Caíque Santos Costa:** Docking studies. **Fábio Henrique Galdino dos Santos:** Writing, Hal-lysson Douglas Andrade de Araújo: Methodology. **Nicácio Henrique da Silva:** Supervision. **Eugénia Cristina Pereira:** Conceptualization and Investigation. **Mônica Cristina Martins:** Methodology and Investigation. **Emerson Peter Silva Falcão:** Funding acquisition, Investigation, Resources, Visualization, Project administration, Writing – review & editing. **Luciana Scotti:** docking study. **Marcus Tullius Scotti:** docking study. **Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro:** Funding acquisition, Investigation, Resources, Visualization, Project administration, Writing – review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data Availability

No data was used for the research described in the article.

Acknowledgments

The authors are grateful to our collaborators at *Centro Acadêmico de Vitória* (CAV/UFPE), the fostering agency *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco* (FACEPE [State of Pernambuco Assistance to Science and Technology Foundation] grant numbers APQ-0443-1.06/15 and APQ-0414-2.08/17), the *Universidade Federal de Pernambuco* (UFPE), especially the Department of Fundamental Chemistry, the Postgraduate Program in Biotechnology (Renorbio/UFPE) and the Brazilian Council of Scientific and Technological Development (CNPq; processes 422233/2018-8 and 303404/2019-1).

References

- Aiub, C.A., Coelho, E.C., Sodré, E., Pinto, L.F., Felzenszwalb, I., 2002. Genotoxic evaluation of the organophosphorous pesticide temephos. *Genet. Mol. Res.* 1 (2), 159–166.
- Albuquerque, B.N.L., da Silva, M.F.R., Bezerra-Silva, P.C., Pimentel, C.S.L., da Rocha, S. K.L., Aguiar, J.C.R.O.F., Agra-Neto, A.C., Paiva, P.M.G., Gomes, M.G.M., da Silva-Júnior, E.F., Navarro, D.M.A.F., 2022. Oviposition deterrence, larvicidal activity and docking of β -germacrene-d-4-ol obtained from leaves of *Piper corcovadensis* (Piperaceae) against *Aedes aegypti*. *Ind. Crops Prod.* 182, 114830 <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114830>.
- Ali, M.Y.S., Ravikumar, S., Beula, J.M., 2013. Mosquito larvicidal activity of seaweeds extracts against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 3 (3), 196–201. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(13\)60040-7](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(13)60040-7).
- Asahina, Yasuhiko, & Shibata, Shoji. (1954). Chemistry of Lichen Substances. Japan Society for the Promotion of Science, Tokyo.
- Barbucci, R., Lamponi, S., Magnani, A., Renier, D., 1998. The influence of molecular weight on the biological activity of heparin like sulphated hyaluronic acids. *Biomaterials* 19 (7–9), 801–806. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(97\)00231-7](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(97)00231-7).
- Bianco, E.M., Pires, L., Santos, G.K.N., Dutra, K.A., Reis, T.N.V., Vasconcelos, E.R.T.P.P., Cocentino, A.L.M., Navarro, D.M.A.F., 2013. Larvicidal activity of seaweeds from northeastern Brazil and of a halogenated sesquiterpene against the dengue mosquito (*Aedes aegypti*). In: *Industrial Crops and Products*, 43. Elsevier BV, pp. 270–275. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.07.032>.
- Brazilian Health Ministry. (2022). Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes aegypti* (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 4 2020. Boletim Epidemiológico, Brasil, 53(4).
- Budiman, Ishak, H., Stang, Ibrahim, E., Daud, A., Amiruddin, R., 2021. Essential oil as a new tool for larvicidal *Aedes aegypti*: a systematic review. *Gac. Sanit.* 35, S459–S462. <https://doi.org/10.1016/j.gaceta.2021.10.074>.
- Chen, Y., Lord, M.S., Piloni, A., Stenzel, M.H., 2015. Correlation between molecular weight and branch structure of glycopolymer stars and their binding to lectins. *Macromolecules* 48 (2), 346–357. <https://doi.org/10.1021/ma501742v>.
- Consoli, R.A., & Oliveira, R.L.D. (1994). Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Editora Focruz.
- Culbertson, C.F., 1969. Chemical and botanical guide to lichen products. The University of North Carolina Press, Chapel Hill.
- Da Silva, J.B.P., Navarro, D.M.A.F., Silva, A.G., Santos, G.K.N., Dutra, K.A., Moreira, D. R., Ramos, M.N., Espíndola, J.W.P., Oliveira, A.D.T., Brondani, D.J., Leite, A.C.L., Hernandes, M.Z., Pereira, V.R.A., Rocha, L.F., Castro, M.C.A.B., Oliveira, B.C., Lan, Q., Merz Jr, K.M., 2015. Thiosemicarbazones as *Aedes aegypti* larvicidal, 162e175 *European J. Med. Chem.* 100. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.061>.
- Da Silva, M.F.R., Bezerra-Silva, P.C., de Lira, C.S., de Lima Albuquerque, B.N., Agra Neto, A.C., Pontual, E.V., Maciel, J.R., Paiva, P.M.G., Navarro, D.M., do, A.F., 2016. Composition and biological activities of the essential oil of *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC (Piperaceae). In: *Experimental Parasitology*, 165. Elsevier BV, pp. 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.03.017>.
- De Barros Alves, G.M., De Sousa Maia, M.B., de Souza Franco, E., Galvão, A.M., da Silva, T.G., Gomes, R.M., Martins, M.B., Falcão, E.P.S., De Castro, C.M.M.B., da Silva, N.H., 2014. Expectant and antioxidant activities of purified fumarprotocetraric acid from *Cladonia verticillaris* lichen in mice. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 27 (2), 139–143. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2013.07.002>.
- De Carvalho, J.R., Pratisoli, D., Vianna, U.R., Holtz, A.M., 2017. Análise de probit aplicada a bioensaios com insetos. IFES, Colatina, p. 102.
- Diniz, M.M.C.de S.L., Henriques, A.D. da S., Leandro, R. da S., Aguiar, D.L., Beserra, E.B., 2014. Resistência de *Aedes aegypti* ao temefos e desvantagens adaptativas. *Rev. De. Saúde Pública* 48, 775–782. <https://doi.org/10.1590/S0034-8910.2014048004649>.
- Emsen, B., Yildirim, E., Aslan, A., 2015. Insecticidal activities of extracts of three lichen species on *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Plant Prot. Sci.* 51 (3), 155–161. <https://doi.org/10.17221/101/2014-PPS>.
- Engdahl, C., Knutsson, S., Ekström, F., Linusson, A., 2016. Discovery of selective inhibitors targeting acetylcholinesterase 1 from disease-transmitting mosquitoes. *J. Med. Chem.* 59 (20), 9409–9421. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00967>.
- Gaikwad, S., Verma, N., Sharma, B.O., Behera, B.C., 2014. Growth promoting effects of some lichen metabolites on probiotic bacteria. *J. Food Sci. Technol.* 51 (10), 2624–2631 <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0785-x>.
- Hlina, B.L., Bircanu, O., Robinson, C.S., Dhiyebi, H., Wilkie, M.P., 2021. The relationship between thermal physiology and lampricide sensitivity in larval sea lamprey (*Petromyzon marinus*). In: *Journal of Great Lakes Research*, Vol. 47. Elsevier BV, pp. S272–S284 <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2021.10.002>.
- Huneck, S., Yoshimura, I., 1996. Identification of lichen substances. In *Identification of lichen substances*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 11–123.
- Igoli, J.O., Gray, A.I., Clements, C.J., Kantheti, P., Singla, R.K., 2014. Antitrypanosomal activity & docking studies of isolated constituents from the lichen *Cetraria islandica*: possibly multifunctional scaffolds. *Curr. Top. Med. Chem.* 14 (8), 1014–1021.
- Jayanthi, S., Priya, P., Devi, D.M., Smily, J.M.B., 2012. Lichens: origin, types, secondary metabolites and applications. *J. Acad. Ind. Res.* 1 (1), 45–49.
- Jiménez-Rosés, M., Morgan, B.A., Sigstad, M.J., Zoe Tran, T.D., Srivastava, R., Bunsuz, A., Borrega-Román, L., Hompluem, P., Cullum, S.A., Harwood, C.R., Koers, E.J., Sykes, D.A., Styles, I.B., Vepintsev, D.B., 2021. Combined docking and machine learning identifies key molecular determinants of ligand pharmacological activity on β_2 adrenoceptor. *Cold Spring Harb. Lab.* <https://doi.org/10.1101/2021.03.18.434755>.
- Kilic, M., Orhan, I.E., Eren, G., Okudan, E.S., Estep, A.S., Bencel, J.J., Tabanca, N., 2021. Insecticidal activity of forty-seven marine algae species from the Mediterranean, Aegean, and Sea of Marmara in connection with their cholinesterase and tyrosinase inhibitory activity. *South Afr. J. Bot.* 143, 435–442. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.06.038>.
- Legaz, M.E., Vicente, C., Ascaso, C., Pereira, E.C., Xavier-Filho, L., 1986. Pigment analyses of sun and shade populations of *Cladonia verticillaris*. *Biochem. Syst. Ecol.* 14 (6), 575–582.
- Martins, M.C.B., Lopes, R.S., Barbosa, P.S., Santiago, R., Rodrigues, B.R., Albuquerque, A. C., de, Flacão, E.P.S., Lima, V.L., de, M., Silva, N.H. da, Pereira, E.C., 2018. Effects of Usnic, Barbatic and Fumarprotocetraric acids on Survival of *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae). *Sociobiology* 65 (1), 79–87. <https://doi.org/10.13102/sociobiology.v65i1.1840>.
- Moreira, A.S., Fernandes, R.O., Lemos, F.J., Braz-Filho, R., Vieira, I.J., 2016. Larvicidal activity of *Ramalina usnea* lichen against *Aedes aegypti*. *Rev. Bras. De. Farmacogn.* 26, 530–532. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.03.006>.
- Musso, D., Cao-Lormeau, V.M., Gubler, D.J., 2015. Zika virus: following the path of dengue and chikungunya. *Lancet* (Lond., Engl.) 386 (9990), 243–244. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)61273-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)61273-9).
- Navarro, D.M.A.F., Silva, P.C.B., Silva, M.F.R., Napoleão, T.H., Paiva, P.M.G., 2013. Larvicidal activity of plant and algae extracts, essential oils and isolated chemical constituents against *Aedes aegypti*. *Nat. Prod. J.* 3 (4), 268–291 <https://doi.org/10.2174/221031550304140328113732>.
- Nóbrega, N.D.A., Ribeiro, S.M., Pereira, E.C., Marcelli, M., Martins, M.C.B., Falcão, E.P. D.S., Gusmão, N.B., Silva, N.H.D., 2012. Produção de compostos fenólicos a partir de células imobilizadas do líquen *Parmotrema andinum* (Müll. Arg.) Hale e avaliação de atividade antimicrobiana. *Acta Bot. Bras.* 26, 101–107.
- Oda, A., Tsuchida, K., Takakura, T., Yamaotsu, N., Hirono, S., 2006. Comparison of consensus scoring strategies for evaluating computational models of protein-ligand complexes. *J. Chem. Inf. Model.* 46 (1), 380–391. <https://doi.org/10.1021/ci050283k>.
- Pavela, R., 2008. Acute and Synergistic Effects of Some Monoterpenoid Essential Oil Compounds on the House Fly (*Musca domestica* L.). *J. E. O. Bear. Plant* 11, 451–459. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2008.10643653>.
- Pavela, R., Maggi, F., Iannarelli, R., Benelli, G., 2019. Plant extracts for developing mosquito larvicides: From laboratory to the field, with insights on the modes of action. *Acta Trop.* 93, 236–271 <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.01.019>.
- Pavela, R., Pavoni, L., Bonacucina, G., Cespi, M., Cappellacci, L., Petrelli, R., Spinozzi, E., Aguzzi, C., Zeppa, L., Ubaldi, M., Desneux, N., Canale, A., Maggi, F., Benelli, G., 2021. Encapsulation of *Carlinia acalis* essential oil and carlina oxide to develop long-lasting mosquito larvicides: microemulsions versus nanoemulsions. *J. Pest Sci.* 94, 899–915. <https://doi.org/10.1007/s10340-020-01327-2>.
- Pöykkö, H., Backor, M., Bencúrová, E., Molcanová, V., Backorová, M., Hyvärinen, M., 2010. Host use of a specialist lichen-feeder: dealing with lichen secondary metabolites. *Oecologia* 164 (2), 423–430 <https://doi.org/10.1007/s00442-010-1682-5>.
- Silva, M.D.C., Sá, R.A., Napoleão, T.H., Gomes, F.S., Santos, N.D.L., Albuquerque, A.C., Xavier, H.S., Paiva, P.M.G., Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B., 2009. Purified *Cladonia verticillaris* lichen lectin: insecticidal activity on *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae). In: *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63. Elsevier BV, pp. 334–340 <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2008.11.002>.
- Silva-Júnior, E.F., Silva, E., França, P., Silva, J., Barreto, E.O., Silva, E.B., Ferreira, R.S., Gatto, C.C., Moreira, D., Siqueira-Neto, J.L., Mendonça-Júnior, F., Lima, M., Bortoluzzi, J.H., Scotti, M.T., Scotti, L., Meneghetti, M.R., Aquino, T.M., Araújo-Júnior, J.X., 2016. Design, synthesis, molecular docking and biological evaluation of thiophen-2-iminothiazolidine derivatives for use against *Trypanosoma cruzi*. *Bioorg. Med. Chem.* 24 (18), 4228–4240. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.07.013>.
- Vieira Santos, V.S., Caixeta, E.S., Campos Júnior, E.O., Pereira, B.B., 2017. Ecotoxicological effects of larvicide used in the control of *Aedes aegypti* on nontarget

- organisms: Redefining the use of pyriproxyfen. *J. Toxicol. Environ. Health, Part A*. 80 (3), 155–160. <https://doi.org/10.1080/15287394.2016.1266721>.
- Wheeler, M.W., Park, R.M., Bailer, A.J., 2006. Comparing median lethal concentration values using confidence interval overlap or ratio tests. *Environ. Toxicol. Chem. Int. J.* 25 (5), 1441–1444. <https://doi.org/10.1897/05-320R.1>.
- World Health Organization. (2016). Can a mosquito transmit more than one disease? Retrieved May 14, 2019, from <https://www.who.int/features/qa/co-infection-mosquitos/en/>.