



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS
E SINTÉTICOS BIOATIVOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Ésteres sintéticos derivados do ácido 3-metil-4-nitrobenzoico
e avaliação da sua atividade antifúngica

ALANA RODRIGUES FERREIRA

João Pessoa
UFPB 2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS
E SINTÉTICOS BIOATIVOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Ésteres sintéticos derivados do ácido 3-metil-4-nitrobenzoico
e avaliação da sua atividade antifúngica

ALANA RODRIGUES FERREIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para a obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de Concentração: FARMACOQUÍMICA.

Orientador: Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa.

João Pessoa

UFPB 2018

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

F383é Ferreira, Alana Rodrigues.

Ésteres sintéticos derivados do ácido
3-metil-4-nitrobenzoico e avaliação da sua atividade
antifúngica / Alana Rodrigues Ferreira. - João Pessoa,
2018.

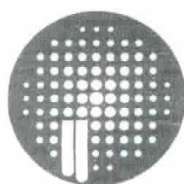
117 f. : il.

Orientação: Damião Pergentino de Sousa.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Produtos naturais. 2. Ésteres derivados -
Caracterização estrutural. 3. Atividade antifúngica -
Avaliação. I. Sousa, Damião Pergentino de. II. Título.

UFPB/BC



PgPNSB

Pós Graduação em Produtos Naturais
e Sintéticos Bioativos

Programa de Pós-Graduação em
Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos:
CONFERE COM O ORIGINAL

Caroline Helena M. de M. Mangueira

Caroline Helena M. de M. Mangueira
SIAPE C 1775369
Assistente em Administração

Ata da 387ª (trecentésima octogésima sétima) Dissertação de Mestrado da aluna do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos **Alana Rodrigues Ferreira**, candidata ao Título de "Mestre" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacoquímica.

Às nove horas (09h00) do dia sete de março do ano de dois mil e dezoito (07.03.2018), nas dependências do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, reuniram-se em caráter de Solenidade Pública os membros da Comissão designada para examinar a aluna **Alana Rodrigues Ferreira**, candidata ao Título de "MESTRE" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacoquímica. Foram componentes da Banca Examinadora os doutores Luis Cezar Rodrigues, Ph.D em Química Orgânica, Vicente Carlos de Oliveira Costa, Ph.D em Farmacoquímica e Damião Pergentino de Sousa, Ph.D em Ciências. Sendo todos integrantes do corpo docente da Universidade Federal da Paraíba. Dando início aos trabalhos, o Presidente da Banca, professor Damião Pergentino de Sousa, após declarar os objetivos da reunião, apresentou a candidata **Alana Rodrigues Ferreira**, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado "Ésteres sintéticos derivados do ácido 3-metil-4-nitrobenzoico e avaliação da sua atividade antifúngica". Após discorrer sobre o referido tema durante cerca de quarenta minutos, a candidata foi arguida pelos examinadores na forma Regimental. Em seguida, passou a comissão, em caráter secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito **APROVADA**. Em face da aprovação, declarou o Presidente achar-se a examinada **Alana Rodrigues Ferreira** legalmente habilitada a receber o Título de "MESTRE" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na Área de Concentração Farmacoquímica, cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito, a expedição do Diploma que a mesma faz jus. Nada mais havendo a tratar, eu, Nilmar Níncia Neves de Medeiros, na qualidade de Secretária, lavrei a presente Ata que submeto a aprovação da Comissão Examinadora.

Nilmar Níncia Neves de Medeiros (Secretária) *Nilmar Níncia Neves de Medeiros*

Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa (Orientador) *Damião Pergentino de Sousa*

Prof. Dr. Vicente Carlos de Oliveira Costa (Examinador) *Vicente Carlos de Oliveira Costa*

Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues (Examinador) *Luis Cezar Rodrigues*

Alana Rodrigues Ferreira (Discente) *Alana Rodrigues Ferreira*



Dedicatória

Dedico esta vitória à minha família, especialmente aos meus pais, Maria Leunides e Alex Sandro, que sempre estiveram ao meu lado, acreditaram em mim, me apoiaram e me ajudaram a chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus e a Nossa Senhora, por toda a proteção e as bênçãos concedidas a mim, todos os dias.

Aos meus pais, Maria Leunides Ferreira Leite e Alex Sandro Rodrigues dos Santos, que sempre batalharam muito por meu irmão, Alann Rodrigues. Tenho certeza de que não chegaria até aqui sem o apoio, confiança, incentivo, motivação e muita ajuda da minha família. Todas as minhas vitórias são pra vocês. Gostaria também de agradecer à Nerileuza, Tia Lunga, Janaina, Tia Sandra e Tia Sulene, pela ajuda imensa de sempre.

Ao meu noivo, João Paulo Gomes de Oliveira, pelo apoio de todos os dias, amizade, carinho e ajuda em tudo, inclusive com algumas etapas para o término desse projeto. Também gostaria de agradecer à sua família, pelas palavras carinhosas e por sempre me acolherem e me ajudarem aqui em João Pessoa.

Às amigas que fiz durante essa difícil trajetória para conclusão do projeto de Mestrado, Ana Júlia e Rayanne, que também são companheiras de laboratório. Pelo carinho, muito apoio e incentivo. Tenho certeza de que o nosso trabalho em conjunto foi o que nos capacitou e nos deu forças para terminar.

Agradeço às minhas amigas-irmãs, Tamires e Ednamarah; que me acompanham desde o início da graduação, por estarem sempre dispostas a me ajudar e me apoiar no que estiver por vir.

Agradeço ao meu Orientador Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa, pela oportunidade concedida, pela confiança em mim depositada para o desenvolvimento do projeto e pela ajuda nos momentos necessários.

Aos colegas do Laboratório de Química Farmacêutica (UFPB): Marianna, Susianne, Lázaro, Anna Emanuella, Caroline, Mayara, Alex, Joice e Carlos; pela companhia nos dias de trabalho, conversas divertidas e ajuda com as dificuldades das nossas reações.

Ao Professor Dr. Ricardo Castro e seus alunos Diego e Ana Cláudia; pelo auxílio com os testes biológicos destinados ao projeto. O aprendizado foi imenso e muito gratificante. Agradeço aos professores do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, por todos os ensinamentos e formação.

Agradeço também ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo apoio financeiro, através da concessão da minha bolsa de Mestrado.

RESUMO

FERREIRA, Alana Rodrigues. **Ésteres sintéticos derivados do ácido 3-metil-4-nitrobenzoico e avaliação da sua atividade antifúngica**. 117p. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2018.

O ácido 3-metil-4-nitrobenzoico é um produto químico obtido através de processos sintéticos, de baixo custo e utilizado em diversos estudos como precursor na obtenção de moléculas bioativas. A presente dissertação envolveu o preparo, purificação e caracterização estrutural de onze ésteres derivados do ácido 3-metil-4-nitrobenzoico com o objetivo de avaliá-los quanto a sua capacidade antifúngica, frente a espécies de leveduras do gênero *Candida*: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. guilliermondii*, patógenos oportunistas de importância clínica que, com o aumento do uso dos agentes antifúngicos, vêm desenvolvendo mecanismos de resistência aos fármacos atualmente disponíveis; o que representa uma extrema dificuldade para o tratamento de infecções causadas por esses microrganismos. Foram utilizadas quatro diferentes metodologias para as esterificações: Esterificação de Fischer, esterificações com haletos de alquila e arila, reação de Mitsunobu e reação de Steglich; os rendimentos dos ésteres obtidos variaram de 12% a 83%. Nos testes antifúngicos foi realizada a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) com a técnica de microdiluição em placa de 96 poços e posterior determinação da concentração fungicida mínima (CFM) em meio de cultura sólido. Com a avaliação da capacidade antifúngica dos ésteres preparados, foi possível observar que todos foram bioativos frente a pelo menos uma das cepas testadas e apresentaram atividade fungicida. Os melhores resultados encontrados foram referentes à cepa de *C. guilliermondii* 207, na qual, **AR1** apresentou atividade inibitória na concentração de 0,039 $\mu\text{mol/mL}$ e **AR6** em 0,031 $\mu\text{mol/mL}$. No tocante as características estruturais dos ésteres que influenciam a bioatividade antifúngica, constatou-se principalmente, a importância das cadeias alquílicas laterais. Também foi observado que a inserção de uma subestrutura terpênica ou de grupos aromáticos, na maioria dos casos, não foram relevantes para a otimização da bioatividade ou contribuíram para a inatividade do éster.

Palavras-chave: Ésteres benzoicos, Relação Estrutura-Atividade, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

FERREIRA, Alana Rodrigues. **Synthetic esters derived from 3-methyl-4-nitrobenzoic acid and evaluation of their antifungal activity**. 117p. Dissertation (Post-graduate Program in Natural Products and Synthetic Bioactives) – Health Sciences Center, Federal University of Paraíba. João Pessoa, 2018.

The 3-methyl-4-nitrobenzoic acid is a compound obtained through synthetic processes, low cost and used in several studies as a precursor in the production of bioactive molecules. The present dissertation involved the preparation, purification and structural characterization of eleven esters derived from 3-methyl-4-nitrobenzoic acid in order to evaluate them for their antifungal capacity against yeast species of the genus *Candida*: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* and *C. guilliermondii*, opportunistic pathogens of clinical importance that, with the increase of the use of the antifungal agents, have been developing mechanisms of resistance to the currently available drugs; which represents an extreme difficulty for the treatment of infections caused by these microorganisms. Four different methodologies were used for the esterifications: Fischer esterification, esterification with alkyl and aryl halides, Mitsunobu reaction and Steglich reaction; the yields of the esters obtained ranged from 12% to 83%. In the antifungal tests, the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined with the 96-well plate microdilution technique and subsequent determination of the minimum fungicidal concentration (CFM) in solid culture medium. With the evaluation of the antifungal capacity of the prepared esters, it was possible to observe that all were bioactive against at least one of the tested strains and presented fungicidal activity. The best results were related to the strain of *C. guilliermondii* 207, in which, **AR1** presented inhibitory activity at the concentration of 0.039 $\mu\text{mol/mL}$ and **AR6** at 0.031 $\mu\text{mol/mL}$. Regarding the structural characteristics of the esters that influence the antifungal bioactivity, the importance of the side alkyl chains was found. It was also observed that the insertion of a terpenic substructure or aromatic groups, in most cases, were not relevant for the optimization of the bioactivity or contributed to the ester inactivity.

Key-Words: Benzoic esters, Structure-Activity Relationship, antimicrobial activity.

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Reações para síntese de ésteres.....	33
Esquema 2 – Mecanismo da esterificação de Fischer.....	34
Esquema 3 – Esterificação do ácido carboxílico com haletos.....	35
Esquema 4 – Mecanismo da reação de Mitsunobu para síntese de ésteres.....	37
Esquema 5 – Mecanismo da esterificação pela reação de Steglich (DCC/DMAP).....	39
Esquema 6 – Metodologias utilizadas para obtenção dos ésteres.....	43
Esquema 7 - Reação de obtenção dos ésteres AR1 a AR5.....	68
Esquema 8 - Reação para obtenção dos ésteres AR6 a AR9.....	72
Esquema 9 - Reação de obtenção do éster AR10.....	76
Esquema 10 - Reação de preparação do éster AR11.....	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do ácido 3-metil-4-nitrobenzoico.....	29
Figura 2 – Derivados esterificados sintetizados com atividade inibitória da enzima β -glicuronidase.....	30
Figura 3 – Derivado triazólico sintetizado a partir do ácido 3-metil-4 nitrobenzoio...	30
Figura 4 – Exemplos de fármacos que possuem em sua estrutura a função éster..	32
Figura 5 – Ésteres preparados no estudo.....	42
Figura 6 – Expansão do espectro de infravermelho do 3-metil-4-nitrobenzoato de metila (AR1).....	48
Figura 7 - Álcoois e helatos de alquila e arila utilizados nas reações de obtenção de derivados esterificados do ácido 3-metil-4--nitrobenzoico.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Representação de alguns exemplares das classes de antifúngicos utilizadas no tratamento de infecções causadas por <i>Candida</i> spp.....	26
Tabela 2 – Dados gerais dos ésteres derivados do ácido 3-metil-4-nitrobenzoico ...	45
Tabela 2 - Continuação – dados gerais dos ésteres derivados do ácido 3-metil-4-nitrobenzoico	46
Tabela 3 – Principais dados de espectroscopia de infravermelho dos ésteres preparados.	48
Tabela 4 – Deslocamentos químicos de ^1H (δ_{H}) para os ésteres AR1 a AR5	50
Tabela 5 – Deslocamentos químicos de ^1H (δ_{H}) para os ésteres AR6 a AR9	51
Tabela 6 – Deslocamentos químicos de ^1H (δ_{H}) para os ésteres AR10 e AR11	52
Tabela 7 – Deslocamentos químicos de ^{13}C (δ_{C}) para os ésteres AR1 a AR11	53
Tabela 8 – Resultados obtidos no teste de determinação da concentração inibitória mínima (CIM $\mu\text{mol/mL}$) para os ésteres preparados, frente a espécies do gênero <i>Candida</i>	59
Tabela 8 continuação – Resultados obtidos no teste de determinação da concentração inibitória mínima (CIM $\mu\text{mol/mL}$) para os ésteres preparados frente, a espécies do gênero <i>Candida</i>	60
Tabela 8 continuação – Resultados obtidos no teste de determinação da concentração inibitória mínima (CIM $\mu\text{mol/mL}$) para os ésteres preparados, frente a espécies do gênero <i>Candida</i>	61
Tabela 9 – Resultados obtidos no teste de determinação da concentração fungicida mínima (CFM $\mu\text{mol/mL}$) e relação CFM/CIM dos ésteres preparados.	62

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1 – Espectro de Infravermelho (KBr cm^{-1}) do 3-metil-4-nitrobenzoato de metila (AR1).....	83
Espectro 2 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de metila (AR1).....	83
Espectro 3 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de metila (AR1).....	83
Espectro 4 – Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de metila (AR1).....	84
Espectro 5 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de metila (AR1).....	85
Espectro 6 – Espectro de Infravermelho (KBr cm^{-1}) do 3-metil-4-nitrobenzoato de etila (AR2).....	85
Espectro 7 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de etila (AR2).....	86
Espectro 8 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de etila (AR2).....	86
Espectro 9 – Espectro de RMN de ^{13}C -APT (125MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de etila (AR2).....	87
Espectro 10 – Espectro de Infravermelho (KBr cm^{-1}) do 3-metil-4-nitrobenzoato de propila (AR3).....	87
Espectro 11 - Espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de propila (AR3).....	88
Espectro 12 - Expansão do espectro de RMN DE ^1H (400MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de propila (AR3).....	88
Espectro 13 - Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de propila (AR3).....	89

Espectro 14 – Espectro de Infravermelho (KBr cm^{-1}) do 3-metil-4-nitrobenzoato de isopropila (AR4).....	89
Espectro 15 - Espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de isopropila (AR4).....	90
Espectro 16 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de isopropila (AR4).....	90
Espectro 17 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de isopropila (AR4).....	91
Espectro 18 – Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de isopropila (AR4).....	91
Espectro 19 – Espectro de Infravermelho (KBr cm^{-1}) do 3-metil-4-nitrobenzoato de 2-metoxietila (AR5).....	92
Espectro 20 - Espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de 2-metoxietila (AR5).....	92
Espectro 21 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de 2-metoxietila (AR5).....	93
Espectro 22 – Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de 2-metoxietila (AR5).....	93
Espectro 23 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (100MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de 2-metoxietila (AR5).....	94
Espectro 24 – Espectro de Massas de alta resolução do tipo MALDI do 3-metil-4-nitrobenzoato de 2-metoxi-etila (AR5).....	93
Espectro 25 – Espectro de Infravermelho (KBr cm^{-1}) do 3-metil-4-nitrobenzoato de pentila (AR6).....	95
Espectro 26 - Espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de pentila (AR6).....	95
Espectro 27 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de pentila (AR6).....	96
Espectro 28 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de pentila (AR6).....	96

Espectro 29 – Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de pentila (AR6).....	97
Espectro 30 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (100MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de pentila (AR6).....	97
Espectro 31 – Espectro de INfravermelho (KBr cm^{-1}) do 3-metil-4-nitrobenzoato de difenilmetila (AR7).....	98
Espectro 32 - Espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de difenilmetila (AR7).....	98
Espectro 33 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de difenilmetila (AR7).....	99
Espectro 34 – Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de difenilmetila (AR7).....	99
Espectro 35 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (100MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de difenilmetila (AR7).....	100
Espectro 36 – Espectro de Infravermelho (KBr cm^{-1}) do 3-metil-4-nitrobenzoato de 4-clorobenzila (AR8).....	100
Espectro 37 - Espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de 4-clorobenzila (AR8).....	101
Espectro 38 – Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de 4-clorobenzila (AR8).....	101
Espectro 39 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (100MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de 4-clorobenzila (AR8).	102
Espectro 40 – Espectro de Infravermelho (KBr cm^{-1}) do 3-metil-4-nitrobenzoato de 2-metil-naftalenila (AR9).....	102
Espectro 41 – Espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de 2-metil-naftalenila (AR9).....	103
Espectro 42 – Expansão espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de 2-metil-naftalenila (AR9).....	103
Espectro 43 – Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de 2-metil-naftalenila (AR9).....	104

Espectro 44 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (100MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de 2-metil-naftalenila (AR9).....	104
Espectro 45 – Espectro de Infravermelho (KBr cm^{-1}) do 3-metil-4-nitrobenzoato de benzila (AR10).....	105
Espectro 46 – Espectro de RMN de ^1H (500MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de benzila (AR10).....	105
Espectro 47 – Espectro de RMN de ^{13}C -APT (125MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de benzila (AR10).	106
Espectro 48 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (125MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de benzila (AR10).....	106
Espectro 49 – Espectro de Infravermelho (KBr cm^{-1}) do 3-metil-4-nitrobenzoato de (+)-bornila (AR11).....	107
Espectro 50 – Espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de (+)-bornila (AR11).....	107
Espectro 51 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de (+)-bornila (AR11).....	108
Espectro 52 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de (+)-bornila (AR11).....	108
Espectro 53 – Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de (+)-bornila (AR11).....	109
Espectro 54 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (100MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de (+)-bornila (AR11).....	109

LISTA DE ABREVIATURAS

µg – Micrograma

µmol – Micromol

APT – *Attached Próton Test*

ASD – Agar Sabouraud Dextrose

ATCC - American Type Culture Collection

CC – Cromatografia em Coluna

CLSI - Clinical Laboratory Standards Institute

CFM – Concentração Fungicida Mínima

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CI₅₀ – Concentração Inibitória média

d – Dupleto

dd – Duplo dupleto

ddd – Dupleto de dupleto de dupleto

CCDA – Cromatografia em Camada Delgada Analítica

DCC – Diclóexilcarbodiimida

DMAP - 4-(dimetilamino)-piridina

DCU – Diclóhexiureia

DMSO – Dimetilsulfóxido

DEAD – Azodicarboxilato de dietila

Et₃N – Trietilamina

Hz – Hertz

IV – Infravermelho

J – Constante de Acoplamento

m – Multiplete

MHz – Megahertz

mL – mililitro

ppm – Partes por milhão

Ph₃P – Trifenilfosfina

q – Quarteto

quint - Quinteto

RMN ¹³C: Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze

RMN ¹H: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

s – Singleto

sex – Sexteto

sept - Septeto

SN2 – Substituição nucleofílica bimolecular

t – Tripleto

THF – Tetrahidrofurano

δ – Deslocamento químico em ppm

SUMÁRIO

1.0. INTRODUÇÃO	21
2.0 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	23
2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE FUNGOS	23
2.1.1. O gênero <i>Candida</i> e a Candidíase	23
2.1.2. Tratamento de infecções causadas por <i>Candida</i> spp. e resistência aos antifúngicos disponíveis	25
2.2. DERIVADOS BENZOICOS COM POTENCIAL ANTIMICROBIANO	28
2.3. O ÁCIDO 3-METIL-4-NITROBENZOICO E COMPOSTOS RELACIONADOS.....	29
2.4. PROPRIEDADES GERAIS DOS ÉSTERES	31
2.4.1. Reações para obtenção de ésteres.....	32
2.5. RELAÇÃO ENTRE ESTRUTURA QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA	40
3.1 OBJETIVO GERAL.....	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1. ETAPA DE PREPARAÇÃO DOS ÉSTERES DERIVADOS DO ÁCIDO 3-METIL-4-NITROBENZOICO	43
4.2. ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA DOS ÉSTERES PREPARADOS.....	47
4.2.1. Espectroscopia de Infravermelho	47
4.2.2. Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C	48
4.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ÉSTERES PREPARADOS	54
5.0. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	63
6.1. MATERIAIS E MÉTODOS UTILIZADOS	65
6.1.2. Métodos cromatográficos	65
6.1.3. Métodos espectroscópicos	65
6.1.3.1. Ressonância Magnética Nuclear	65
6.1.3.2. Espectroscopia de Infravermelho	66
6.1.3.3. Espectrometria de Massas de Alta Resolução	66
6.1.4. Ponto de Fusão	66
6.2.1. Preparação dos ésteres AR1 a AR5	68
6.2.1.1. Dados espectroscópicos de AR1 a AR5.....	69

• AR1: 3-metil-4-nitrobenzoato de metila	69
• AR2: 3-metil-4-nitrobenzoato de etila	70
• AR3 – 3-metil-4-nitrobenzoato de propila	70
• AR4: 3-metil-4-nitrobenzoato de isopropila	71
• AR5: 3-metil-4-nitrobenzoato de 2-metoxietila	71
6.2.2. Preparação dos ésteres AR6 a AR9	72
6.2.2.1. Dados espectroscópicos dos ésteres AR6-AR9	73
• AR6: 3-metil-4-nitrobenzoato de pentila	73
• AR7: 3-metil-4-nitrobenzoato de difenilmetila.....	74
• AR8: 3-metil-4-nitrobenzoato de 4-cloro-benzila	75
• AR9: 3-metil-4-nitrobenzoato de 2-metil-naftalenila	75
6.2.3. Preparação do éster AR10	76
6.2.3.1. Dados espectroscópicos do éster AR10.....	77
• AR10: 3-metil-4-nitrobenzoato de benzila	77
6.2.4. Preparação do éster AR11	78
• AR11: 3-metil-4-nitrobenzoato de (+)-bornila	79
5.3.1. Local de Trabalho	80
6.3.2. Produtos testados	80
6.3.3. Meio de cultura	80
6.3.4. Microrganismos	80
6.3.5. Ajuste do Inoculo	81
6.3.6. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos produtos testados	81
6.3.7. Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos produtos testados.....	82
ESPECTROS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
REFERÊNCIAS	110

1.0. INTRODUÇÃO

Infecções fúngicas severas são importantes causas de mortalidade em todo o mundo. Espécies de fungos patogênicos infectam bilhões de pessoas anualmente. Além disso, os avanços no campo da medicina, de diagnóstico e tratamento de diversas enfermidades, aumentaram a taxa de cura de pacientes e também a sobrevivência de indivíduos imunocomprometidos, elevando consideravelmente a incidência de infecções fúngicas oportunistas (BROOKS *et al.*, 2013 p. 672; EDDOUZI *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2017).

Infecções oportunistas são extremamente frequentes em ambientes hospitalares; estão associadas ao aumento no tempo de internação e a altas taxas de mortalidade. Entre os principais fungos patógenos oportunistas, destacam-se as leveduras do gênero *Candida*, causadoras de uma ampla variedade de infecções, desde superficiais a invasivas, em diversos sítios anatômicos (LI *et al.*, 2017; SZE *et al.*, 2014).

A dificuldade no tratamento de infecções fúngicas é a limitação da terapêutica devido ao crescente aparecimento de cepas de espécies fúngicas resistentes aos agentes antimicrobianos disponíveis. O uso prolongado, incorreto e muitas vezes desnecessário dessa classe de medicamentos, tanto em ambiente doméstico como em ambiente hospitalar, favorece a excessiva exposição dos mesmos aos microrganismos, que dessa forma, são capazes de desenvolver mecanismos de resistência (PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017; MARSTON, *et al.*, 2016).

Perante essa problemática, diversas pesquisas estão direcionadas à procura de moléculas bioativas, frente a fungos patógenos de humanos, que possam ser utilizadas em estudos direcionados ao desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos. Os compostos orgânicos provenientes de fontes naturais estão constantemente envolvidos nessa busca. Incontáveis metabólitos secundários são associados a diversas atividades biológicas, bem como aplicados em estudos de síntese orgânica (como modelos estruturais) que objetivam a otimização da bioatividade através de alterações na estrutura química e nas propriedades físico-químicas (BARREIRO; BOLZANI, 2009; BURNHAM *et al.*, 2017; PERLIN;

RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017; SPAMPINATO; LEONARDI, 2013).

Derivados do ácido benzoico podem ser facilmente encontrados na natureza, na forma de ácidos livres, substiuidos, esterificados, ou ainda fazendo parte de moléculas maiores e mais complexas. Estudos relatam que sua produção, pelas plantas, é aumentada durante infecções por fungos e/ou bactérias. Também possuem larga aplicação na indústria química e de produtos farmacêuticos, onde são utilizados como conservantes antimicrobianos. Dessa forma, as propriedades químicas e de bioatividade de derivados benzoicos e compostos relacionados vêm sendo cada vez mais estudadas (AMBORABÉ *et al.*, 2002; BERNE *et al.*, 2015; LÓPEZ; MING; TOWERS, 2002; OLMO; CALZADA; NUÑEZ, 2015; ŚWISŁOCKA *et al.*, 2013).

Arelado a isso, no projeto de mestrado de NASCIMENTO (2017), realizado no Laboratório de Química Farmacêutica da UFPB, foram identificados derivados do ácido o-nitrocínâmico esterificados com cadeias carbônicas alquílicas e arílicas que apresentaram potencial antimicrobiano, bioativos frente a cepas do gênero *Candida*: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, com concentrações inibitórias mínimas de ótimas a moderadas; esse potencial foi atribuído ao grupo nitro, que tem a capacidade de ampliar a atividade antimicrobiana dos derivados que o possuem, e às variações ocorridas nas cadeias laterais.

Levando em consideração a importância do grupo nitro para essa bioatividade e a influência da variação da cadeia carbônica lateral; o presente projeto de pesquisa foi proposto com o objetivo preparar derivados esterificados do ácido 3-metil-4-nitrobenzoico e avaliar a capacidade antifúngica dos mesmos, frente a cepas de espécies do gênero *Candida*, e estabelecer quais as características químicas estruturais foram determinantes ou significativas para a bioatividade.

2.0 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Considerações gerais sobre fungos

Fungos são microrganismos eucarióticos, leveduriformes ou filamentosos; adaptam-se a condições diversas e são encontrados em praticamente todos os ambientes. Na natureza, são importantes para o equilíbrio ecológico, são os principais degradadores do material orgânico depositado, através do qual obtêm seus nutrientes; vivem em simbiose com outros seres vivos e podem parasitar plantas e animais (BROOKS *et. al*, 2013; p. 671-672).

Existem fungos classificados como patógenos verdadeiros para o homem. Há também espécies que são agentes de infecções oportunistas, ou seja, que ocorrem na microbiota normal de tecidos humanos saudáveis, mas em indivíduos que apresentam o sistema imunológico comprometido, tais fungos multiplicam-se e invadem tecidos e órgãos, produzindo um quadro infeccioso. Esse tipo de infecção tem ganhado atenção e importância por parte de instituições de assistência à saúde devido ao aumento significativo da sua frequência nos últimos anos, são causas de altas taxas de morbidade e mortalidade em ambiente hospitalar; no que diz respeito às infecções oportunistas causadas por fungos, as leveduras do gênero *Candida* estão entre os principais agentes etiológicos envolvidos (BROOKS *et. al*, 2013; p. 671; GUINEA, 2014; LI *et al.*, 2017).

2.1.1. O gênero *Candida* e a Candidíase

O gênero *Candida* contém cerca de 200 espécies de fungos caracterizados como leveduriformes, ou seja, apresentam estrutura morfológica ovalada (blastocónídeos). No organismo humano saudável, espécies de *Candida* fazem parte da microbiota normal das mucosas oral, gastrointestinal e do trato genitourinário. A candidíase é o termo dado ao conjunto de infecções oportunistas causadas pelas leveduras do gênero. A gravidade com a qual o quadro infeccioso desenvolve-se depende dos fatores de virulência da espécie envolvida e, sobretudo da suscetibilidade do organismo (BARBEDO; SGARBI, 2010; PEIXOTO *et al.*, 2014).

A candidíase ocorre mais frequentemente de maneira endógena, quando as leveduras da microbiota mudam sua condição de comensal para patogênica;

mediante alterações nas defesas imunológicas do hospedeiro, devido à terapia com antibióticos de amplo espectro (causa modificações na flora bacteriana das mucosas) ou pelo comprometimento de barreiras anatômicas através de queimaduras ou procedimentos cirúrgicos invasivos, por exemplo. Também ocorrem os casos de infecções exógenas, nos quais os microrganismos são transmitidos de uma pessoa a outra ou adquiridos a partir do ambiente e de objetos inanimados. As espécies de *Candida* conseguem aderir-se a materiais médico-hospitalares e formarem biofilmes inclusive, o que lhes proporciona características diferenciadas e resistência à antifúngicos (BRÜHWASSER *et al.*, 2016; PEIXOTO *et al.*, 2014; SANGUINETTI; POSTERARO; LASS-FLORL, 2015; SILVA *et al.*, 2012).

Com relação aos atributos de virulência, espécies de *Candida* apresentam adesinas na sua parede celular para adesão às células das mucosas, lipases e proteinases que estão envolvidas na invasão tecidual, produzem metabólitos que desencadeiam processos alérgicos e, algumas espécies, tem a capacidade de formar hifas verdadeiras ou pseudohifas durante o crescimento, o que dificulta a fagocitose dos microrganismos pelas células do hospedeiro (BROOKS *et al.*, 2013; KARKOWSKA-KULETA; RAPALA-KOZIK; KOZIK, 2009; SILVA *et al.*, 2012).

Considerando a questão da suscetibilidade do organismo; em indivíduos saudáveis, as principais infecções causadas por *Candida* spp. são superficiais, cutâneo-mucosas com acometimento de pele, unhas, mucosa orofaríngea e genital; não são severas e nem frequentes. Mas, pacientes que apresentam o sistema imunológico debilitado por diversas razões, possuem maior chance de desenvolver quadros de candidíase invasiva, o que inclui candidemia, infecções profundas e candidíase disseminada ((DAVIDSON; NETEA; KULLBERG, 2018; RIBEIRO *et al.*, 2015).

Os casos de candidíase invasiva podem resultar de disseminação hematogênica ou inoculação da cepa em um sítio corporal estéril. A candidemia é causa de altas taxas de mortalidade em ambiente nosocomial; a maioria das manifestações de candidíase (com cultura sanguínea negativa) em músculos, ossos, olhos e sistema nervoso central, por exemplo, é decorrente de uma candidemia não diagnosticada; a mesma está entre as infecções da corrente sanguínea mais frequentes em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), configurando-se, dessa forma, como um sério problema de saúde em hospitais de todo o mundo (CAMPION;

KULLBERG; ARENDRUP, 2015; DAVIDSON; NETEA; KULLBERG, 2018; GUINEA, 2014; MCCARTY; PAPPAS, 2015).

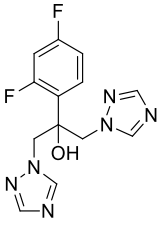
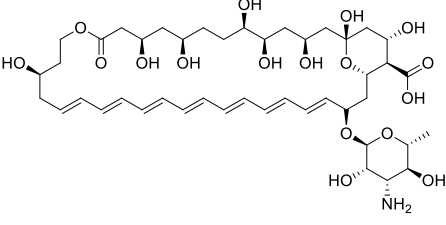
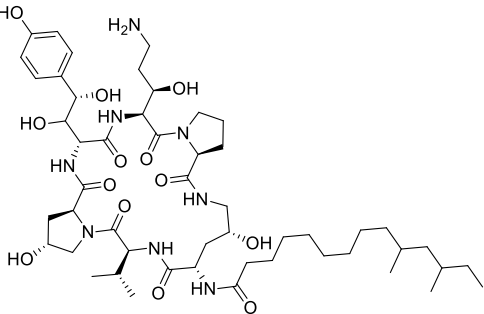
As espécies de *Candida* de maior importância clínica são *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*; *C. guilliermondii* é considerada um patógeno emergente. As infecções por *C. albicans* ainda são as mais frequentes; no entanto, tem se observado nos últimos anos, o aumento da incidência de infecções causadas por cepas das outras espécies mencionadas, denominadas de não-*C. albicans* (OLIVGERIS; SPILIOPOULOU; FLIGOU, 2017; SADEGHI *et al.*, 2018; WHIBLEY; GAFFEN, 2015).

O estudo de Lima e colaboradores (2017) realizado em um hospital universitário no Mato Grosso do Sul (entre 2011 e 2012) mostrou que as espécies não-*C. albicans* foram predominantes em infecções fúngicas do trato urinário de pacientes hospitalizados (60,4% dos pacientes). Ashong *et al.* (2017) relata que altas taxas de mortalidade por candidemia (entre 31% e 44%) são, entre outros fatores, decorrentes do envolvimento de espécies mais resistentes como *C. glabrata* e *C. krusei*. (ASHONG *et al.*, 2017; OLIVGERIS; SPILIOPOULOU; FLIGOU, 2017; TAIRA *et al.*, 2017; WHIBLEY; GAFFEN, 2015).

2.1.2. Tratamento de infecções causadas por *Candida* spp. e resistência aos antifúngicos disponíveis

As principais classes de antifúngicos utilizadas para tratamento de infecções causadas por *Candida* spp. são as seguintes: azólicos (fluconazol e voriconazol), equinocandinas (anidulafungina, caspofungina e micafungina) e poliênicos (anfotericina B e nistatina); suas estruturas estão representadas na tabela 1, todos os fármacos mencionados exercem sua ação a nível de membrana e parede celular. (COLOMBO *et al.*, 2013; SUI; YAN; JIANG, 2017; ZHOU *et al.*, 2016).

Tabela 1 – Representação da alguns exemplares das classes de antifúngicos utilizadas no tratamento de infecções causadas por *Candida* spp.

Fármaco (classe)	Mecanismo de ação	Usos
 Fluconazol (azóis)	Inibem a 14- α -desmetilase, enzima envolvida na síntese do ergosterol (principal esterol da membrana fúngica), resulta na alteração da fluidez da membrana.	Antifúngicos da classe dos azólicos estão disponíveis para uso tópico, oral e intravenoso.
 Anfotericina B (polieno)	Liga-se à membrana fúngica; apresenta predileção pelo ergosterol; leva a formação de poros membranares que resultam em ruptura.	Apenas para administração endovenosa. Aplicação em candidíase invasiva.
 Caspofungina (equinocandina)	Inibe a β -1,3-glucano sintase, enzima responsável por sintetizar o β -1,3-glucano, principal polissacarídeo da parede celular fúngica. Resulta em ruptura da parede celular.	As equinocandinas são de uso intravenoso, indicadas para candidíase invasiva.

Fonte: COLOMBO *et al.*, 2013; PERLIN *et al.*, 2015.

Esse arsenal terapêutico é considerado limitado quando se tem em vista o frequente isolamento de cepas clínicas resistentes aos antifúngicos disponíveis e aos graves efeitos adversos causados por alguns fármacos. A anfotericina B, por exemplo, utilizada para candidíase invasiva e administrada apenas de maneira endovenosa, tem o uso restrito devido à nefrotoxicidade decorrente (COLOMBO *et al.*, 2013; MAUBON *et al.*, 2014; MOHAMED; RADWAN; RAAFAT, 2018; SUI; YAN; JIANG, 2017; ZHOU *et al.*, 2016).

No tocante à resistência aos antifúngicos, a mesma pode ser classificada em clínica ou microbiológica. Esta última caracteriza-se pela não suscetibilidade da cepa ao determinado agente antifúngico testado, em ensaios de suscetibilidade *in vitro*, e pode ser intrínseca: a cepa fúngica já é resistente ao fármaco sem ter sido exposta ao mesmo; ou adquirida: nesse caso, cepas da espécie podem desenvolver um mecanismo de resistência (através de alterações genéticas) sendo previamente expostas ao antimicrobiano. A resistência clínica refere-se às infecções fúngicas persistentes, mesmo quando se faz uso do tratamento medicamentoso adequado, isso ocorre por diversos fatores, inclusive devido à debilidade das defesas imunitárias do paciente, redução da biodisponibilidade do fármaco ou aumento do seu metabolismo, por exemplo; vale ressaltar ainda, que a resistência microbiológica contribui para o desenvolvimento da clínica (PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017; SANGUINETTI; POSTERARO; LASS-FLORL, 2015).

A resistência adquirida por *C. glabrata* e a intrínseca de *C. krusei* aos azólicos já são bem conhecidas. Tal classe antifúngica é a de primeira escolha para o início da terapia ou para finalidades profiláticas em pacientes de alto risco (imunocomprometidos, por exemplo), já que os fármacos são relativamente seguros. O que vem sendo observado em estudos epidemiológicos, é o aumento da prevalência de candidíase invasiva causada por cepas de *C. glabrata* e *C. krusei* resistentes ao fluconazol, como consequência do seu uso profilático difundido (LI *et al.*, 2017; PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017).

É importante destacar também, o emergente surgimento de cepas de *Candida* spp. resistentes às equinocandinas, estando atrelado à repetida e prolongada exposição dos agentes dessa classe terapêutica às amostras clínicas das espécies nas últimas décadas. Equinocandinas são recomendadas para pacientes com candidíase, inclusive para tratamento de candidemia; são ativas contra a maioria das espécies do gênero *Candida*, mas menos ativas contra *C. guilliermondii* e *C. parapsilosis*, por exemplo. O desenvolvimento de resistência tem sido reportado para cepas de *C. albicans* e principalmente para as espécies não-*C. albicans*, em especial *C. glabrata* que, somado à resistência aos azólicos, já há isolados clínicos de *C. glabrata* multirresistentes (PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017; PERLIN, 2015).

2.2. Derivados benzoicos com potencial antimicrobiano

Os derivados benzoicos tem sido assunto de muitas investigações no campo científico. Uma das razões para isso é o fato de serem encontrados na natureza, em tecidos de plantas e também de animais. São constituintes estruturais de uma grande quantidade de produtos naturais; desempenham funções importantes nas plantas: regulação do crescimento, defesa, atração de polinizadores, entre outras. Além disso, em estudos anteriores, já foram relacionados à atividade antioxidante, antiinflamatória, citotóxica (em células cancerígenas) e também antimicrobiana (BANTI *et al.*, 2014; BERNE *et al.*, 2015; HUSEIN, ZATAR, ALI-SHTAYEH, 2014; KRÁTKÝ; VINŠOVÁ; BUCHTA, 2012; NGUYEN *et al.*, 2015; QUALLEY *et al.*, 2012; REFAAT *et al.*, 2015; XU; CHANG, 2010).

Dando maior ênfase ao potencial antimicrobiano de derivados benzoicos, alguns estudos são encontrados na literatura. Kim e colaboradores (2010) verificaram a capacidade antifúngica de análogos substituídos do ácido benzoico contra *Aspergillus* spp. No mesmo estudo também foi observado que esterificações de um ácido benzoico (ácido gálico) com grupos alquila (metila, etila, propila, octila, decila) foi interessante para a melhor bioatividade dos derivados esterificados.

A capacidade antibacteriana da própolis iraniana demonstrada no estudo de Trusheva e colaboradores (2010) frente *Staphylococcus aureus*, é decorrente da presença de ésteres benzoicos, entre outras substâncias. O *p*-hidroxibenzoato de bornila foi identificado como um dos compostos que apresentou melhor bioatividade. Popova e colaboradores (2011) também observaram a capacidade antifúngica, frente *Candida albicans*, de ésteres terpênicos de ácidos benzoicos substituídos constituintes da própolis do mediterrâneo.

Carta e colaboradores (2011) observaram a capacidade inibitória de alguns ácidos benzoicos e derivados esterificados, frente à anidrase carbônica presente em alguns fungos patogênicos como *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Cryptococcus neoformans*, com o objetivo de encontrar algum mecanismo de ação antifúngica. O derivado do ácido 4-nitrobenzoico esteve entre as substâncias que mostraram boa atividade inibitória das enzimas de *C. albicans* e *C. neoformans*.

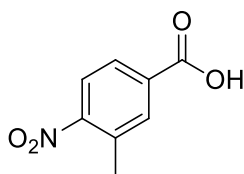
No estudo de Krátky e colaboradores (2015), salicilanilidas foram esterificadas com ácidos benzoicos *p*-substituídos e testados frente cepas de *Mycobacterium*.

Mycobacterium tuberculosis apresentou maior suscetibilidade ao derivado esterificado com o ácido 4-nitrobenzoico (CIM=0,5 µM); a mesma molécula também inibiu o crescimento de *M. avium* (CIM ≤ 21 µM) e *M. kansasii* (CIM ≤ 1 µM); os autores reportaram a relevância do grupo nitro, como sendo um possível grupo farmacofórico para a atividade antimicobacteriana.

2.3. O ácido 3-metil-4-nitrobenzoico e compostos relacionados

O ácido 3-metil-4-nitrobenzoico (figura 1) é um derivado benzoico dissustituído. É considerado um produto químico de grande interesse, obtido através de processos sintéticos. É utilizado em diversos estudos como precursor na obtenção de moléculas bioativas (WU *et al.*, 2016).

Figura 1 – Estrutura química do ácido 3-metil-4-nitrobenzoico



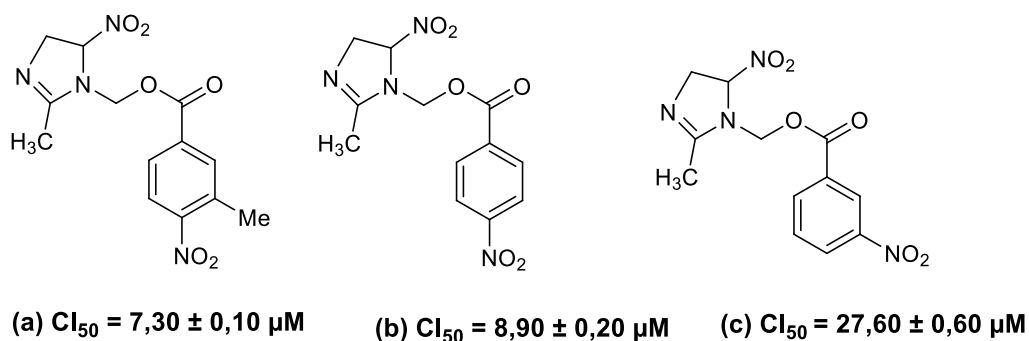
Fonte: Adaptado de WU *et al.*, 2016.

Na indústria farmacêutica o ácido 3-metil-4-nitrobenzoico está inserido em pesquisas de síntese de substâncias com potencial atividade anti-câncer e de drogas que possam ser utilizadas na AIDS, por exemplo; além de ser um intermediário na síntese do telmisartan (farmaco anti-hipertensivo, antagonista do receptor da angiotensina II) (CHAO *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2012; MOCCI *et al.*, 2016; WU *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2017).

Em um estudo realizado por SALAR e colaboradores (2017); um derivado do ácido 3-metil-4-nitrobenzoico esterificado com uma porção nitroimidazólica (figura 2a), foi um dos compostos mais potentes (CI₅₀ = 7,30 ± 0,10 µM) na inibição da β-glicuronidase, enzima presente em bacteroides anaeróbicos, no gênero *Clostridia* e *Escherichia*. No estudo, vários ésteres foram sintetizados, utilizando o metronidazol e ácidos aromáticos com diferentes padrões de substituição. Entre os resultados, além de observar que o composto (a) da figura 2 foi um dos mais potentes, os autores chamaram atenção para a influência dos substituintes aromáticos na

atividade inibitória das moléculas. Destacaram que a ausência do grupo metila no anel aromático (figura 2b) ocasiona uma ligeira diminuição na atividade inibitória e que a modificação da posição do grupo nitro de *para* para *meta* (figura 2c) diminuiu consideravelmente a atividade, demonstrando a relevância de tal grupo para a otimização da bioatividade.

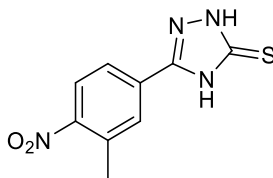
Figura 2 – Derivados esterificados sintetizados com atividade inibitória da enzima β -glicuronidase.



Fonte: Adaptado de SALAR *et al.*, 2017.

A molécula representada na figura 3 também foi sintetizada a partir do ácido 3-metil-4-nitrobenzoico. A mesma mostrou-se bioativa frente aos estágios inativo e ativado de *Micobacterium tuberculosis* no estudo de SONAWANE e colaboradores (2016), no qual foram sintetizados uma série de derivados triazólicos utilizando diferentes ácidos benzoicos como precursores. Os autores enfatizaram a importância da presença do grupo nitro como uma espécie elétron-retiradora para a melhor bioatividade do composto.

Figura 3 – Derivado triazólico sintetizado a partir do ácido 3-metil-4-nitrobenzoico



Fonte: Adaptado de SONAWANE *et al.*, 2017.

Considerando a relevância que foi dada ao grupo nitro ($-NO_2$) nos estudos apresentados, é importante destacar que atualmente tem-se conhecimento de um vasto número de substâncias bioativas contendo este substituinte na sua estrutura (nitrocompostos), inclusive produtos de origem natural, isolados de plantas, fungos,

bactérias e mamíferos. Estes compostos apresentam alta diversidade estrutural e um amplo leque de atividades biológicas, tais como: antibacteriana, antifúngica, antiparasitária, antitumoral, bem como envolvimento em sinalização celular (FRIES *et al.*, 2011; PARRY, 2011; WINKLER; HERTWECK, 2007).

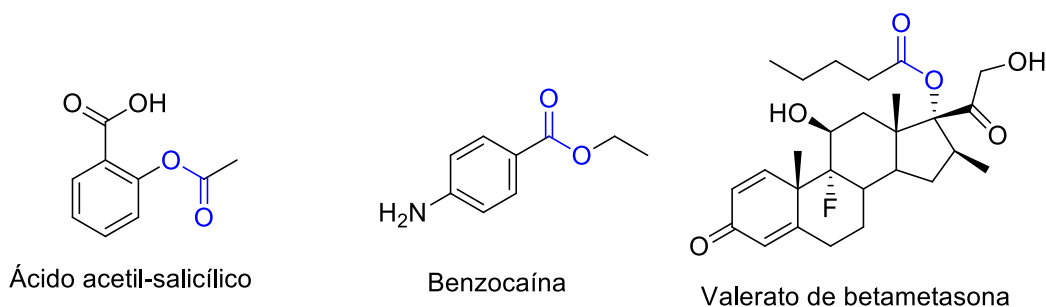
Segundo PAULA *et. al*, 2009, como o -NO_2 tem forte caráter aceptor de elétrons (espécie elétron-retiradora), ele tem uma capacidade redutora que, no interior das células de bactérias, fungos e parasitas, resulta na formação de radicais livres que interagem com as biomoléculas essenciais à sobrevivência do microrganismo, causando danos por estresse oxidativo.

2.4. Propriedades gerais dos ésteres

Ésteres (R-COO-R') classificam-se como compostos orgânicos oxigenados derivados de ácidos carboxílicos. São frequentemente encontrados na natureza, estando associados ao odor agradável de flores, frutos e óleos vegetais; também fazem parte da composição de gorduras animais (ésteres graxos) (RIEMENSCHNEIDER; BOLT, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Os ésteres possuem vasta aplicabilidade no setor industrial: utilizados como intermediários em síntese orgânica, na fabricação de tecidos (poliéster), de tintas (éster polivinílico), plastificantes, fibras, filmes fotográficos (politereftalato de etileno, acetato de celulose); utilizados na indústria alimentícia como flavorizantes de bebidas e alimentos (LIU *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Também há aplicações da referida classe química no campo farmacêutico. Ésteres são utilizados no revestimento de cápsulas e também fazem parte da composição química de vários princípios ativos. Dando como exemplo: o ácido acetil-salicílico (anti-inflamatório não esteroide, analgésico, antipirético), sintetizado a partir da esterificação de uma hidroxila aromática do ácido salicílico; a benzocaína (anestésico local) e valerato de betametasona (anti-inflamatório esteroide). As estruturas químicas dos fármacos estão representadas na figura 4 (MORAES CALVALCANTE *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

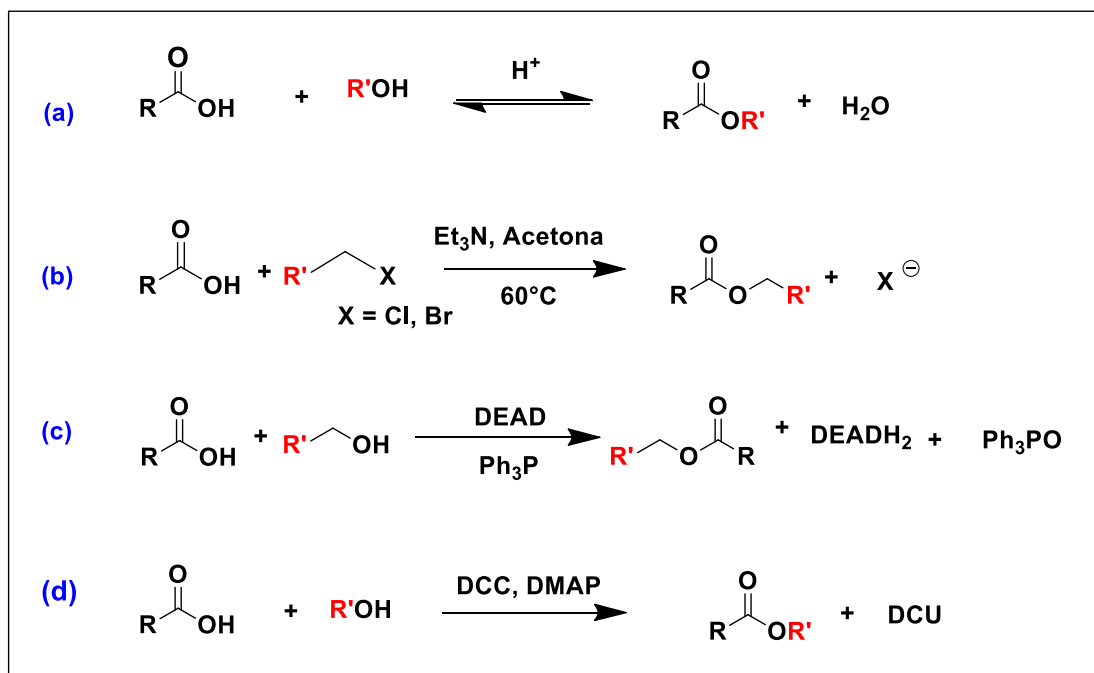
Figura 4 – Exemplos de fármacos que possuem em sua estrutura a função éster.

Fonte: Adaptado de (OLIVEIRA *et al.*, 2014; VIEGAS *et al.*, 2006).

Com relação as suas propriedades físico-químicas; ésteres de baixo peso molecular normalmente são incolores, altamente voláteis e possuem aroma agradável. À medida que a massa molecular aumenta, a volatilidade é reduzida e a substância pode apresentar-se como um sólido. Geralmente, o ponto de ebulição de ésteres é menor do que o de um ácido carboxílico ou de um álcool de peso molecular semelhante, visto que as moléculas do éster perdem o hidrogênio ligado ao oxigênio e não consegue fazer interações de hidrogênio fortes entre si. São compostos de baixa polaridade, solúveis em muitos solventes orgânicos e insolúveis em água, com exceção dos ésteres provenientes de ácidos carboxílicos e álcoois de cadeia curta (RIEMENSCHNEIDER; BOLT, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2014; SOLOMON; FRYHLE, 2012 p. 797, 798).

2.4.1. Reações para obtenção de ésteres

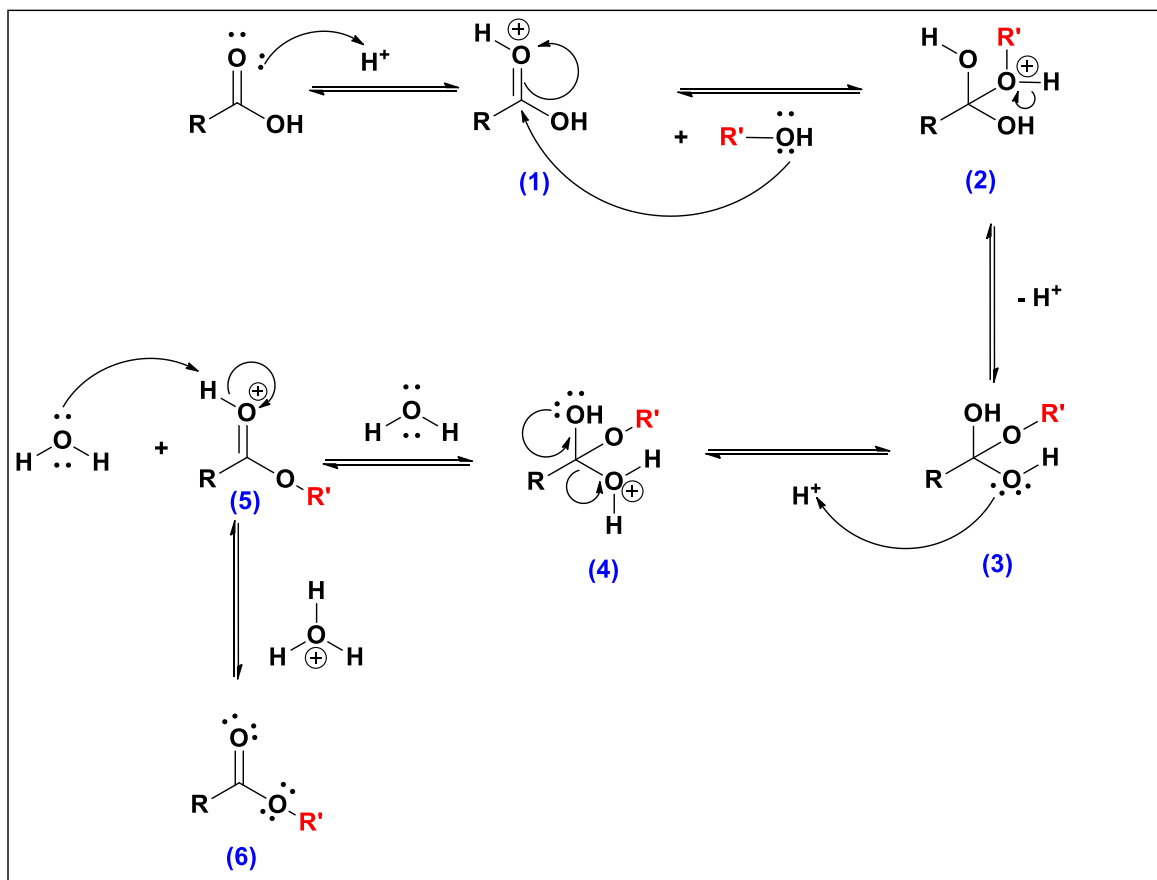
Levando em consideração a importância, ubiquidade e aplicabilidade da função química éster, o desenvolvimento de novas metodologias para o preparo dessas substâncias é objetivo de muitos estudos, dessa forma, existem diversos procedimentos de esterificação. No esquema 1 estão representadas algumas reações para tal finalidade (LIU *et al.*, 2014).

Esquema 1 – Reações para síntese de ésteres.

(a) Esterificação de Fischer; (b) Esterificação com haletos; (c) Reação de Mitsunobu; (d) Reação de Steglich. (Adaptado de: BATOVSKA, 2005; SOLOMONS; FRYHLE, 2012 p. 797; LI *et al.*, 2012a; NEISES; STEGLICH, 1978).

O método mais conhecido para obtenção de ésteres foi desenvolvido por Emil Fischer e Arthur Speier em 1895, é conhecido como esterificação de Fischer (esquema 1-a) e ocorre entre um ácido carboxílico e um álcool, sob aquecimento e na presença de um ácido forte como catalisador (esterificação catalisada por ácido) (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Trata-se de uma reação reversível que, nas condições descritas, atinge o equilíbrio em poucas horas e dessa forma, para se obter um melhor rendimento, desloca-se o equilíbrio para a formação dos produtos, adicionando um dos reagentes em excesso ou retirando a água que vai sendo formada (utilizando um agente desidratante ou uma vidraria chamada dean-stark). O mecanismo proposto para a esterificação de Fischer pode ser observado no esquema 2 (OLIVEIRA *et al.*, 2014; SOLOMONS, FRYHLE, 2012 p. 797-799).

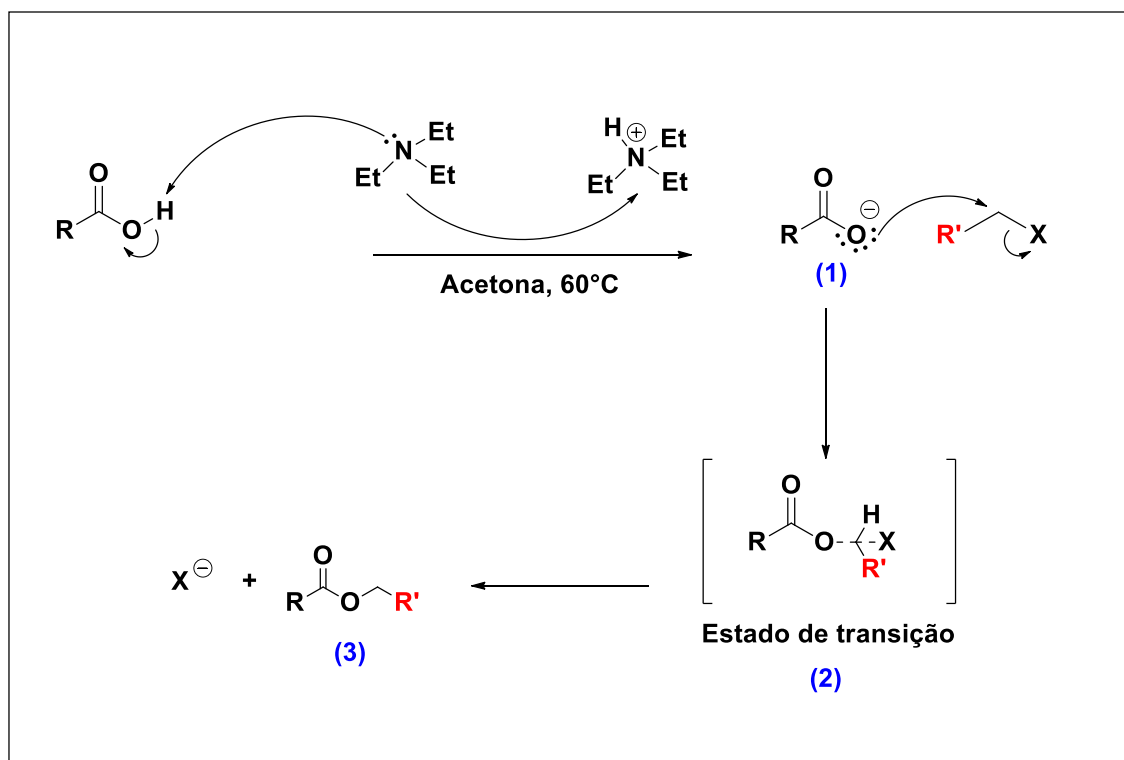
Esquema 2 – Mecanismo da esterificação de Fischer.

Fonte: Adaptado de SOLOMONS; FRYHLE, 2012 p. 798.

A esterificação de Fischer é uma reação de substituição em carbono acílico (dois passos: adição nucleofílica seguida de eliminação). Como pode ser observado no esquema 2. Primeiramente, ocorre a protonação do oxigênio carbonílico **(1)** fazendo com que o par de elétrons da ligação dupla $C=O$ desloque-se para esse oxigênio tornando o carbono acílico mais reativo, com caráter eletrofílico, o que facilita o ataque feito em seguida pelo álcool, gerando um intermediário tetraédrico **2**. Em **2**, o oxigênio positivamente carregado perde um próton para o meio gerando o intermediário **3**. Uma das hidroxilas de **3** capta o próton do meio ácido, formando uma molécula de água ligada ao carbono acílico **(4)**. A molécula de água é um bom grupo abandonador, assim, com a saída da mesma, a hidroxila compartilha um par de elétrons com o carbono, reestabelecendo a carbonila **(5)**, o que contribui para a perda do próton pelo oxigênio, regenerando o meio ácido e formando o éster **(6)** (SOLOMONS; FRIHLE, 2012 p. 798).

No segundo método de esterificação (esquema 1-b), o ácido carboxílico reage com haletos, através de uma substituição nucleofílica bimolecular (S_N2). Esse tipo de reação ocorre preferivelmente em carbonos primários, devido ao menor impedimento estérico, fato de substratos primários não formarem carbocátions estáveis favorece a via S_N2 . Esta também ocorre em carbonos secundários só que com maior dificuldade. O meio aprótico é o ideal para evitar a solvatação do nucleófilo. Haletos são interessantes para reações de substituição com nucleófilos porque, na ligação carbono-halogênio, o halogênio é mais eletronegativo do que o carbono, ficando com a maior densidade eletrônica, o que deixa o carbono com caráter eletrofílico, podendo sofrer o ataque do nucleófilo. O mecanismo está representado no esquema 3 (BOECK *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2012a; MUSKAWAR *et al.*, 2014).

Esquema 3 – Esterificação do ácido carboxílico com haletos.



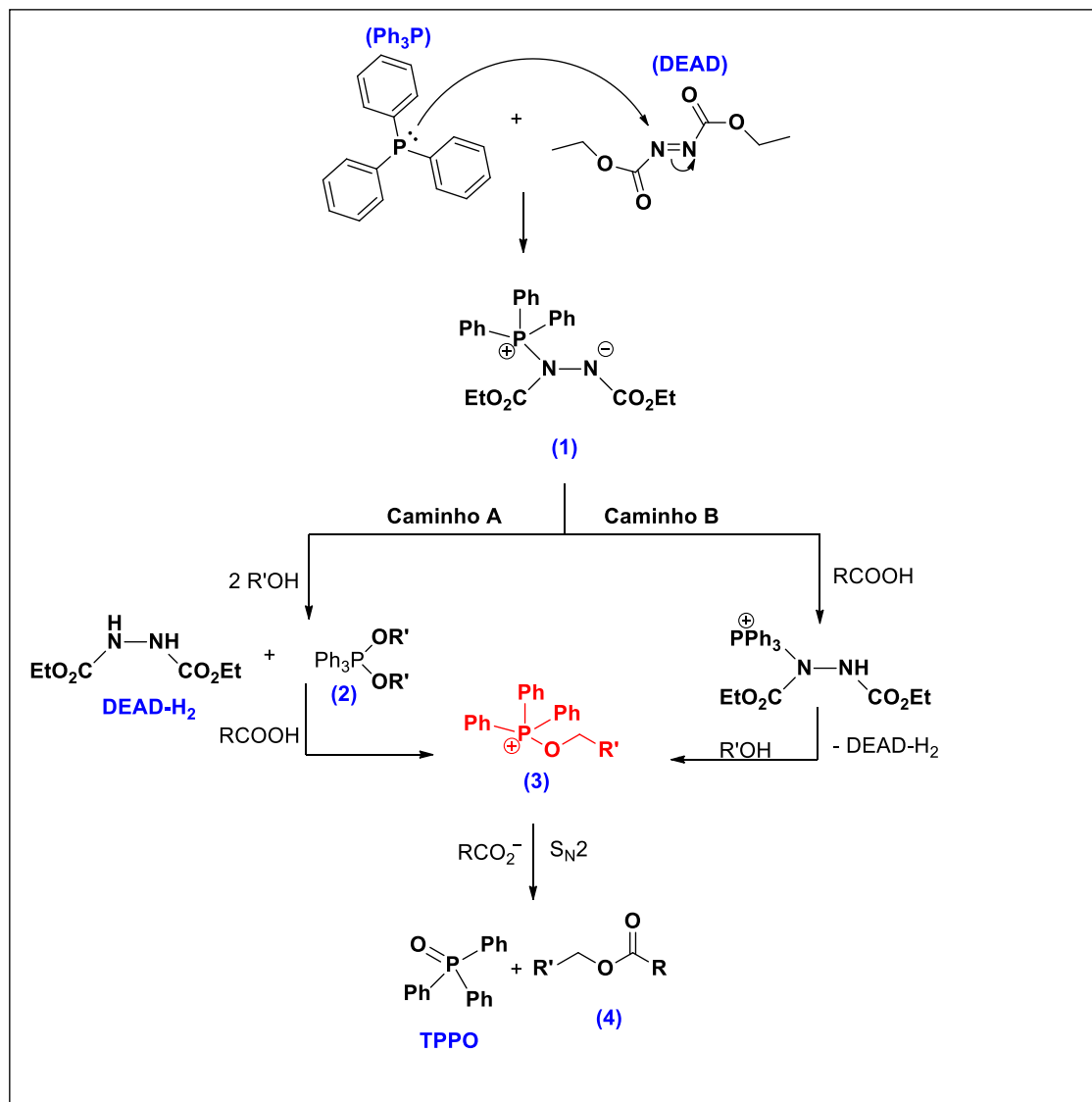
Fonte: Adaptado de LI *et al.*, 2012a, MUSKAWAR *et al.*, 2014.

A substituição nucleofílica bimolecular ocorre em uma única etapa, sem a formação de intermediários carbocátions. Como visto no esquema 3; o ácido carboxílico é desprotonado pela trietilamina, adquirindo caráter nucleofílico (1). O

nucleófilo formado ataca o carbono do haleto pelo lado oposto ao grupo abandonador levando ao estado de transição **(2)** em que a entrada do grupo nucleofílico ocorre de forma simultânea à saída do halogênio (grupo abandonador), resultando na formação do éster **(3)** (BOECK *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2012a; MUSKAWAR *et al.*, 2014).

Ésteres também são preparados pela reação de Mitsunobu (esquema 1-c). Metodologia primeiramente descrita por Oyo Mitsunobu em 1967 e muito aplicada atualmente para síntese de ésteres arílicos, cíclicos, tionoésteres, para a formação de ligações carbono-carbono, carbono-nitrogênio, entre outras. Nesse tipo de reação ocorre um acoplamento desidratante entre um álcool primário ou secundário e um nucleófilo (obtido a partir do ácido carboxílico) mediado pela reação de um agente oxidante do tipo azo, o mais comum é o azodicarboxilato de dietila (DEAD), com um reagente redutor do tipo fosfina, a exemplo da trifenilfosfina (Ph_3P); sob condições suaves a neutras, à temperaturas de 0°C à ambiente. Os solventes frequentemente utilizados são tetrahidrofurano (THF), éter dietílico, diclorometano e tolueno. No esquema 4 está o mecanismo da reação fundamentado na literatura (CAMP; ITZSTEIN; JENKINS, 2015; YUEN; BUT; TOY, 2007).

Inicialmente ocorre o ataque nucleofílico da trifenilfosfina ao DEAD originando o intermediário **1**, chamado de betaína. O intermediário **1** pode passar por duas vias mecanísticas. No caminho **A**, a betaína (**1**) reage, por meio de uma reação ácido-base, com uma molécula de álcool abstraindo um próton e gerando um alcóxido que, em uma segunda etapa, realiza um ataque ao grupo fosfórico que está carregado positivamente. Esse processo se repete para a geração do DEAD- H_2 e do intermediário **2** que, estando em meio ácido (RCOOH), libera uma molécula de álcool e o derivado alcóxifosfônio **3**. No caminho **B**, a betaína (**1**) inicialmente abstrai um próton do ácido (RCOOH) e quando em contato com o álcool elimina DEAD- H_2 e forma o derivado **3**. O intermediário **3**, via $\text{S}_{\text{N}}2$, reage com o carboxilato, gerando o éster **(4)** e **TPPO** (CAMP; ITZSTEIN; JENKINS, 2015; YUEN; BUT; TOY, 2007).

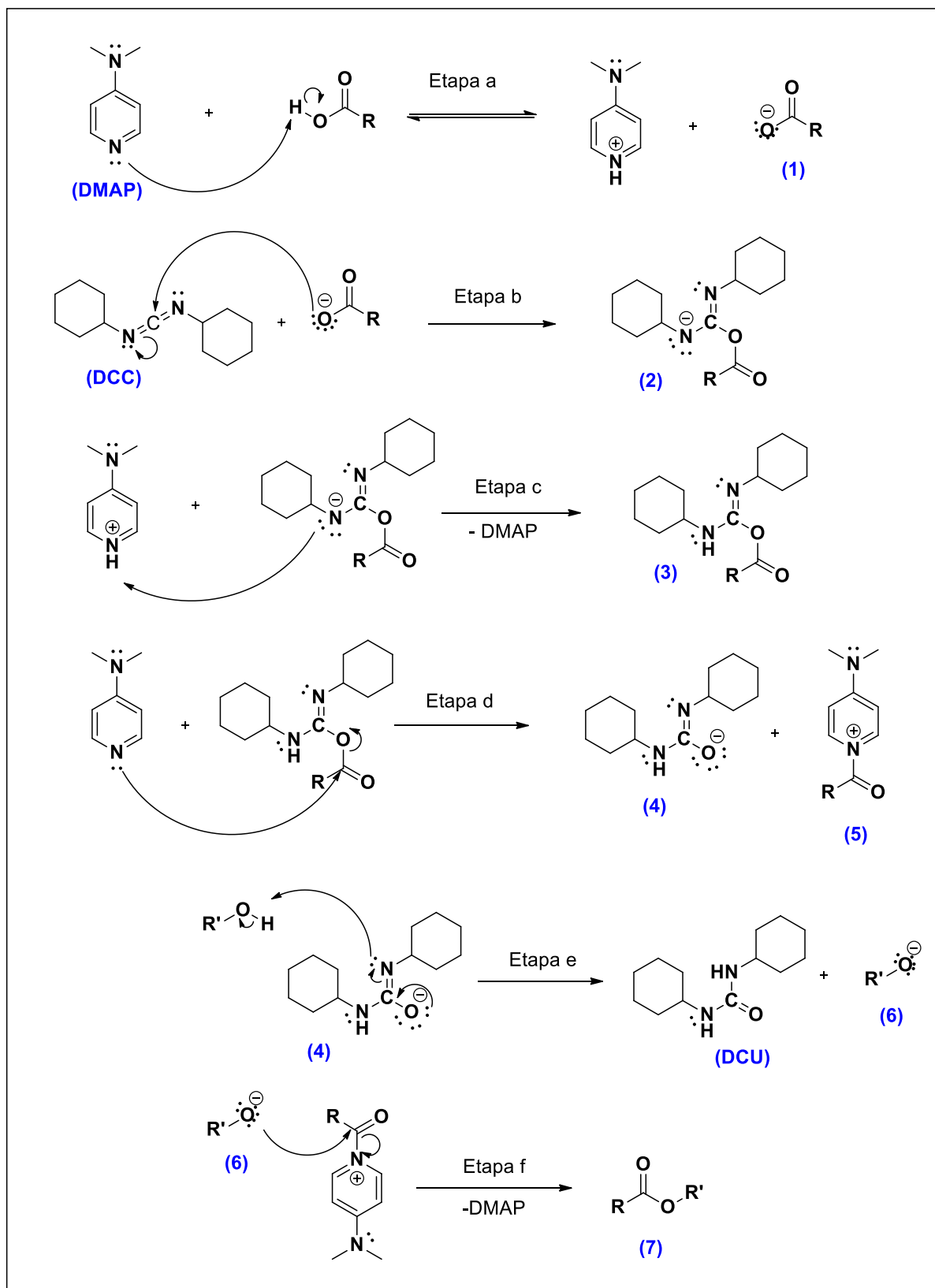
Esquema 4 – Mecanismo da reação de Mitsunobu para síntese de ésteres.

Fonte: Adaptado de: (CAMP; ITZSTEIN; JENKINS, 2015; YUEN; BUT; TOY, 2007).

O último método destinado à preparação de ésteres mostrado no esquema 1-d é a reação de Steglich, que foi desenvolvida por Wolfgang Steglich e Bernhard Neises em 1978, amplamente utilizada para esterificações e amidações. Para tal, é necessário o uso de um catalisador nucleofílico conhecido como 4-(dimetilamino)-piridina (DMAP) e a diciclohexilcarbodiimida (DCC) como agente de acoplamento. O solvente usual é o diclorometano e as condições empregadas são agitação e temperatura ambiente. (GILLES *et al.*, 2015; STEGLICH; NEISES, 1978).

De acordo com o mecanismo representado no esquema 5, na **etapa a** ocorre uma reação ácido-base entre o DMAP (base) e o ácido carboxílico, resultando no

ácido conjugado do DMAP e no nucleófilo **1**. Este realiza um ataque nucleofílico ao carbono central da estrutura do DCC (**etapa b**) que apresenta caráter eletrofílico devido a proximidade aos dois nitrogênios, assim o par de elétrons da ligação C=N vai para o nitrogênio (**2**) que, dessa forma, abstrai um próton do ácido conjugado do DMAP o que reestabelece o catalisador da reação e gera o intermediário **3**. Na **etapa d**, o DMAP realiza uma adição ao carbono da carbonila de **3** formando o intermediário **4** e o grupo acila (**5**). Na **etapa e**, o intermediário **4** abstrai um próton do álcool utilizado formando o grupo alcóxido (**6**) e a diciclohexiureia (**DCU**) que é o subproduto da reação pouco solúvel em diclorometano. Na última etapa mecanística (**etapa f**) o alcóxido (**6**) realiza o ataque ao carbono da carbonila de **5**, eliminando o DMAP e formando o éster (**7**) (GILLES *et al.*, 2015; STEGLICH; NEISES, 1978).

Esquema 5 – Mecanismo da esterificação pela reação de Steglich (DCC/DMAP).

Fonte: Adaptado de (GILLES *et al.*, 2015; STEGLICH; NEISES, 1978).

2.5. Relação entre estrutura química e atividade biológica

Diversas pesquisas desenvolvidas no campo da química medicinal estudam os efeitos que determinadas alterações realizadas na estrutura química de um composto modelo terão sobre a sua atividade biológica, na interação com biorreceptores, enzimas, canais iônicos ou outras macromoléculas. Tais análises são de grande importância visto que possibilitam a determinação dos fatores que são fundamentais para a bioatividade, guiando a síntese de novas moléculas (ALMEIDA *et al.*, 2010; ARROIO; HONÓRIO; DA SILVA, 2010; GUIDO, ADRICOPULO, OLIVA, 2010).

É importante destacar que as interações de um composto químico orgânico com uma macromolécula ocorrem através de forças intermoleculares hidrofóbicas, polares, covalentes, interações de hidrogênio (quando possível), eletrostáticas, entre outras. Essas interações são influenciadas por parâmetros estéricos, de conformação espacial; pelas propriedades físico-químicas, eletrônicas e princípios de hidro e lipossolubilidade da molécula em estudo, por exemplo (ALMEIDA *et al.*, 2010; ARROIO; HONÓRIO; DA SILVA, 2010; GUIDO, ADRICOPULO, OLIVA, 2010).

Para entender as influências da estrutura química na bioatividade, podem ser realizadas análises comparativas de uma série de compostos estruturalmente relacionados, obtidos a partir de modificações na estrutura de um composto tido como modelo, já conhecido e que exibe uma determinada atividade biológica. Alterações no tamanho e conformação do esqueleto carbônico, introdução de grupos substituintes ou de centros estereogênicos, são alguns exemplos de modificações estruturais, cujo principal objetivo é otimizar a bioatividade do composto e, possivelmente, aumentar sua seletividade pelo alvo, o que pode reduzir toxicidade (BARREIRO; FRAGA, 2013, LIMA, 2007; SILVA, 2013).

3.0 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Preparar um conjunto de ésteres derivados do ácido 3-metil-4-nitrobenzoico e estabelecer uma relação estrutura-atividade biológica dos ésteres preparados.

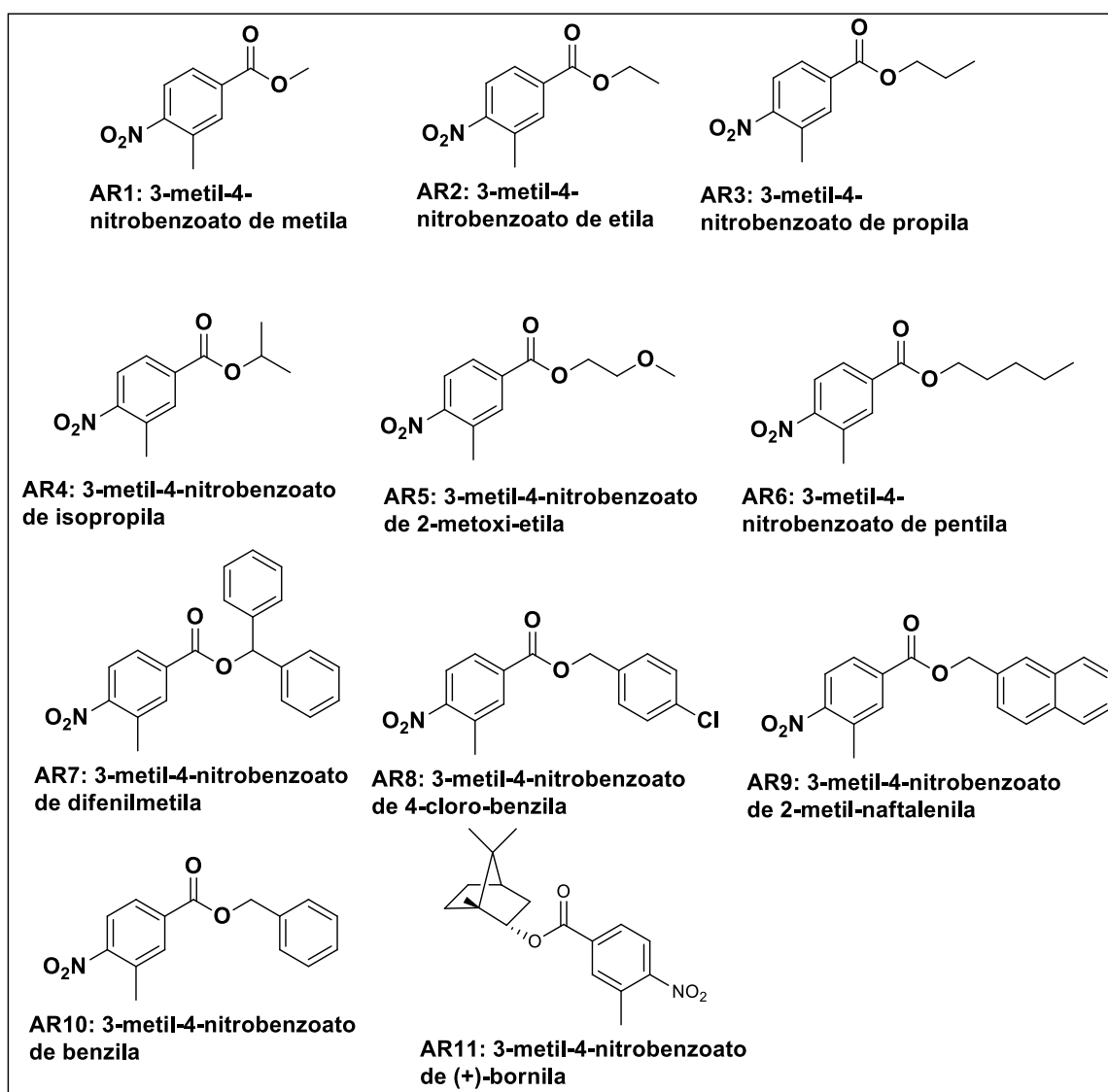
3.2 Objetivos específicos

- Preparar e purificar onze ésteres utilizando o ácido 3-metil-4-nitrobenzoico como material de partida;
- Avaliar a capacidade antifúngica das substâncias;
- Estabelecer uma relação estrutura-atividade dos ésteres preparados;
- Propor mudanças estruturais para a obtenção de novos derivados antimicrobianos

4.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram preparados onze ésteres derivados do ácido 3-metil-4-nitrobenzoico utilizando quatro diferentes metodologias. Os mesmos foram purificados e sua confirmação estrutural ocorreu através das técnicas de Espectroscopia de Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C . Em seguida foram submetidos a testes de avaliação da sua capacidade antifúngica, com a finalidade de traçar uma relação entre a estrutura química e a atividade biológica dos produtos obtidos. Na figura 5 estão as estruturas de cada éster preparado.

Figura 5 – Ésteres preparados no estudo.

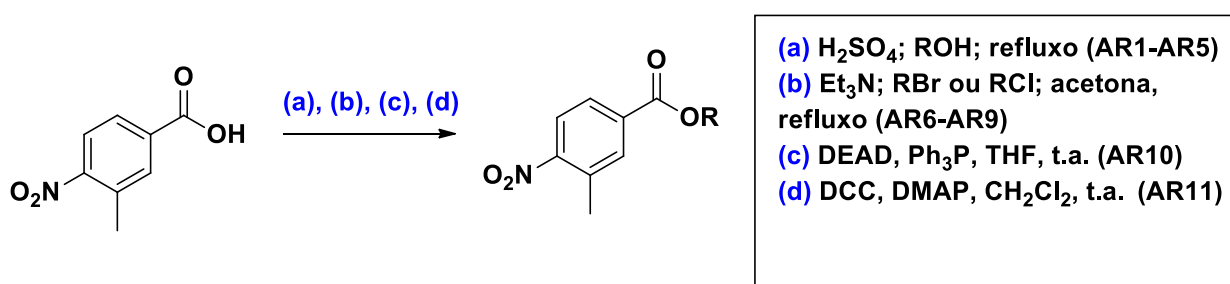


Fonte: Elaborado pela autora.

4.1. Etapa de preparação dos ésteres derivados do ácido 3-metil-4-nitrobenzoico

Os ésteres foram obtidos por quatro diferentes metodologias: Esterificação de Fischer (BUZZI *et. al*, 2009; SANDERSON *et. al*, 2013), esterificação com haletos de alquila e arílicos (BOECK *et. al*, 2005; LI *et. al*, 2012a), reação de Mitsunobu (BATOVSKA *et. al*, 2005) e reação de Steglich (NEISES; STEGLICH, 1978). O esquema geral das diferentes reações utilizadas pode ser observado abaixo (esquema 6).

Esquema 6 – Metodologias utilizadas para obtenção dos ésteres.



(a) esterificação de Fischer; **(b)** esterificação com haletos de alquila e arílicos; **(c)** Reação de Mitsunou; **(d)** Reação de Steglich.

AR1 a **AR5** foram preparados pela esterificação de Fischer (esquema 6-a), utilizando o ácido carboxílico e álcoois alifáticos de até três carbonos. Os álcoois foram adicionados em excesso deslocando assim o equilíbrio para a formação dos ésteres. O catalisador utilizado foi o ácido sulfúrico (H_2SO_4) que tem a finalidade de protonar o oxigênio carbonílico forçando-o a captar os elétrons da ligação dupla, tornando o carbono da carbonila mais reativo ao ataque nucleofílico feito pela hidroxila do álcool, o que resulta na formação do éster e formação de uma molécula de água (mecanismo no esquema 2, p. 34).

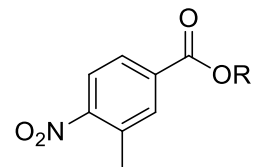
Na tabela 2 encontram-se os dados reacionais, de purificação, bem como de rendimento de todos os ésteres preparados. Considerando **AR1** a **AR5** pode-se dizer que a maioria foi obtida com bons rendimentos e em tempo relativamente curto (4-24 horas), tendo como ponto positivo o fato de não haver necessidade de purificação em coluna cromatográfica para a maioria, obtendo o produto puro depois da extração. É importante destacar que utilizando ácidos carboxílicos ou álcoois com

cadeias carbônicas muito extensas dificulta o uso desse método, visto que a reação torna-se muito lenta devido ao efeito estérico das cadeias longas próximas ao sítio de reação, por isso os álcoois utilizados tiveram até três carbonos. (SOLOMONS; FRYHLE, 2012 p. 799). Entre os ésteres preparados por esterificação de Fischer, o **AR5** é inédito na literatura.

Os ésteres **AR6** à **AR9** foram obtidos através da esterificação do ácido 3-metil-4-nitrobenzoico com haletos (esquema 6-b). Sabe-se que essa reação ocorre através de uma substituição nucleofílica bimolecular (S_N2), em que o ácido adquire caráter nucleofílico quando é desprotonado pela trietilamina e ataca o carbono de caráter eletrofílico, de forma que esse ataque é simultâneo à saída do halogênio (mecanismo no esquema 3, p. 35). Como solvente aprótico foi utilizada a acetona anidra. Os haletos envolvidos possuem cadeia alquílica ou contêm grupos acrílicos. Foi necessária purificação em coluna cromatográfica para todos os produtos.

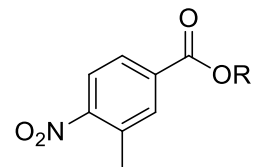
Para a obtenção do éster **AR10** foi utilizada a reação de Mitsunobu com uso de dicarboxilato de dietila (DEAD), trifenilfosfina (Ph_3P) e tetrahidrofurano (THF) como solvente (esquema 6-c). Nesse caso, ocorre a ativação da hidroxila alcoólica e formação de um nucleófilo a partir do ácido carboxílico, este ataca o carbono ligado à hidroxila do álcool, o que culmina na clivagem de uma ligação carbono-oxigênio e formação do éster (mecanismo no esquema 4, p. 37).

A formação do éster **AR11** ocorreu apenas através da reação de Steglich, utilizando o agente catalisador 4-(dimetilamino)-piridina (DMAP) e diciclohexilcarbodiimida (DCC) como agente de acoplamento (mecanismo no esquema 5, p. 39). A maior dificuldade encontrada no procedimento foi a purificação do produto, devido a formação de um subproduto da reação, a diciclohexiureia (DCU); foram necessárias várias filtrações, além de purificação em coluna cromatográfica.

Tabela 2 – Dados gerais dos ésteres derivados do ácido 3-metil-4-nitrobenzoico

Éster	R	Fórmula Molecular	Massa molar (g/mol)	Tempo de reação (h) para preparo	Solvente para extração	Sistema de purificação em coluna (Hex:AcOEt)	Massa (mg)	Rend. (%)	Aspecto	Ponto de Fusão (°C)
AR1	Metil	C ₉ H ₉ NO ₄	195,17	6	AcOEt	-	95,8	83,3	Cristais amarelos	80-81
AR2	Etil	C ₁₀ H ₁₁ NO ₄	209,19	24	AcOEt	-	57	49,3	Sólido marrom	51-52
AR3	Propil	C ₁₁ H ₁₃ NO ₄	223,23	7	AcOEt	-	98,2	79,8	Sólido marrom	37-38
AR4	Isopropil	C ₁₁ H ₁₃ NO ₄	223,23	24	AcOEt	90:10	93	75,5	Sólido amarelo	58-59
AR5	2-metoxi-etil	C ₁₁ H ₁₃ NO ₅	239,22	4	AcOEt	80:20	64	48,5	Sólido verde	36-37
AR6	Pentil	C ₁₃ H ₁₇ NO ₄	251,26	24	CH ₂ Cl ₂	95:5	41,7	30	Óleo amarelo	-

AcOEt: Acetato de etila. CH₂Cl₂: diclorometano.

Tabela 2 continuação – Dados gerais dos ésteres derivados do ácido 3-metil-4-nitrobenzoico

Éster	R	Fórmula Molecular	Massa molar (g/mol)	Tempo de reação (h) para preparo	Solvente para extração	Sistema de purificação em coluna (Hex:AcOEt)	Massa (mg)	Rend. (%)	Aspecto	Ponto de Fusão (°C)
AR7	Defenilmetil	C ₂₁ H ₁₇ NO ₄	347,36	72	CHCl ₃	98:2	24,3	12,7	Sólido branco	100-101
AR8	4-Cl-benzil	C ₁₅ H ₁₂ ClNO ₄	305,71	48	CH ₂ Cl ₂	90:10	87,75	52	Sólido amarelo	96-97
AR9	2-metil-natalenil	C ₁₉ H ₁₅ NO ₄	321,33	72	CH ₂ Cl ₂	90:10	60,35	34,1	Sólido branco	102-102
AR10	benzil	C ₁₅ H ₁₃ NO ₄	271,27	48	CH ₂ Cl ₂	95:5	62,2	43	Sólido branco	36-37
AR11	(+)-bornil	C ₁₈ H ₂₃ NO ₄	317,38	48	CH ₂ Cl ₂	95:5	49	28	Sólido verde	160-161

AcOEt: Acetato de etila. CH₂Cl₂: diclorometano. CHCl₃: clorofórmio.

4.2. Análise espectroscópica dos ésteres preparados

4.2.1. Espectroscopia de Infravermelho

Na tabela 3 encontram-se os principais dados de espectroscopia de infravermelho que foram característicos para os ésteres preparados utilizando o ácido 3-metil-4-nitrobenzoico. Os espectros foram interpretados baseando-se na literatura de PAVIA e colaboradores (2010), no artigo de LOPES; FASCIO, 2004 e em outros artigos científicos. A partir do infravermelho é possível avaliar, principalmente, a presença e/ou ausência de grupos funcionais das respectivas estruturas químicas.

Nesse caso, em todos os espectros das onze substâncias foram observados sinais característicos da função éster: absorção forte do grupo C=O entre 1730 e 1718 cm^{-1} , valores típicos de carbonila de éster conjugada com anel aromático; absorções de estiramento C-O de éster, que comumente aparecem como duas bandas de absorção entre 1000 e 1300 cm^{-1} sendo uma mais larga e mais forte que a outra; nas substâncias apresentadas nessa dissertação, tais bandas foram observadas entre 1286-1280 cm^{-1} e 1197-1192 cm^{-1} . Além disso, a ausência da banda de absorção forte do grupo hidroxila de ácido carboxílico em torno de 3400 cm^{-1} evidenciou a esterificação (NIGROGI *et al*, 2011).

Todos os análogos preparados apresentaram em comum o substituinte nitro (NO_2) no anel aromático, que também pode ser caracterizado pela espectroscopia de infravermelho através de duas bandas de absorção fortes: banda de estiramento assimétrico entre 1550 e 1490 cm^{-1} e de estiramento simétrico entre 1355 e 1315 cm^{-1} . É importante ressaltar que as bandas de NO_2 podem sobrepor as de C=C aromático que ocorrem na região próxima, dificultando sua visualização. No caso dos ésteres apresentados, foram observadas duas bandas de intensidade média entre 1618 e 1583 cm^{-1} que foram atribuídas ao estiramento das ligações C=C aromáticas. Tomando como exemplo, observa-se abaixo uma expansão do espectro de infravermelho do 3-metil-4-nitrobenzoato de metila (**AR1**) com destaque para os grupos químicos que foram caracterizados com auxílio da técnica de espectroscopia de infravermelho (figura 6).

Figura 6 – Expansão do espectro de infravermelho do 3-metil-4-nitrobenzoato de metila (AR1).

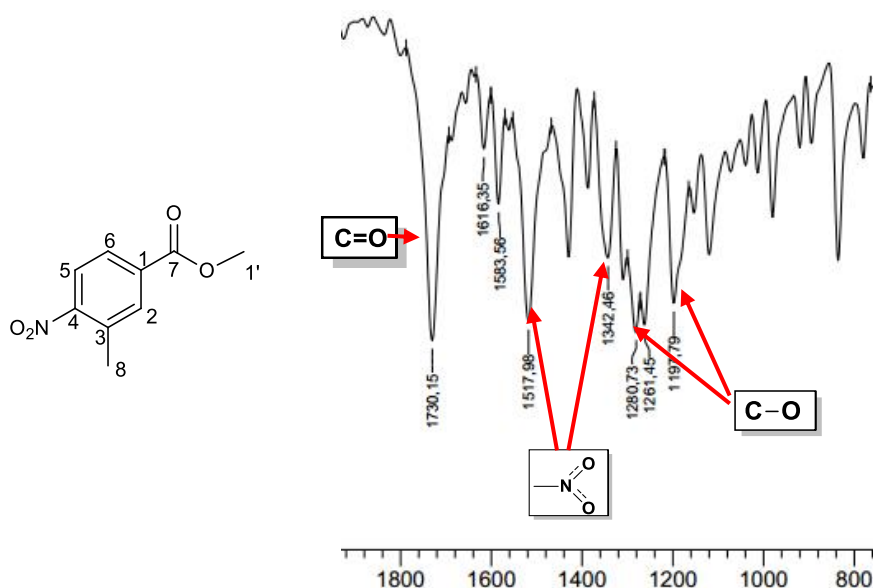


Tabela 3 – Principais dados de espectroscopia de infravermelho dos ésteres preparados.

Éster	$\nu(\text{C=O})$	$\nu(\text{C-O})$	$\nu(\text{NO}_2)$
AR1	1730	1280 e 1197	1517 e 1342
AR2	1726	1284 e 1199	1523 e 1583
AR3	1722	1284 e 1193	1521 e 1346
AR4	1718	1284 e 1193	1519 e 1342
AR5	1722	1282 e 1193	1519 e 1340
AR6	1726	1285 e 1195	1533 e 1354
AR7	1726	1280 e 1192	1519 e 1346
AR8	1722	1276 e 1192	1521 e 1344
AR9	1720	1278 e 1193	1519 e 1344
AR10	1718	1280 e 1192	1527 e 1357
AR11	1726	1286 e 1195	1529 e 1352

4.2.2. Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C

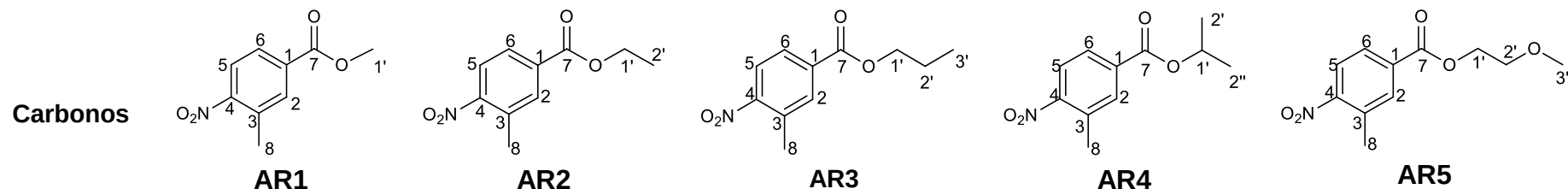
Nas tabelas 4, 5, 6 e 7 estão os deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C que confirmam a formação dos respectivos ésteres. A caracterização foi realizada a partir de comparações com dados já existentes na literatura.

Nos espectros de RMN de ^1H dois sinais são comuns a todos os ésteres: o primeiro é o multipeto entre 8,06 e 7,94 ppm referente aos hidrogênios do anel aromático proveniente do ácido 3-metil-4-nitrobenzoico (H-2, H-5, H-6), essa faixa de deslocamento é típica de hidrogênios aromáticos devido à desblindagem ocasionada

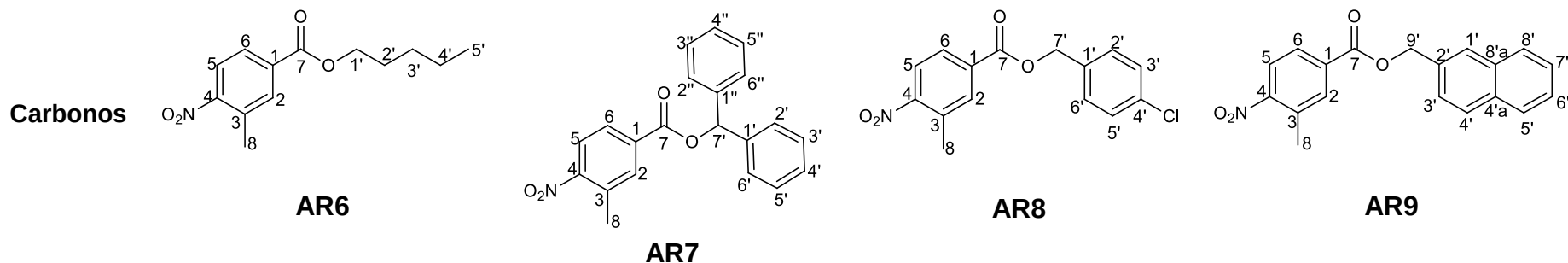
pela circulação dos elétrons π do anel (corrente de anel). O maior deslocamento desses hidrogênios aromáticos também pode ser atribuído à presença de um grupo substituinte elétron-retirador (NO_2) que, ao retirar a densidade eletrônica do anel, por ressonância, desprotege os hidrogênios aromáticos. O segundo sinal é o singlete com deslocamento entre 2,61 – 2,63 ppm, referente aos hidrogênios da metila substituinte do anel, que também são desprotegidos pelo efeito anisotrópico do anel (hidrogênios metilênicos normalmente apresentam deslocamento entre 0,7-1,3 ppm) (NIGROGI, *et al.*, 2011; PAVIA, 2010).

Os deslocamentos químicos dos hidrogênios do carbono diretamente ligado ao oxigênio do grupo funcional também foram fundamentais para confirmar a esterificação. Devido à eletronegatividade do átomo de oxigênio, este fica com a maior densidade eletrônica deixando os hidrogênios do carbono desblindados. Os referidos sinais foram encontrados na região de 3,96-5,60 ppm, excetuando o éster AR7 (3-metil-4-nitrobenzoato de difenilmetila), cujo deslocamento do hidrogênio foi 7,17 ppm, semelhante ao encontrado na literatura de MAGENS *et al.*, 2010. Além disso, a multiplicidade do sinal desses hidrogênios foi importante para identificar o restante da cadeia carbônica de cada éster.

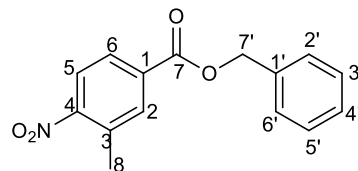
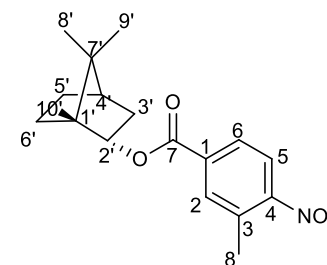
Os espectros de RMN de ^{13}C também evidenciam a formação das substâncias; havendo destaque para os deslocamentos do carbono carbonílico (C-7: entre 166 e 164 ppm), do carbono diretamente ligado ao grupo nitro (C-4: entre 153 e 151 ppm), estando desprotegidos devido à eletronegatividade e efeito retirador de elétrons do oxigênio da carbonila e do NO_2 respectivamente. Também são observados os sinais dos carbonos hidrogenados ($=\text{CH}$) do anel aromático: C-2 e C-6 são os mais desprotegidos devido a perda de densidade eletrônica para o grupo $\text{C}=\text{O}$. O carbono da metila, substituinte aromático, também semelhante em todas as caracterizações, apresenta deslocamento entre 21 e 20 ppm. Além disso, também são assinalados os deslocamentos dos carbonos do restante da cadeia de cada éster; os carbonos diretamente ligados ao oxigênio do grupo funcional, também tiveram deslocamentos característicos, entre 60 e 70 ppm, o que confirma a esterificação.

Tabela 4 – Deslocamentos químicos de ^1H (δ_{H}) para os ésteres **AR1** a **AR5**.

	δ_{H} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{H} (ppm)
1	-	-	-	-	-
2, 5, 6	8,01–7,95 (<i>m</i> , 3H)	8,02-7,96 (<i>m</i> , 3H)	8,02-7,97 (<i>m</i> , 3H)	8,00-7,95 (<i>m</i> , 3H)	8,02-7,94 (<i>m</i> , 3H)
3	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-
8	2,62 (<i>s</i> , 3H)	2,62 (<i>s</i> , 3H)	2,62 (<i>s</i> , 3H)	2,62 (<i>s</i> , 3H)	2,59 (<i>s</i> , 3H)
1'	3,96 (<i>s</i> , 3H)	4,42 (<i>q</i> , $J=5,7\text{Hz}$, 2H)	4,31 (<i>t</i> , $J=6,6\text{Hz}$, 2H)	5,27 (<i>sept</i> , $J=6,3\text{Hz}$, 1H)	4,48 (<i>t</i> , $J=4,6\text{Hz}$, 2H)
2'	-	1,43 (<i>t</i> , $J=5,7\text{Hz}$, 3H)	1,81 (<i>sext</i> , $J=7,4\text{Hz}$, 2H)	1,38 (<i>d</i> , $J=6,3\text{Hz}$, 6H): H-2' e H-2''	3,72 (<i>t</i> , $J=4,6\text{Hz}$, 2H)
3'	-	-	1,03 (<i>t</i> , $J=7,4\text{Hz}$, 3H)	-	3,40 (<i>s</i> , 3H)

Tabela 5 – Deslocamentos químicos de ^1H (δ_{H}) para os ésteres **AR6** a **AR9**.

	δ_{H} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{H} (ppm)
1	-	-	-	-
2, 5, 6	8,00-7,95 (<i>m</i> , 3H)	8,11-7,97 (<i>m</i> , 3H)	8,02-7,96 (<i>m</i> , 3H)	8,06-7,94 (<i>m</i> , 3H)
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
7	-	-	-	-
8	2,61 (s, 3H)	2,63 (s, 3H)	2,61 (s, 3H)	2,61 (s, 3H)
1'	4,34 (<i>t</i> , <i>J</i> =6,7Hz, 2H)	-	-	7,91-7,85 (<i>m</i> , 1H)
2'	1,77 (<i>quint</i> , <i>J</i> =6,8Hz, 2H)	7,47-7,32 (<i>m</i> , 10H: 2' à 6' e 2'' à 6'')	7,40-7,35 (<i>m</i> , 1H)	-
3'	137-1,42 (<i>m</i> , 4H)		7,40-7,35 (<i>m</i> , 1H)	7,57-7,49 (<i>m</i> , 1H)
4'			-	7,91-7,85 (<i>m</i> , 1H)
5'			7,40-7,35 (<i>m</i> , 1H)	7,91-7,85 (<i>m</i> , 1H)
6'	-		7,40-7,35 (<i>m</i> , 1H)	7,57-7,49 (<i>m</i> , 1H)
7'	-	7,17 (s, 1H)	5,34 (s, 2H)	7,57-7,49 (<i>m</i> , 1H)
8'	-	-		7,91-7,85 (<i>m</i> , 1H)
9'	-	-		5,55 (s, 2H)

Tabela 6 – Deslocamentos químicos de ^1H (δ_{H}) para os ésteres **AR10** e **AR11**.**Carbonos****AR10****AR11**

	δ_{H} (ppm)	δ_{H} (ppm)
1	-	-
2,5,6	8,04-7,94 (<i>m</i> , 3H)	8,01-7,95 (<i>m</i> , 3H)
3	-	-
7	-	-
8	2,61 (<i>s</i> , 3H)	2,63 (<i>s</i> , 3H)
1'	-	-
2'	7,43 – 7,37 (<i>m</i> , 5H)	5,14 (<i>ddd</i> , $J=9,9$; 3,4; 2,2 Hz, 1H)
3'		2,53-2,44 (<i>m</i> , 1H-3'a)
4'		1,12 (<i>dd</i> , $J=13,9$; 3,4 Hz, 1H-3'b)
5'		1,73 (<i>t</i> , $J=4,5$ Hz, 1H)
6'		1,86-1,74 (<i>m</i> , 1H-5'a)
7'	5,39 (<i>s</i> , 2H)	1,35-1,28 (<i>m</i> , 1H-5'b)
8'	-	2,11-2,04 (<i>m</i> , 1H)
9'	-	1,47-1,39 (<i>m</i> , 1H-6'b)
10'	-	-
		0,97 (<i>s</i> , 3H)
		0,92 (<i>s</i> , 3H)
		0,91 (<i>s</i> , 3H)

Tabela 7 – Deslocamentos químicos de ^{13}C (δ_{C}) para os ésteres **AR1 a **AR11****

[illegible]

4.3. Avaliação da atividade antifúngica dos ésteres preparados

Com a finalidade de avaliar a capacidade antifúngica dos ésteres preparados, os mesmos foram submetidos ao teste de microdiluição em placa de 96 poços, para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e posteriormente, a fungicida mínima (CFM) em meio sólido; frente às cepas de *Candida albicans* (ATCC-90028), *C. glabrata* (ATCC-90030) resistente a fluconazol e cetoconazol, *C. krusei* (ATCC-34125) resistente a fluconazol e *C. guilliermondii* (207) resistente a cetoconazol e fluconazol.

A CIM foi definida como a menor concentração capaz inibir visualmente o crescimento do microrganismo; quando comparado com o controle, contendo apenas o meio de cultura e o inóculo e interpretada da seguinte maneira: 50-500 µg/mL= forte/ótima atividade; 600-1500 µg/mL= moderada atividade; > acima de 1500 µg/mL=fraca atividade ou produto inativo (HOLETZ *et al.*, 2002; SARTORATTO *et al.*, 2004; HOUGHTON *et al.*, 2007). A CFM foi definida como a menor concentração que inibiu visualmente o crescimento fúngico em meio sólido. E a relação entre CFM/CIM foi calculada para determinar se cada substância é fungistática (CFM/CIM $\geq$ 4) ou fungicida (CFM/CIM < 4), tais parâmetros são referenciados por PEIXOTO *et al.*, 2017. Os testes foram realizados no Laboratório de Farmacologia Experimental e Cultivo Celular (CCS/UFPB). Na tabela 8 estão os valores da CIM e na tabela 9 encontram-se os valores da CFM e da relação CFM/CIM para cada éster.

A partir dos dados antimicrobianos obtidos nos testes antifúngicos foi realizada uma análise das características estruturais que, possivelmente, estão influenciando na bioatividade de cada substância. Pode-se observar que a coleção de ésteres preparada é estruturalmente relacionada, nesse caso, foi mantida a estrutura benzoica substituída, com o 4-NO₂ (grupo nitro) e 3-CH₃ (metila), variando o substituínte ligado ao oxigênio da função éster.

Em diversos estudos, envolvendo as mais variadas classes de moléculas orgânicas, com estruturas simples ou complexas, o grupo nitro, como substituínte aromático, é mencionado como sendo importante para a bioatividade frente a fungos e bactérias. No trabalho realizado por ARAÚJO *et al.*, 2013, foi demonstrado que a introdução de grupos retiradores de elétrons (a exemplo do nitro) em esqueletos cumarínicos aparentou contribuir positivamente na atividade antifúngica frente

Aspergillus flavus e *Aspergillus fumigatus*. JADHAV *et al*, 2016, constatou que derivados oxidiazólicos contendo o 4-NO₂ como substituinte aromático apresentaram potencial atividade antifúngica frente *Candida albicans*. Com relação ao substituinte metila, é bem possível que o mesmo esteja envolvido com a inserção da molécula na membrana ou parede celular fúngica, visto que, ele contribui para a maior lipofilicidade do éster (BARREIRO; ARTHUR; FRAGA, 2011).

Ao se observar os resultados obtidos para *C. albicans* (ATCC 90028), a maioria dos ésteres foi bioativa e, segundo a relação CFM/CIM os mesmos apresentaram capacidade fungicida, com exceção de **AR7** e **AR8**. Para os ésteres **AR1** a **AR6** pode-se afirmar que o aumento da cadeia alifática não teve influência significativa para a melhor bioatividade das moléculas; bem como a inserção de um heteroátomo na cadeia do **AR5**. Quando se compara **AR1** (estrutura bioativa mais simples do grupo) com **AR7**, **AR8**, **AR9** e **AR10**, que apresentam anéis aromáticos em sua cadeia lateral, observa-se que os mesmos foram bioativos frente à *C. albicans* em menores concentrações molares, especialmente o éster **AR7** (CIM = 2,87 µmol/mL), que possui a cadeia difenólica. Segundo a literatura, a introdução de anéis cíclicos ou aromaticos aumenta a rigidez da molécula, o que pode tanto ampliar a interação com as biomacromoléculas (através do estabelecimento de interações hidrofóbicas) como impossibilitá-la (BARREIRO; FRAGA, 2008; LIMA, 2007; THOMAS, 2003).

Ainda sobre a bioatividade dos ésteres para *C. albicans* (ATCC 90028), o éster **AR11**; que possui a subestrutura terpênica na cadeia lateral foi inativo, quando comparado ao **AR1**, pode-se inferir que a disposição espacial e possivelmente volumosa do bornila tenha dificultado a interação da molécula com a célula fúngica.

Para *C. glabrata* (ATCC 90030) resistente à cetoconazol e fluconazol, os ésteres **AR3**, **AR4** e **AR5** tiveram capacidade inibitória na maior concentração em que foram testados, apresentando capacidade fungicida em meio sólido, de acordo com a relação CFM/CIM. Através desses resultados, pode-se afirmar que apenas cadeias carbônicas alifáticas laterais de três carbonos foram interessantes para a bioatividade frente *C. glabrata* (ATCC 90030). Observa-se também que a modificação de n-propila (**AR3** CIM=CFM=4,47µmol/mL) para isopropila (**AR4** CIM= 4,47 µmol/mL, CFM=8,94 µmol/mL) e a presença de um heteroátomo em **AR5** (CIM=CFM=4,18 µmol/mL) não tiveram influência nessa específica ação biológica.

C. krusei (ATCC 34125) apresentou suscetibilidade aos ésteres **AR2**, **AR5**, **AR6**, **AR8** e **AR11**, com exceção deste último, os demais também tiveram capacidade fungicida em meio sólido. Através da análise das características estruturais, observa-se inicialmente que o aumento da cadeia alifática lateral está envolvido com a bioatividade antifúngica considerando que, tendo-se uma única metila esterificada (**AR1**) não se constata capacidade biológica; mas o pequeno aumento da cadeia para a etila confere bioatividade ao **AR2**, no entanto, quando se modifica a cadeia alifática para uma que tenha três carbonos, a capacidade antifúngica só é observada na presença de um heteroátomo (**AR5**), possivelmente devido a melhor distribuição eletrônica ou por ter a capacidade de atuar como um aceptor de ligação de hidrogênio, já o aumento da cadeia carbônica alifática, observado em **AR6** (cadeia lateral aberta com cinco carbonos) contribuiu para a melhor bioatividade do mesmo frente a *C. krusei*, quando comparado com o **AR2**, o que sugere a importância desse tipo de cadeia lateral para a capacidade antifúngica.

A inserção da subestrutura terpênica (**AR11**), também foi interessante para a inibição do crescimento de *C. krusei* ATCC 34125, quando se compara **AR11** com **AR2** observa-se que **AR11** necessitou de uma menor concentração molar para exercer a mesma bioatividade inibitória do crescimento fúngico observada para **AR2**.

Ainda analisando os resultados obtidos para *C. krusei* (ATCC 34125); é possível constatar que a inserção de grupos arílicos na cadeia lateral, resulta na inatividade dos ésteres **AR7**, **AR9** e **AR10**. É válido destacar que houve influência do substituinte cloro (-Cl) para a bioatividade de **AR8**. Quando se tem **AR10** inativo frente à cepa analisada de *C. krusei* e a única diferença entre ele e o **AR8** é o *p*-Cl no anel aromático da cadeia lateral, é possível que a bioatividade de **AR8** frente à *C. krusei* tenha sido decorrente da presença deste substituinte.

O que se encontra a respeito da influência de halogênios na literatura é a chamada ligação de halogênio. Esta é formada por um átomo de halogênio (que participa de uma ligação covalente, por exemplo: C-X em que X = Cl, Br) com um nucleófilo; geralmente são decorrentes da polarização da ligação C-X que deixa a região do halogênio com potencial eletrostático positivo e dessa forma o átomo consegue interagir com porções nucleofílicas. Esse tipo de interação vem crescendo em importância no entendimento de aspectos estruturais envolvidos no

reconhecimento de fármacos por alvos moleculares e no planejamento de novos candidatos a fármacos (XU *et al.*, 2014).

Os resultados encontrados para *C. guilliermondii* 207 foram bastante significantes; com destaque para **AR1** (CIM=0,031 $\mu\text{mol/mL}$, CFM= 0,078 $\mu\text{mol/mL}$) e **AR6** (CIM=0,039 $\mu\text{mol/mL}$, CFM= 0,039 $\mu\text{mol/mL}$) que apresentaram inibição do crescimento fúngico na menor concentração testada e capacidade fungicida em meio sólido, de acordo com os valores apresentados nas tabelas 8 e 9. No trabalho de LIMA *et al.*, 2017; realizado no laboratório de Química Farmacêutica da UFPB, também foi preparado o 3-metil-4-nitrobenzoato de metila e testado frente a *C. albicans* (ATCC 76645), o éster apresentou CIM de 256 $\mu\text{g/mL}$; o que sugere a importância de suas características estruturais para a bioatividade frente cepas de *Candida* spp.

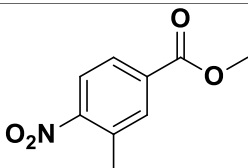
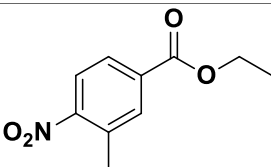
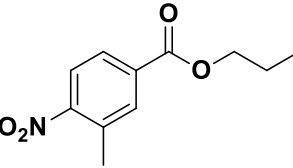
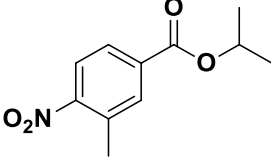
Pelo que pode ser observado ao comparar **AR1**, **AR2** e **AR3**, ao passo que se aumenta a cadeia alifática, os valores de CIM e CFM elevam-se, indicando a redução da capacidade antifúngica de ésteres com cadeias laterais maiores. Analisando **AR3**, **AR4** e **AR5**, todos com cadeias laterais de três carbonos, é possível constatar que a leve modificação de n-propila (**AR3**) para isopropila (**AR4**) ou a inserção de um heteroátomo (**AR5**) contribuíram para a redução da capacidade biológica já observada de **AR3** em *C. guilliermondii* 207.

Ao analisar o resultado de **AR6** frente à *C. guilliermondii* 207 observa-se que o aumento da cadeia carbônica alifática para uma de cinco carbonos resultou em bioatividade semelhante à observada para **AR1**, substância mais simples do grupo (ambos apresentaram capacidade antifúngica na menor concentração testada). Este resultado contrasta com o visto para **AR2** e **AR3**, em que o aumento da cadeia reduz a capacidade antifúngica do éster frente a cepa de *C. guilliermondii* 207, dessa forma, verifica-se, mais uma vez, a importância da influência das cadeias carbônicas alifáticas laterais para a capacidade antifúngica das substâncias avaliadas.

Com relação ao envolvimento de grupos volumosos, como a subestrutura terpênica ou os anéis aromáticos, na bioatividade frente *C. guilliermondii* 207, foi verificada a capacidade antifúngica apenas com a introdução de um anel aromático (**AR10** CIM=1,84 $\mu\text{mol/mL}$) e com a inserção do (+)-bornil (**AR11** CIM=CFM=

1,57 μ mol/mL) o que não foi mais interessante do que o resultado encontrado para **AR1**, composto bioativo mais simples do grupo, mas a partir dos resultados encontrados para esta cepa, é possível inferir que as interações estabelecidas por cadeias alifáticas laterais apresentam-se importantes para a ação antifúngica dos ésteres frente a *C. guilliermonbii* 207.

Tabela 8 – Resultados obtidos no teste de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM $\mu\text{mol/mL}$) para os ésteres preparados, frente a espécies do gênero *Candida*.

Éster	<i>Candida albicans</i> (ATCC 90028)	<i>Candida glabrata</i> (ATCC 90030)	<i>Candida krusei</i> (ATCC 34125)	<i>Candida guilliermondii</i> (207)
	CIM ($\mu\text{mol/mL}$)			
 AR1	5,12	+	+	0,039
 AR2	4,78	+	4,78	0,597
 AR3	4,47	4,47	+	1,11
 AR4	4,47	4,47	+	4,47

(+): crescimento de microrganismo. (-): não crescimento de microrganismo.

Tabela 8 continuação – Resultados obtidos no teste de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM $\mu\text{mol/mL}$) para os ésteres preparados frente, a espécies do gênero *Candida*.

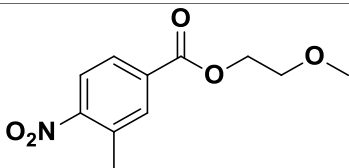
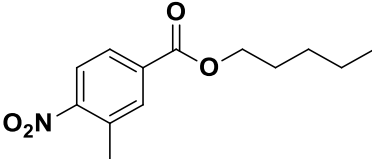
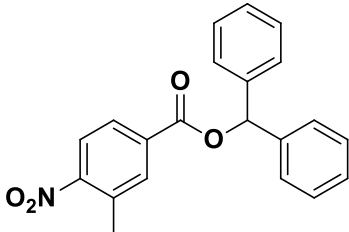
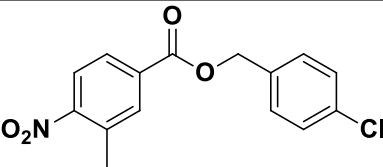
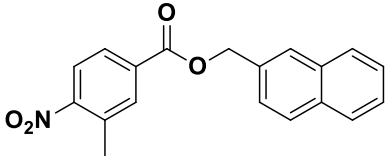
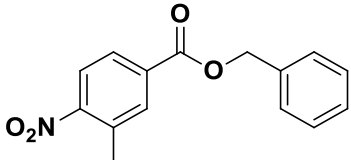
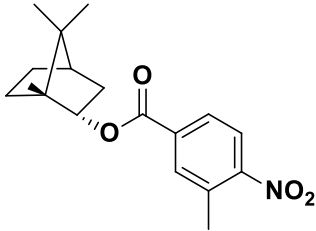
Éster	<i>Candida albicans</i> (ATCC 90028)	<i>Candida glabrata</i> (ATCC 90030)	<i>Candida krusei</i> (ATCC 34125)	<i>Candida guilliermondii</i> (207)
	CIM ($\mu\text{mol/mL}$)			
 AR5	4,18	4,18	4,18	4,18
 AR6	3,97	+	3,97	0,031
 AR7	2,87	+	+	+
 AR8	3,27	+	3,27	+

Tabela 8 continuação – Resultados obtidos no teste de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM $\mu\text{mol/mL}$) para os ésteres preparados, frente a espécies do gênero *Candida*.

Éster	<i>Candida albicans</i> (ATCC 90028)	<i>Candida glabrata</i> (ATCC 90030)	<i>Candida krusei</i> (ATCC 34125)	<i>Candida guilliermondii</i> (207)
	CIM ($\mu\text{mol/mL}$)			
 AR9	3,11	+	+	+
 AR10	3,68	+	+	1,84
 AR11	+	+	3,15	1,57
Nistatina	0,00043	0,00043	0,00043	0,00043
Controle do meio	-	-	-	-
Controle do microrganismo	+	+	+	+

(+): crescimento de microrganismo. (-): não houve crescimento de microrganismo.

Tabela 9 – Resultados obtidos no teste de determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM $\mu\text{mol/mL}$) e relação CFM/CIM dos ésteres preparados.

Éster	<i>Candida albicans</i> (ATCC 90028)		<i>Candida glabrata</i> (ATCC 90030)		<i>Candida krusei</i> (ATCC 34125)		<i>Candida guilliermondii</i> (207)	
	CFM	CFM/CIM	CFM	CFM/CIM	CFM	CFM/CIM	CFM	CFM/CIM
AR1	5,12	1	+		+		0,078	2
AR2	9,56	2	+		4,78	1	0,597	1
AR3	4,47	1	4,47	1	+		1,11	1
AR4	8,94	2	4,47	1	+		4,47	1
AR5	4,18	1	4,18	1	4,18	1	4,18	1
AR6	3,97	1	+		3,97	1	0,031	1
AR7	+		+		+		+	
AR8	+		+		3,27	1	+	
AR9	3,11	1	+		+		+	
AR10	7,36	2	+		+		+	
AR11	+		+		3,15	+	1,57	1

(+): A substância não tem CFM

Relação CFM/CIM ≥ 4 : fungistático. CFM/CIM < 4 : fungicida (PEIXOTO *et al*, 2017).

5.0. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Nesta Dissertação foram preparados e purificados onze ésteres derivados do ácido 3-metil-4-nitrobenzoico, utilizando quatro diferentes metodologias. As reações foram desenvolvidas com relativa facilidade e os melhores rendimentos foram dos ésteres preparados pela esterificação de Fischer. Todas as estruturas químicas das substâncias foram confirmadas por espectroscopia de Infravermelho e por RMN de ^1H e ^{13}C . Dos ésteres preparados o **AR5** (3-metil-4-nitrobenzoato de 2-metoxi-etila) é inédito na literatura.

Com a análise da capacidade antifúngica dos ésteres obtidos, pode-se afirmar que todos foram bioativos frente a pelo menos uma das cepas de *Candida* spp. testadas, os melhores resultados encontrados foram frente a *C. guilhermondii* 207, em que os ésteres **AR1** (3-metil-4-nitrobenzoato de metila) e o **AR6** (3-metil-4-nitrobenzoato de pentila) apresentaram-se bioativos nas menores concentrações em que foram testados. A respeito da influência da estrutura química na atividade biológica; foi evidenciada a provável importância de cadeias laterais alquílicas para a bioatividade antifúngica das substâncias preparadas, também foi possível observar que, na maioria dos casos, a inserção de grupos arílicos ou da subestrutura terpênica na cadeia esterificada, não contribuiu significativamente para a obtenção de uma melhor bioatividade frente às cepas testadas.

Os resultados obtidos podem ser utilizados em pesquisas que objetivam desenvolver compostos orgânicos com elevada atividade antifúngica. Também torna-se significativa a sugestão de novas modificações estruturais que possam otimizar a ação antimicrobiana de tais substâncias.

Tendo em vista que as cadeias laterais alifáticas apresentaram maior influência na bioatividade testada nessa dissertação, a avaliação da atividade antifúngica de derivados do ácido 3-metil-4-nitrobenzoico esterificado com cadeias alifáticas de tamanhos variáveis, contendo até sete, dez ou doze carbonos, junto com a realização de estudos mais aprofundados, como o de modo de ação, se em parede celular ou membrana fúngica, por exemplo; permitirão o estabelecimento de um melhor entendimento das influências do aumento na cadeia carbônica para essa bioatividade. Além disso, também é importante verificar a importância dos substituintes aromáticos na capacidade antifúngica das moléculas, como é o caso do

grupo nitro, utilizando para isso, comparações da bioatividade antifúngica de derivados que apresentam o grupamento com aqueles que não o possuem.

6.0. PARTE EXPERIMENTAL

6.1. Materiais e métodos utilizados

A etapa química foi realizada no Laboratório de Química Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba (DCF/CCS/UFPB). Os reagentes e solventes utilizados nos procedimentos foram adquiridos das empresas Sigma Aldrich, Vetec, Neon, Dinâmica, Qhemis, entre outras. Todos apresentavam alto grau de pureza.

6.1.2. Métodos cromatográficos

As reações foram acompanhadas através da cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), utilizando cromatofolhas de alumínio suportadas com sílica gel 60 (fase estacionária) e tendo como fase móvel uma mistura entre hexano e acetato de etila em diferentes proporções. A visualização das placas cromatográficas se deu através da irradiação em câmara de luz ultravioleta com dois comprimentos de onda (254 e 356 nm) e utilizando revelador químico de ácido sulfúrico a 5% em álcool etílico.

Para a purificação das substâncias obtidas foi utilizada a técnica de cromatografia de absorção em coluna (CC). A fase estacionária utilizada foi sílica gel 60 ART 7734 da MERK (partículas de dimensões entre 0,063-0,200 mm) suportada em colunas de vidro cilíndricas. A fase móvel constituiu-se de uma mistura entre hexano e acetato de etila com proporções variáveis.

6.1.3. Métodos espectroscópicos

6.1.3.1. Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C foram obtidos por meio dos espectrômetros de Mercury-Varian operando a 200 MHz (^1H) e 50 MHz (^{13}C), AscendTM – Bruker operando a 400 MHz (^1H) e 100 MHz (^{13}C) e o Varian-RMN-System operando à 500 MHz (^1H) e 125 MHz para (^{13}C); todos localizados no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA/UFPB).

As amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado (CDCl_3) da MERK. Os deslocamentos químicos (δ) foram medidos em partes por milhão (ppm) e as

constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). Para os espectros de RMN de ^1H os desdobramentos referentes aos acoplamentos dos hidrogênios foram indicados como: *s* (singleto), *d* (dubleto), *dd* (duplo dubleto), *t* (triplete), *q* (quarteto), *quint* (quinteto), *sext* (sexteto), *sept* (septeto), *m* (multiplete).

Para os espectros de RMN de ^{13}C foi utilizada a técnica de APT em que os carbonos quaternários e metilênicos ficam na face positiva do gráfico (para cima) e os sinais de carbonos metínicos e metílicos ficam na face negativa do gráfico (para baixo).

6.1.3.2. Espectroscopia de Infravermelho

Os ésteres foram caracterizados por espectrofotômetro FTIR modelo IRPrestige-21, do fabricante Shimadzu, no Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal da Paraíba (CCEN-UFPB), utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr) e frequência medida em cm^{-1} .

6.1.3.3. Espectrometria de Massas de Alta Resolução

As medições foram realizadas no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) utilizando um espectrofotômetro de massa Ultraflex II MALDI TOF/TOF equipado com um laser de alta performance de estado sólido ($\lambda=355\text{ nm}$) e refletor. O sistema é operado pelo software FlexControl 2,4 (Bruker Daltonics G, bsh, Bremen, Alemanha); localizado

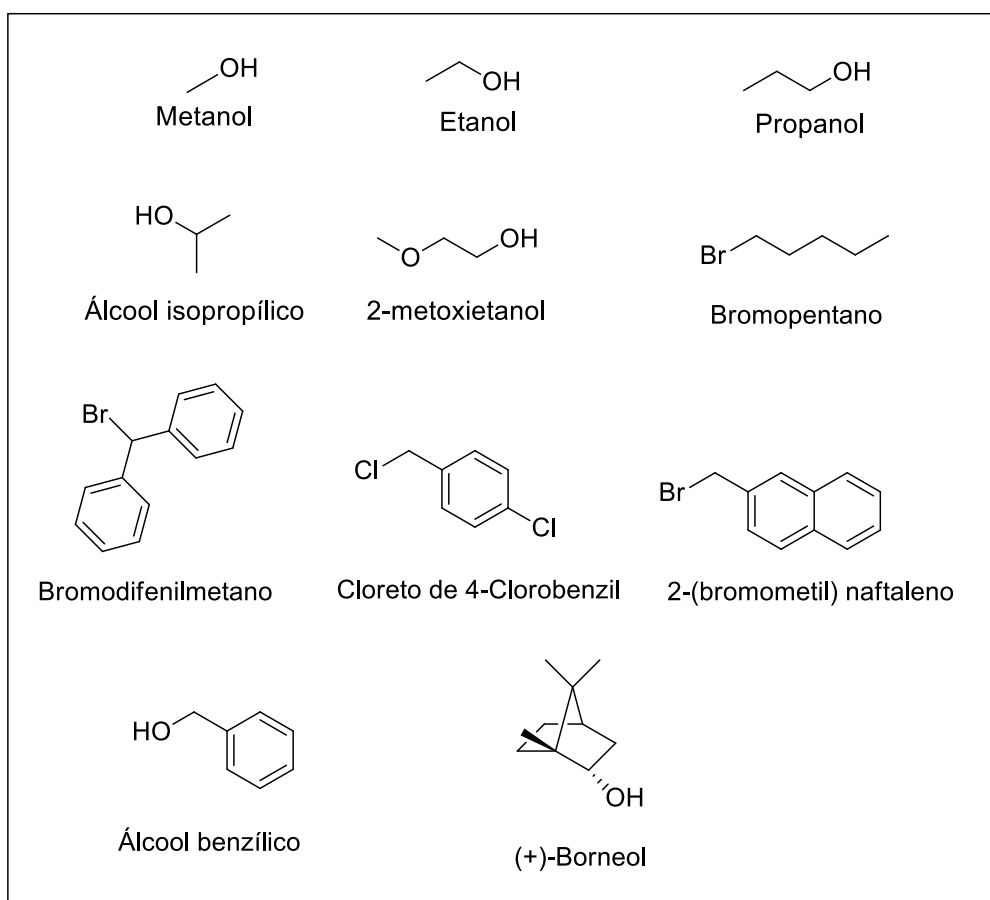
6.1.4. Ponto de Fusão

O ponto de fusão de cada amostra foi determinado utilizando placa de aquecimento de aparelho digital de marca GEHAKA, modelo PF 1500; funcionando a 110V, com temperatura que varia de 0-350°C.

6.2. Procedimentos de preparação dos ésteres

Para a preparação dos onze ésteres foram utilizadas quatro metodologias: Reações de esterificação de Fischer, esterificação com haletos de alquila e arila, reação de Mitsunobu e reação de Steglich. O material de partida para todas as reações foi o ácido 3-metil-4-nitrobenzoico e na figura 7 estão representadas as estruturas químicas dos álcoois e haletos que foram utilizados.

Figura 7 - Álcoois e haletos utilizados nas reações de obtenção de derivados esterificados do ácido 3-metil-4-nitrobenzoico.

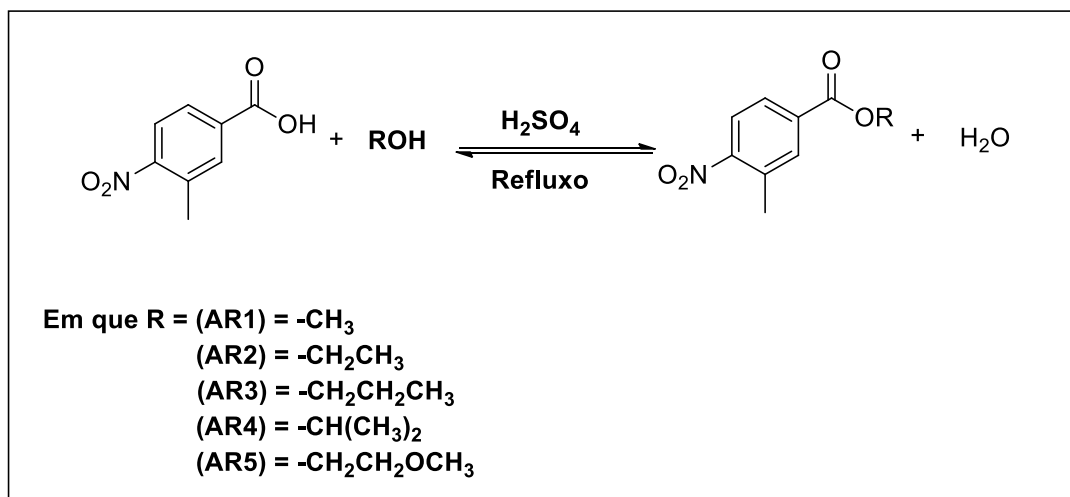


Fonte: Elaborado pela autora.

6.2.1. Preparação dos ésteres AR1 a AR5

O método utilizado foi esterificação de Fischer. O esquema geral encontra-se abaixo (esquema 7).

Esquema 7 - Reação de obtenção dos ésteres **AR1** a **AR5**.



Fonte: Elaborado pela autora.

Em um balão de fundo redondo de 50 mL com torneira lateral e equipado com uma barra de agitação magnética colocou-se 100 mg (0,1 g, 0,552 mmol) do ácido 3-metil-4-nitrobenzoico, 20 mL do álcool e 0,1 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄). O balão foi colocado em sistema de refluxo sob agitação. A temperatura de aquecimento variou de acordo com o ponto de ebulição dos álcoois utilizados. As reações desenvolvidas por esse método tiveram duração de 6 à 24 horas, foram monitoradas através de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) utilizando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etila em diferentes proporções (BUZZI *et. al*, 2009; SANDERSON *et. al*, 2013).

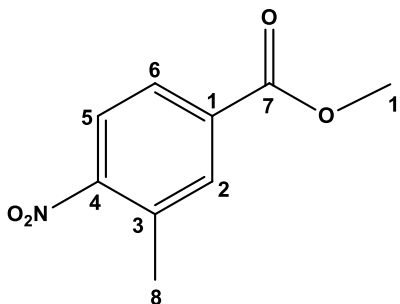
O álcool foi concentrado em rotaevaporador e em seguida o conteúdo foi vertido em funil de separação. Colocou-se 10 mL de água destilada e 10 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi separada e a fase aquosa ainda foi tratada com acetato de etila (2x 10 mL). À fase orgânica final adicionou-se 10 mL de uma solução de bicarbonato de sódio à 5% (NaHCO₃) com eliminação da fase aquosa; em seguida foram adicionados 10 mL de água destilada e posterior eliminação da fase aquosa. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄), filtrada

e concentrada em evaporador rotativo (BUZZI *et. al*, 2009; SANDERSON *et. al*, 2013).

As frações resultantes dos processos de extração das substâncias **AR4** (3-metil-4-nitrobenzoato de isopropila) e **AR5** (3-metil-4-nitrobenzoato de metoxi-etila) foram submetidas a uma purificação em coluna cromatográfica de silica gel 60, utilizando como fase móvel uma mistura de hexano e acetato de etila em proporções variadas.

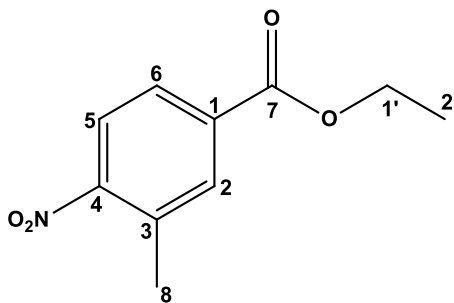
6.2.1.1. Dados espectroscópicos de AR1 a AR5

- **AR1: 3-metil-4-nitrobenzoato de metila**



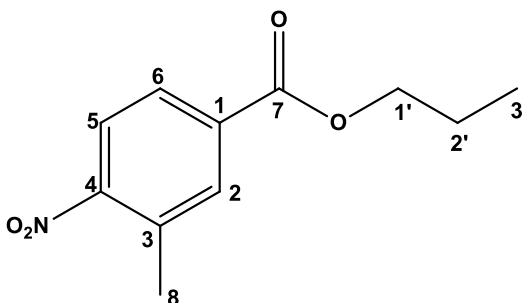
Cristais de cor amarela. Rendimento: 83,3% (95,8 mg). P. F: 80-81°C. IV (KBr, cm^{-1}): 3043 (C-H sp^2); 2958 (C-H sp^3); 1730 (estiramento C=O); 1616 e 1583 (estiramento C=C aromático); 1517 e 1342 (estiramento NO_2); 1280 e 1197 (estiramento C-O). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): $\delta(\text{ppm}) = 8,01 - 7,95$ (m, 3H, H-2, H-5, H-6), 3,95 (s, 3H, H-1'), 2,60 (s, 3H, H-8). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): $\delta(\text{ppm}) = 165,43$ (C-7), 151,97 (C-4); 134,10 (C-2); 133,87 (C-1); 133,57 (C-3), 128,15 (C-6), 124,67 (C-5), 52,82 (C-1'), 20,15 (C-8) (JIANG *et al.*, 2014; NIGROGI *et al.*, 2011).

- **AR2: 3-metil-4-nitrobenzoato de etila**



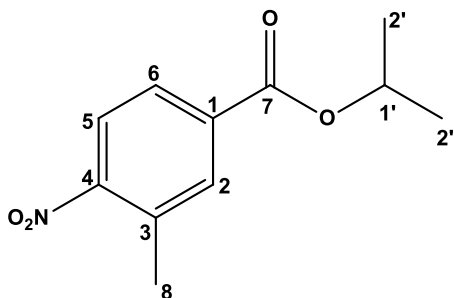
Sólido de cor marrom. Rendimento: 49,3% (57 g). P.F: 51-52°C. IV (KBr, cm^{-1}): 3047 (C-H sp^2); 2985 (C-H sp^3); 1726 (estiramento C=O); 1612 e 1587 (estiramento C=C aromático); 1523 e 1363 (estiramento NO_2); 1284 e 1199 (estiramento C-O). RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 8,02 – 7,96 (*m*, 3H, H-2, H-5, H-6), 4,42 (*q*, $J = 5,7$ Hz, 2H, H-1'), 2,62 (*s*, 3H, H-8), 1,42 (*t*, $J = 5,7$ Hz, 3H, H-2'). RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): δ (ppm)= 164,95 (C-7), 151,84 (C-4), 134,17 (C-1), 134,06 (C-2), 133,55 (C-3), 128,09 (C-6), 124,63 (C-5), 61,94 (C-1'), 20,28 (C-8), 14,37 (C-2') (DEKA; PAUL, 2006; NIGROGI *et al.*, 2011).

- **AR3 – 3-metil-4-nitrobenzoato de propila**



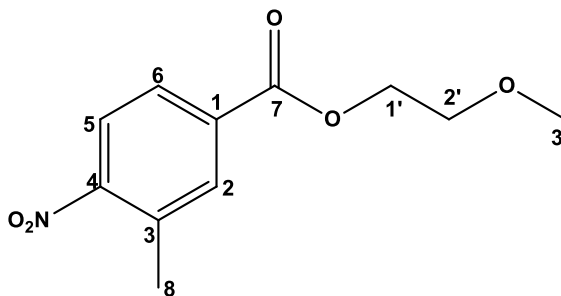
Sólido de cor marrom. Rendimento: 79,8% (98 g). P. F.: 37-38°C. IV (KBr, cm^{-1}): 3047 (C-H sp^2); 2966 (C-H sp^3); 1722 (estiramento C=O); 1614 e 1583 (estiramento C=C aromático); 1521 e 1346 (estiramento NO_2); 1284 e 1193 (estiramento C-O). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm)= 8,02 – 7,97 (*m*, 3-H, H-2, H-5, H-6), 4,31 (*t*, $J = 6,6$ Hz; 2H, H-1'), 2,62 (*s*, 3H, H-8), 1,81 (*sext*, $J = 7,4$ Hz; 2H, H-2'), 1,03 (*t*, $J = 7,4$ Hz, 2H, H-3'). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm)= 165,01 (C-7), 151,86 (C-4), 134,19 (C-1), 134,05 (C-2), 133,56 (C-3), 128,14 (C-6), 124,70 (C-5), 67,45 (C-1'), 22,12 (C-2'), 20,19 (C-8), 10,58 (C-3') (DEKA; PAUL, 2006; NIGROGI *et al.*, 2011).

- **AR4: 3-metil-4-nitrobenzoato de isopropila**



Sólido de cor amarela. Rendimento: 75,5% (93 mg). P. F.: 58-59°C. IV (KBr, cm^{-1}): 3045 (C-H sp^2); 2990 (C-H sp^3); 1718 (estiramento C=O); 1614 e 1583 (estiramento C=C aromático); 1519 e 1342 (estiramento NO_2); 1284 e 1193 (estiramento C-O). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 8,00 – 7,95 (*m*, 3H, H-2, H-5, H-6), 5,26 (*sept*, $J = 6,3$ Hz, 1H, H-1'), 2,62 (*s*, 3H, H-8), 1,38 (*d*, $J = 6,3$ Hz, 6H, H-2', H-2''). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm)= 164,46 (C-7), 151,84 (C-4), 134,64 (C-1), 133,99 (C-2), 133,49 (C-3), 128,15 (C-6), 124,63 (C-5), 69,63 (C-1'), 22,12 (C-2', C-2''), 20,19 (C-8) (DEKA; PAUL, 2006; NIGROGI *et al.*, 2011).

- **AR5: 3-metil-4-nitrobenzoato de 2-metoxietila**

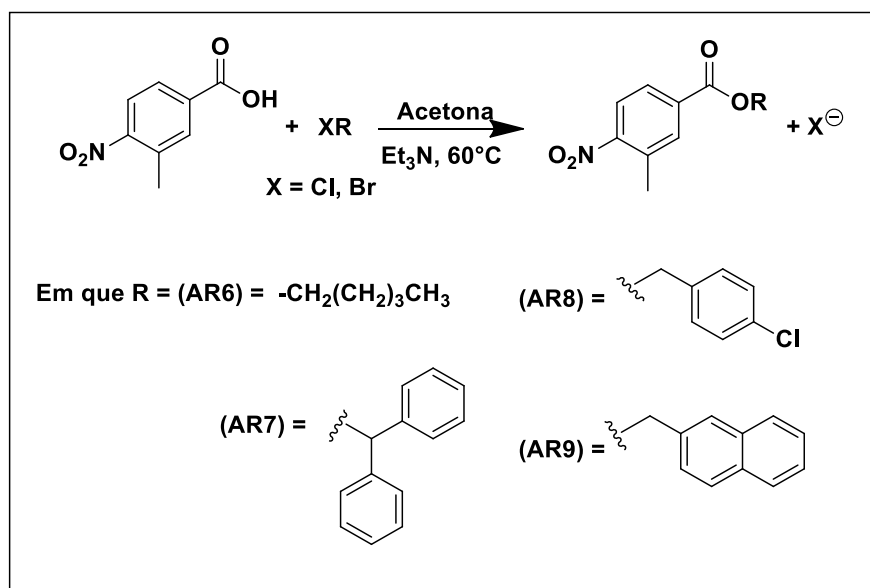


Sólido averdeado. Rendimento: 48,5% (64 mg). P.F. 36-37°C. IV (KBr, cm^{-1}): 3045 (C-H sp^2); 2931 (C-H sp^3); 1722 (estiramento C=O); 1614 e 1583 (estiramento C=C aromático); 1519 e 1340 (estiramento NO_2); 1282 e 1193 (estiramento C-O). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm)= 8,02 – 7,94 (*m*, 3H, H-2, H-5, H-6), 4,48 (*t*, $J=4,6$ Hz, 2H, H-1'), 3,72 (*t*, $J=4,6$ Hz, 2H, H-2'), 3,40 (*s*, 3H, H-3'), 2,59 (*s*, 3H, H-8). RMN de ^{13}C (100MHz, CDCl_3): δ (ppm)= 164,92 (C-7), 151,98 (C-4), 134,14 (C-2), 133,75 (C-1), 133,51 (C-3), 128,27 (C-6), 124,60 (C-5), 70,42 (C-1'), 64,80 (C-2'), 59,12 (C-3'), 20,09 (C-8) (MAGENS; PLIETKER, 2010; NIGROGI *et al.*, 2011). MALDI TOF/TOF calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}_5$ [M^+] = 239,2246, encontrada: 239,9802.

6.2.2. Preparação dos ésteres AR6-AR9

Foram realizadas esterificações entre o ácido 3-metil-4-nitrobenzoico e haletos de alquila e arila. O esquema reacional pode ser observado abaixo (esquema 8).

Esquema 8 - Reação para obtenção dos ésteres **AR6** a **AR9**.



Fonte: Elaborado pela autora.

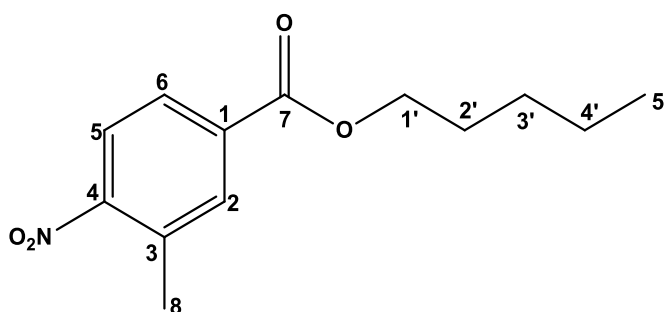
Em um balão de fundo redondo de 50mL com torneira lateral e equipado com barra de agitação magnética colocou-se 100 mg (0,1 g, 0,552 mmol) do ácido 3-metil-4-nitrobenzoico, 20 mL de acetona anidra, 0,1 mL (0,552 mmol, 1 equiv.) de trietilamina e por fim o haleto (0,552 mmol, 1 equiv.). O balão foi acoplado a um sistema de refluxo com banho de óleo (60°C) e agitação magnética (BOECK *et. al*, 2005; LI *et. al*, 2012). As reações desenvolvidas por esse método tiveram duração de 48 à 72 horas e foram monitoradas por CCDA. Após o final da reação, o conteúdo foi rotaevaporado e transferido para um funil de separação, onde também foi adicionado 10 mL de água destilada e 10 mL do solvente para extração. Após agitação, as fases orgânica e aquosa foram separadas; a fase aquosa foi tratada com 2 x 10 mL do solvente. A fase orgânica resultante foi seca com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄), filtrada e concentrada em evaporador rotativo. Com exceção do éster **AR7**, que mostrou melhor solubilidade em clorofórmio, os demais ésteres

dessa segunda coleção foram extraídos com diclorometano (BOECK *et. al*, 2005; LI *et. al*, 2012a).

Os resíduos resultantes dos processos de extração foram submetidos à purificação em coluna cromatográfica de sílica gel 60, tendo como eluente uma mistura de hexano e acetato de etila em diferentes proporções.

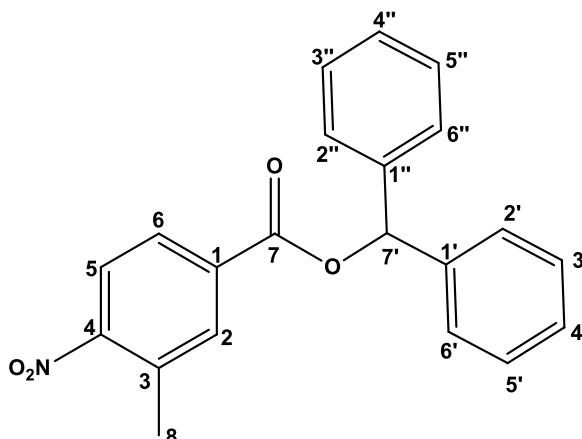
6.2.2.1. Dados espectroscópicos dos ésteres AR6-AR9

- **AR6: 3-metil-4-nitrobenzoato de pentila**



Óleo de cor esverdeada. Rendimento: 30% (42 mg). IV (KBr, cm^{-1}): 2958 (C-H sp^2); 2931 (C-H sp^3); 1726 (estiramento C=O); 1610 e 1589 (estiramento C=C aromático); 1533 e 1354 (estiramento NO_2); 1286 e 1195 (estiramento C-O). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm)= 8,00 – 7,95 (*m*, 3H, H-2, H-5, H-6), 4,34 (*t*, $J=6,7$ Hz, 2H, H-1'), 2,61 (*s*, 3H, H-8), 1,77 (*quint*, $J=6,8$ Hz, 2H, H-2'), 1,42 – 1,37 (*m*, 4H, H-3', H-4'), 0,93 (*t*, $J=7,1$ Hz, 3H, H-5'). RMN de ^{13}C (100MHz, CDCl_3): δ (ppm)= 165,02 (C-7), 151,91 (C-4), 134,24 (C-1), 134,03 (C-2), 133,54 (C-3), 128,11 (C-6), 124,65 (C-5), 66,07 (C-1'), 28,43 (C-2'), 28,23 (C-3'), 22,44 (C-4'), 20,19 (C-8), 14,07 (C-5') (LIU *et al.*, 2014).

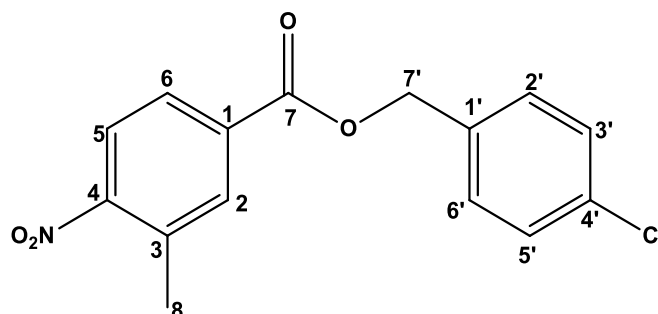
- **AR7: 3-metil-4-nitrobenzoato de difenilmetila**



Nome IUPAC: 3-metil-4-nitrobenzoato de benzidryla.

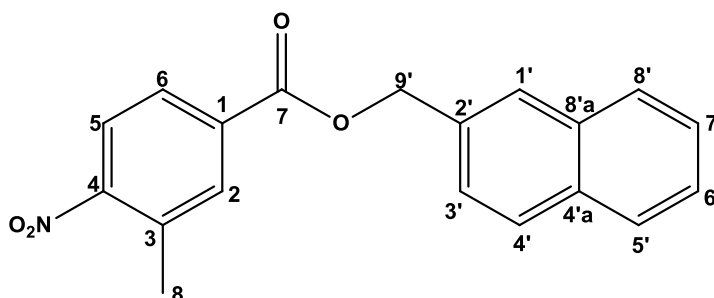
Sólido amorfo e branco. Rendimento: 12,7% (24,3 mg), P.F.: 100-101°C. IV (KBr, cm^{-1}): 3032 (C-H sp^2); 2924 (C-H sp^3); 1726 (estiramento C=O); 1614 e 1583 (estiramento C=C aromático); 1519 e 1346 (estiramento NO_2); 1280 e 1192 (estiramento C-O). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm)= 8,11 – 7,97 (m, 3H, H-2, H-5, H-6); 7,47 – 7,32 (m, 10H, H-2' à H-6' e H-2'' à H-6''); 7,17 (s, 1H, H-7'); 2,64 (s, 3H, H-8). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm)= 163,97 (C-7); 152,07 (C-4); 139,73 (C-1' e C-1''); 134,18 (C-2); 133,88 (C-1); 133,62 (C-3); 128,77 (C-2', C-6' e C-2'', C-6''); 128,33 (C-4' e C-4''); 128,30 (C-6); 127,23 (C-3', C-5' e C-3'', C-5''); 124,70 (C-5); 78,43 (C-7'); 20,13 (C-8) (MAGENS; PLIETKER, 2010; NIGROGI *et al.*, 2011).

• **AR8: 3-metil-4-nitrobenzoato de 4-cloro-benzila**



Sólido de cor esverdeada. Rendimento: 52% (87,8 mg). P.F. 96-97°C. IV (KBr, cm^{-1}): 2933 (C-H sp^2); 1722 (estiramento C=O); 1614 e 1581 (estiramento C=C aromático); 1521 e 1344 (estiramento NO_2); 1276 e 1192 (estiramento C-O). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm)= 8,02 – 7,96 (m, 3H, H-2, H-5, H-6), 7,40-3,35 (m, 4H, H-2', H-3', H-5', H-6'), 5,34 (s, 2H, H-7'), 2,61 (s, 3H, H-8). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm)= 164,71 (C-7), 152,10 (C-4), 134,69 (C-1'), 134,17 (C-2), 133,96 (C-1), 133,65 (C-4'), 133,62 (C-3), 129,96 (C-2', C-6'), 129,06 (C-3', C-5'), 128,27 (C-6), 124,71 (C-5), 66,79 (C-7'), 20,15 (C-8) (KIM *et al.*, 2010b; NIGROGI *et al.*, 2011).

• **AR9: 3-metil-4-nitrobenzoato de 2-metil-naftalenila**



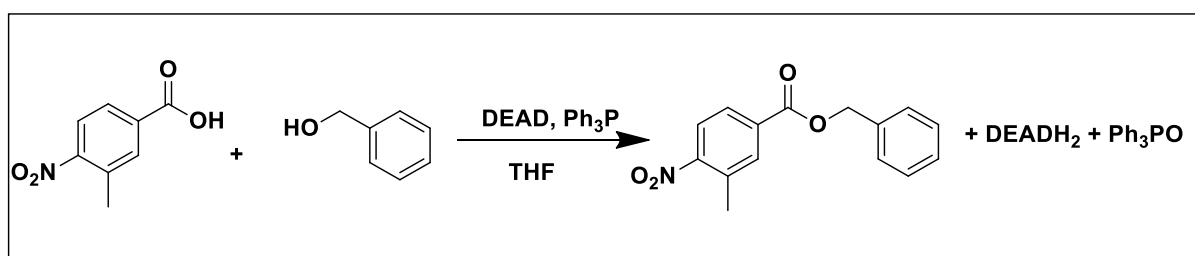
Sólido branco. Rendimento: 34,1% (60,4 mg). P.F.: 101-102°C. IV (KBr, cm^{-1}): 3057 (C-H sp^2); 2935 (C-H sp^3); 1720 (estiramento C=O); 1612 e 1583 (C=C aromático); 1519 e 1344 (estiramento NO_2); 1278; 1193 (estiramento C-O). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm)= 8,06-7,94 (m, 3H, H-2, H-5, H-6); 7,91-7,85 (m, 4H, H-1', H-4', H-8', H-5'); 7,57-7,49 (m, 3H, H-3', H-6', H-7'); 5,55 (s, 2H, H-9'); 2,61 (s, 3H, H-8). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm)= 164,87 (C-7); 152,06 (C-4); 134,21 (C-2); 133,85 (C-2'); 133,63 (C-1'); 133,39 (C-8'a); 133,30 (C-4'a); 132,85 (C-3); 128,74 (C-4'); 128,32 (C-8'); 128,15 (C-5'); 127,93 (C-1'); 127,89 (C-7'); 126,66 (C-6);

126,62 (C-6'); 126,07 (C-3'); 124,71 (C-5); 67,84 (C-9'); 20,17 (C-8 (DANDAPANI; CURRAN, 2004; NIGROGI *et al.*, 2011).

6.2.3. Preparação do éster AR10

O método utilizado foi a reação de Mitsunobu. De acordo com o seguinte esquema reacional (esquema 9):

Esquema 9 - Reação de obtenção do éster **AR10**.



Fonte: Elaborado pela autora.

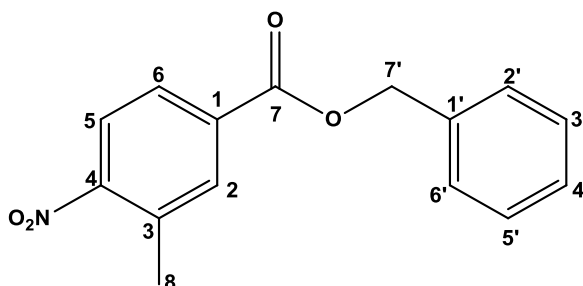
Em um balão de fundo redondo de 50 mL equipado com uma barra de agitação magnética foi colocado 100 mg (0,1 g; 0,552 mmol) do ácido 3-metil-4-nitrobenzoico, 0,057 mL do álcool benzílico (0,552 mmol, 1 equiv.) e 2 mL de tetrahydrofurano (THF). O conteúdo foi colocado em agitação magnética e posto em um banho de gelo por 30 minutos. Após esse período adicionou-se à mistura 140 mg (0,14 g, 0,552 mmol, 1 equiv.) de trifetilfosfina (PPh₃) e 0,11 mL (0,552 mmol, 1 equiv.) do azodicarboxilato de dietila (DEAD). A mistura permaneceu à temperatura ambiente sob agitação magnética por 48 horas. A reação foi monitorada por CCDA (BATOVSKA *et. al.*, 2005).

Ao fim da reação, o conteúdo foi rotaevaporado e vertido em funil de separação. Adicionou-se 10 mL de água destilada e 10 mL de diclorometano, após agitação as fases orgânica e aquosa foram separadas. A fase aquosa foi tratada 2 x 10 mL de diclorometano. A fase orgânica resultante foi tratada com 10 mL de uma solução de bicarbonato de sódio à 5% (NaHCO₃); em seguida com 10 mL de água destilada, seca com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄), filtrada e rotaevaporada (BATOVSKA *et. al.*, 2005).

A fração resultante foi submetida à purificação por coluna cromatográfica contendo sílica gel 60 como fase estacionária e utilizando como fase móvel uma mistura de hexano e acetato de etila na proporção de 95:5.

6.2.3.1. Dados espectroscópicos do éster AR10

- **AR10: 3-metil-4-nitrobenzoato de benzila**

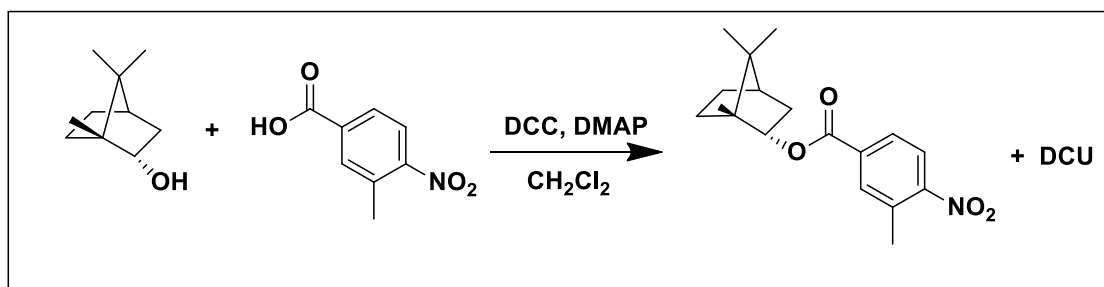


Sólido branco. Rendimento: 43,2% (62,2 mg). P. F.: 35-36°C. IV (KBr, cm^{-1}): 3037 (C-H sp^2); 2968 (C-H sp^3); 1718 (estiramento C=O); 1612 e 1585 (estiramento C=C aromático); 1527 e 1358 (estiramento NO_2); 1280 e 1192 (estiramento C-O). RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): $\delta(\text{ppm})=8,04-7,94$ (m, 3H, H-2, H-5, H-6); 7,43-7,37 (m, 5H, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6'); 5,39 (s, 2H, H-7'); 2,61 (s, 3H, H-8). RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 164,81 (C-7); 152,08 (C-4); 135,51 (C-1'); 134,18 (C-2); 133,87 (C-1); 133,59 (C-3) 128,85 (C-3', C-5'); 128,72 (C-6); 128,54 (C-2', C-6'); 128,29 (C-4'); 124,67 (C-5); 67,64 (C-7'); 20,14 (C-8) (MAGENS; PLIETKER, 2010; NIGROGI *et al.*, 2011).

6.2.4. Preparação do éster AR11

O método utilizado foi a esterificação de Steglich, entre o ácido 3-metil-4-nitrobenzoico e o (+)-borneol. O esquema geral da reação encontra-se abaixo (esquema 10):

Esquema 10 - Reação de preparação do éster **AR11**.



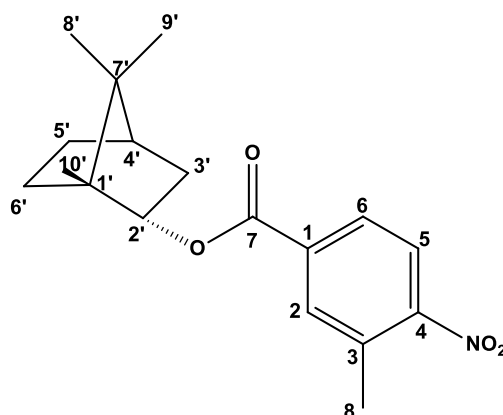
Fonte: Elaborado pela autora.

Em um balão de fundo redondo de 50 mL equipado com uma barra de agitação magnética foi colocado 100 mg (0,1 g, 0,552 mmol) do ácido 3-metil-4-nitrobenzoico, 170 mg do (+)-borneol (0,170 g, 1,104 mmol, 2 equiv.) e 6,74 mg (0,00674 g, 0,0552 mmol, 0,1 equiv.) de 4-(dimetilamino)-piridina (DMAP); esse conteúdo foi dissolvido em diclorometano (4 mL) e o balão foi acoplado ao agitador magnético. Em seguida, 125 mg (0,125 g, 1,1 equiv.) de diciclohexilcarbodiimida (DCC) foi dissolvido em diclorometano (6 mL) e adicionado ao meio reacional gota a gota (NEISES; STEGLICH, 1978).

A reação teve duração de 48 horas e foi monitorada por CCDA. Após a retirada do conteúdo reacional da agitação o mesmo foi filtrado para a retirada da DCU, pouco solúvel em diclorometano, foram necessárias três filtrações. O conteúdo foi vertido em funil de separação, onde foram adicionados 10 mL de água destilada e 10 mL de diclorometano, com posterior separação da fase orgânica. A fase aquosa foi tratada com 2 x 10 mL de diclorometano. A fase orgânica resultante foi tratada com 10 mL de uma solução de ácido clorídrico (HCl) à 0,5 N, em seguida, foi tratada com 10 mL de uma solução de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) à 5% e com 10 mL de água destilada. A solução foi seca com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄), filtrada e rotaevaporada (NEISES; STEGLICH, 1978). O resíduo foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel 60 como fase estacionária e uma mistura entre hexano e acetato de etila na proporção de 95:5 como fase móvel.

6.2.4.1. Dados espectrocópicos do éster AR11:

- AR11: 3-metil-4-nitrobenzoato de (+)-bornila



Nome IUPAC: (1R, 2S, 4R) – 3-metil-4-nitrobenzoato de 1,7,7 - trimetilbiciclo (2, 2, 1)-heptan-2-il.

Sólido verde. Rendimento: 28% (49 mg). P.F 160-161 °C. IV IV (KBr, cm^{-1}): 2960 (C-H sp^3); 1726 (estiramento C=O); 1612 e 1589 (estiramento C=C aromático); 1529 e 1352 (estiramento NO_2); 1286 e 1195 (estiramento C-O). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): $\delta(\text{ppm})$ = 8,01-7,95 (*m*, 3H, H-2, H-5, H6), 5,14 (*ddd*, J = 9,9; 3,4; 2,2 Hz; 1H, H-2'); 2,63 (*s*, 3H, H-8); 2,53-2,44 (*m*, 1H, H-3'a); 2,11-2,04 (*m*, 1H, H-6a'); 1,86-1,74 (*m*, 1H, H-5a'); 1,76 (*t*, J =4,5Hz, 1H, H-4'); 1,47-1,39 (*m*, 1H, H-6'b); 1,35-1,28 (*m*, 1H, H-5'b); 1,12 (*dd*, J =13,9; 3,4 Hz, 1H, H-3'b); 0,97 (*s*, 3H, H-8'); 0,92 (*s*, 3H, H-9'); 0,91 (*s*, 3H, H-10'). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 165,22 (C-7); 151,91 (C-4); 134,63 (C-1); 133,99 (C-2); 133,59 (C-3); 128,08 (C-6); 124,71 (C-5); 81,75 (C-2'); 49,31 (C-1'); 48,12 (C-7'); 45,08 (C-4'); 36,98 (C-3'); 28,22 (C-5'); 27,55 (C-6'); 20,29 (C-8), 19,85 (C-9'); 19,04 (C-8'), 13,77 (C-10').

6.3. Testes de avaliação da atividade antifúngica

5.3.1. Local de Trabalho

Os ensaios biológicos de avaliação da atividade antifúngica foram realizados no Laboratório de Farmacologia Experimental e Cultivo Celular do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba (CCS/UFPB).

6.3.2. Produtos testados

Os produtos foram submetidos a ensaios biológicos para testes de avaliação da atividade antifúngica sobre cepas de fungos leveduriformes. Os mesmos foram solubilizados em dimetil-sulfóxido (DMSO) e em seguida em água destilada e esterilizada (quantidade suficiente para 1,0 mL) obtendo-se uma solução em que a concentração inicial, na primeira linha da placa de microdiluição foi de 1000 µg/mL das substâncias testadas. (CLEELAND; SQUIRES, 1991; NASCIMENTO et al., 2007; PEREIRA et al., 2014).

6.3.3. Meio de cultura

O meio de cultura utilizado nos ensaios de avaliação da atividade antifúngica foi o Caldo Sabouraus Dextrose (ASD), da Kasvi, preparado segundo as normas do fabricante.

6.3.4. Microrganismos

Para os testes de avaliação da atividade antifúngica foram utilizadas as seguintes cepas: *Candida albicans* ATCC 90028; *Candida glabrata* ATCC 90030; *Candida krusei* ATCC 34125 e *Candida guilliermondii* 207.

Os microrganismos pertencem ao laboratório de Farmacologia Experimental e Cultivo Celular (CCS/UFPB).

6.3.5. Ajuste do Inóculo

Para a reativação dos microrganismos, os mesmos foram inoculados em meio de cultura estéril (ASD), incubados por 24 horas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. A quantidade de leveduras para a realização dos testes foi ajustada da seguinte maneira: utilizando a absorbância (lida em espectrofotômetro) do inóculo inicial, detectou-se o volume (em μL) necessário deste inóculo, que foi submetido a posterior diluição em meio ASD e obtenção de um inóculo ajustado com concentração de $2,5 \times 10^3$ UFC/mL (PEIXOTO *et al.*, 2017)(PEIXOTO *et al.*, 2017).

6.3.6. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos produtos testados

A Concentração Inibitória Mínima das substâncias avaliadas foi realizada utilizando a técnica de Microdiluição em placa de 96 poços com fundo em “U”; de acordo com o previsto pelo CLSI (Instituto de Padrões para Laboratório Clínico), 2002 e pela referência de PEIXOTO *et al.*, 2017. Inicialmente foram distribuídos 100 μL do caldo sabouraud dextrose (ASD) duplamente concentrado nos orifícios das placas de microdiluição. Em seguida, 100 μL da solução dos produtos preparados foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. Por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foi obtida concentrações de 1000 $\mu\text{g/mL}$ até 7,8 $\mu\text{g/mL}$. Por fim, foi adicionado 100 μL do inóculo da cepa fúngica em cada orifício das placas. Em paralelo foram realizados os controles: controle do meio (ASD), controle dos microrganismos (ASD + inóculo), controle para as substâncias (ASD + 50 μL de cada produto). Para comprovação da viabilidade do meio, do microrganismo e das substâncias. As placas foram fechadas e submetidas a uma temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas. A nistatina foi utilizada como controle positivo na concentração de 0,4 $\mu\text{g/mL}$.

Após o período de incubação foi adicionado a cada poço, 50 μL de cloreto de trifeniltetrazólio (TCT) a 1% (Sigma-Aldrich®), um indicador colorimétrico de oxido-redução para fungos. As placas foram incubadas novamente $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas (GRABE, 1976; DESWAL; CHAND, 1997; DUARTE *et al.*, 2005).

Os testes foram realizados em duplicata. A leitura dos ensaios foi realizada através da visualização de coloração vermelha nas cavidades, indicando o

crescimento do microrganismo. A CIM para cada produto foi definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico, sendo interpretada da seguinte maneira: 50-500 µg/mL= forte/ótima atividade; 600-1500 µg/mL= moderada atividade; > acima de 1500 µg/mL=fraca atividade ou produto inativo (HOLETZ *et al.*, 2002; SARTORATTO *et al.*, 2004; HOUGHTON *et al.*, 2007).

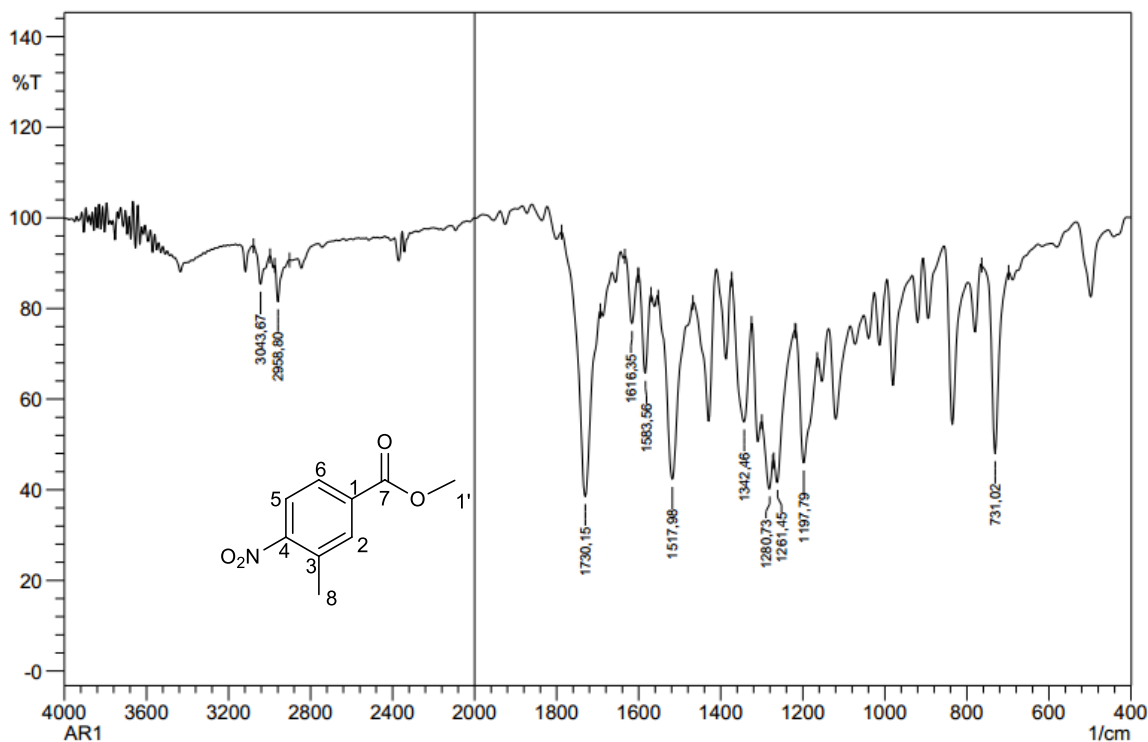
6.3.7. Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos produtos testados

A determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) das substâncias foi realizada após leitura da CIM. Foram retiradas três alíquotas de 30 µL do sobrenadante dos orifícios onde foi observado completa inibição do crescimento fúngico e semeadas em placas de petri contendo 15 mL de Ágar Sabouraud. A incubação foi a 35 ± 2 °C por 24 horas. A CFM foi definida como a menor concentração que inibiu visualmente o crescimento fúngico em meio sólido (PEIXOTO, *et al.*, 2017).

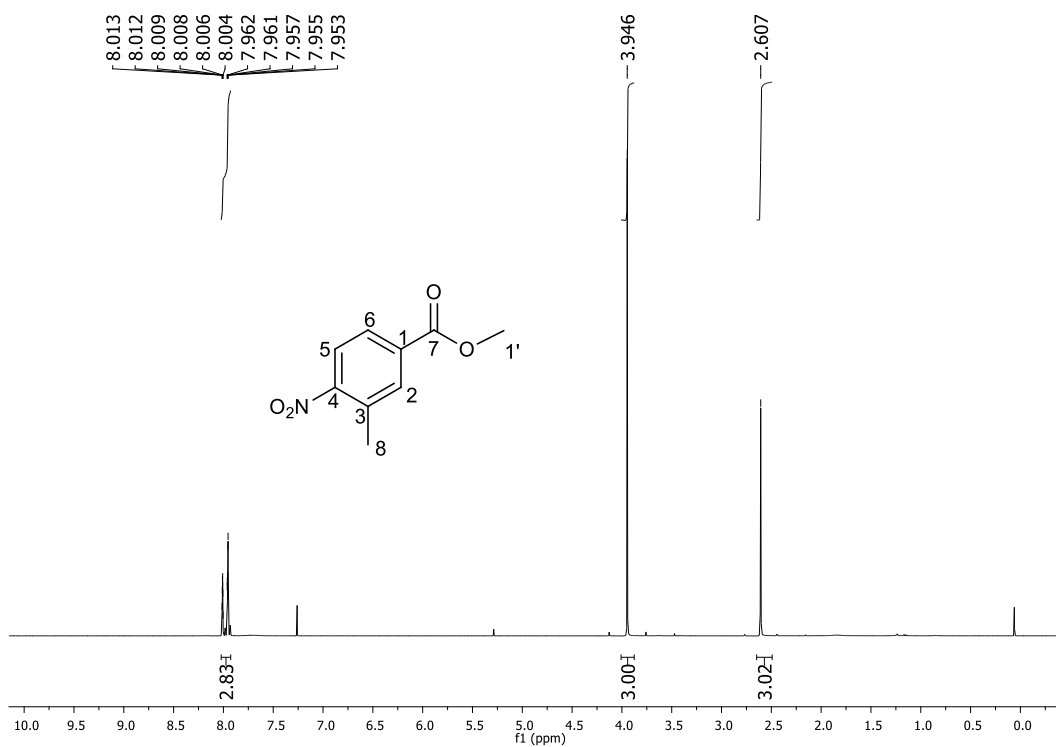
A relação entre CFM/CIM foi calculada para determinar se as substâncias são fungistática ($CFM/CIM \geq 4$) ou fungicida ($CFM/CIM < 4$) (PEIXOTO *et al.*, 2017).

ESPECTROS

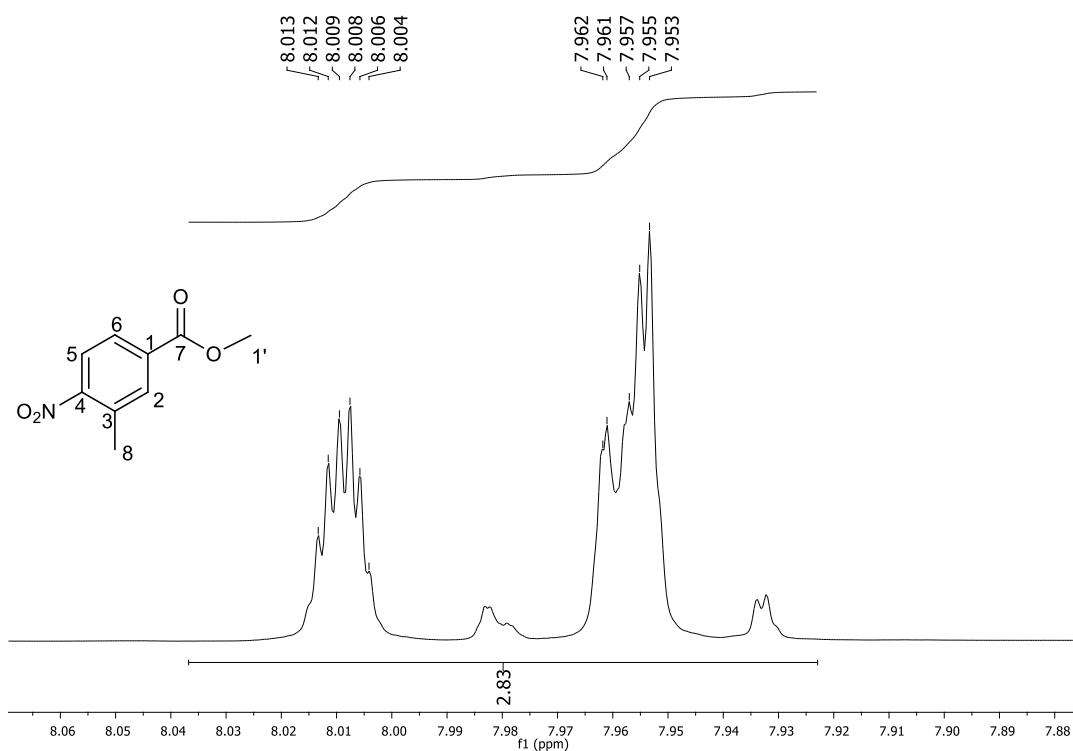
Espectro 1 – Espectro de Infravermelho (KBr cm^{-1}) do 3-metil-4-nitrobenzoato de metila (AR1).



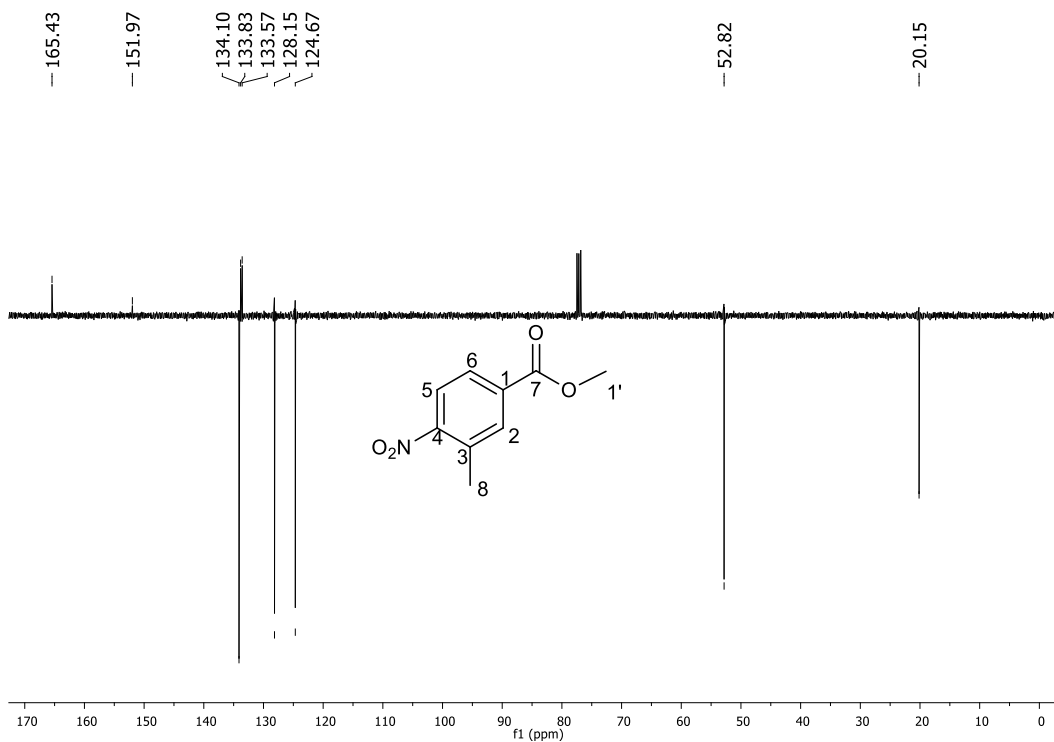
Espectro 2 - Espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de metila (AR1).



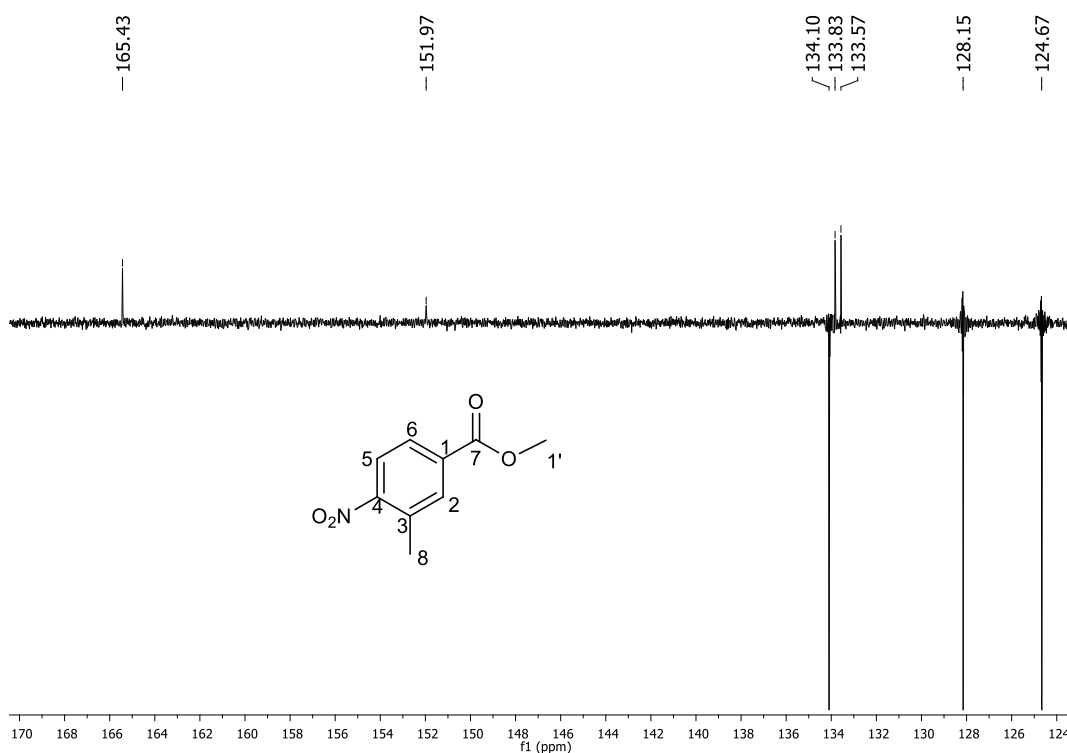
Espectro 3 – Expansão Espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de metila (**AR1**).



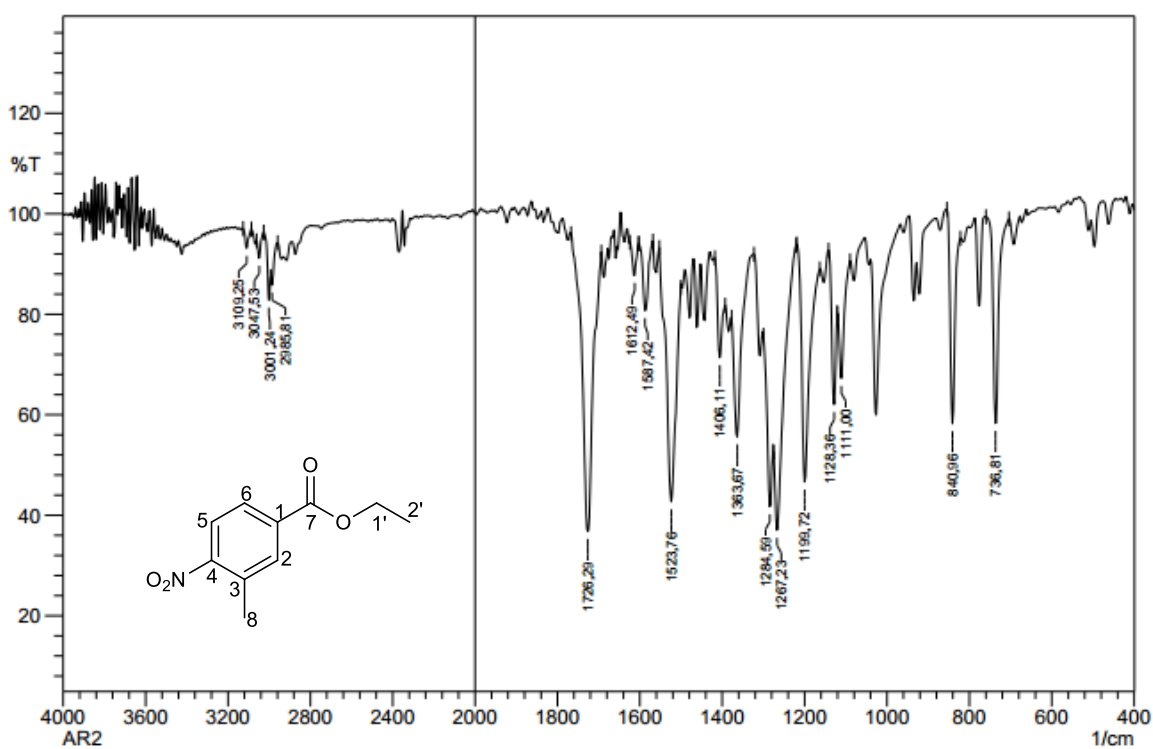
Espectro 4 – Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de metila (**AR1**).



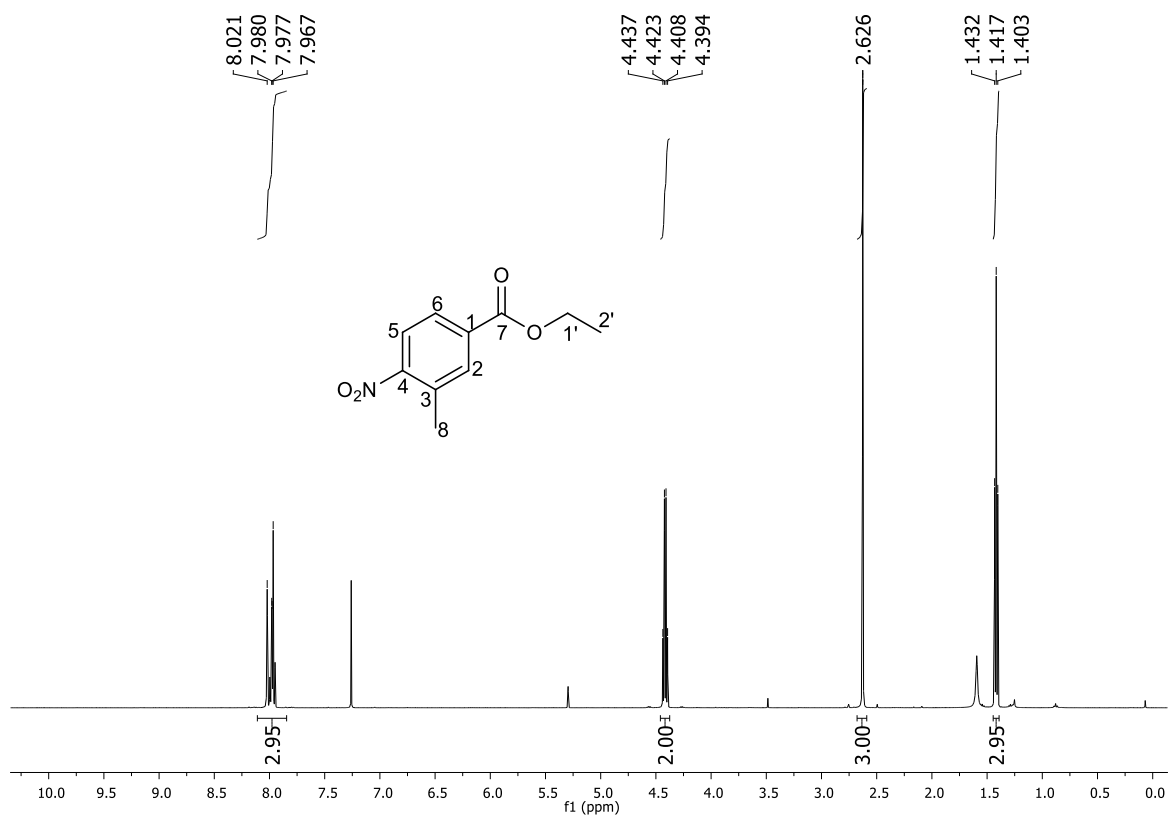
Espectro 5 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (100MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de metila (**AR1**).



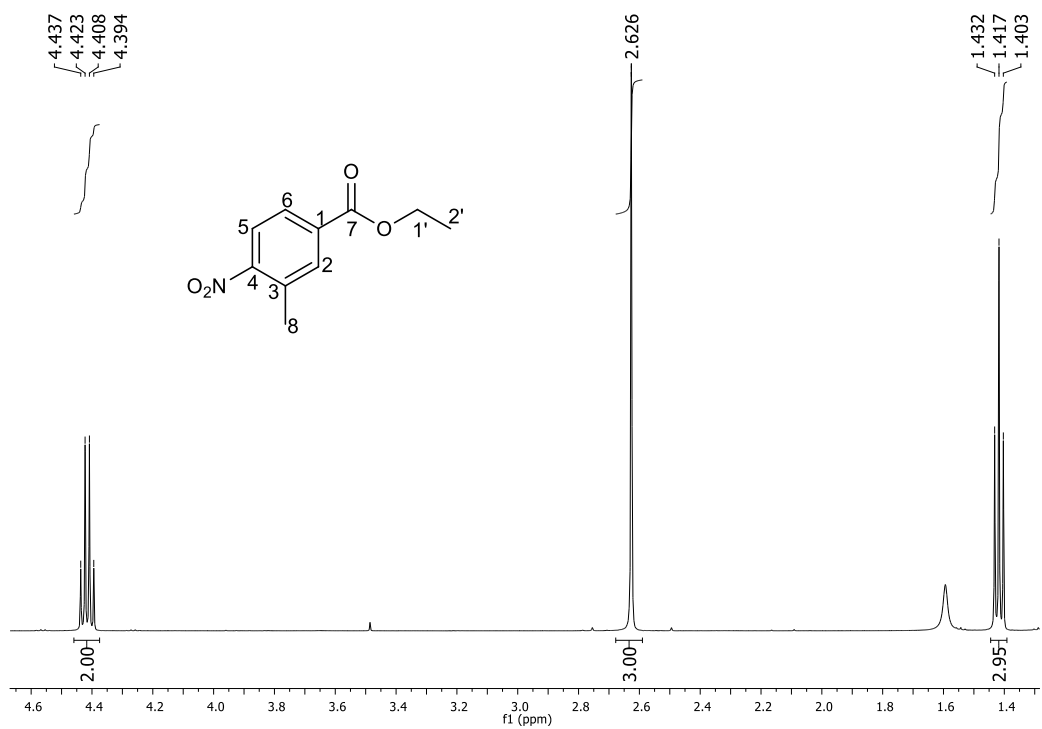
Espectro 6 – Espectro de Infravermelho (KBr cm^{-1}) do 3-metil-4-nitrobenzoato de etila (**AR2**).



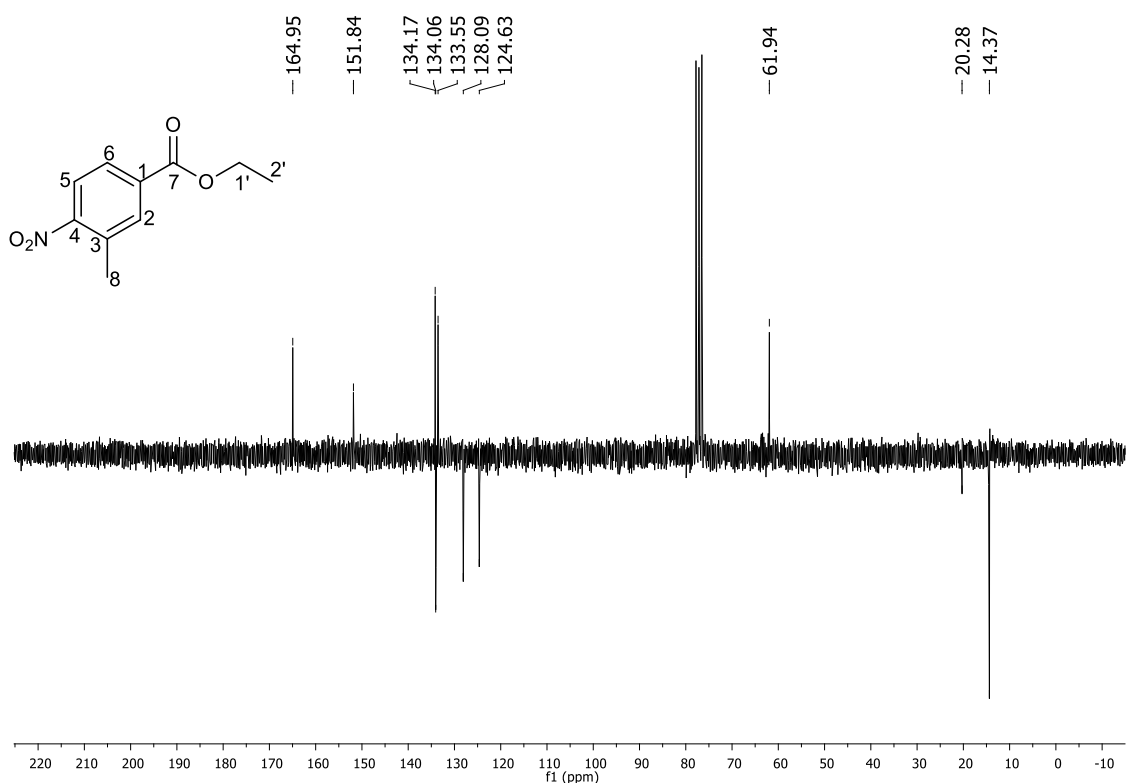
Espectro 7 - Espectro de RMN de ^1H (500MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de etila (**AR2**).



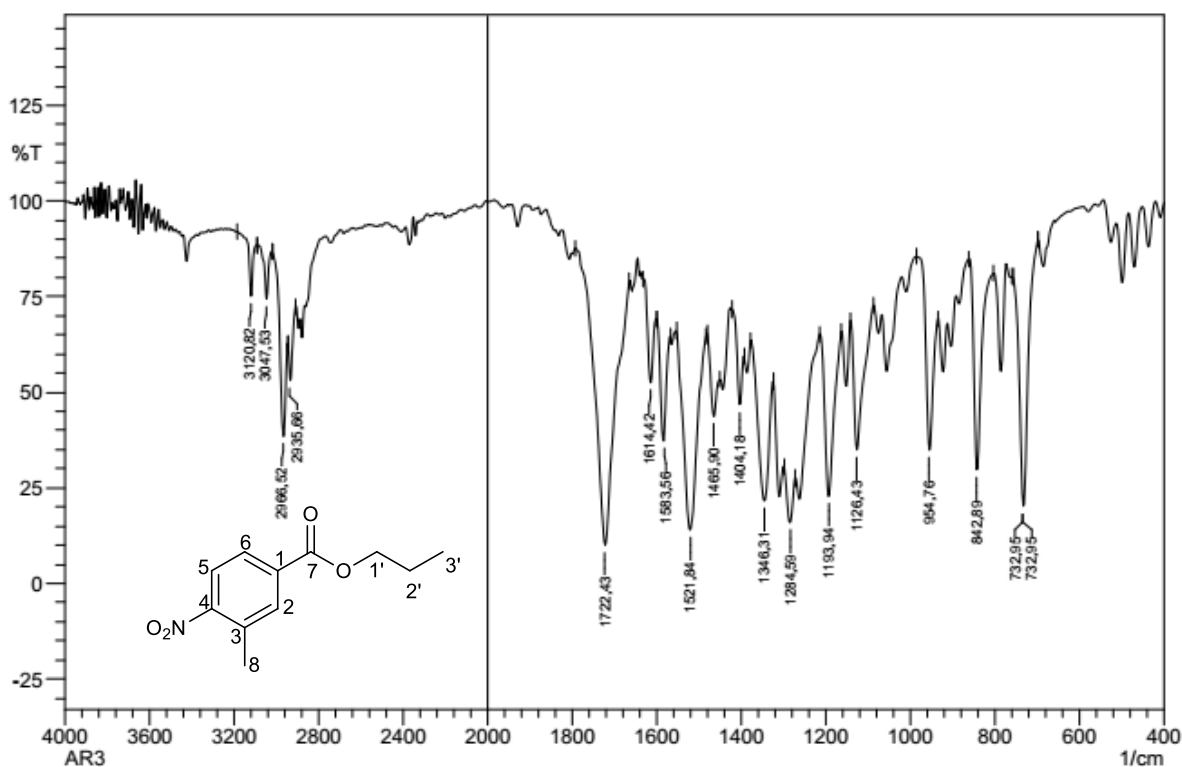
Espectro 8 - Expansão do Espectro de RMN de ^1H (500MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de etila (**AR2**).



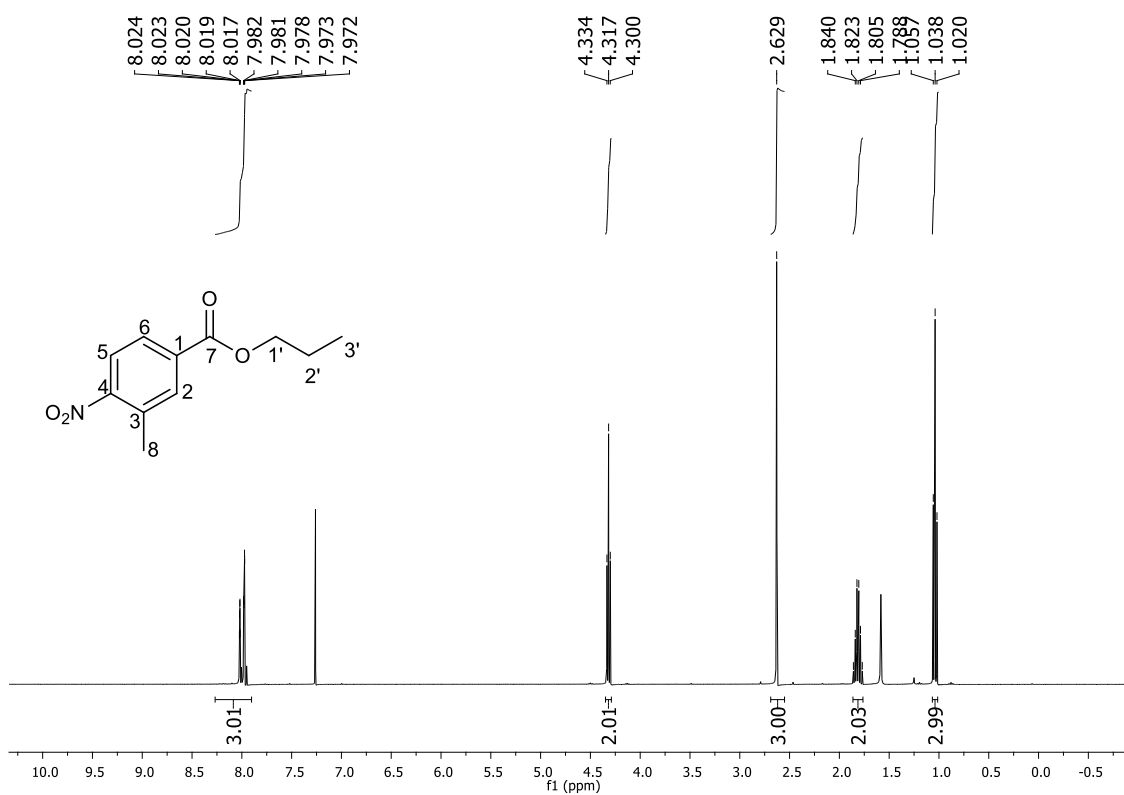
Espectro 9 – Espectro de RMN de ^{13}C -APT (125MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de etila (AR2).



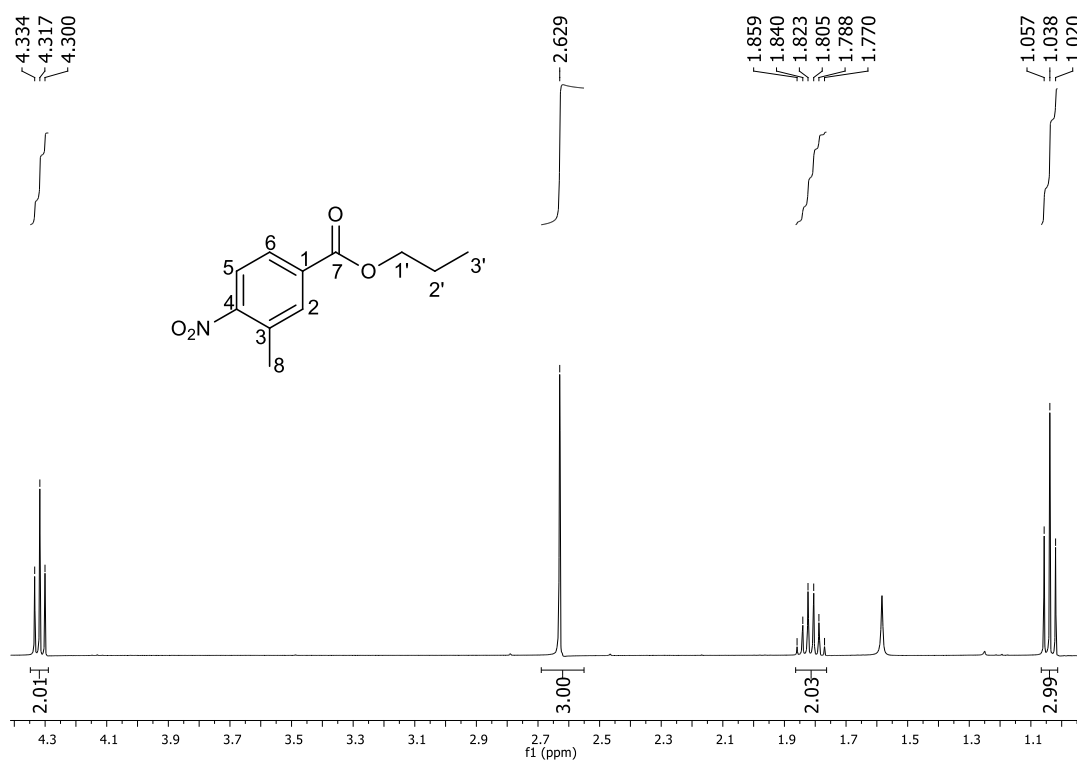
Espectro 10 – Espectro de Infravermelho (KBr cm^{-1}) do 3-metil-4-nitrobenzoato de propila (AR3).



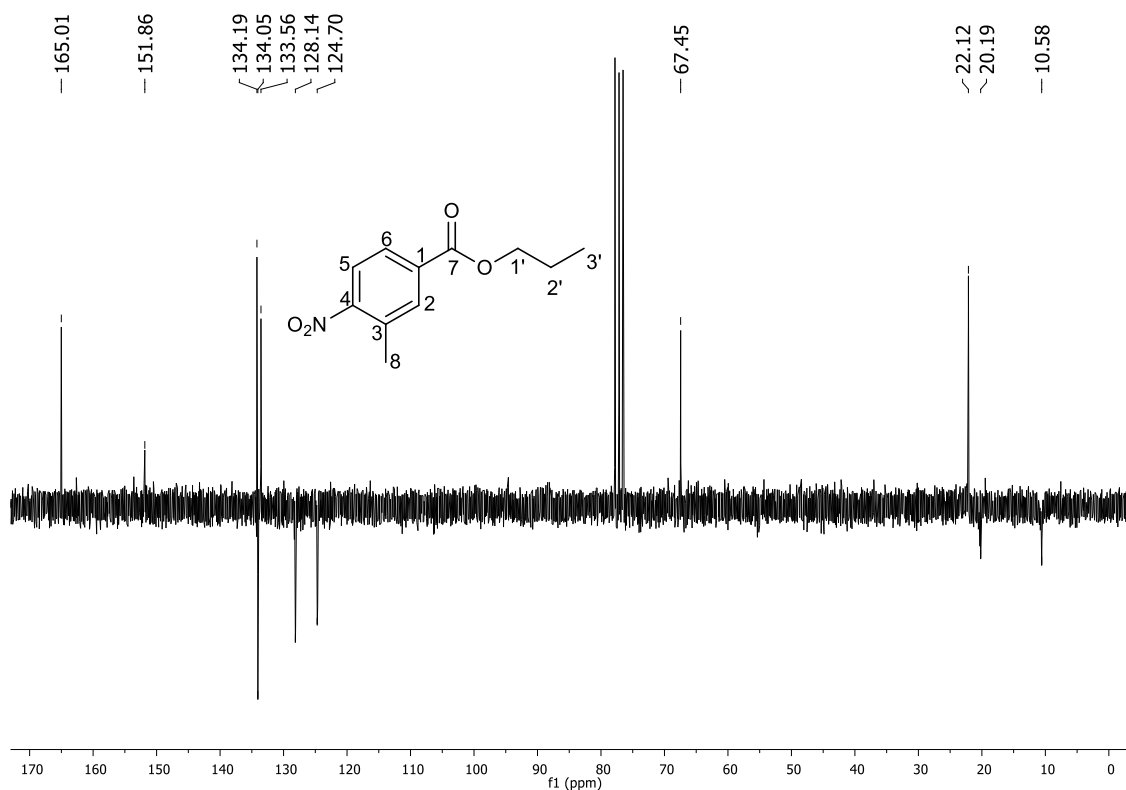
Espectro 11 - Espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de propila (**AR3**).



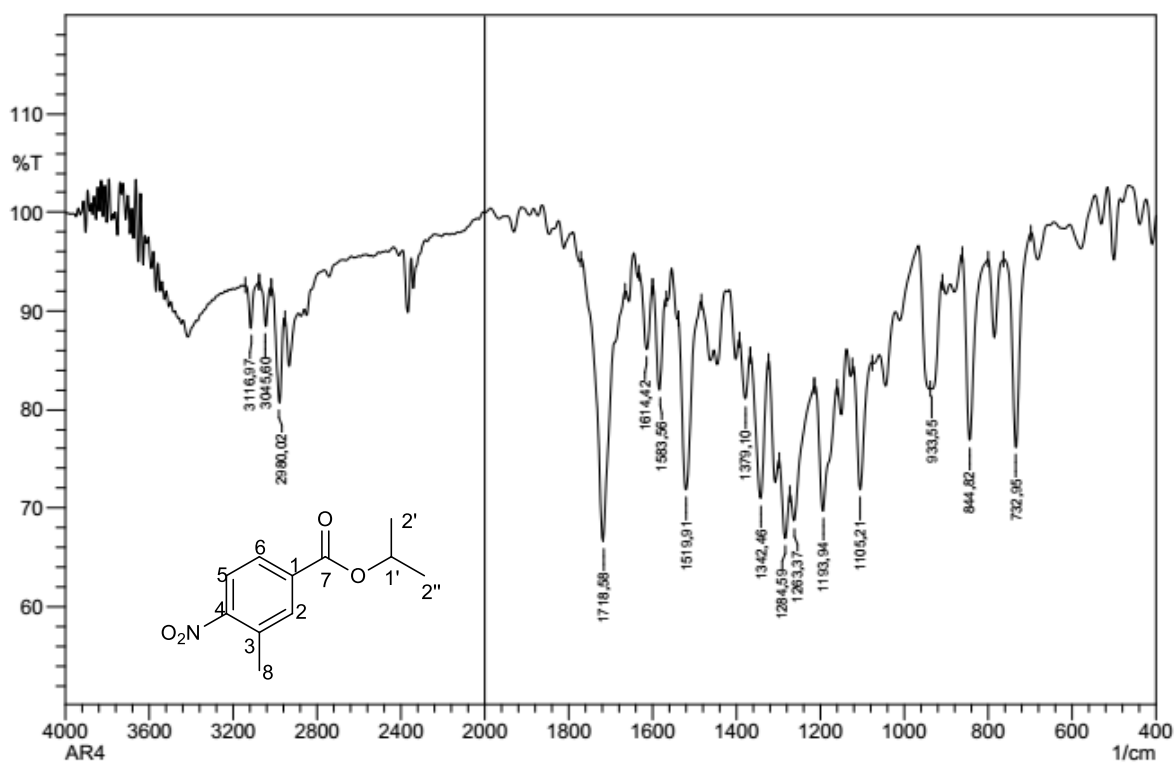
Espectro 12 - Expansão do Espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de propila (**AR3**).



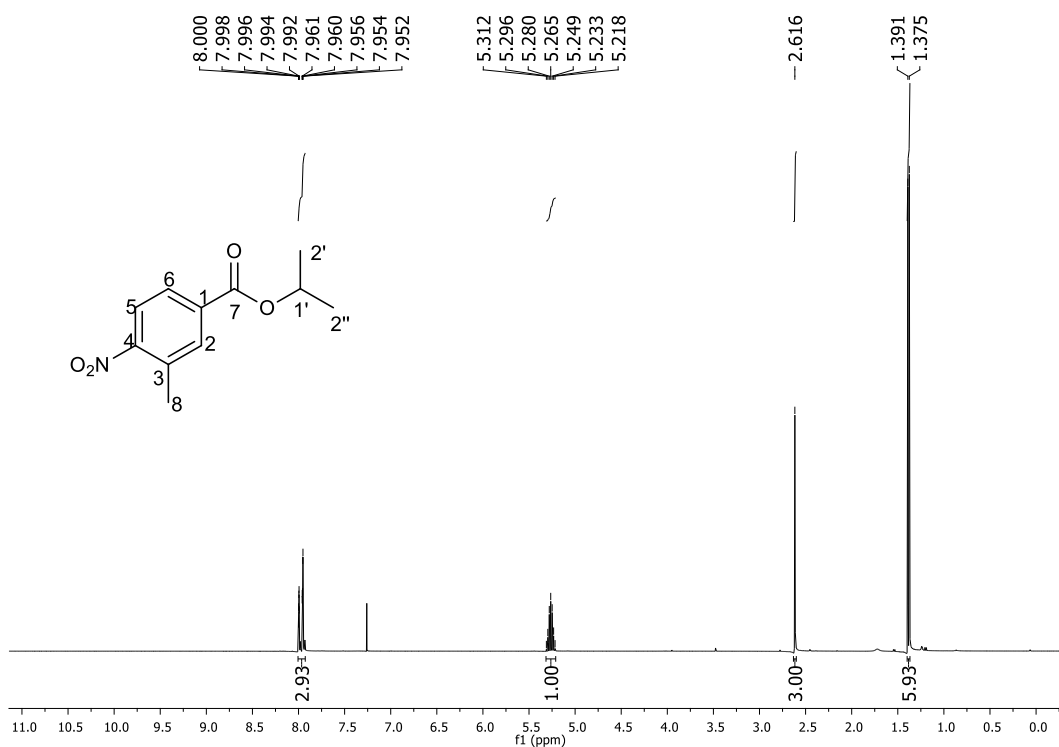
Espectro 13 – Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de propila (**AR3**).



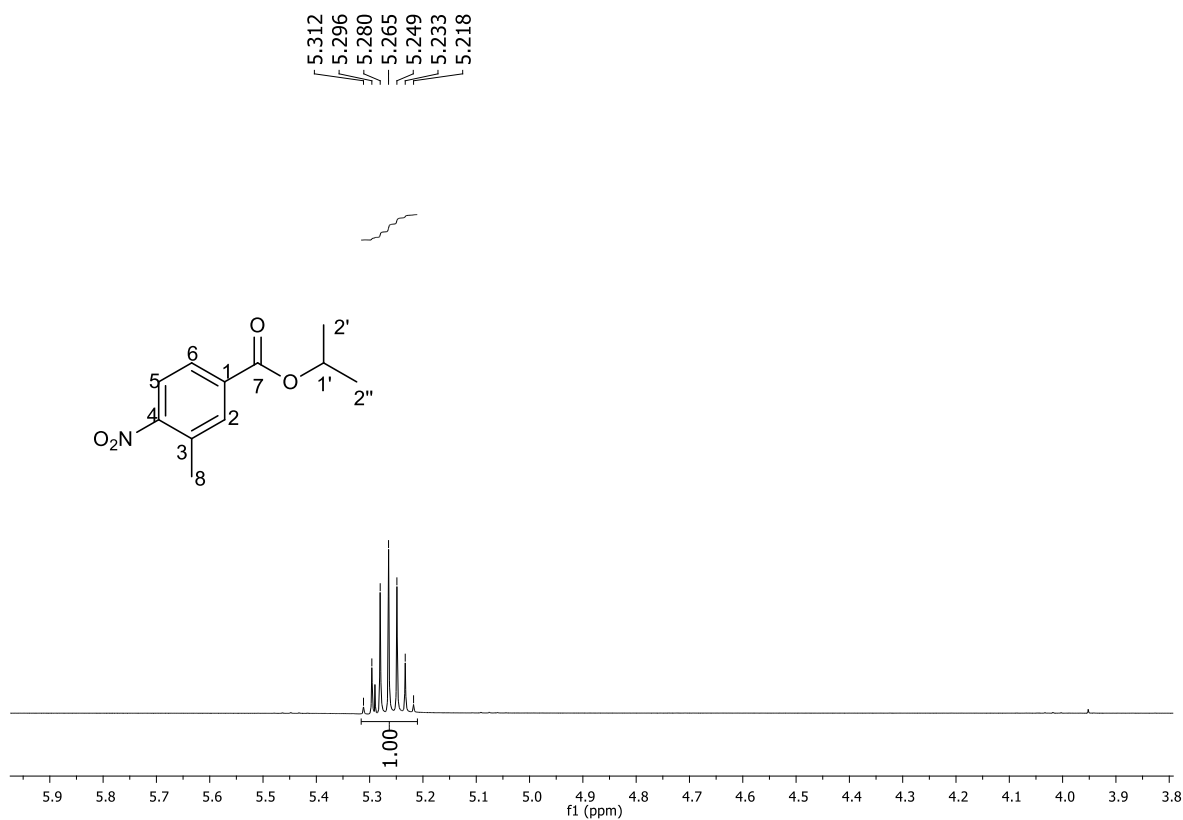
Espectro 14 – Espectro de Infravermelho (KBr cm^{-1}) do 3-metil-4-nitrobenzoato de isopropila (**AR4**).



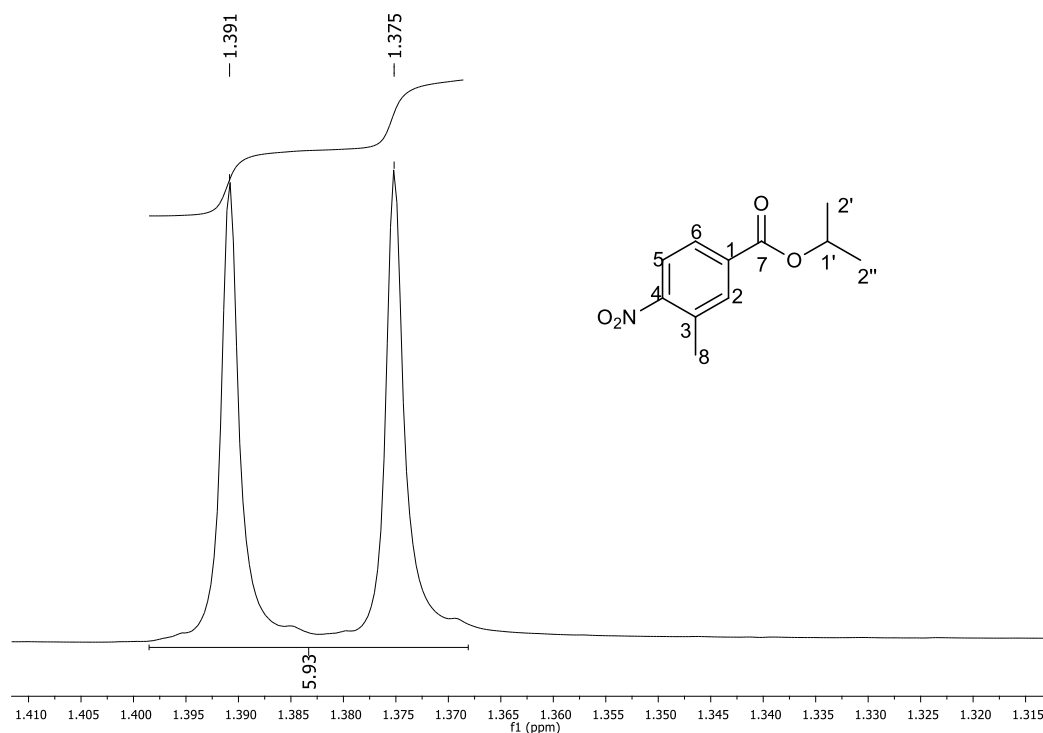
Espectro 15 - Espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de isopropila (**AR4**).



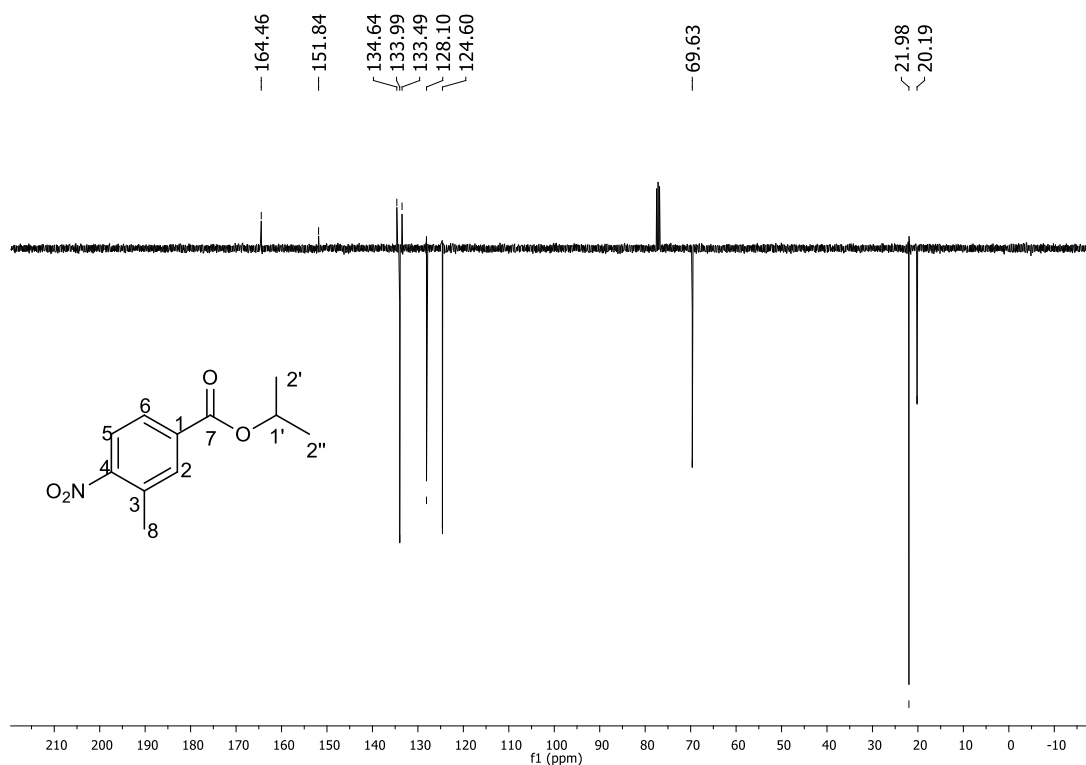
Espectro 16 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de isopropila (**AR4**).



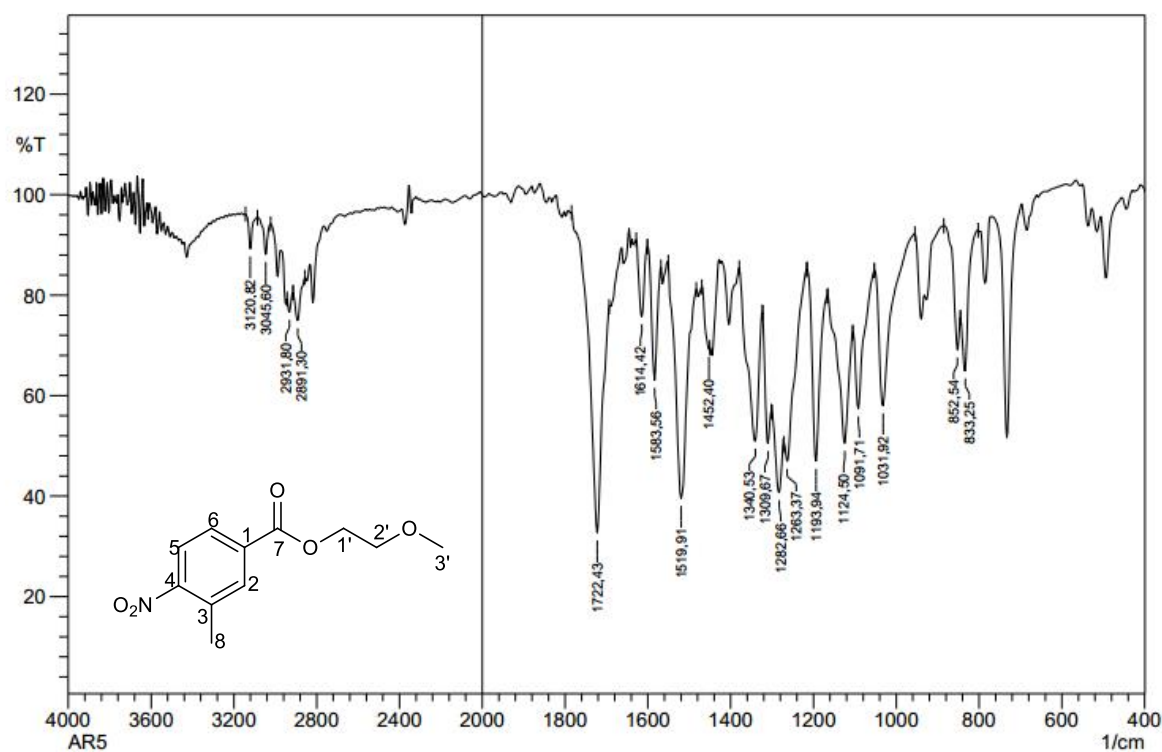
Espectro 17 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de isopropila (**AR4**).



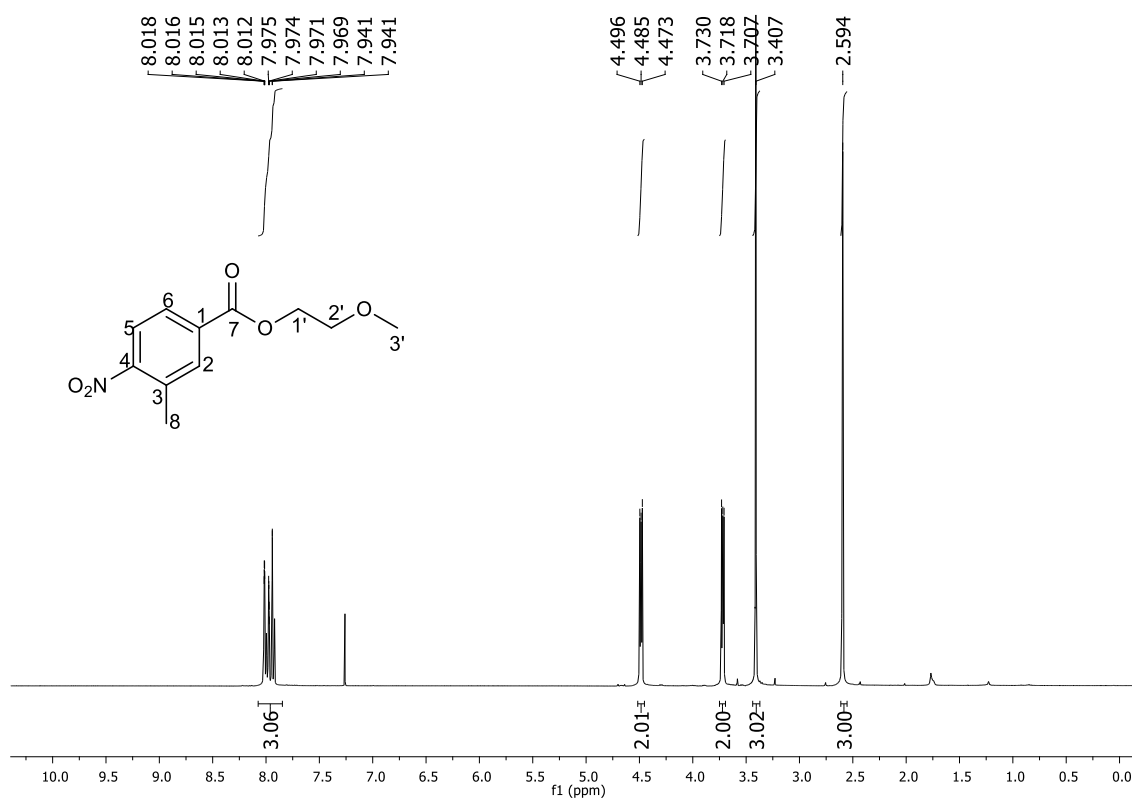
Espectro 18 – Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de isopropila (**AR4**).



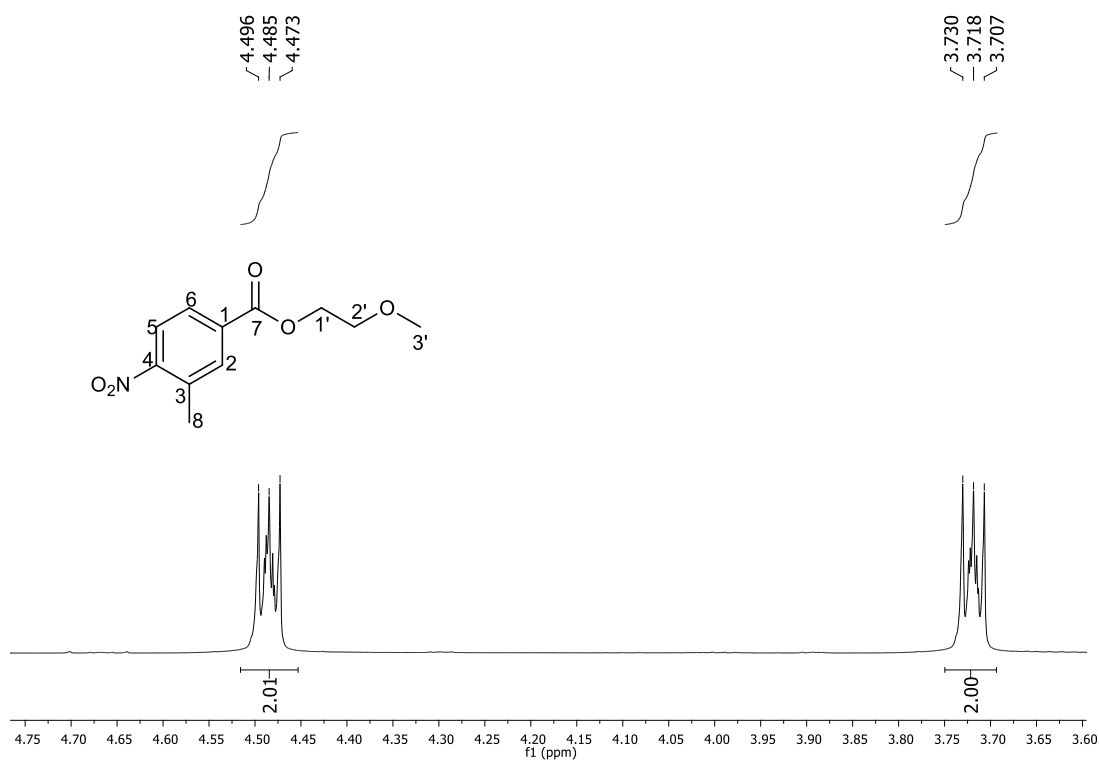
Espectro 19 – Espectro de Infravermelho (KBr cm^{-1}) do 3-metil-4-nitrobenzoato de 2-metoxietila (**AR5**).



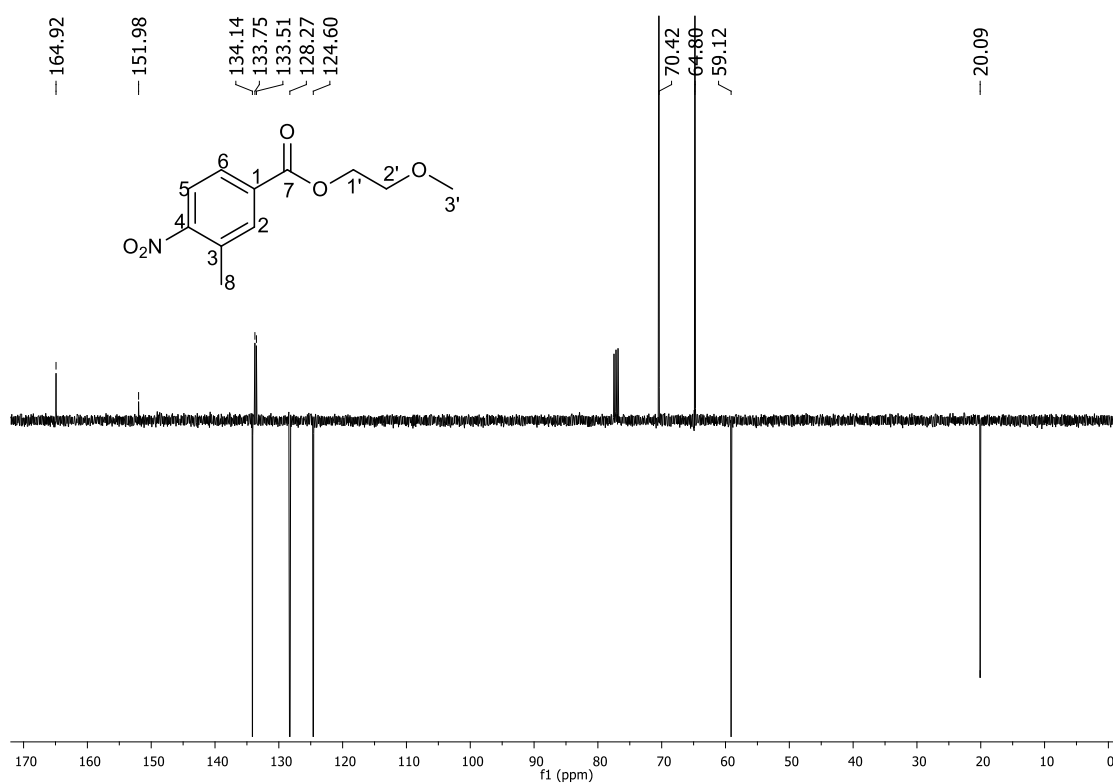
Espectro 20 - Espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de 2-metoxietila (**AR5**).



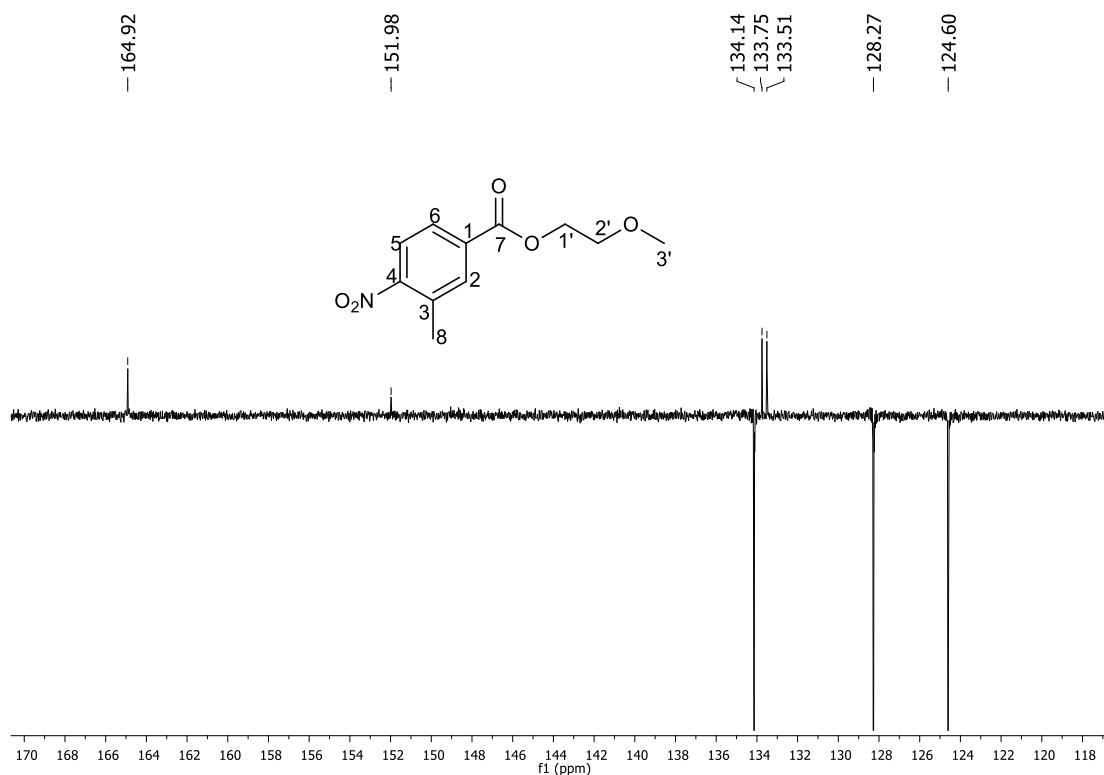
Espectro 21 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de 2-metoxietila (**AR5**).



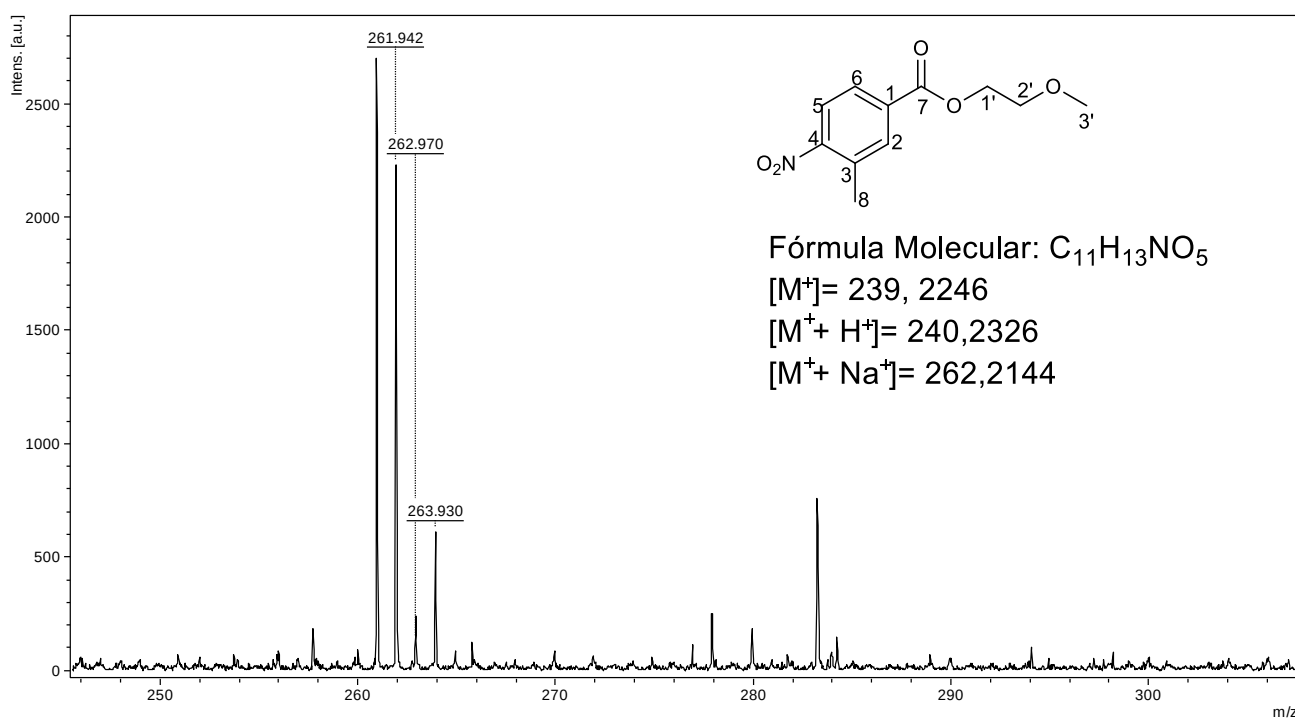
Espectro 22 – Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de 2-metoxietila (**AR5**).



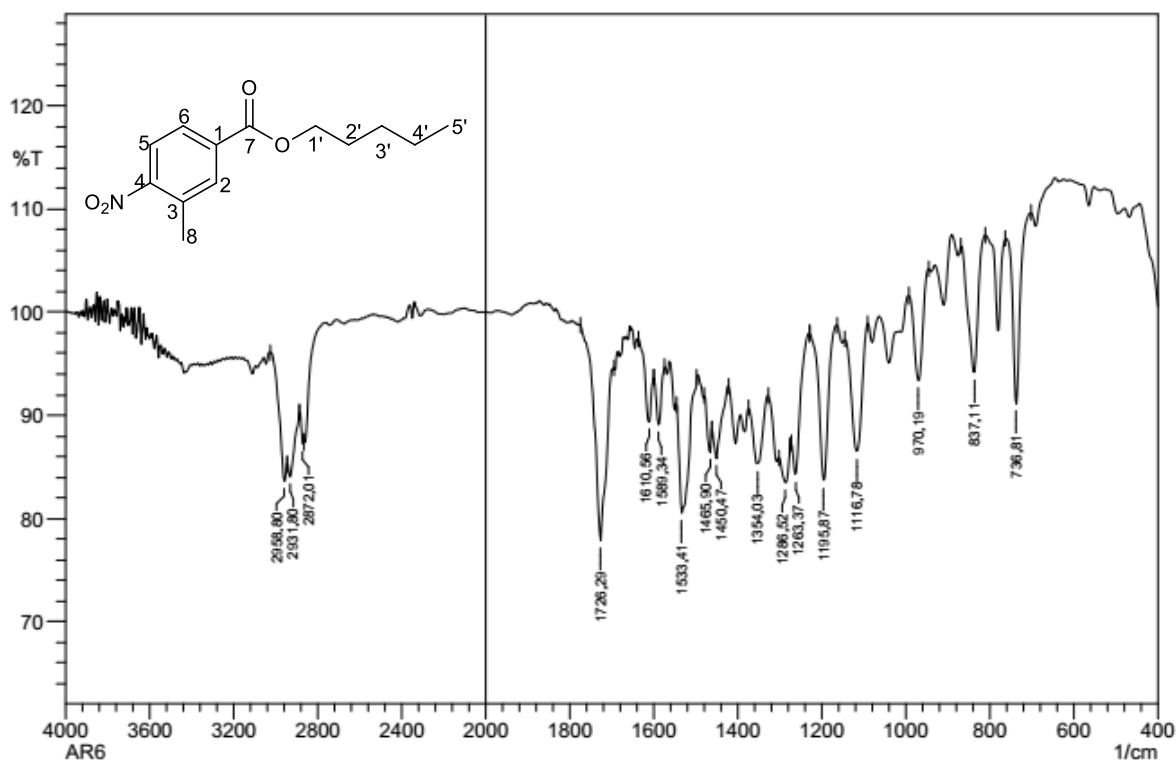
Espectro 23 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (100MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de 2-metoxietila (**AR5**).



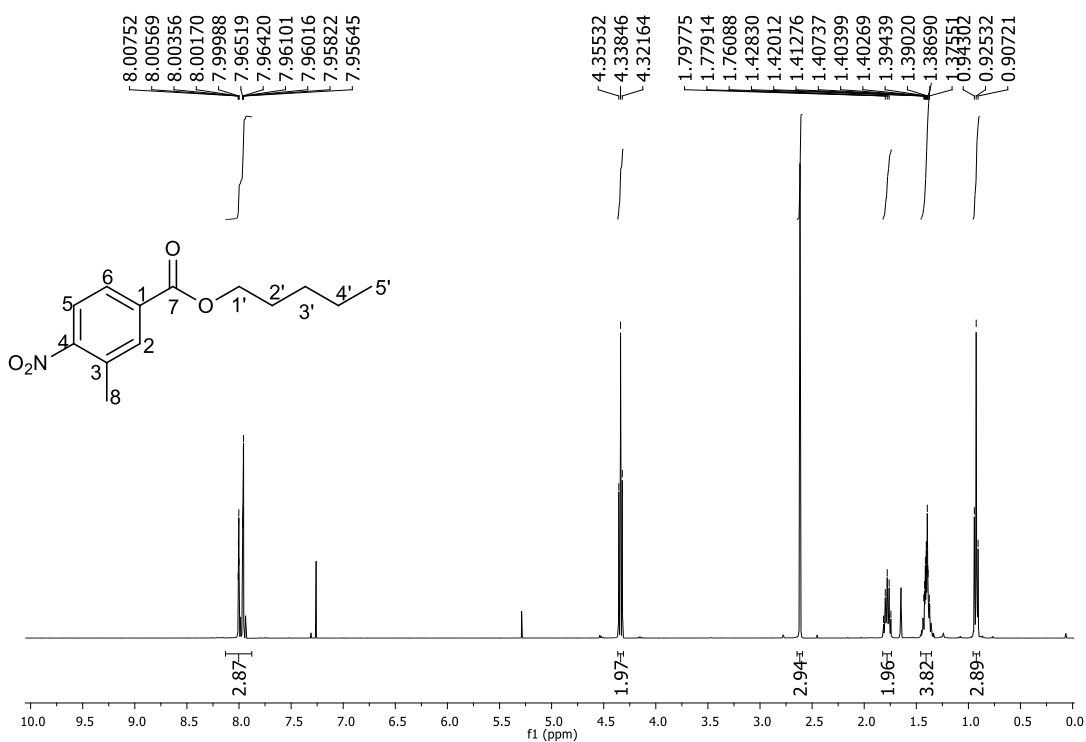
Espectro 24 – Espectro de Massas de alta resolução do tipo MALDI do 3-metil-4-nitrobenzoato de 2-metoxi-etila (**AR5**).



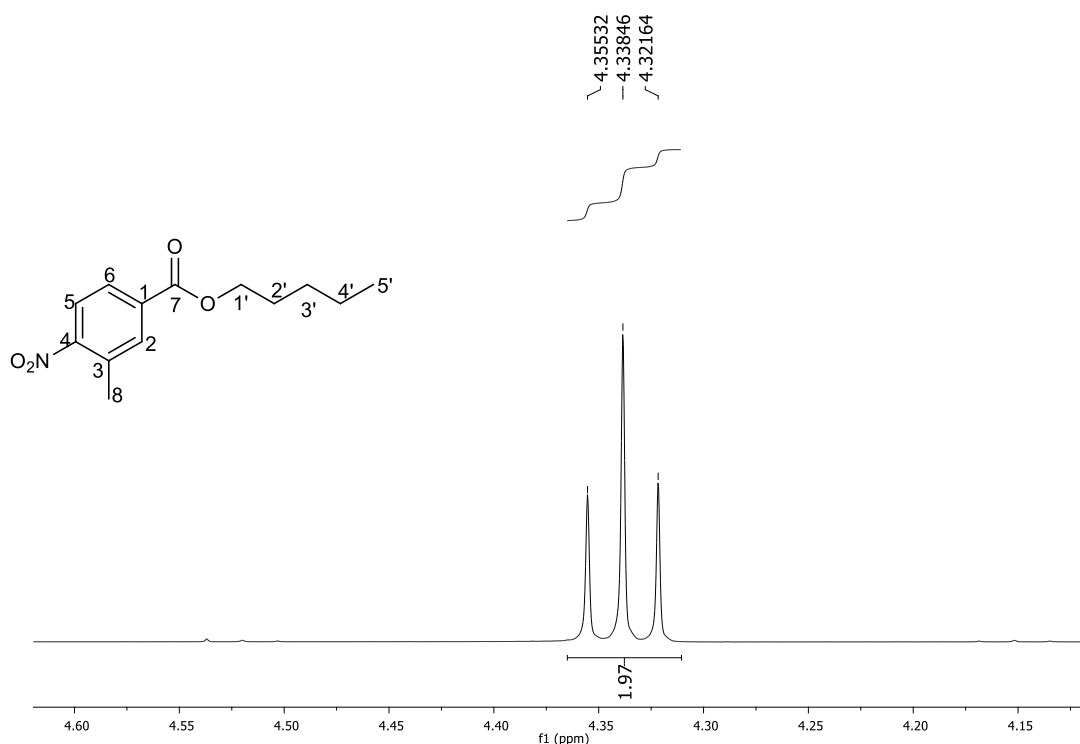
Espectro 25 – Espectro de Infravermelho (KBr cm^{-1}) do 3-metil-4-nitrobenzoato de pentila (**AR6**).



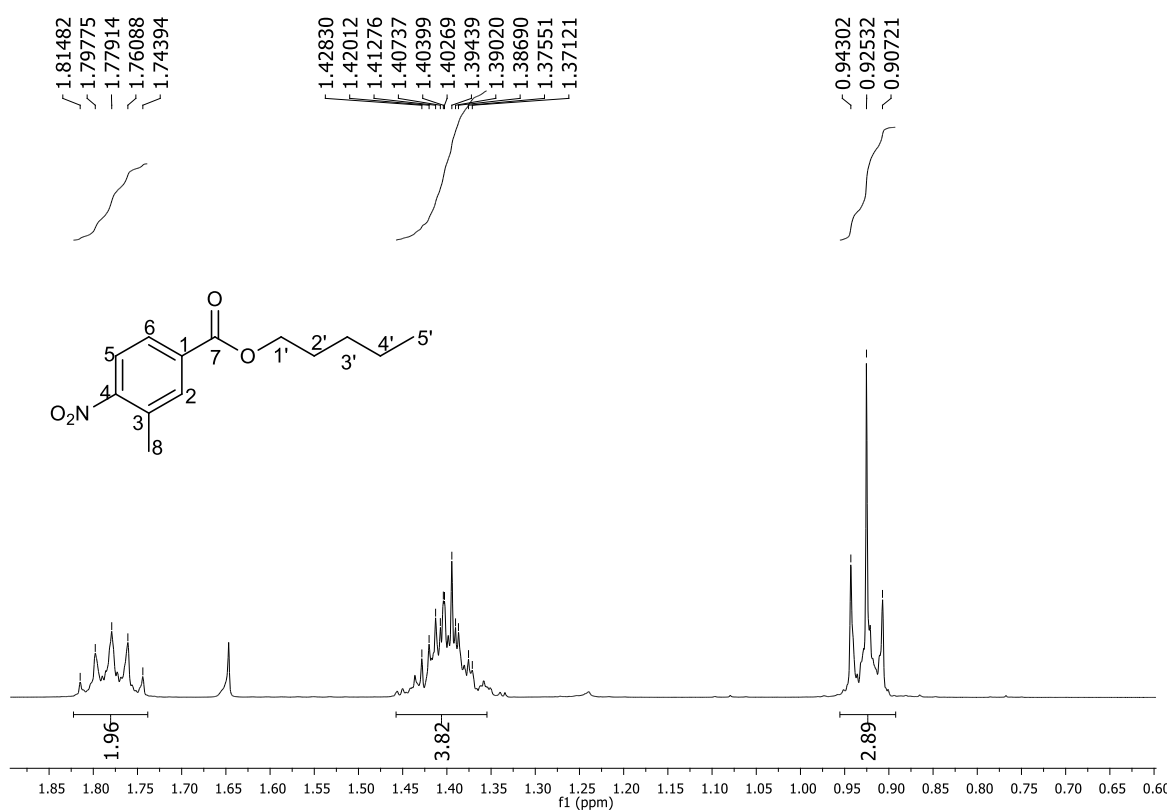
Espectro 26 - Espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de pentila (**AR6**).



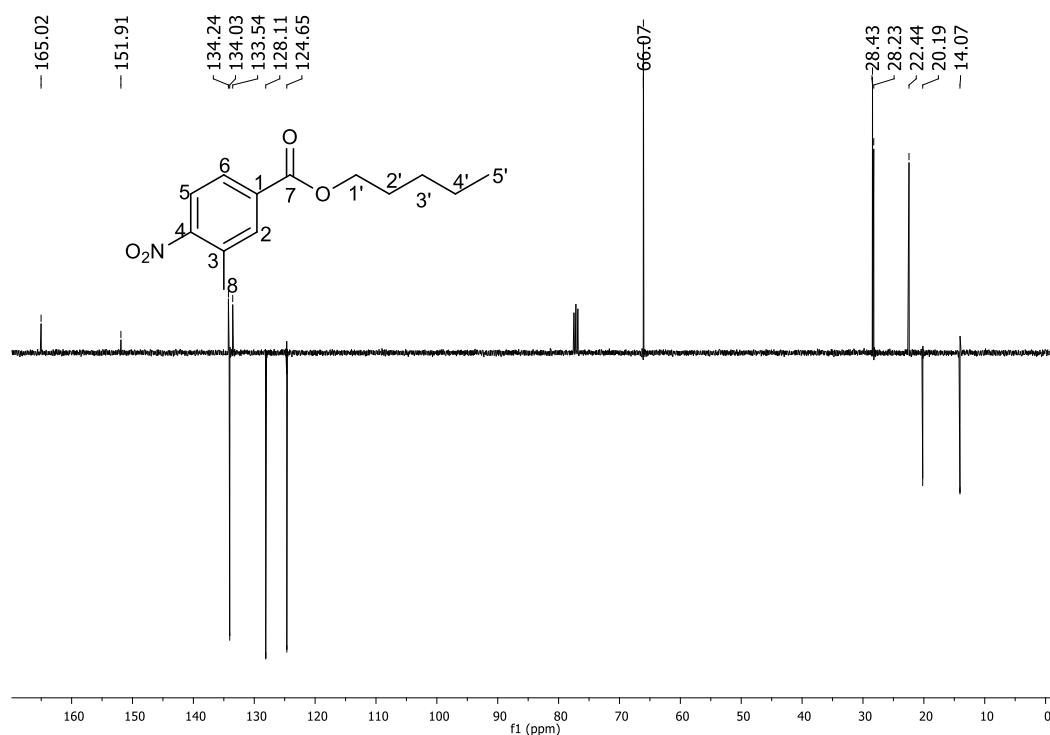
Espectro 27 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de pentila (**AR6**).



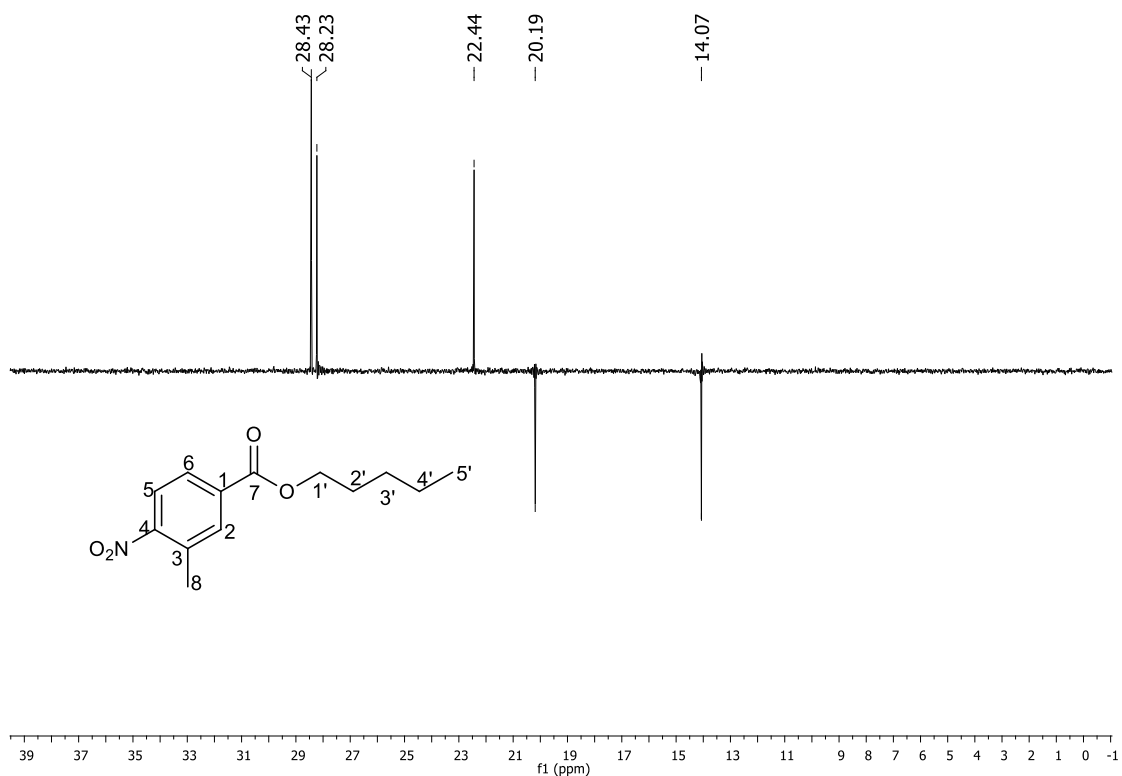
Espectro 28 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de pentila (**AR6**).



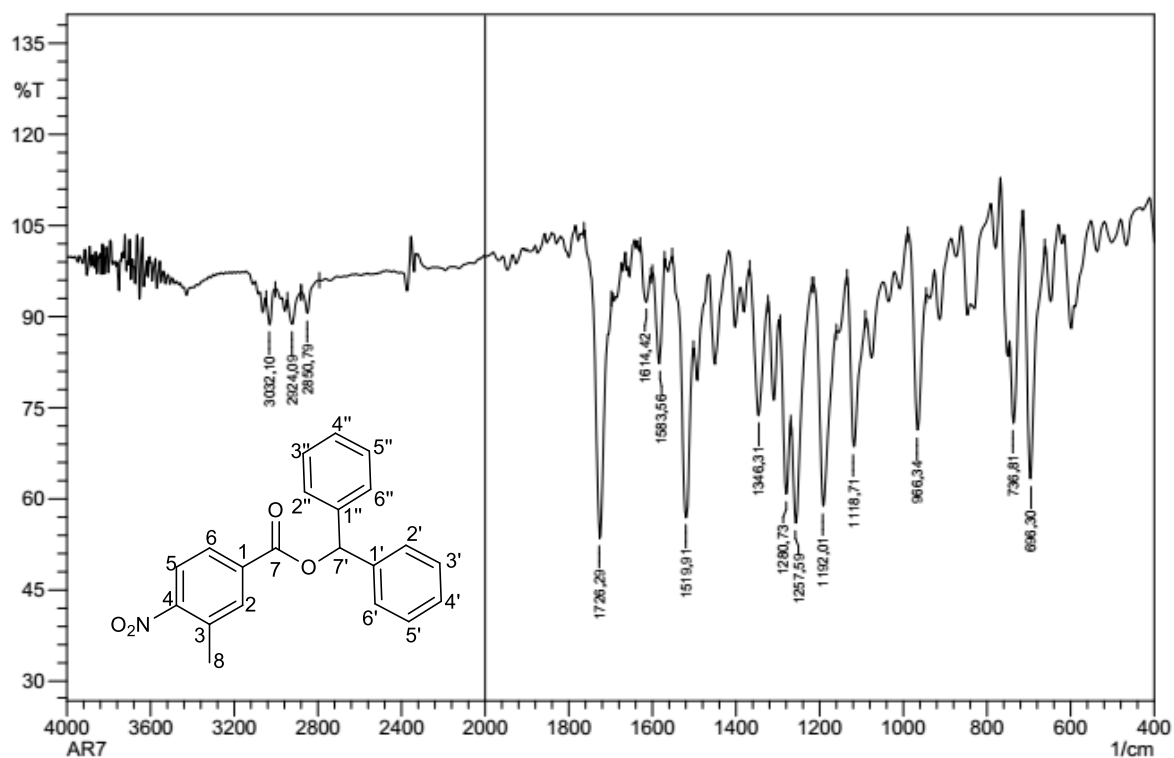
Espectro 29 – Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de pentila (**AR6**).



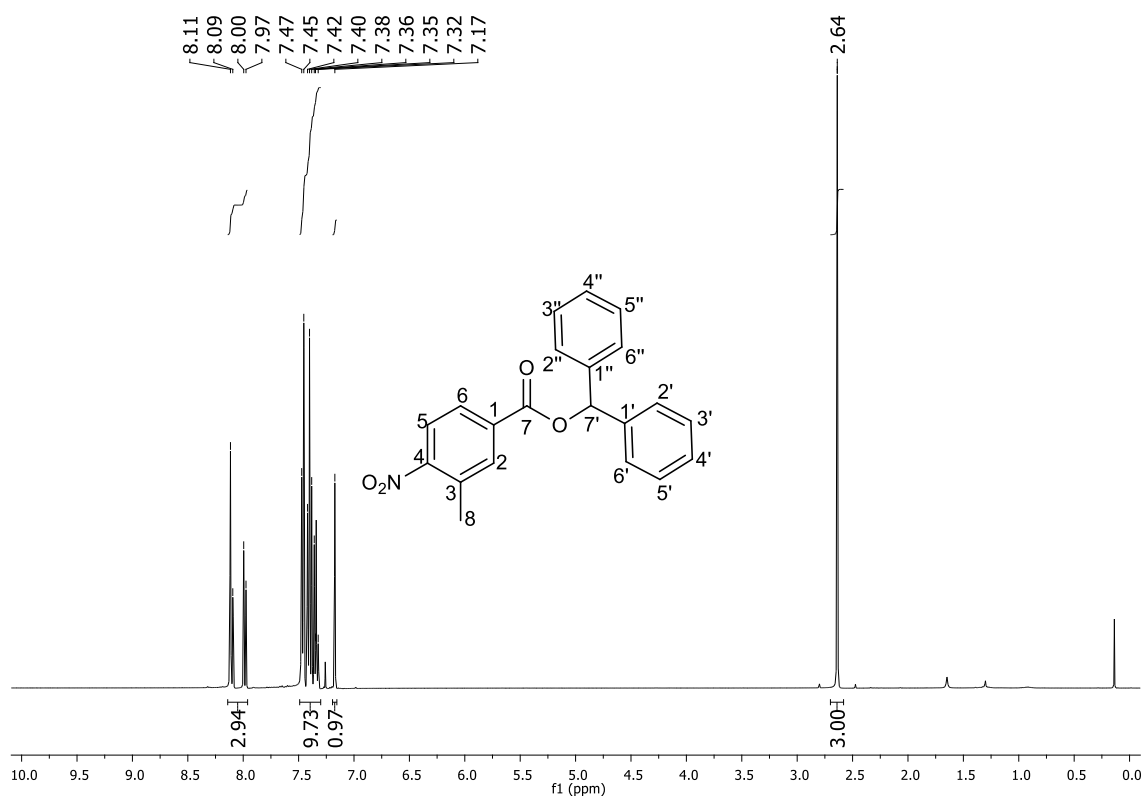
Espectro 30 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (100MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de pentila (**AR6**).



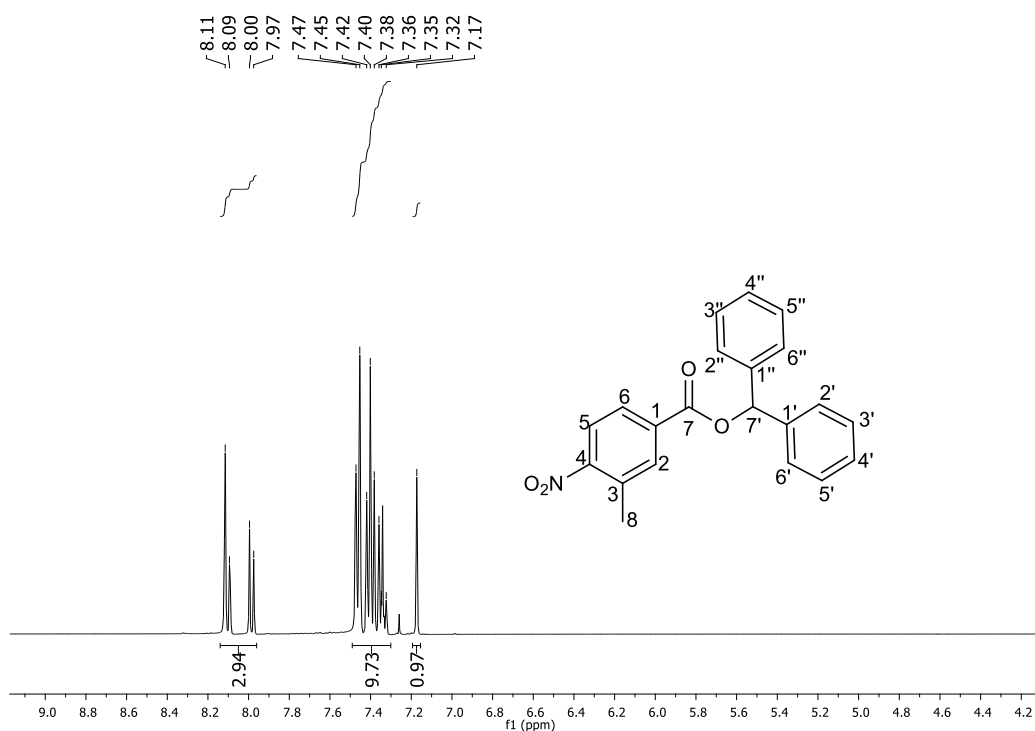
Espectro 31 – Espectro de Infravermelho (KBr cm^{-1}) do 3-metil-4-nitrobenzoato de difenilmetila (**AR7**).



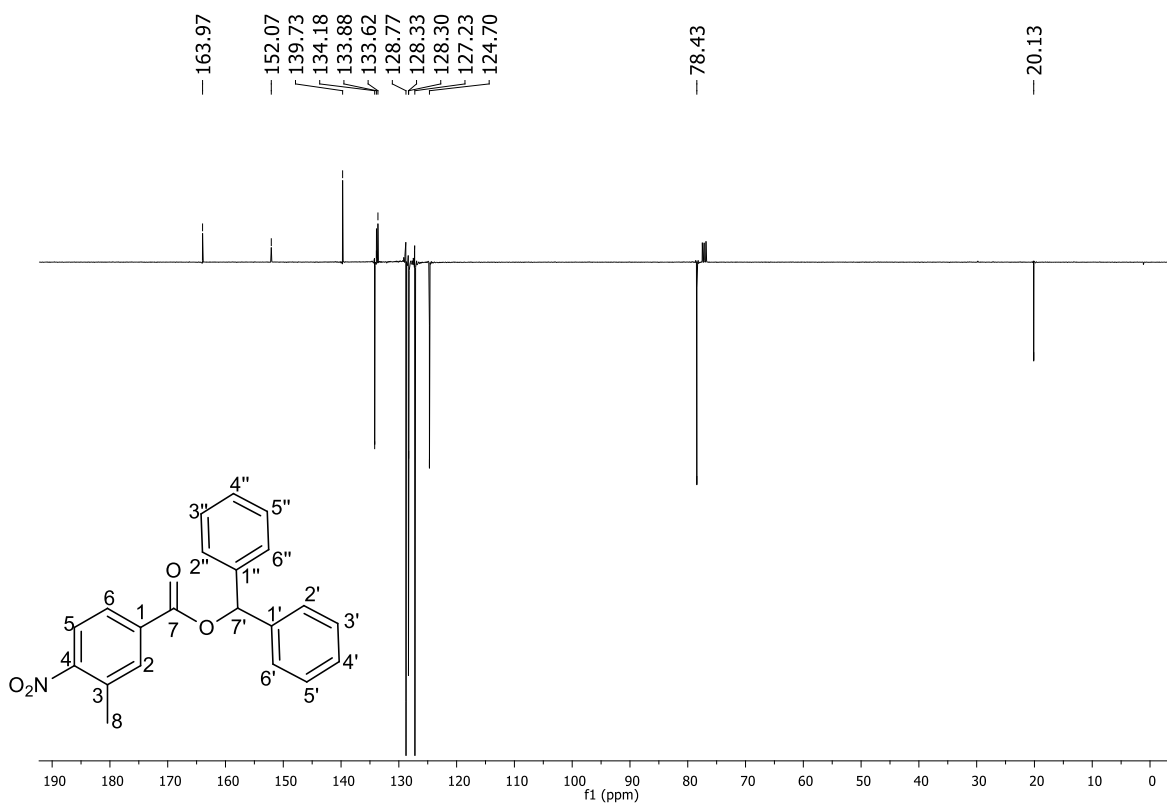
Espectro 32 - Espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de difenilmetila (**AR7**).



Espectro 33 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de difenilmetila (**AR7**).



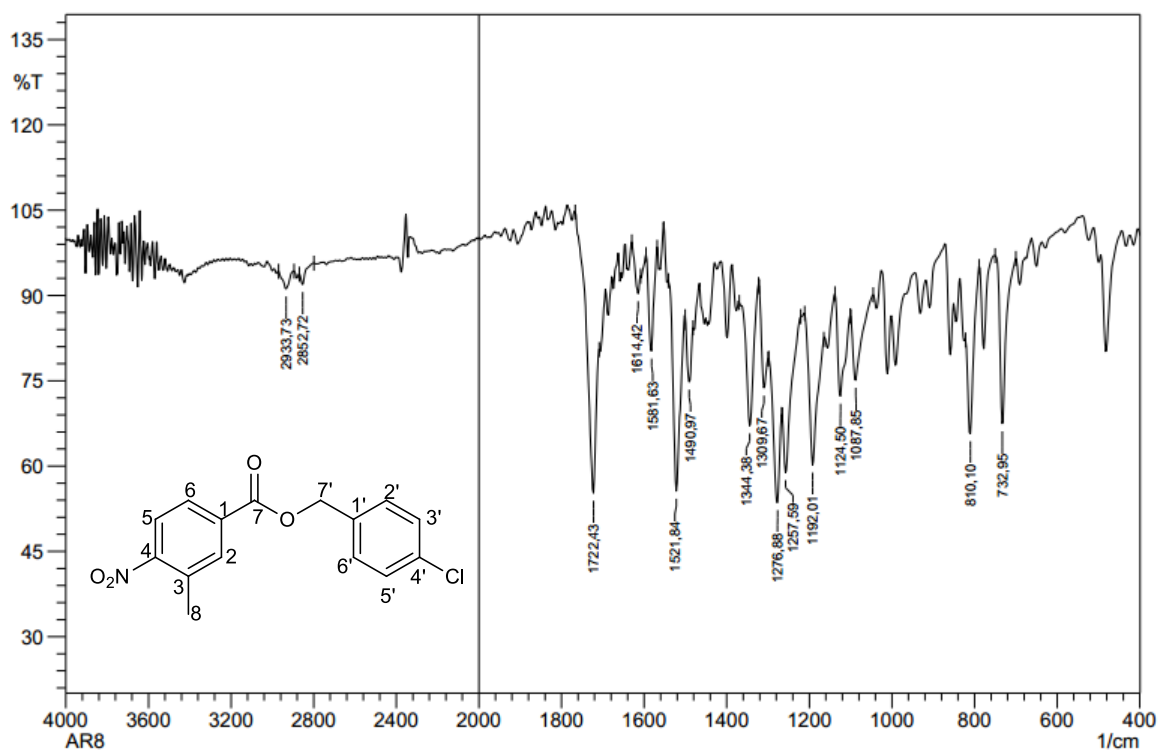
Espectro 34 – Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de difenilmetila (**AR7**).



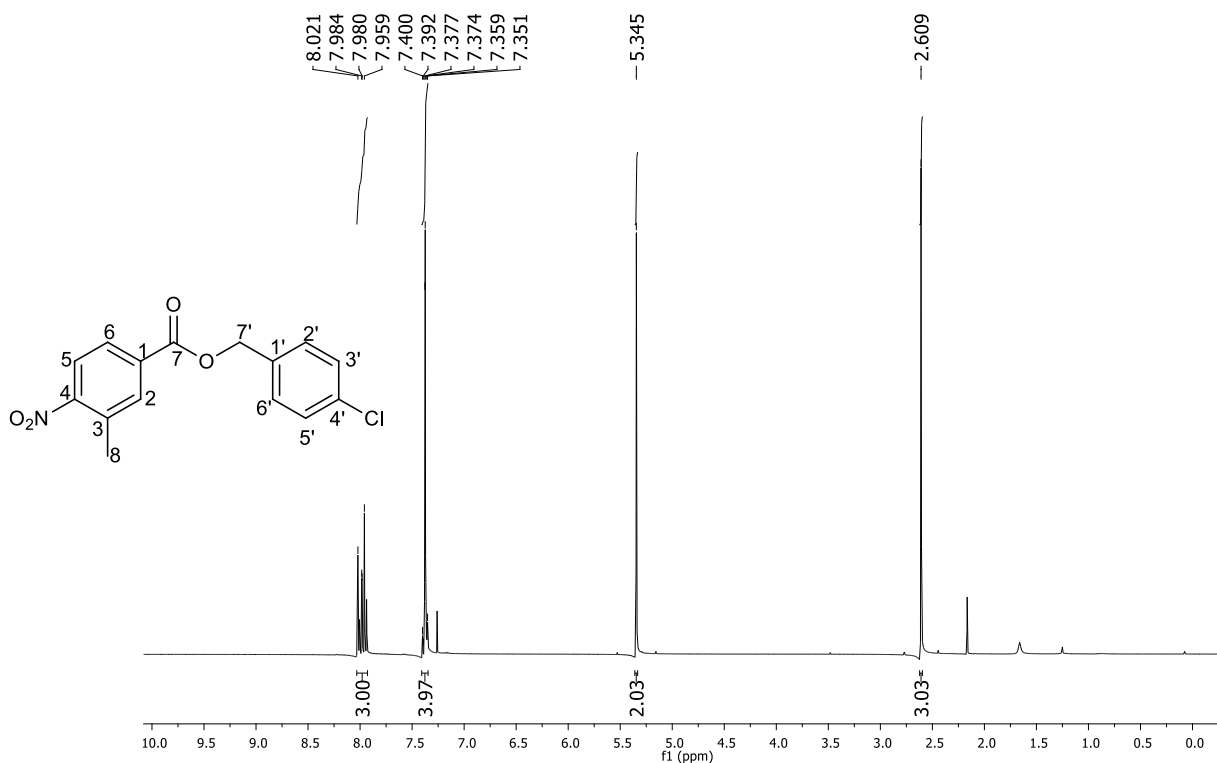
Espectro 35 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (100MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de difenilmetila (**AR7**).



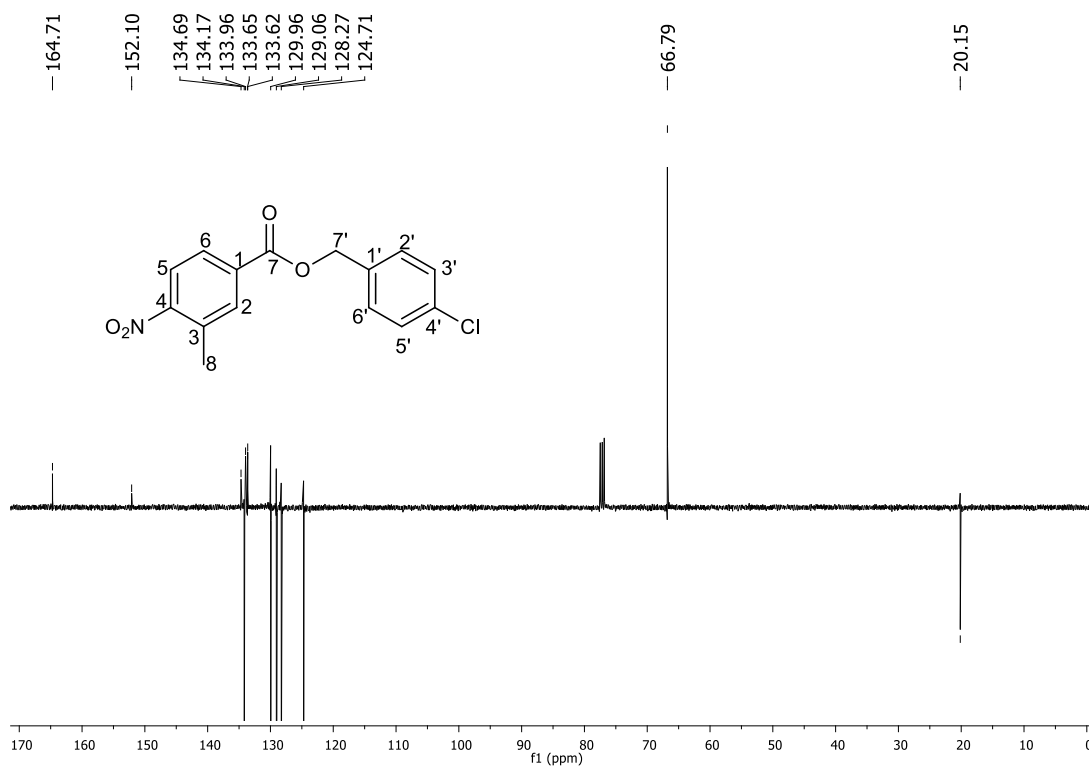
Espectro 36 – Espectro de Infravermelho (KBr cm^{-1}) do 3-metil-4-nitrobenzoato de 4-clorobenzila (**AR8**).



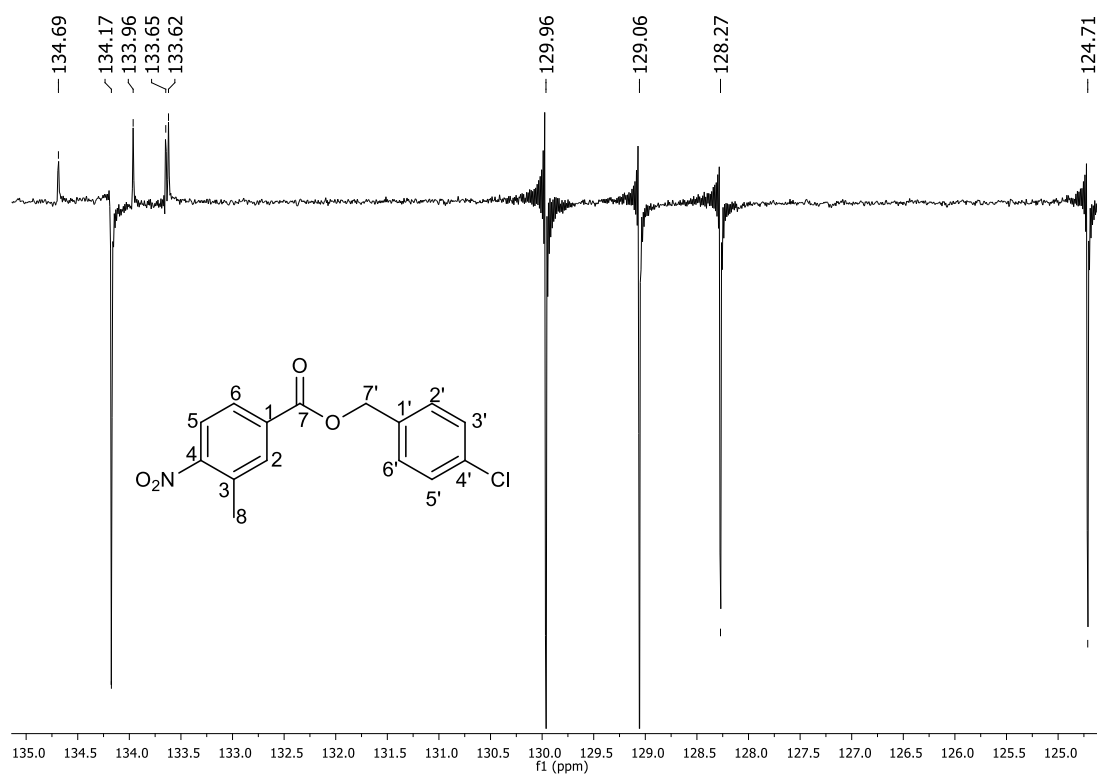
Espectro 37 - Espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de 4-clorobenzila (**AR8**).



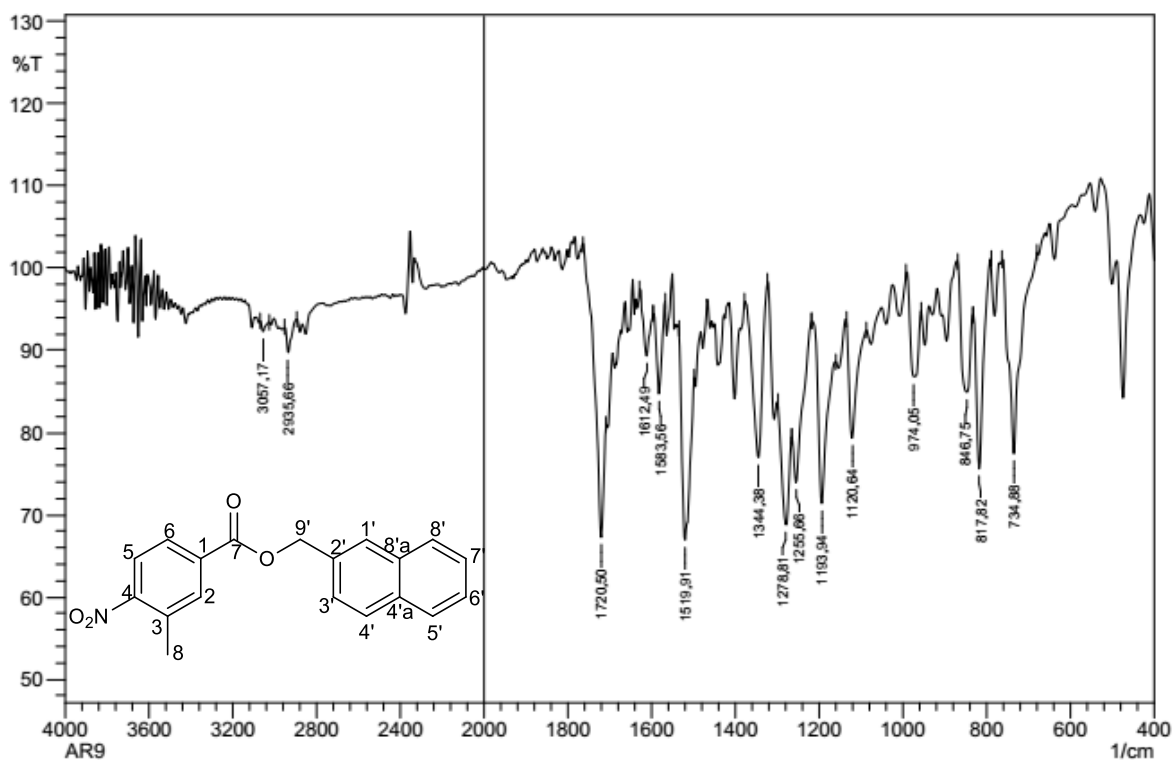
Espectro 38 - Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de 4-clorobenzila (**AR8**).



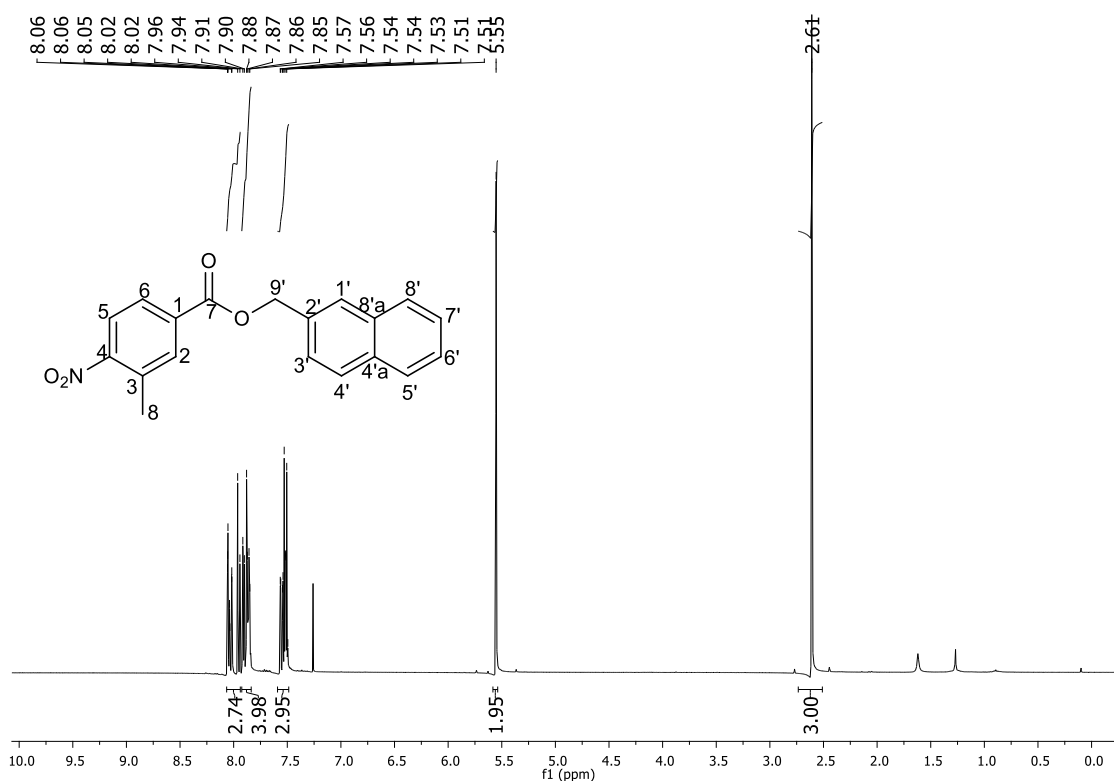
Espectro 39 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (100MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de 4-clorobenzila (**AR8**).



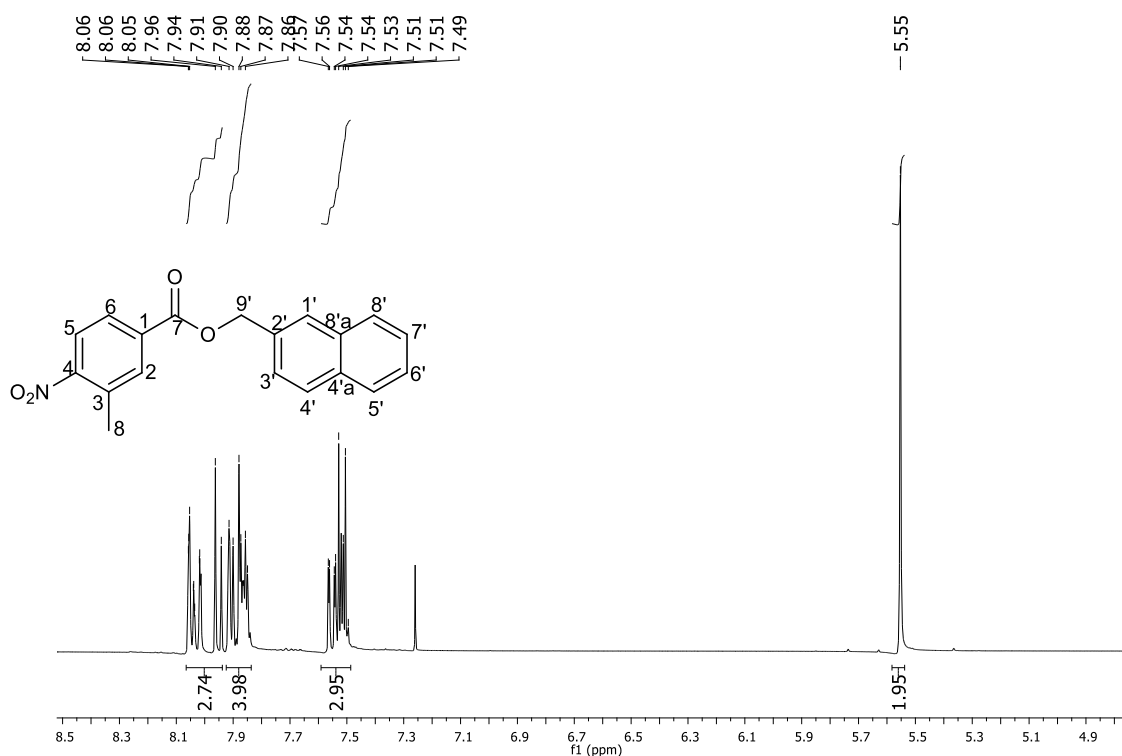
Espectro 40 – Espectro de Infravermelho (KBr cm^{-1}) do 3-metil-4-nitrobenzoato de 2-metil-naftalenila (**AR9**).



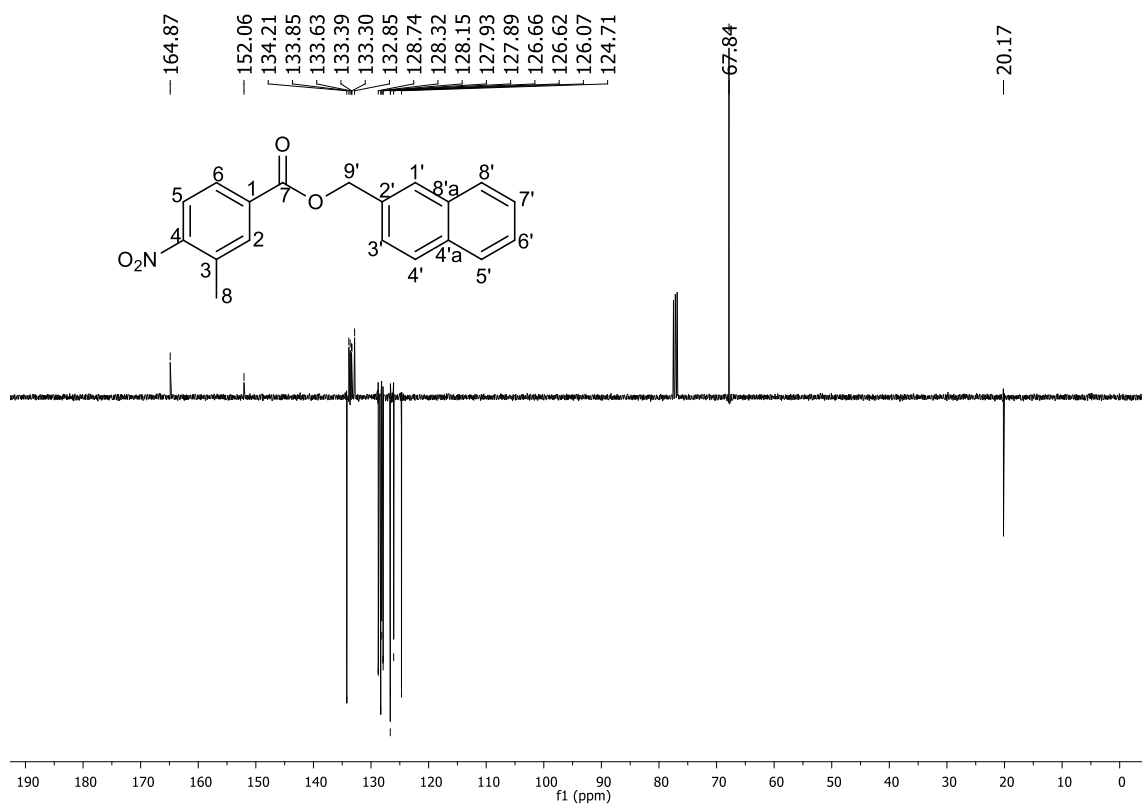
Espectro 41 – Espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de 2-metil-naftalenila (**AR9**).



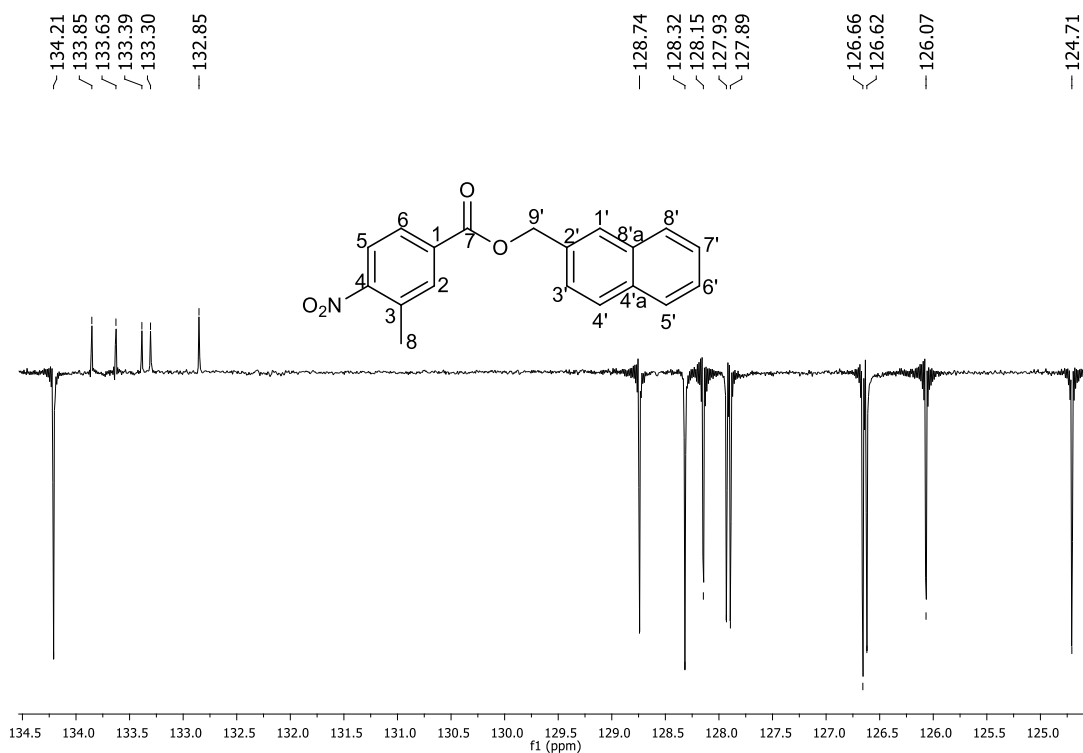
Espectro 42 – Expansão espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de 2-metil-naftalenila (**AR9**).



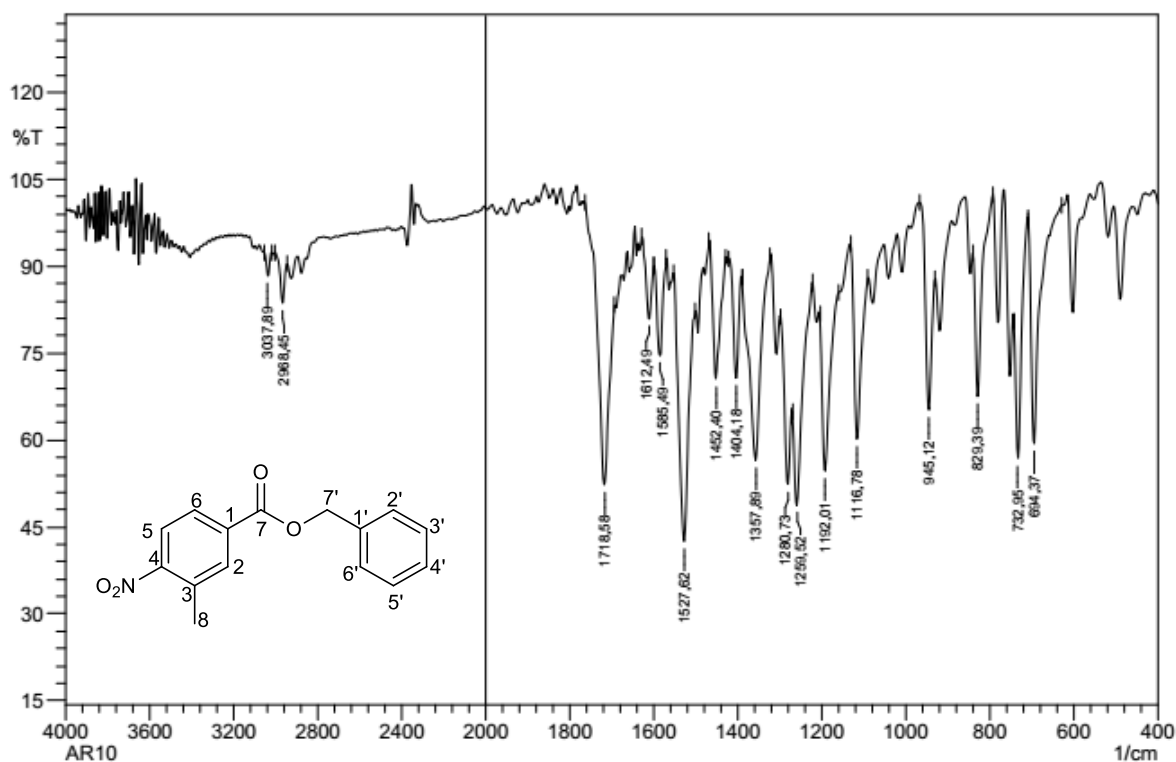
Espectro 43 – Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de 2-metil-naftalenila (**AR9**).



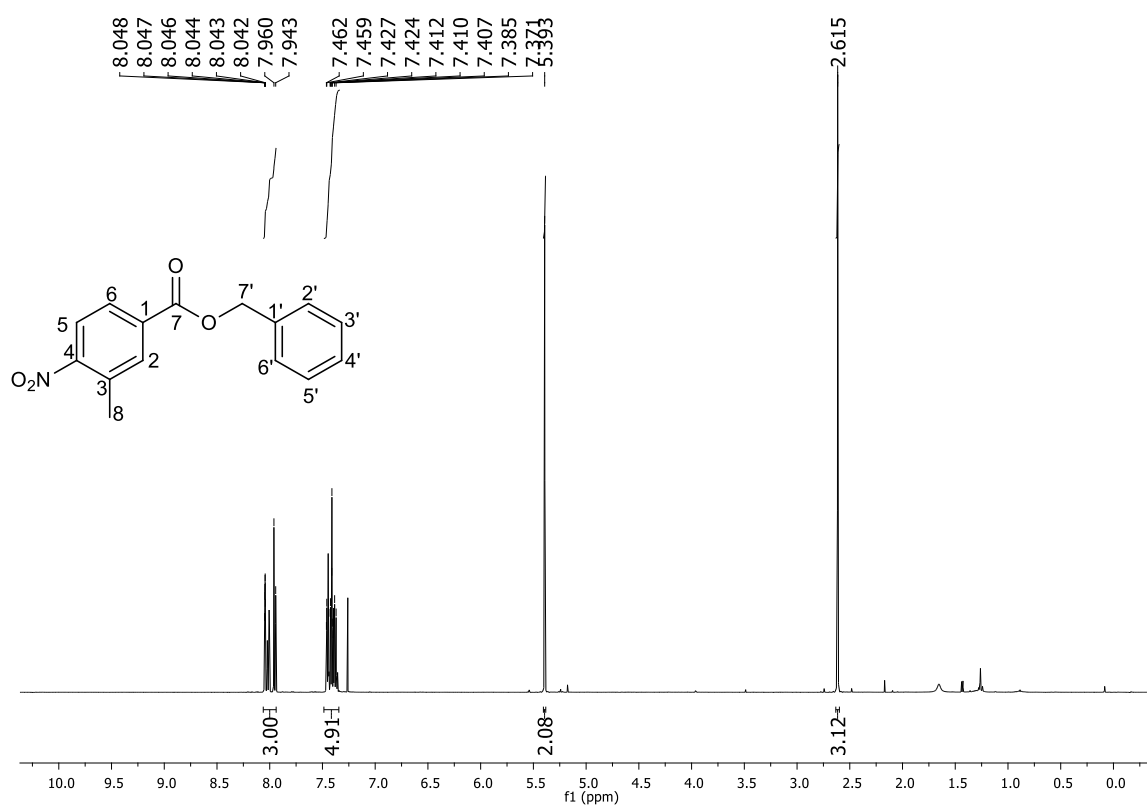
Espectro 44 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (100MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de 2-metil-naftalenila (**AR9**).



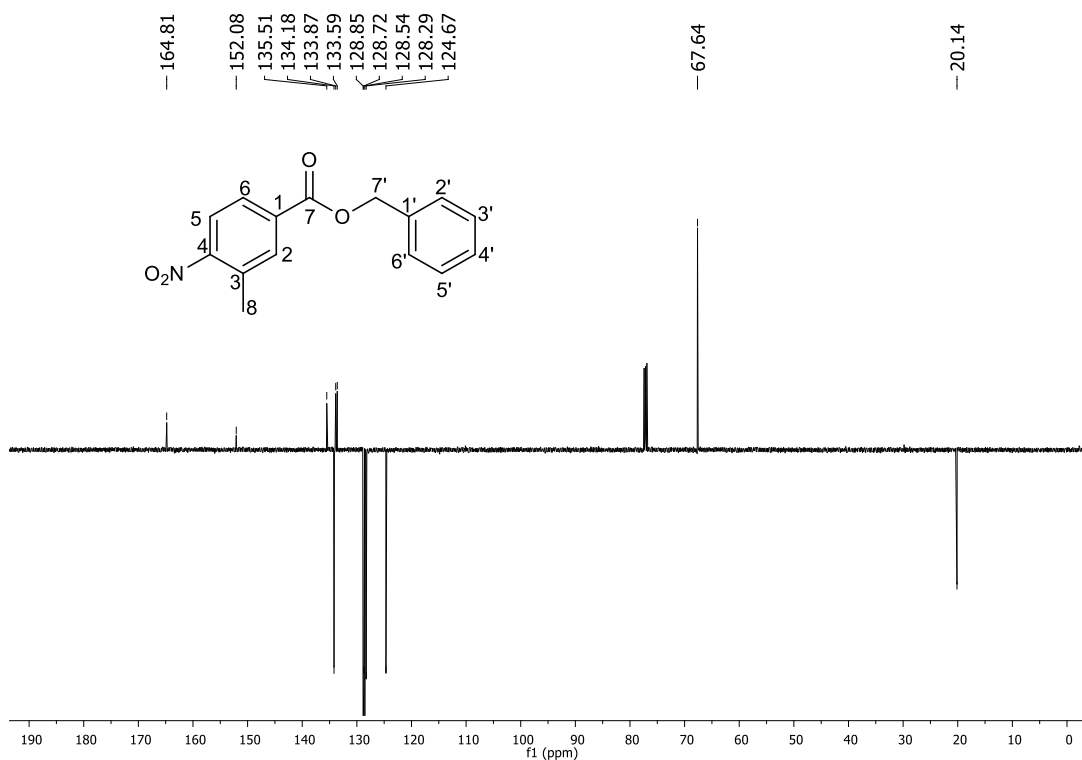
Espectro 45 – Espectro de Infravermelho (KBr cm^{-1}) do 3-metil-4-nitrobenzoato de benzila (**AR10**).



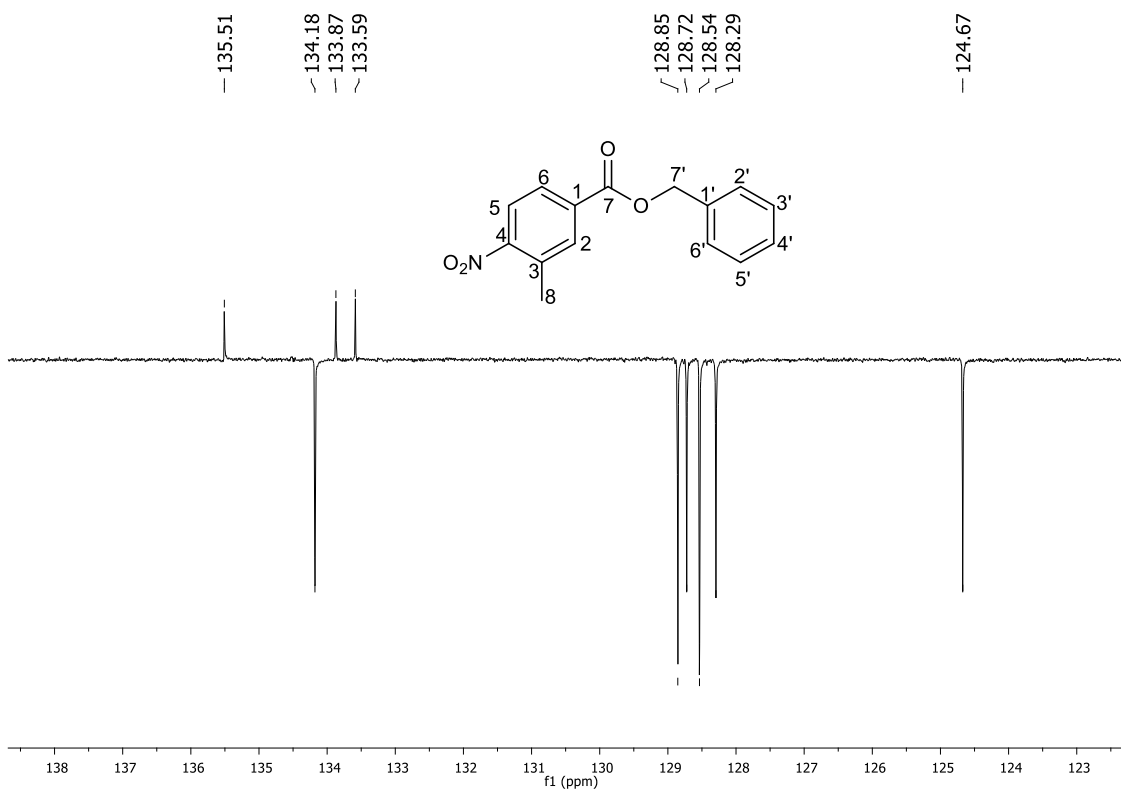
Espectro 46 – Espectro de RMN de ^1H (500MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de benzila (**AR10**).



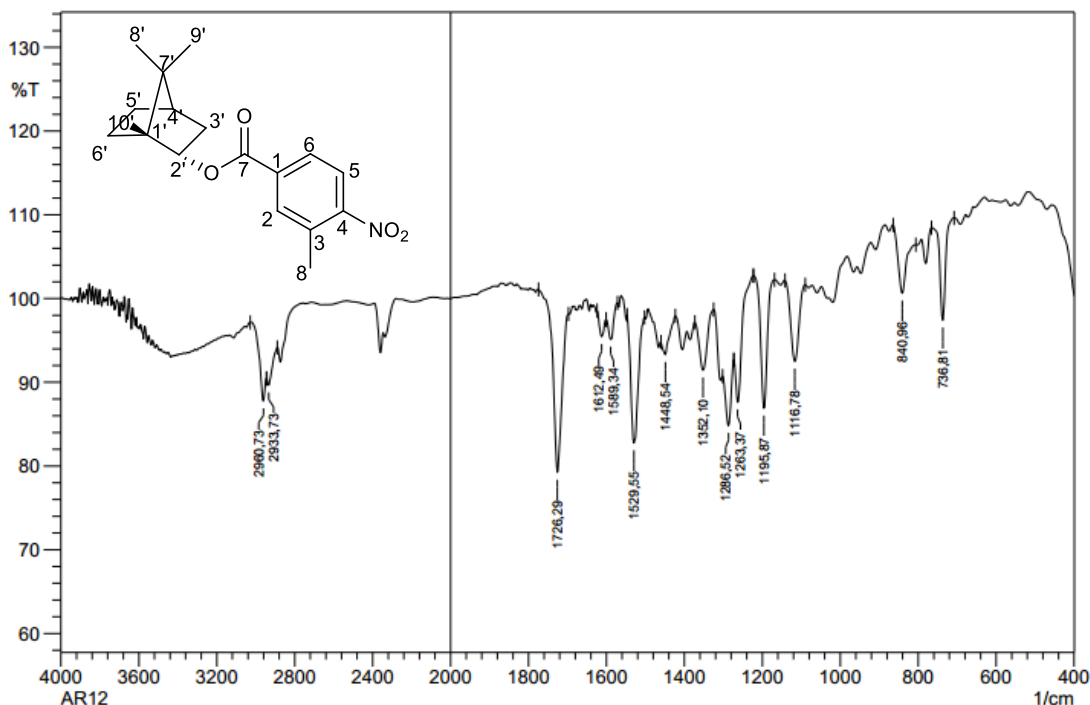
Espectro 47 – Espectro de RMN de ^{13}C -APT (125MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de benzila (**AR10**).



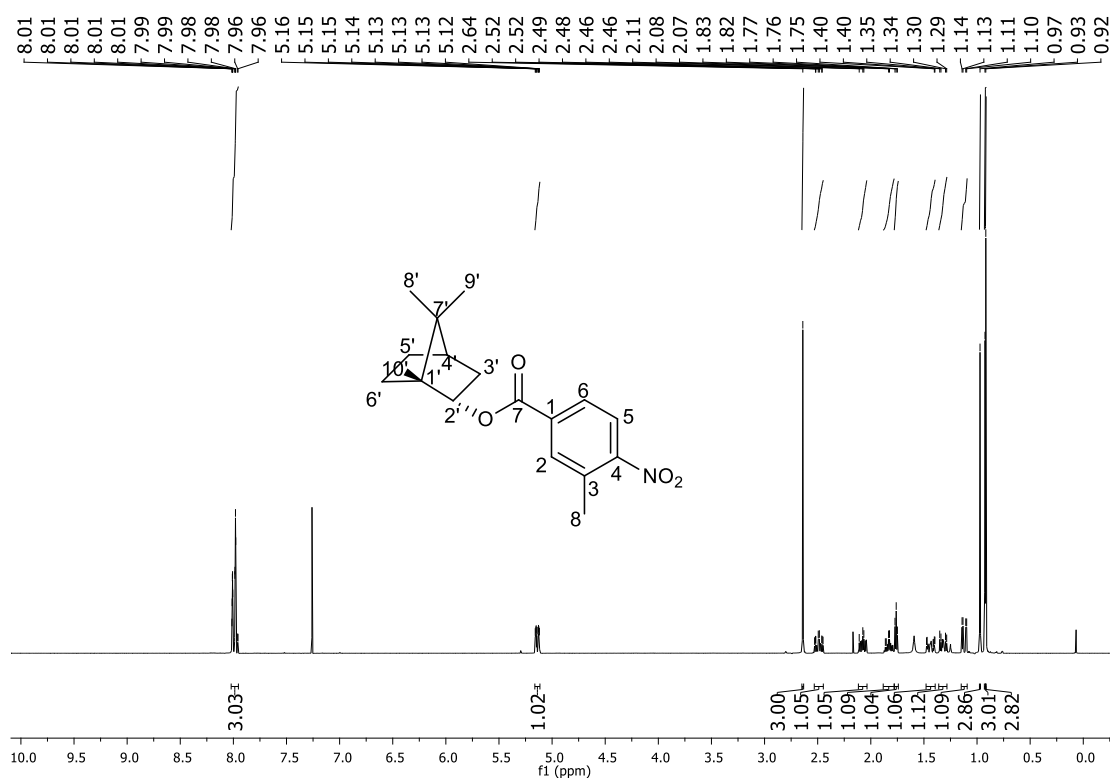
Espectro 48 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (125MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de benzila (**AR10**).



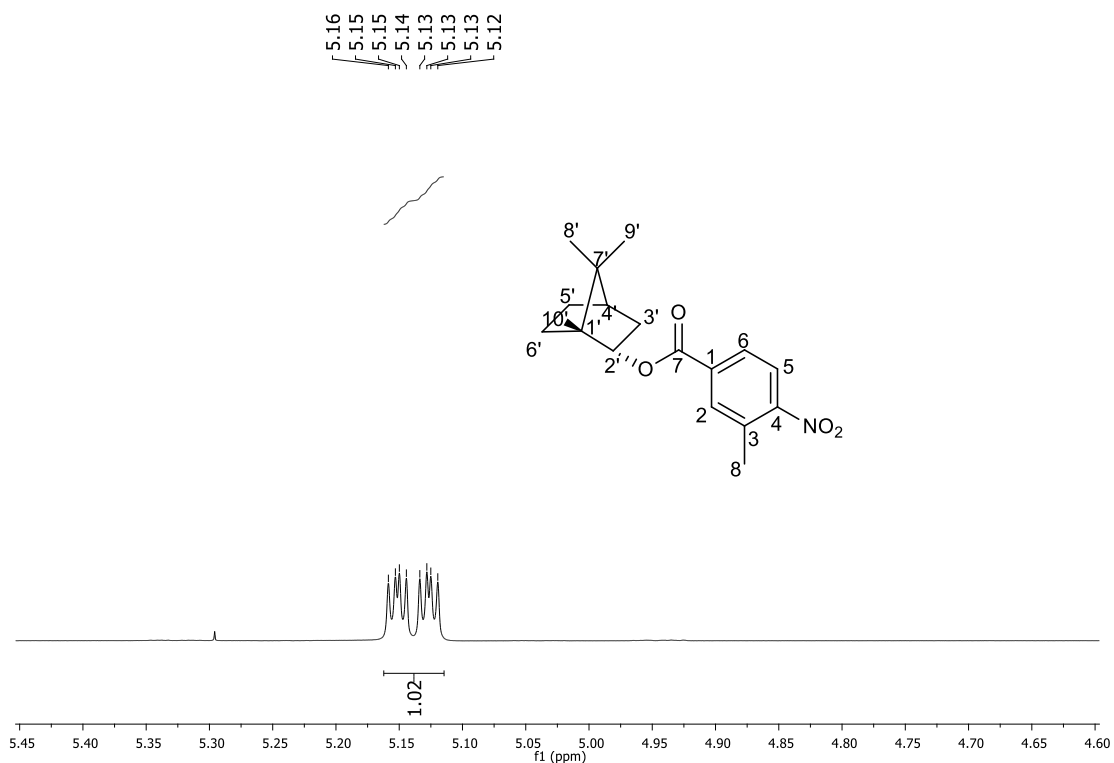
Espectro 49 – Espectro de Infravermelho (KBr cm^{-1}) do 3-metil-4-nitrobenzoato de (+)-bornila (**AR11**).



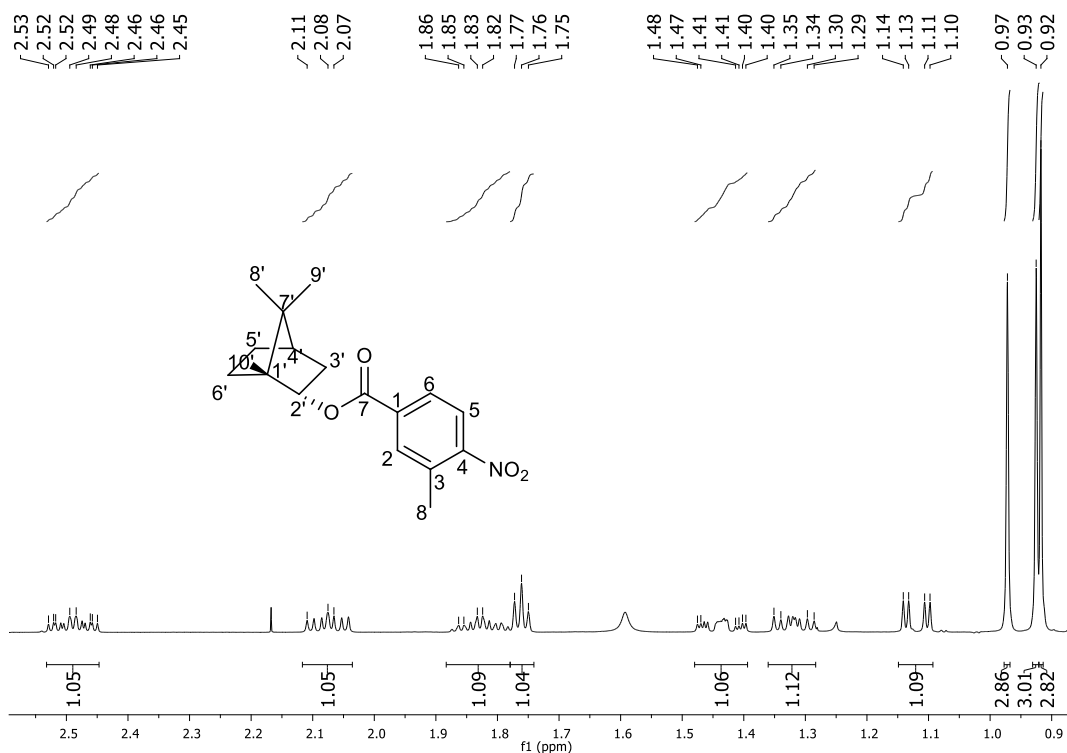
Espectro 50 – Espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de (+)-bornila (**AR11**).



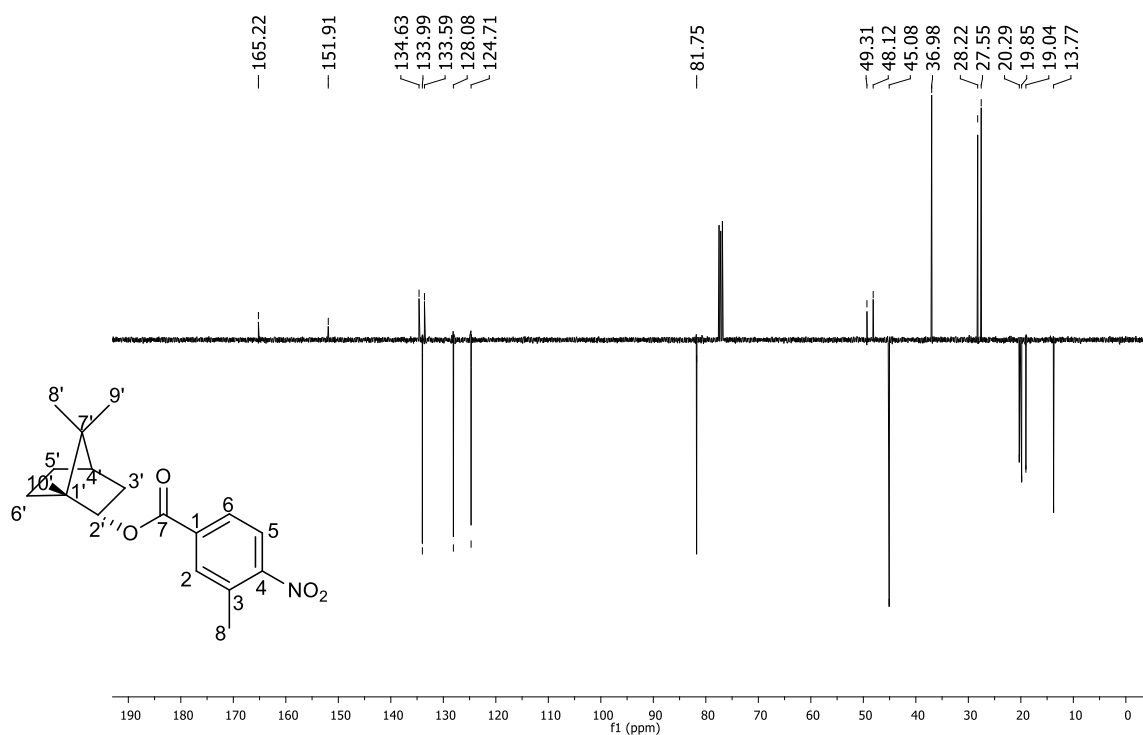
Espectro 51 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de (+)-bornila (**AR11**).



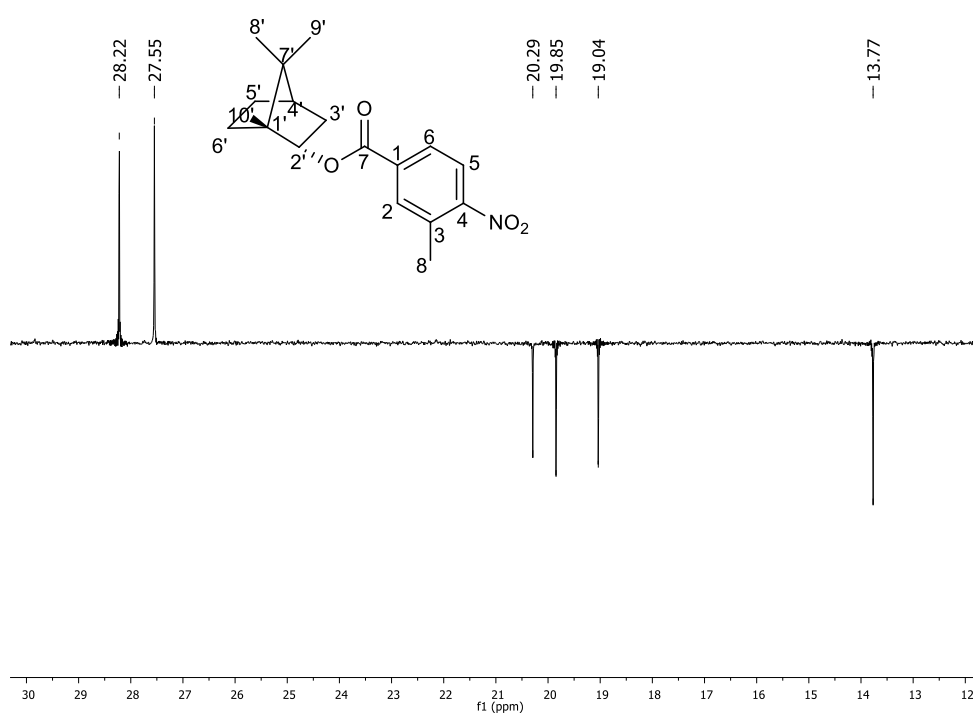
Espectro 52 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de (+)-bornila (**AR11**).



Espectro 53 – Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de (+)-bornila (**AR11**).



Espectro 54 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT (100MHz, CDCl_3) do 3-metil-4-nitrobenzoato de (+)-bornila (**AR11**).



REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, Vera L. *et al.* Estudos de relação estrutura-atividade quantitativas (QSAR) de bis-benzamidinas com atividade antifúngica. **Química Nova**. v. 33, n. 7, p. 1482–1489, 2010.
- AMBORABÉ, Bénigne-Ernest *et al.* Antifungal effects of salicylic acid and other benzoic acid derivatives towards *Eutypa lata*: Structure-activity relationship. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 12, p. 1051–1060, 2002.
- ARAÚJO, RODRIGO S.A. *et al.* Synthesis , Structure-Activity Relationships (SAR) and in Silico Studies of Coumarin Derivatives with Antifungal Activity. **International Journal of Molecular Sciences**. n. 2, p. 1293–1309, 2013.
- ARROIO, A.; HONÓRIO, K. M.; DA SILVA, A. B. F. Propriedades químico-quânticas empregadas em estudos das relações estrutura-atividade. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 694–699, 2010.
- ASHONG, C. N. *et al.* Adherence to clinical practice guidelines for the treatment of candidemia at a Veterans Affairs Medical Center. **International Journal of Health Sciences**. p. 18–23, 2017.
- AIKAWA, Nádia E. *et al.* Infecção sistêmica e localizada por *Candida* spp. em pacientes reumatológicos em terapia anti-TNF. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v. 6, n. 6, p. 478–482, 2015.
- BANTI, C. N. *et al.* Silver(I) compounds of the anti-inflammatory agents salicylic acid and p-hydroxyl-benzoic acid which modulate cell function. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 142, p. 132–144, 2014.
- BARBEDO, Leonardo S.; SGARBI, Diana B. G. Candidíase. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 22, n. 1, p. 22–38, 2010.
- BARREIRO, Eliezer J.; Bolzani, Vanderlan S. Biodiversidade: Fonte potencial para descoberta de Fármacos. **Química Nova**. v. 32, n. 3, p. 679–688, 2009.
- BARREIRO, E. J.; ARTHUR, E. K.; FRAGA, C. A. M. The Methylation Effect in Medicinal Chemistry. **Chemical Reviews**. p. 5215–5246, 2011.
- BARREIRO, Eliezer J.; FRAGA, Carlos Alberto M. **Química Medicinal: As bases moleculares da ação de fármacos**. 2ªed. Porto Alegre: Artmed, 2008.
- BATOVSKA, Daniela I. *et al.* Synthesis of Some Phenylpropanoid Monoglycerides via the Mitsunobu Protocol. **Molecules**. p. 552–558, 2005.
- BERNE, Sabina *et al.* Benzoic acid derivatives with improved antifungal activity: Design, synthesis, structure-activity relationship (SAR) and CYP53 docking studies. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 15, p. 4264–4276, 2015.
- BOECK, Paula *et al.* A Simple synthesis of kaurenoic esters and other derivatives and evaluation of their antifungal activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 16, n. 6, p. 1360–1366, 2005.
- BROOKS, G. F; CARROLL, KAREN C.; BUTEL, J. S; MORSE, S. A.; MIETZNER, T. A. **Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology**. 26 ed: The McGraw-Hill Companies, 2013.

BUT, Tracy Y. S.; TOY, Patrick H. The Mitsunobu Reaction: Origin, Mechanism, Improvements, and Applications. **Chemistry - An Asian Journal**. p. 1340–1355, 2007.

BUZZI, Fátima C. *et al.* Antinociceptive properties of caffeic acid derivatives in mice. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 2009.

BRÜHWASSER, Christina *et al.* A point prevalence survey on hand hygiene , with a special focus on *Candida* species. **American Journal of Infection Control**, v. 44, n. 1, p. 71–73, 2016.

BURNHAM, Carey-Ann D. *et al.* Diagnosing antimicrobial resistance. **Nature Publishing Group**, v. 15, n. 11, p. 697–703, 2017.

CALVALCANTE, Phelipe Matheus Moraes *et al.* Proposta de preparação e caracterização de ésteres: Um experimento de análise orgânica na graduação. **Educacion Química**, v. 26, n. 4, p. 319–329, 2015.

CAMP, D.; ITZSTEIN, M. VON; JENKINS, I. D. The mechanism of the first step of the Mitsunobu reaction. **Tetrahedron**. v. 71, p. 4946–4948, 2015.

CAMPION, E. W.; KULLBERG, B. J.; ARENDRUP, M. C. Invasive Candidiasis. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 15, p. 1445–1456, 2015.

CARTA, Fabrizio *et al.* Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the β -class enzymes from the fungal pathogens *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* with branched aliphatic/aromatic carboxylates and their derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 8, p. 2521–2526, 2011.

CHAO, Danming *et al.* Multifunctional hyperbranched polyamide: Synthesis and properties. **Polymer**, v. 54, n. 13, p. 3223–3229, 2013.

CLELAND, R.; SQUIRES, E. Evalution of new antimicrobials “*in vitro*” and in experimental animal infections. In: LORIAN, V. M. D. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. Williams & Wilkins, p. 739-788, 1991.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE^a. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. Approved standard M27-A3. Pennsylvania, United States of America: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

COLOMBO, Arnaldo Lopes *et al.* Brazilian guidelines for the management of candidiasis - a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. 283–312, 2013.

DESWAL, D. P.; CHAND, U. Standardization of the tetrazolium test for viability estimation in ricebean (*Vigna umbellata* (Thumb) Ohwi & Ohashi) seeds. **Seed Science and Technology**, v.25, p.409-417, 1997.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELINA, C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 97, p. 305-311, 2005.

DANDAPANI, SIVARAMAN; CURRAN, DENNIS P. Second Generation Fluorous

DEAD Reagents Have Expanded Scope in the Mitsunobu Reaction and Retain Convenient Separation Features. **The Journal of Organic Chemistry**. p. 8751–8757, 2004.

DAVIDSON, L.; NETEA, M. G.; KULLBERG, B. J. Patient Susceptibility to Candidiasis — A Potential for Adjunctive Immunotherapy. **Journal of Fungi**. 2018.

DEKA, Dibakar C.; PAUL, Maumita. Indirect olefination of o-aminobenzaldehyde. **Journal of Chemical Research**. p. 102–103, 2006.

EDDOUZI, Jamel *et al.* Molecular mechanisms of drug resistance in clinical *Candida* species isolated from tunisian hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 7, p. 3182–3193, 2013.

FRIES, Alexander *et al.* A Ribonucleotide Reductase-Like Electron Transfer System in the Nitroaryl- Forming N-Oxygenase AurF. **ChemBioChem**. p. 1832–1835, 2011.

GILLES, Vitor *et al.* A New, Simple and Efficient Method of Steglich Esterification of Juglone with Long-Chain Fatty Acids: Synthesis of a New Class of Non-Polymeric Wax Deposition Inhibitors for Crude Oil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 26, n. 1, p. 74–83, 2015.

GUIDO R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**. v. 24, n. 70, p. 81–98, 2010.

GUINEA, J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, p. 5–10, 2014.

GRABE, D. F. **Manual de Teste de Tetrazólio**. Brasília: AGIPLAN, 1976.

HOLETZ, F.B.; HOMES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HOUGHTON, P. J.; HOWES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, v.110, p.391-400, 2007.

HUSEIN JONDI, W.J., ZATAR, N.A., ALI-SHTAYEH, M.S., A. I. Synthesis and biological evaluation of novel mono acid esters derived from the constituents of *Urtica pilulifera*. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 4, p. 1173–1181, 2014.

JADHAV, Ghenshyam R. *et al.* 2,5-Disubstituted 1,3,4-oxadiazole derivatives of chromeno[4,3-*b*]pyridine: synthesis and study of antimicrobial potency. **Heterocyclic Communications**. v. 22, n. 3, p. 123–130, 2016.

JIANG, Yuyu *et al.* Copper-Catalyzed Decarboxylative Methylation of Aromatic Carboxylic Acids with PhI(OAc)₂. **European Journal of Organic Chemistry**. p. 1–6, 2014.

KARKOWSKA-KULETA, J.; RAPALA-KOZIK, M.; KOZIK, A. Fungi pathogenic to humans. **Acta Biochimica Polonica**, v. 56, n. 2, p. 211–224, 2009.

- KIM, Jong H. *et al.* Augmenting the activity of antifungal agents against *Aspergilli* using structural analogues of benzoic acid as chemosensitizing agents. **Fungal Biology**, v. 114, n. 10, p. 817–824, 2010a.
- KIM, Kyung Dong *et al.* Melanogenesis Inhibition by Mono-hydroxycinnamic Ester Derivatives in B16 Melanoma Cells. **Bulletin of the Korean Chemical Society**. v. 31, n. 1, p. 16–19, 2010b.
- KOSHIO, Hiroyuki *et al.* Synthesis and biological activity of novel 1,2-disubstituted benzene derivatives as factor Xa inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 13, p. 1305–1323, 2005.
- KRÁTKÝ, M.; VINŠOVÁ, J.; BUCHTA, V. *In Vitro* Antibacterial and Antifungal Activity of Salicylanilide Benzoates. **The Scientific World Journal**, v. 2012, n. Mic, p. 1–7, 2012.
- KRÁTKÝ, Martin *et al.* Synthesis and in vitro biological evaluation of 2-(phenylcarbamoyl)phenyl 4-substituted benzoates. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 4, p. 868–875, 2015.
- LI, Weixia *et al.* Biological activity evaluation and structure – activity relationships analysis of ferulic acid and caffeic acid derivatives for anticancer. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 19, p. 6085–6088, 2012a.
- LI, Yanwu *et al.* Pyrrolidinobenzoic acid inhibitors of influenza virus neuraminidase : The hydrophobic side chain influences type A subtype selectivity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 14, p. 4582–4589, 2012b.
- LI, Xinlu *et al.* Extensive functional redundancy in the regulation of *Candida albicans* drug resistance and morphogenesis by lysines deacetylases Hos2, Hda1, Rpd3 and Rpd31. **Molecular Microbiology** v. 103, n. 4, p. 635–656, 2017.
- LIMA, Lídia M. Química medicinal moderna: desafios e contribuição brasileira. **Química Nova**. v. 30, n. 6, p. 1456–1468, 2007.
- LIMA, Gláucia Moreira E. *et al.* Identification and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from the urine of patients in a university hospital in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 2017.
- LIMA, Tamires C. *et al.* Antifungal activity of cinnamic acid and benzoic acid esters against *Candida albicans* strains. **Natural Product Research**, 2017.
- LIU, Jan *et al.* Copper-catalyzed highly efficient ester formation from carboxylic acids / esters and formates. **Organic and Biomolecular Chemistry**. v. 2. 2014.
- LOPES, Wilson A.; FASCIO, Miguel. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**. v. 27. n. 4. p. 670-673. 2004.
- LÓPEZ, A.; MING, D. S.; TOWERS, G. H. N. Antifungal activity of benzoic acid derivatives from *Piper lanceaefolium*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 1, p. 62–64, 2002.
- MAGENS, Silja; PLIETKER, Bernd. Nucleophilic Iron Catalysis in Transesterifications: Scope and Limitations. **The Journal of Organic Chemistry**. p. 3715–3721, 2010.

MAUBON, Danièle *et al.* Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: Where are we now? **Intensive Care Medicine**, v. 40, n. 9, p. 1241–1255, 2014.

MARSTON, Hilary D. Antimicrobial Resistance. **Journal of the American Medical Association**, v. 316, n. 11, p. 1193–1204, 2016.

MCCARTY, Todd P.; PAPPAS, Peter G. Invasive Candidiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 103–124, 2015.

MOCCI, Rita *et al.* An environmentally sustainable mechanochemical route to hydroxamic acid derivatives. **Advanced Synthesis and Catalysis**, p. 3135–3144, 2016.

MOHAMED, H. A.; RADWAN, R. R.; RAAFAT, A. I. Antifungal activity of oral (Tragacanth / acrylic acid) Amphotericin B carrier for systemic candidiasis : in vitro and in vivo study. **Drug Delivery and Translational Research**, p. 191–203, 2018.

MUSKAWAR, Prashant N. *et al.* Facile esterification of carboxylic acid using amide functionalized benzimidazolium dicationic ionic liquids. **Applied Catalysis A: General**, v. 482, p. 214–220, 2014.

NAKAMURA H. M.; CALDEIRA, S. M.; AVILA, M. A. G. Incidência de infecções fúngicas em pacientes cirúrgicos : uma abordagem retrospectiva. **Revista SOBECC**, v. 18, n. 3, p. 49–58, 2013.

NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, M. P. O.; JÚNIOR, A. M. B., TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 108-113, 2007.

NASCIMENTO, Lázaro Gomes. **Preparação de ésteres nitrocinâmicos e avaliação da sua atividade antimicrobiana**. 115p. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.

NEISES, Bernhard; STEGLICH, Wolfgang. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. **Angewandte Chemie International Edition in English** v. 553, n. 7, p. 12–14, 1978.

NGUYEN, P. H. *et al.* Isolation of benzoic and cinnamic acid derivatives from the grains of Sorghum bicolor and their inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 cells. **Food Chemistry**, v. 168, p. 512–519, 2015.

NIGROGI, Ramakrishna V. S. *et al.* Synthesis of novel (1-substituted benzenesulfonyl-1H-indol-5-yl)-(4- substituted piperazin-1-yl)-methanone derivatives as 5-HT6R ligands. **Der Pharma Chemica**, v. 3, n. 3, p. 221-231, 2011.

OLIVEIRA, C. A. *et al.* Síntese de ésteres de aromas de frutas: Um experimento para cursos de graduação dentro de um dos princípios da química verde. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 1, p. 152–167, 2014.

OLMO, A.; CALZADA, J.; NUÑEZ, M. Benzoic Acid and Its Derivatives as Naturally Occurring Compounds in Foods and as Additives: Uses , Exposure and Controversy. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 8398, 2015.

- PAPADIMITRIOU-OLIVGERIS, M.; SPILIOPOULOU, A.; FLIGOU, F. Risk factors and predictors of mortality of candidaemia among critically ill patients: role of antifungal prophylaxis in its development and in selection of non - *albicans* species. **Infection**, v. 45, n. 5, p. 651–657, 2017.
- PARRY, R.; NISHINO S.; SPAIN J. Naturally-occurring nitro compounds. **Natural Product Reports**. v. 28. p. 152–167, 2011.
- PAULA, F. R.; SERRANO, S. H. P.; TAVARES, L. C. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1013–1020, 2009.
- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. Tradução da 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.
- PEIXOTO, Juliana Vieira *et al.* Candidíase: uma revisão de literatura. **Braslian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 8, n. 2, p. 75–82, 2014.
- PEIXOTO, Larissa R. *et al.* Archives of Oral Biology Antifungal activity , mode of action and anti-bio fi lm effects of *Laurus nobilis* Linnaeus essential oil against *Candida* spp . **Archives of Oral Biology**, v. 73, p. 179–185, 2017.
- PEREIRA, F. O.; MENDES, J. M.; LIMA, I. O.; MOTA, K. S. L.; OLIVEIRA, W. A.; LIMA, E. O. Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against *Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 2, p. 1–7, 2014.
- PERLIN, D. S. Mechanisms of echinocandin antifungal drug resistance. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**. p. 1–11, 2015.
- PERLIN, D. S.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. Series Fungal infections 5. The global problem of antifungal resistance : prevalence , mechanisms , and management. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 12, p. e383–e392, 2017.
- POPOVA, Milena *et al.* The specific chemical profile of Mediterranean propolis from Malta. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 1431–1435, 2011.
- QUALLEY, Anthony V. *et al.* Completion of the core β -oxidative pathway of benzoic acid biosynthesis in plants. **PNAS**. v. 109, n. 40, p. 16383–16388, 2012.
- REFAAT, John *et al.* Chemical constituents from *Chorisia chodatii* flowers and their biological activities. **Medicinal Chemistry Research**, v. 24, n. 7, p. 2939–2949, 2015.
- RIEMENSCHNEIDER, Wilhelm; BOLT Hermann M. Esters, Organic. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**. 1 ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2012.
- SADEGHI, G. *et al.* Emergence of non- *Candida albicans* species: Epidemiology, phylogeny and fluconazole susceptibility profile. **Journal de Mycologie Medicale**. p. 6–13, 2018.
- SALAR, Uzma *et al.* Biology-oriented drug synthesis (BIODS): In vitro β -glucuronidase inhibitory and *in silico* studies on 2- (2-methyl-5-nitro-1 H -imidazol-1-yl) ethyl aryl carboxylate derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 125, p. 1289–1299, 2017.

- SANDERSON, J. Thomas *et al.* Antiproliferative, antyandrogenic and cytotoxicity effects of novel caffeic acid derivatives in LNCaP human androgen-dependent prostate cancer cells. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**. v. 21. n. 22. p. 7182-7193, 2013
- SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; LASS-FLORL, C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: Mechanisms and clinical impact. **Mycoses**, v. 58, n. S2, p. 2–13, 2015.
- SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004.
- SILVA, Sônia *et al.* *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: Biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 2, p. 288–305, 2012.
- SILVA, T. F. Abordagens da química medicinal para o desenho de protótipos de fármacos. **Revista Virtual de Química**. v. 5, n. 5, p. 921–933, 2013.
- SOLOMONS, Graham; FRYHLE, Craig. Ácidos Carboxílicos e seus Derivados. Adição-Eliminação Nucleofílica do Carbono Acílico. In: SOLOMONS, Graham; FRYHLE, Craig. **Química Orgânica**. vol. 2, 10^o ed: LTC, 2012. Cap. 17, p. 795-799.
- SONAWANE, Amol D. *et al.* 1, 3,4- oxadiazole- 2- thione as antimycobacterial agents. **Chemical Biology & Drug Discovery**. p. 200–209, 2017.
- SPAMPINATO, Claudia; LEONARDI, Dário. *Candida* Infections, Causes, Targets, and Resistance Mechanisms: Traditional and Alternative Antifungal Agents. **BioMed Research International**. v. 2013, 2013.
- SUI, X.; YAN, L.; JIANG, Y. The vaccines and antibodies associated with Als3p for treatment of *Candida albicans* infections. **Vaccine**, v. 35, n. 43, p. 5786–5793, 2017.
- ŚWISŁOCKA, R. *et al.* Experimental and theoretical study on benzoic acid derivatives. **Journal of Molecular Structure**, v. 1044, p. 181–187, 2013.
- THOMAS, G. **Química medicinal: Uma introdução**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 413p
- TRUSHEVA, Boryana *et al.* Antibacterial mono- and sesquiterpene esters of benzoic acids from Iranian propolis. **Chemistry Central journal**, v. 4, p. 8, 2010.
- VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos Naturais e Química Medicina Moderna. **Química Nova**. v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006.
- WINKLER, Robert; HERTWECK, Christian. Biosynthesis of Nitro Compounds. **ChemBioChem**. p. 973–977, 2007.
- WHIBLEY, Natasha; GAFFEN, Sarah L. Beyond *Candida albicans*: Mechanisms of immunity to non- *albicans* *Candida* species. **Cytokine**, v. 76, n. 1, p. 42–52, 2015.
- WONG, Sarah S. W. *et al.* In Vitro and In Vivo Activity of a Novel Antifungal Small Molecule against *Candida* Infections. **PLoS ONE**. v. 9, n. 1, 2014.
- WU, Y.; ZHANG, Y. D. X.; ZHANG, Y. Solubility determination and thermodynamic

modeling of 3-methyl-4- nitrobenzoic acid in twelve organic solvents from $T = (283 . 15 - 318 . 15)$ K and mixing properties of solutions. **Journal of Chemical Thermodynamics**. v. 102, p. 257–269, 2016.

WU, Y.; ZHANG, Y. D. X.; ZHANG, Y. Solubility of 3-methyl-4-nitrobenzoic acid in binary solvent mixtures of $\{(1,4\text{-dioxane, N-methyl-2-pyrrolidone, N,N-dimethylformamide}) + \text{methanol}\}$ from $T = (283 . 15 \text{ to } 318 . 15)$ K: Experimental determination and thermodynamic modelling. **Journal of Chemical Thermodynamics**. v. 105, p. 165–172, 2017.

XU, Baojun.; CHANG, Sam K. C. Phenolic substance characterization and chemical and cell-Based antioxidant activities of 11 lentils grown in the Northern United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 3, p. 1509–1517, 2010.

XU, Zhijian *et al.* Halogen Bond: Its Role beyond Drug – Target Binding Affinity for Drug Discovery and Development. **Journal of Chemical Information and Modeling**. 2014.

ZHANG, Yanmin *et al.* Potent pan-raf and receptor tyrosine kinase inhibitors based on a cyclopropyl formamide fragment overcome resistance. **Journal of Chemical Information and Modeling**. 2017.

ZHOU, Zi-Li *et al.* The distribution and drug susceptibilities of clinical *Candida* species in TSARY 2014. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 86, n. 4, p. 399–404, 2016.