



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



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

AMIDAS DERIVADAS DO ÁCIDO VANÍLICO: REAÇÕES DE
ACOPLAMENTO E BIOATIVIDADE

ANA JÚLIA DE MORAIS SANTOS OLIVEIRA

João Pessoa

UFPB-2018



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

AMIDAS DERIVADAS DO ÁCIDO VANÍLICO: REAÇÕES DE
ACOPLAMENTO E BIOATIVIDADE

ANA JÚLIA DE MORAIS SANTOS OLIVEIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

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: Professor Dr. Damião Pergentino de Sousa

João Pessoa

UFPB-2018

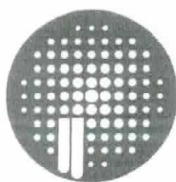
Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

O48a Oliveira, Ana Júlia de Moraes Santos.
Amidas derivadas do ácido vanílico: reações de
acoplamento e bioatividade / Ana Júlia de Moraes Santos
Oliveira. - João Pessoa, 2018.
131 f. : il.

Orientação: Damião Pergentino de Sousa.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Produtos naturais. 2. Amidas - Ácido vanílico. 3.
Coleção de amidas - Preparação. 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. Manguieira
SIAPE C1775369
Assistente em Administração

Ata da 388ª (trecentésima octogésima oitava) Dissertação de Mestrado da aluna do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos **Ana Júlia Morais Santos Oliveira**, candidata ao Título de "Mestre" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacoquímica.

Às quatorze horas (14h00) 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 **Ana Júlia Morais Santos Oliveira**, candidata ao Título de "MESTRE" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacoquímica. Foram componentes da Banca Examinadora os doutores Emídio Vasconcelos Leitão da Cunha, Ph.D em Ciências Farmacêuticas, José Maria Barbosa Filho, Ph.D em Química de Produtos Naturais e Damião Pergentino de Sousa, Ph.D em Ciências. Sendo o primeiro integrante do corpo docente da Universidade Estadual da Paraíba e os demais 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 **Ana Júlia Morais Santos Oliveira**, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado "Amidas derivadas do ácido vanílico: reações de acoplamento e bioatividade". 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 **Ana Júlia Morais Santos Oliveira** 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)

Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa (Orientador)

Prof. Dr. Emídio Vasconcelos Leitão da Cunha (Examinador)

Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho (Examinador)

Ana Júlia Morais Santos Oliveira (Discente)



Dedicatória

Dedico a Deus por todas as graças que tem derramado em minha vida, aos meus pais Jordânia e Erivar por todo amor e incentivo dado, as minhas irmãs Juliana e Júlia por todo incentivo, ao meu sobrinho Heitor, que é um anjo em nossas vidas e ao meu namorado Danilo e sua família por todo apoio e amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, força e paciência para galgar dia a dia, e por ter proporcionado tantas coisas boas na minha vida.

À minha mãe, Jordânia, por ser meu porto seguro e minha conselheira fiel, que sempre está do meu lado, mesmo estando longe e ao meu pai, Erivar, pelo apoio, amor e incentivo dado. Às minhas irmãs Júlia e Juliana por cada palavra de incentivo e de amor. Ao meu sobrinho lindo que mesmo sendo uma criança, me fez ver o real sentido da vida e o quanto somos especiais aos olhos de Deus. Todas as minhas conquistas são deles e para eles.

Aos familiares que de alguma forma contribuíram durante a minha caminhada, em especial Titio Leudo e Tia Sirley que me deram abrigo na sua casa quando eu mais precisei, sou muito grata.

Ao meu namorado Danilo Rangel e sua família por toda paciência, carinho, apoio e amor. Sempre que precisei eles estavam prontos a me ajudar.

Às minhas amigas/irmãs que a farmácia fez questão de me presentear, Rayanne Hellen e Bárbara Cavalcanti, por todas as broncas, apoio, carinho, companheirismo, incentivo e noites em claro de estudos durante todos os anos.

Às minhas companheiras de mestrado e do futuro doutorado, Rayanne Hellen e Alana Rodrigues, vocês foram essenciais nessa caminhada árdua e pesada que percorremos, serei sempre grata.

Agradeço ao Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa por todos os ensinamentos e incentivos que contribuíram muito para a minha formação acadêmica e pela oportunidade e espaço para executar esse projeto e os próximos que virão.

Agradeço também a todos os professores que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

A todos os amigos do Laboratório de química farmacêutica: Anne, Lázaro, Marianna, Flávio, Alana, Rayanne, Ricardo, Mayara, Carol, Susi, Anna, Alex, Joice, Carlos por todas as orientações, apoio e amizade.

A todos vocês
Muito Obrigado!

RESUMO

AMIDAS DO ÁCIDO VANÍLICO: REAÇÕES DE ACOPLAMENTO E BIOATIVIDADE

Ana Júlia de Moraes Santos Oliveira

Dissertação em produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (Farmacoquímica)

Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde – 2018

Na última década observou-se um aumento considerável na prevalência da resistência aos agentes antimicrobianos, o que motivou o estudo do presente trabalho, que teve como finalidade a preparação de uma coleção de amidas derivadas do ácido vanílico através de reações de acoplamento utilizando o PyBOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tripirrolidino-fosfônio) e DCC (dicicloexilcarbodiimida) como agentes acopladores, como também avaliar a atividade antimicrobiana das amidas preparadas frente a espécies dos gêneros *Candida*, *Staphylococcus* e *Pseudomonas*. Nesse contexto, existem os compostos fenólicos, que podem ser extraídos de fontes naturais ou obtidos por meio de síntese, como exemplo, o ácido vanílico que possui diversas atividades biológicas, tais como a antimicrobiana. Na caracterização das amidas foram utilizados métodos espectroscópicos de Infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C e Espectrometria de Massas de Alta Resolução. Todas as amidas foram submetidas a testes antimicrobianos pelo método de microdiluição em caldo, tendo como controle antimicrobiano a nistatina e a caspofungina. As dez amidas foram obtidas com rendimentos variando entre 28,81-86,44%, e três são inéditas. Todas as amidas apresentaram atividade antifúngica em pelo menos uma cepa testada. Na avaliação antibacteriana todas as amidas foram bioativas na maior concentração testada frente à cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25925. A amida com melhor perfil antifúngico foi a AN05 que apresentou uma Concentração inibitória mínima de CIM (Concentração Inibitória Mínima) igual a 0,46 $\mu\text{mol/mL}$, sugerindo que a presença de grupo metila ligado ao anel aromático potencializa a atividade da molécula. A presença de grupos hidroxilas nas posições *orto* e *para*, e a metoxila na posição *meta* também são importantes para atividade antimicrobiana.

Palavras-chaves: amida, antimicrobiano, ácido fenólicos.

ABSTRACT

AMIDES OF VANILIC ACID: REACTIONS OF COUPLING AND BIOACTIVITY

Ana Júlia de Moraes Santos Oliveira

Dissertation in Natural and Synthetic Bioactive (of Pharmacochimistry) Products
Federal University of Paraíba, Health Sciences Center – 2018

In the last decade a considerable increase in the prevalence of resistance to antimicrobial agents was observed, which motivated the study of the present work, whose purpose was the preparation of a collection of amides derived from vanillic acid through coupling reactions using PyBOP (benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate) and DCC (dicyclohexylcarbodiimide) as coupling agents, as well as to evaluate the antimicrobial activity of amides prepared against species of the genus *Candida*, *Staphylococcus* and *Pseudomonas*. In this context, there are the phenolic compounds, which can be extracted from natural sources or obtained by means of synthesis, for example, vanillic acid that has several biological activities, such as antimicrobial. In the characterization of the amides were used Infrared Spectroscopic Methods, ^1H and ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance and High Resolution Mass Spectrometry. All the amides were submitted to antimicrobial tests by the broth microdilution method, with antimicrobial control as nystatin and caspofugin. The ten amides were obtained with yields varying between 28,81 - 86,44%, and three are unpublished. All the amides presented antifungal activity in at least one strain tested. In the antibacterial evaluation, all the amides presented bioactivity in the highest concentration tested against *Staphylococcus aureus* strain ATCC 25925. The amide with the best antifungal profile was AN05 which had a minimum inhibitory MIC concentration of 0,46 $\mu\text{mol} / \text{mL}$, suggesting that the presence of a methyl group bound to the aromatic ring potentiates the activity of the molecule. The presence of hydroxyl groups in the *ortho* and *para* positions, and the presence of methoxyl in the *meta* position are also important for antimicrobial activity.

Keywords: amide, antimicrobial, phenolic acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da vanilina.....	28
Figura 2. Imagem da orquídea <i>Vanilla planifolia</i>	29
Figura 3. Estrutura química geral das amidas	30
Figura 4. Formação de amida pela reação de um ácido carboxílico e uma amina....	31
Figura 5: Estrutura química do agente acoplador PYBOP	33
Figura 6: Proposta de ativação e mecanismo de reação por PYBOP	34
Figura 7: Estrutura química da DMAP	35
Figura 8: Estrutura química da DCC	36
Figura 9: Mecanismo geral da reação de amidas por meio de DCC	36
Figura 10: Mecanismo de ação da amidificação por DCC	37
Figura 11: Estrutura química do ácido vanílico	39
Figura 12. Esquema geral das amidas derivadas do ácido vanílico	44
Figura 13. Aminas utilizadas como reagentes na preparação das amidas derivadas do ácido vanílico.....	64
Figura 14. Amidas derivadas do ácido vanílico (AN1 - AN10) obtidas no presente trabalho	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados da reação e propriedades físico-químicas das amidas derivadas do ácido vanílico.....	42
Tabela 2. Assinalamentos de RMN de ¹ H das amidas derivadas do ácido vanílico (AN01 – AN04).....	46
Tabela 3. Assinalamentos de RMN de ¹ H das amidas derivadas do ácido vanílico (AN05 – AN07).....	47
Tabela 4. Assinalamentos de RMN de ¹ H das amidas derivadas do ácido vanílico (AN8 – AN10).....	48
Tabela 5. Assinalamentos de RMN de ¹³ C das amidas derivadas do ácido vanílico (AN1 – AN10).....	49
Tabela 6. Dados do espectro de massas tipo MALDI das amidas AN06, AN07 e AN08	50
Tabela 7. Resultados dos testes antifúngicos realizados com as amidas (AN01 – AN10).....	56
Tabela 8. Continuação da Tabela 7 que contém os resultados dos testes antifúngicos realizados com as amidas (AN01 – AN10).....	57
Tabela 9. Valores de CFM (µmol/mL) e relação CFM/CIM para cada amida (AN01 – AN10).....	58
Tabela 10. Efeitos da amida AN05 na CIM de <i>C. guilliermondii</i> na presença ou ausência de um protetor osmótico (sorbitol 0,8 M), indicando uma ação potencial na biossíntese da parede celular.....	59
Tabela 11. Efeitos da amida AN05 na CIM de <i>C. guilliermondii</i> na presença ou ausência de ergosterol, indicando uma ação potencial na membrana plasmática fúngica.....	60
Tabela 12. Resultados dos testes antibacterianos realizados com as amidas (AN01 – AN10).....	61
Tabela 13. Continuação da tabela 12 que contém os resultados dos testes antibacterianos realizados com as amidas (AN01 – AN10).....	62

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Métodos usados na síntese de amidas. Os produtos podem ser obtidos a partir de cloretos ácidos (a), anidridos (b), ésteres (c), rearranjo de aldoximas (d) e hidratação de nitrilas (e)	31
Esquema 2. Reação de acoplamento com DCC para obtenção de amidas utilizando como material de partida o ácido vanílico	40
Esquema 3. Esquema geral da reação de acoplamento com PyBOP para obtenção de amidas utilizando como material de partida o ácido vanílico	41

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 4-Hidroxi-N-isobutil-3-metoxibenzamida (AN01).....	76
Espectro 2. Espectro de RMN ^1H da 4-Hidroxi-N-isobutil-3-metoxibenzamida (AN01), (CDCl_3 , 500 MHz).....	76
Espectro 3. Expansão do espectro de RMN ^1H da 4-Hidroxi-N-isobutil-3-metoxibenzamida (AN01), (CDCl_3 , 500 MHz)	77
Espectro 4. Expansão do espectro de RMN ^1H da 4-Hidroxi-N-isobutil-3-metoxibenzamida (AN01), (CDCl_3 , 500 MHz).. ..	77
Espectro 5. Espectro de RMN ^{13}C -APT da 4-Hidroxi-N-isobutil-3-metoxibenzamida (AN01), (CDCl_3 , 125 MHz).. ..	78
Espectro 6. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) da (4-Hidroxi-3-metoxifenil) (pirrolidin-1-il) metanona (AN02).. ..	80
Espectro 7. Espectro de RMN ^1H da (4-Hidroxi-3-metoxifenil) (pirrolidin-1-il) metanona (AN02), (CDCl_3 , 500 MHz)	80
Espectro 8. Expansão de espectro de RMN ^1H da (4-Hidroxi-3-metoxifenil) (pirrolidin-1-il) metanona (AN02), (CDCl_3 , 500 MHz).....	81
Espectro 9. Expansão de espectro de RMN ^1H da (4-Hidroxi-3-metoxifenil) (pirrolidin-1-il) metanona (AN02), (CDCl_3 , 500 MHz).....	81
Espectro 10. Espectro de RMN ^{13}C -APT da (4-Hidroxi-3-metoxifenil) (pirrolidin-1-il) metanona (AN02), (CDCl_3 , 125 MHz)	82
Espectro 11. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de N-Ciclo-hexil-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN03).....	84
Espectro 12. Espectro de RMN ^1H de N-Ciclo-hexil-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN03), (DMSO-d_6 , 400 MHz)	84
Espectro 13. Expansão do espectro de RMN ^1H de N-Ciclo-hexil-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN03), (DMSO-d_6 , 400 MHz)	85
Espectro 14. Expansão do espectro de RMN ^1H de N-Ciclo-hexil-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN03), (DMSO-d_6 , 400 MHz).....	85

Espectro 15. Espectro de RMN ^{13}C -APT de N-Ciclo-hexil-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN03), (DMSO- d_6 , 100 MHz).....	86
Espectro 16. Expansão de espectro de RMN ^{13}C -APT de N-Ciclo-hexil-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN03), (DMSO- d_6 , 100 MHz).....	86
Espectro 17. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de N-Benzil-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN04).....	88
Espectro 18. Espectro de RMN ^1H de N-Benzil-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN04), (CDCl $_3$, 500 MHz)	88
Espectro 19. Expansão de espectro de RMN ^1H de N-Benzil-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN04), (CDCl $_3$, 500 MHz)..	89
Espectro 20. Expansão de espectro de RMN ^1H de N-Benzil-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN04), (CDCl $_3$, 500 MHz)..	89
Espectro 21. Espectro de RMN ^{13}C -APT de N-Benzil-4-hidroxi-3-metóxi-benzamida (AN04), (CDCl $_3$, 125 MHz)	90
Espectro 22. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de N-benzil-4-hidroxi-3-metóxi-benzamida (AN04), (CDCl $_3$, 125 MHz)	90
Espectro 23. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 4-Hidroxi-3-metoxi-N-(4-metilbenzil) benzamida (AN05).	92
Espectro 24. Espectro de RMN ^1H de 4-Hidroxi-3-metoxi-N-(4-metilbenzil) benzamida (AN05), (CDCl $_3$, 400 MHz).....	92
Espectro 25. Expansão de espectro de RMN ^1H de 4-Hidroxi-3-metoxi-N-(4-metilbenzil) benzamida (AN05), (CDCl $_3$, 400 MHz).....	93
Espectro 26. Expansão de espectro de RMN ^1H de 4-Hidroxi-3-metoxi-N-(4-metilbenzil) benzamida (AN05), (CDCl $_3$, 400 MHz).....	93
Espectro 27. Espectro de RMN ^{13}C de 4-Hidroxi-3-metoxi-N-(4-metilbenzil) benzamida (AN05), (CDCl $_3$, 100 MHz).....	94
Espectro 28. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 4-Hidroxi-3-metoxi-N-(4-metoxibenzil) benzamida (AN06)..	96

Espectro 29. Espectro de RMN ^1H de 4-Hidroxi-3-metoxi-N-(4-metoxibenzil) benzamida (AN06), (CDCl_3 , 400 MHz).....	96
Espectro 30. Expansão do espectro de RMN ^1H de 4-Hidroxi-3-metoxi-N-(4-metoxibenzil) benzamida (AN06), (CDCl_3 , 400 MHz).....	97
Espectro 31. Expansão do espectro de RMN ^1H de 4-Hidroxi-3-metoxi-N-(4-metoxibenzil) benzamida (AN06), (CDCl_3 , 400 MHz).....	97
Espectro 32. Espectro de RMN ^{13}C de 4-Hidroxi-3-metoxi-N-(4-metoxibenzil) benzamida (AN06), (CDCl_3 , 100 MHz).....	98
Espectro 33. Espectro de massa de alta resolução do tipo MALDI de 4-Hidroxi-3-metoxi-N-(4-metoxibenzil) benzamida (AN06).....	98
Espectro 34. Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) de N-(Benzo [d] [1,3] dioxol-5-ilmetil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN07).....	100
Espectro 35. Espectro de RMN ^1H de N-(Benzo [d] [1,3] dioxol-5-ilmetil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN07), (CDCl_3 , 400 MHz).....	100
Espectro 36. Expansão espectro de RMN ^1H de N-(benzo [d] [1,3] dioxol-5-ilmetil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN07), (CDCl_3 , 400 MHz).....	101
Espectro 37. Expansão espectro de RMN ^1H de N-(Benzo [d] [1,3] dioxol-5-ilmetil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN07), (CDCl_3 , 400 MHz).....	101
Espectro 38. Espectro de RMN ^{13}C de N-(Benzo [d] [1,3] dioxol-5-ilmetil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN07), (CDCl_3 , 100 MHz).....	102
Espectro 39. Expansão espectro de RMN ^{13}C de N-(Benzo [d] [1,3] dioxol-5-ilmetil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN07), (CDCl_3 , 100 MHz).....	102
Espectro 40. Espectro de massa de alta resolução tipo MALDI de N-(benzo [d] [1,3]dioxol-5-ilmetil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN07).....	103
Espectro 41. Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) de N-(3,4-dimetoxibenzil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN08).....	105
Espectro 42. Espectro de RMN ^1H de N-(3,4-dimetoxibenzil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN08), (CDCl_3 , 500 MHz).....	105

Espectro 43. Expansão espectro de RMN ^1H de N-(3,4-dimetoxibenzil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN08), (CDCl_3 , 500 MHz)..	106
Espectro 44. Expansão espectro de RMN ^1H de N-(3,4-dimetoxibenzil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN08), (CDCl_3 , 500 MHz)..	786
Espectro 45. Espectro de RMN ^{13}C de N-(3,4-dimetoxibenzil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN08), (CDCl_3 , 125 MHz)..	787
Espectro 46. Expansão espectro de RMN ^{13}C de N-(3,4-dimetoxibenzil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN08), (CDCl_3 , 125 MHz)..	787
Espectro 47. Expansão espectro de RMN ^{13}C de N-(3,4-dimetoxibenzil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN08), (CDCl_3 , 125 MHz)..	788
Espectro 48. Expansão espectro de RMN ^{13}C de N-(3,4-dimetoxibenzil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN08), (CDCl_3 , 125 MHz)..	788
Espectro 49. Espectro de massa de alta resolução tipo MALDI de N-(3,4-dimetoxibenzil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN08)..	789
Espectro 50. Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) de 4-Hidroxi-3-metóxi-N-fenilbenzamida (AN09)..	7811
Espectro 51. Espectro de RMN ^1H de 4-hidroxi-3-metoxi-N-fenilbenzamida (AN09), (CDCl_3 , 125 MHz)..	7811
Espectro 52. Expansão do espectro de RMN ^1H de 4-Hidroxi-3-metóxi-N-fenilbenzamida (AN09), (CDCl_3 , 125 MHz)..	7812
Espectro 53. Espectro de RMN ^{13}C de 4-Hidroxi-3-metóxi-N-fenilbenzamida (AN09), (CDCl_3 , 125 MHz)..	7812
Espectro 54. Expansão do Espectro de RMN ^{13}C de 4-Hidroxi-3-metóxi-N-fenilbenzamida (AN09), (CDCl_3 , 125 MHz).	7813
Espectro 55. Espectro de Infravermelho (KBr , cm^{-1}) de N-(4-fluorobenzil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN10)..	785
Espectro 56. Espectro de RMN ^1H de N-(4-fluorobenzil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN10), (DMSO-d_6 , 500 MHz)..	115

Espectro 57. Expansão espectro de RMN ^1H de N-(4-fluorobenzil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN10), (DMSO- d_6 , 500 MHz).....	116
Espectro 58. Expansão espectro de RMN ^1H de N-(4-fluorobenzil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN10), (DMSO- d_6 , 400 MHz).....	116
Espectro 59. Espectro de RMN ^{13}C de N-(4-fluorobenzil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN10), (DMSO- d_6 , 125 MHz).....	117
Espectro 60. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de N-(4-fluorobenzil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN10), (DMSO- d_6 , 125 MHz).....	117

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt: Acetato de etila

AIDS: Acquired Immune Deficiency Syndrome

APT: Attached Proton Test

ATCC: American Type Culture Collection

BOP: Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tris-(dimetilamino)-fosfônio

CCDA: Cromatografia em Camada Delgada Analítica

CDCl₃-d₆: Clorofórmio deuterado

CIM: Concentração inibitória mínima

CFM: Concentração fungicida mínima

Cl: Cloro

d: Dubleto

DCC: Dicicloexilcarbodiimida

dd: Duplo dubleto

DMAP: 4-dimetilaminopiridina

DMF: Dimetilformamida

DMSO: Dimetilsulfóxido

Et₃N: trietilamina

H₂SO₄: ácido sulfúrico

HMPA: Hexametilfosforamida

Hz: Hertz

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

IV: Infravermelho

m: Multipleteo

Me: Metila

MeOH: Metanol

µg: micrograma

MHz Megahertz

mL: mililitro

MRSA: Methicillin-resistant Staphylococcus aureus

NaHCO₃: Bicarbonato de sódio

Na₂SO₄: Sulfato de sódio

Kbr: Brometo de potássio

P.F.: Ponto de fusão

Ppm: Partes por milhão

PyBOP: Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate

quint: Quinteto

QSAR: Relação estrutura-atividade quantitativa

RMN ¹³C: Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze

RMN ¹H: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

s: Singleto

sl: Singleto largo

sp: Subníveis de energia eletrônica s e p

t: Tripleto

TTC: Cloreto de Trifeniltetrazólio

UV: Ultravioleta

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE ESQUEMAS	XI
LISTA DE ESPECTROS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XVII
SUMÁRIO	XIX
1.INTRODUÇÃO	22
2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	24
2.1. Considerações gerais sobre bactérias	24
2.2. Considerações gerais sobre fungos	25
2.2.3. Gênero <i>Candida</i>	25
2.3. Compostos fenólicos	27
2.4. Propriedades da Vanilina e ácido vanílico.....	28
2.5. Amidas, suas propriedades e tipos de reações.....	30
2.6. Sínteses de amidas a partir de agentes acopladores.....	32
2.6.1. Agente acoplador PyBOP.....	32
2.6.2. Agente acoplador DCC.....	35
3. OBJETIVOS	38
3.1. Geral.....	38
3.2. Específicos	38
3.RESULTADOS E DISCUSSÕES	39
4.2. Etapa Química.....	39
4.2.1. Etapa de obtenção e preparação das amidas derivadas do ácido vanílico	39
4.3. Análise espectroscópica das amidas derivadas do ácido vanílico	43
4.3.1. Interpretação dos espectros de infravermelho dos compostos AN01 a AN10..	43
.....	43
4.3.2. Interpretação dos espectros de RMN de ¹ H e ¹³ C dos compostos AN01 a AN10	44
.....	44

4.3.3. Interpretação dos espectros de massas dos compostos AN06, AN07 e AN08.....	50
4.4. Atividade antimicrobiana das amidas derivadas do ácido vanílico	50
4.4.1. Relação estrutura-atividade das amidas derivadas do ácido vanílico no estudo antifúngico	51
4.4.2. Relação estrutura-atividade das amidas derivadas do ácido vanílico no estudo antibacteriano.....	54
4.4.2.1 Mecanismo de ação da substância com melhor potencial bioativo frente á cepa de <i>Candida guilliermondii</i>	54
5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	63
6. ETAPA EXPERIMENTAL.....	64
6.1. Reagentes utilizados na preparação das amostras.....	64
6.2. Métodos cromatográficos	66
6.3. Ponto de fusão	66
6.4. Análises espectroscópicas	66
6.4.1. Infravermelho	66
6.4.2. Ressonância magnética nuclear	66
6.4.3. Espectroscopia de Massa de Alta Resolução	667
6.5. Testes de avaliação da atividade antimicrobiana	67
6.5.1. Teste antifúngico	67
6.5.1.1. Local de trabalho	67
6.5.1.2. Produtos testados.....	68
6.5.1.3. Meio de cultura	68
6.5.1.4. Microrganismos	68
6.5.1.5. Ajuste do Inóculo	68
6.5.1.6. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos produtos testados.....	68
6.5.1.7. Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos produtos testados.....	69
6.5.2. Mecanismo de ação	70
6.5.2.1. Ensaio de sorbitol	70
6.5.2.2. Ensaio de ergosterol.....	70

6.6. Teste antibacteriano	70
6.6.2. Produtos testados	71
6.6.3. Microrganismos	71
6.6.4. Meio de Cultura	71
6.6.5. Preparação do inóculo bacteriano	71
6.6.6. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	71
7. PREPARAÇÃO DAS AMIDAS DERIVADAS DO ÁCIDO VANÍLICO	73
7.1. Obtenção das amidas AN05-AN08	73
7.2. Obtenção das amidas AN01, AN02, AN03, AN04, AN09 e AN10	73
7.3. Dados físico-químicos, rendimentos e dados espectroscópicos das amidas derivadas do ácido vanílico (AN01 – AN10).....	75
7.3.1. 4-Hidroxi-N-isobutil-3-metoxibenzamida (AN01)	75
7.3.2. (4-hidroxi-3-metoxifenil) (pirrolidina-1-il) metanona (AN02).....	79
7.3.3. N-Ciclo-hexil-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN03)	83
7.3.4. N-Benzil-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN04)	87
7.3.5. 4-Hidroxi-3-metoxi-N-(4-metilbenzil) benzamida (AN05)	95
7.3.6. 4-hidroxi-3-metoxi-N-(4-metoxibenzil) benzamida (AN06).....	95
7.3.7. N-(benzo [d] [1,3]dioxol-5-il-metil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN07)	99
7.3.8. N-(3,4-dimetoxibenzil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN08).....	104
7.3.9. 4-Hidroxi-3-metóxi-N-fenilbenzamida (AN09).....	109
7.3.10. N-(4-fluorbenzil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN10)	114
8. REFERÊNCIAS.....	118

1. INTRODUÇÃO

O termo microrganismo corriqueiramente é associado a diversas patologias graves em uma vasta gama de infecções. No entanto, alguns desses microrganismos contribuem para manutenção e equilíbrio do organismo, vivendo em harmonia com o homem, sendo, dessa forma, pertencentes à microbiota normal dos seres humanos (BLACK, 2002; TORTORA, 2005).

Dentro do contexto de infecções causadas por microrganismos, podemos destacar a presença da bactéria Gram positiva *Staphylococcus aureus* na microbiota normal do organismo, onde pode agir de forma patogênica, uma vez que atua em uma ampla gama de infecções, variando desde as mais superficiais até as mais graves e disseminadas. Nos dias de hoje, grande parte de sua importância deve-se ao aumento das infecções hospitalares causadas por amostras multirresistentes desse microrganismo (SANTOS & DARINI, 2002; TAVARES, 2000).

Além das bactérias, deve-se dar atenção também aos organismos eucariontes, como os fungos, que em sua maioria estão presentes no ambiente, embora possam ser encontrados na microbiota normal dos seres humanos. Os fungos, geralmente considerados inofensivos, têm tido um aumento significativo no número de infecções nos últimos anos, passando a ser considerado como patógenos oportunistas. Devido a essa problemática, grande parte das infecções fúngicas é observada em pacientes que se encontram em ambiente hospitalar, onde esses microrganismos encontram as condições ideais para se proliferarem (MARTINS-DINIZ et al., 2005).

O tratamento utilizado nas infecções causadas por fungos e bactérias são os antimicrobianos, que podem ser oriundos de fontes naturais ou sintéticas que agem sobre os microrganismos inibindo seu crescimento ou causando sua exterminação (SÁEZ-LLORENS et al., 2000). O uso de fármacos antimicrobianos começou na década de 1940 (POWERS, 2004), o êxito na redução na morbidade e mortalidade das doenças infecciosas levou à necessidade da continuação de pesquisa sobre o tratamento e controle dos microrganismos (MARKLE; FISCHER; SMEGO JÚNIOR, 2015).

Na última década se observou um aumento considerável na prevalência da resistência aos agentes antimicrobianos associadas com tempos de tratamento

prolongados, com maior toxicidade e custos onerosos (COHEN, 1992; GOLD; MOELLERING JUNIOR, 1996), podendo ocorrer em pacientes da unidade de terapia intensiva (UTI) ou pacientes com tratamento a domicílio (EADY; COVE, 2003). Devido a esse aumento da resistência aos antimicrobianos já existentes no mercado se tem a necessidade da busca de novas substâncias com menor toxicidade e melhor eficácia farmacológica.

Dessa forma, dentre a gama de compostos largamente distribuídos na natureza estão os compostos fenólicos, que participam da composição de vegetais e frutas, que possuem atividades: antitumoral, antimicrobiana, ação preventiva a doenças cardiovasculares e degenerativas (GAÑAN et al., 2009; MARQUES et al., 2009; NICHENAMETLA et al., 2006). Este grupo pode-se dividir em flavonóides (antocianinas, flavonóis e seus derivados) e ácidos fenólicos (ácidos benzóico, ácido vanílico, cinâmico e seus derivados) e cumarinas (KING & YOUNG, 1999).

Com base nisso, o presente trabalho tem como foco a continuidade do estudo realizado pelo Dr. Ricardo Carneiro Montes, em sua tese de doutorado, no Laboratório de Química Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, que utilizou o ácido vanílico como material de partida para a síntese de amidas halogenadas, onde foram testadas as atividades biológicas dos compostos frente a espécies de bactérias e fungos, demonstrando potente atividade fungicida frente às espécies do gênero *Candida* (MONTES, 2016). Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi preparar dez amidas derivadas do ácido vanílico **AN01 – AN10** e avaliar suas atividades antimicrobianas frente aos microrganismos *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 8027, *Pseudomonas aeruginosa* 102, *Staphylococcus aureus* ATCC 25925, *Staphylococcus aureus* 47, *Candida albicans* ATCC 90028; *Candida glabrata* ATCC 90030; *Candida krusei* ATCC 34125 e *Candida guilliermondii* 207, com o intuito de estudar a relação entre a atividade antimicrobiana e a estrutura química das moléculas, a fim de obter um derivado sintético com melhor perfil antimicrobiano.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Considerações gerais sobre bactérias

A espécie *Staphylococcus aureus*, pertence a um grupo de bactérias Gram-positivas, em forma de cocos, além de ser um microrganismo comensal da pele e mucosas, é um importante patógeno que está envolvido tanto em infecções comunitárias como hospitalares, devido a sua capacidade de sintetizar uma variedade de exotoxinas direcionadas ao metabolismo da célula hospedeira, como as hemolisinas, relatadas pela sua atividade citolítica, hemolítica e tóxica. Apresentam-se frequentemente como furúnculo, carbúnculo, abscesso, miocardite, endocardite, pneumonia, meningite e artrite bacteriana (COUTINHO et al., 2010; DINGES et al., 2000; KAWATE; GOUAUX, 2003).

O *S. aureus* é um patógeno que pode estar presente na flora epitelial de 30 a 70% da população, colonizando a pele úmida em diversos locais (axilas, nariz, períneo e intestino) de pessoas saudáveis, sem causar nenhum tipo de dano, entretanto, em algumas situações e juntamente com os fatores de virulência, pode vir a agir como patogênico (LINDSAY & HOLDEN, 2004).

O primeiro caso de resistência do *S. aureus* ao tratamento com penicilina ocorreu um ano depois de implementada a sua utilização para tratar infecções em humanos, desde então sua resistência a outros tipos de agentes terapêuticos vêm se desenvolvendo dificultando ainda mais o tratamento e possível cura dos pacientes afetados (WASSENBERG, 2010).

Nas infecções causadas por *S. aureus* o tratamento de escolha são os β -lactâmicos, que agem impedindo a formação da camada de peptidoglicano da parede celular e dessa forma induz a sua morte. Entretanto, para as amostras resistentes, como é o caso do MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*), a síntese da parede celular ocorre normalmente, uma vez que não responde a ação dos β -lactâmicos (GELATTI et al., 2009).

Dessa forma, o surgimento do *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), fez com que a vancomicina se tornasse uma das poucas formas de tratamento viáveis (KLEVENS et al., 2006, 2007). O uso da vancomicina requer administração por via intravenosa por período de 2-6 semanas, entretanto, dependendo do tratamento pode vir a desenvolver nefrotoxicidade no paciente, como também pode desenvolver

resistência da bactéria em decorrência de tratamentos repetitivos, gerando uma problemática (KULLAR et al., 2011).

Inserido no contexto de bactérias envolvidas em infecções hospitalares e com histórico de resistência aos antimicrobianos, temos a *Pseudomonas aeruginosa* que é uma bactéria Gram-negativa extremamente versátil, encontrada em diversos ambientes, principalmente solo e água, ou ainda associada a plantas e animais, onde pode causar infecções oportunistas. Em seres humanos, a *P.aeruginosa* causa infecções em indivíduos imunocomprometidos, como pacientes portadores da AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) e câncer, vítimas de queimaduras, e portadores de fibrose cística. Na fibrose cística ocorre a colonização dos pulmões pela *P. aeruginosa*, produzindo grande quantidade do exopolissacarídeo alginato e acredita-se que cresça em forma de biofilme. Geralmente é encontrada em infecções hospitalares, sendo capaz de se aderir a diversos materiais, contaminando cateteres, ventiladores, próteses e lentes de contato (INKENO et al., 2007; MAHAJAN-MIKLOS et al., 2000; SILBY et al., 2011).

Diante desta problemática gerada pela resistência aos antibióticos existentes no mercado gera uma constante necessidade de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos com atividade antibacteriana, sejam estes de origem natural, semissintética ou sintética (SILVEIRA et al., 2006).

2.2. Considerações gerais sobre fungos

2.2.3. Gênero *Candida*

As espécies do gênero *Candida* estão presentes de forma ampla na natureza, onde podem atuar de forma saprófita, participando da microbiota normal do ser humano sem causar danos, assim como, podem agir de maneira oportunista, migrando de fase comensal para patogênica, induzida por alterações no organismo do indivíduo hospedeiro. Inúmeros fatores estão ligados ao aumento de casos de candidíase, dentre eles estão: o aumento do uso indiscriminado de terapias imunossupressoras, procedimentos cirúrgicos invasivos e uso de antibióticos de amplo espectro. A candidíase se apresenta de três formas: cutânea (pele e seus apêndices), mucosa (orofaríngea, esofágico e vulvovaginal) e sistêmica (infecções sanguíneas, isto é, candidemia e outras formas de candidíase invasiva). Atualmente a candidíase simboliza a quarta principal causa de infecção nosocomial, com taxa de

10% de mortalidade devido à candidíase sistêmica, variando de 15 a 35% dependendo das espécies infecciosas de *Candida* (PAPON et al., 2013).

As espécies de *Candida* mais comumente isoladas em infecções sistêmicas (candidemia) são *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei*. (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

A espécie que possui maior prevalência nas infecções fúngicas é a *Candida albicans* (MENEZES et al., 2015). Representa de 80 a 90% da microbiota fúngica em humanos e possui uma diversidade de fatores de virulência (FREITAS et al., 2003). Apresenta-se como um fungo dimórfico, no estado assintomático age de forma leveduriforme, enquanto que na sua forma patogênica, se apresenta de forma filamentosa (pseudo-hifas e hifas verdadeiras) (ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007). A sua plasticidade morfológica, ainda permite, com que estas se fixem a superfícies sólidas formando biofilmes (KABIR; HUSSAIN; AHMAD, 2012).

Nos últimos 10 anos existem inúmeros estudos que demonstram uma resistência intrínseca para antifúngicos da classe dos azólicos, especialmente para o fluconazol, desenvolvida por diversas espécies do gênero *Candida*, principalmente por *C. glabrata* e *C. krusei* (SANGLARD, & ODDS, 2002).

Ao longo do tempo outra espécie de *Candida* veio emergindo, a *Candida guilliermondii* caracterizada por sua propensão para desenvolver resistência a agentes antifúngicos durante o tratamento. Mais precisamente, estudos recentes especificaram que *C. guilliermondii* representa 1-3% de toda candidemia e que a maioria dos casos de infecção estão associados a pacientes oncológicos (DESNOS-OLLIVIER et al., 2008; GIRMENIA et al., 2006; PFALLER et al., 2006; SAVINI et al., 2011).

Em relação ao tratamento da candidíase, grande quantidade de fármacos obtidos por meio de síntese orgânica tem sido utilizada no tratamento de infecções micóticas superficiais ou sistêmicas atualmente. As principais classes de antifúngicos são: os poliênicos, azóis e as equinocandinas; estes agentes exercem sua ação em nível de membrana ou parede. Porém, as infecções fúngicas são de difícil tratamento, fato relacionado à elevada resistência da *Candida* frente à ação de alguns antifúngicos convencionais (ARAÚJO et al, 2004; COLOMBO, 2013).

Na terapia antifúngica usada na candidíase superficial teve início com a introdução de antifúngicos poliênicos como a nistatina, e o tratamento das micoses profundas é feito com o uso de anfotericina B, que atuam reagindo com esteróis das membranas celulares do fungo formando poros ou canais, aumentando a permeabilidade da célula, levando a um extravasamento do conteúdo citoplasmático e conseqüente morte da célula. Contudo, novas substâncias sintéticas ativas contra leveduras vêm merecendo destaque especial por apresentarem menor toxicidade, comparados com a anfotericina B, apresentam largo espectro de atividade e alguns podem ser administrados por via oral, exercendo ação sistêmica, como a exemplo: a 5-flucitosina e os derivados azólicos, entre os quais o miconazol, clotrimazol, cetoconazol, fluconazol e itraconazol, onde o seu mecanismo de ação ocorre pela inibição da síntese de ergosterol, inibindo assim o crescimento do fungo, levando-o a morte celular (ANDRADE, 2006; GOODMAN; GILMAN, 2012; SALLES, 2000; SOYSA et al., 2008; TAVARES, 2001).

Dessa forma, o aumento do uso indiscriminado de antifúngicos, aliado ao crescimento do número de casos de pacientes imunossuprimidos tem levado ao aparecimento de linhagens fúngicas resistentes aos agentes antimicrobianos disponíveis no mercado, tornando necessária a pesquisa por novos agentes antifúngicos mais potentes, seguros e eficazes (HARTMANN, 2016).

2.3. Compostos fenólicos

Atualmente tem sido muito estudado em plantas a presença de compostos fenólicos por apresentarem diversas atividades farmacológicas e nutricionais, como também por inibirem a oxidação lipídica e a proliferação de fungos. Além disso, participam de processos responsáveis pela cor, adstringência e aroma em diversos alimentos (AZIZ et al., 1998; FERNANDEZ et al., 1998; GAMACHE et al., 1993; HOLLMAN & KATAN, 1998; IVANOVA et al., 1997; NAGEM et al., 1992; PELEG et al., 1998).

Dessa forma, vários pesquisadores têm se interessado por essa classe de compostos, e têm se dedicado nos processos de separação, identificação, quantificação e utilização dos compostos fenólicos em alimentos, enfrentando muitos problemas metodológicos, pelo fato de apresentar uma gama de substâncias diferentes (fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides, taninos e

lignóides), como também, por apresentarem na maioria das vezes alta polaridade, serem muito reativos, e suscetíveis à ação de enzimas (KING & YOUNG, 1999).

Dentre as substâncias presentes nos compostos fenólicos, temos os ácidos fenólicos, que caracterizam por possuírem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, atribuindo propriedades antioxidantes tanto para os alimentos como para o organismo. Por esse motivo são indicados para o tratamento e prevenção do câncer, doenças cardiovasculares e entre outras doenças (SOARES, 2002).

Na família dos compostos fenólicos pouco distribuídos na natureza estão um número reduzido deles, embora estes sejam encontrados com certa frequência. Neste grupo estão os fenóis simples, o pirocatecol, a hidroquinona e o resorcinol. Ainda pertencentes esta família, existem os aldeídos derivados dos ácidos benzóicos, que fazem parte da constituição dos óleos essenciais como exemplo, à vanilina (SOARES, 2002).

2.4. Propriedades da Vanilina e ácido vanílico

A vanilina ou 4-hidróxi-3-metoxibenzaldeído (IUPAC) é conhecida tradicionalmente como aroma de baunilha. O aroma natural da baunilha também é extraído através das favas da orquídea do gênero *Vanilla*. Dentre os diversos tipos de espécies identificadas neste gênero, apenas três delas possuem interesse comercial: a *Vanilla pampona*, *Vanilla tahitensis* e *Vanilla planifolia*. Os compostos ativos extraídos da orquídea são os seguintes fenóis: vanilina, 4-hidroxibenzaldeído, 4-hidroxibenzilmetileter, ácido acético e o ácido vanílico (BERGER, et al., 2007; RAO, et al., 2000).

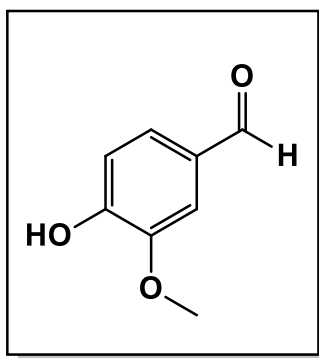


Figura 1: Estrutura da vanilina (Oliveira, 2018).



Figura 2: Imagem da orquídea *Vanilla planifolia* (Ortobotanico, 2008).

Cerca de 50% da produção mundial de vanilina sintética é utilizado como intermediário para síntese de herbicidas, agentes antiespumantes ou drogas tais como: papaverina, L-dopa, L-metildopa e agentes antimicrobianos. A vanilina também é utilizada para desodorizantes de ambientes e ceras para pisos e assoalhos (PACHECO & DAMESIO, 2010).

Alguns compostos fenólicos obtidos por meio de fontes naturais também podem ser usados para a produção biotecnológica de vanilina como, por exemplo, o ácido vanílico. O ácido vanílico também vem sendo citado em algumas publicações como composto intermediário formado antes da produção de vanilina a partir do ácido ferúlico. Autores, tais como Lesage-Meessen e colaboradores (1996), demonstraram a obtenção rentável de vanilina a partir de ácido vanílico, utilizando o fungo *Pycnoporus cinnabarinus*.

Outra fonte rica em ácidos e ésteres cinâmicos, como ácido cafeico, o ácido ferúlico, o ácido benzoico, o 4-hidroxibenzoico e o ácido vanílico é a própolis, oriunda do exsudato e secreções das plantas, que possuem propriedades anti-inflamatórias, imunostimuladoras e antimicrobianas (VELIKOVA et al., 2000).

Vários trabalhos têm demonstrado evidência da eficácia do ácido vanílico no tratamento de respostas imunitária ou inflamatória. Na literatura existem algumas atividades descritas, tais como: atividade de proliferação de linfócitos humanos, secreção de interferon-gama em células mononucleares de sangue periférico, efeito hepatoprotetor através da sua ação supressora sobre a inflamação hepática imunomediada em lesão hepática induzida por concavalina A e colite ulcerosa induzida por sulfato de sódio de dextrano (KIM et al., 2010). Análogos vaniloides e isovaniloides demonstraram-se eficazes na inibição Aminoacil-ARNt-sintetases, uma

importante enzima-alvo produzida por bactérias resistentes a antibióticos (LEE et al. 2001).

2.5. Amidas, suas propriedades e tipos de reações

A função amida é caracterizada pelo grupamento de átomos carbonila-nitrogênio. São moléculas polares e em sua maioria sólida, em temperatura ambiente. O grupo responsável por sua capacidade de solubilidade é o grupamento amino (CARVALHO, 1997).

O grupo funcional amida é comum em moléculas sintéticas ou de ocorrência natural e está presente em diversos produtos farmacêuticos com aplicação em clínica médica (MONTALBETTI, 2005). Estima-se que a função amida faça parte da constituição química de mais de 25% dos fármacos conhecidos (GHOSE, 1999).

As amidas são encontradas na natureza e pelo fato de apresentarem baixa reatividade se destacam, e ainda são capazes de formar ligações de hidrogênio altamente estáveis quando comparadas com os outros derivados carboxílicos. Geralmente apresentam altos pontos de ebulição e fusão, devido à presença das ligações de hidrogênio que geram interações moleculares muito fortes. Essa regra só não se aplica as amidas terciárias (VALEUR & BRADLEY, 2009).

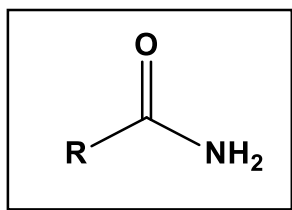


Figura 3: Estrutura química geral das amidas (Oliveira, 2018).

O processo de síntese de amidas ocorre geralmente a partir da condensação de ácidos carboxílicos e aminas (**Figura 4**). Entretanto, a reação entre estes dois grupos funcionais não ocorre de forma espontânea, onde no processo de reação o ácido carboxílico reage com a amina formando um sal à temperatura ambiente (JONES, 1994). Dessa forma, tem-se a necessidade de converter os ácidos carboxílicos em grupos funcionais mais reativos (JORDAN and ROUGHLEY, 2009) e essas transformações tem sido extensivamente estudadas.

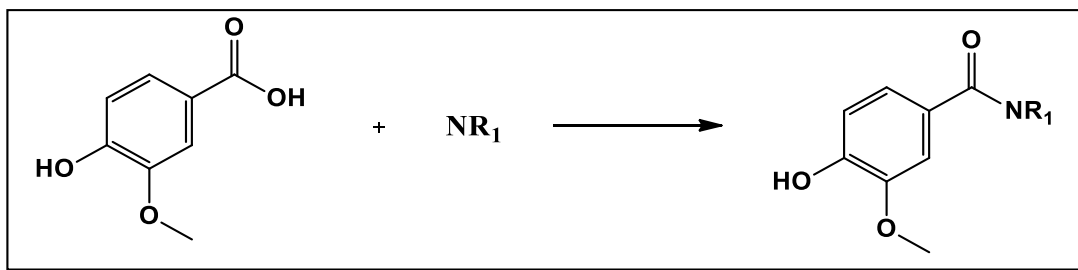
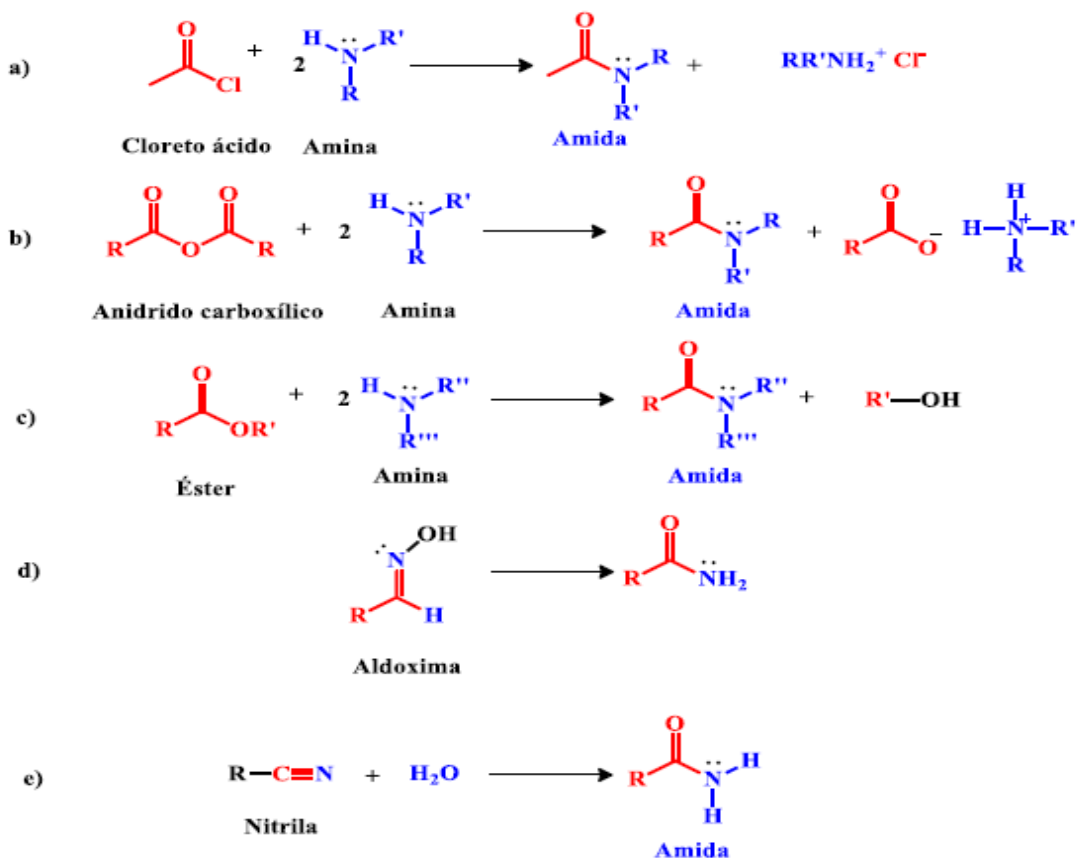


Figura 4: Formação de amida pela reação de um ácido carboxílico e uma amina (Oliveira, 2018).



Esquema 1. Métodos usados na síntese de amidas. Os produtos podem ser obtidos a partir de cloreto ácido (a), anidridos (b), ésteres (c), rearranjo de aldoximas (d) e hidratação de nitrilas (e) (Adaptado de WU et al, 2014).

As amidas são consideradas bases fracas quando comparadas com as aminas, onde o par de elétrons livres presente no nitrogênio das amidas é direcionado ao oxigênio da carbonila em consequência de uma maior eletronegatividade. Criando assim um momento dipolo na molécula, que aumenta a polaridade das amidas, e faz com que as amidas detenham alto ponto de fusão e de ebulição quando comparado com ésteres, ácidos carboxílicos, aldeídos e cetonas.

Esse fenômeno também aumenta a capacidade das amidas de serem solvatadas por moléculas de água ou de se agregar com outras moléculas através de pontes de hidrogênio (ligações de hidrogênio) (IUPAC, 1997).

2.6. Sínteses de amidas a partir de agentes acopladores

2.6.1. Agente acoplador PyBOP

No processo de síntese de amidas existem muitos métodos de preparação, onde a maioria envolve a ativação do ácido carboxílico, transformando-o em um bom eletrófilo na forma de cloreto ácido (SOCl_2 , COCl_2 , PCl_3 , PCl_5) ou anidrido acético, que reagem com as aminas. Um método convencional utilizado é por meio dos agentes acopladores, como BOP, PyBOP, HOBt, HOAt (DUNETZ, *et al.*, 2016; MONTALBETTI & FALQUE, 2005).

Inserido no contexto de substâncias utilizadas como agentes acopladores, estão os sais de fosfônio que foram pesquisados pelos pioneiros GAWNE, KENNER & SHEPPARD (1969) e ficaram conhecidos no mundo da química orgânica pela realização de uma aminólise de passo único, gerando o reagente ativo *in situ*. De regra, a parte catiônica do sal de fosfônio, reage com o ânion do ácido carboxílico, formando um intermediário acilofosfônio (MONTALBETTI & FALQUE, 2005). O sal de fosfônio utilizado nesse trabalho para síntese de amidas é o [2-(benzotriazol-1-iloxi) pirrolindina-1-il]-dipirrolidina-1-il-phosphonium-hexafluoro-fosfato, também chamado de PYBOP, um sólido cristalino e termolábil, utilizado na preparação de amidas a partir de várias combinações de ácidos carboxílicos com aminas orgânicas. Além disso, a reação pode ser feita sem a presença de gás inerte (N_2) e a temperatura ambiente, sendo uma reação mais prática do que outros métodos para a síntese de amidas (COSTE *et al.*, 1990).

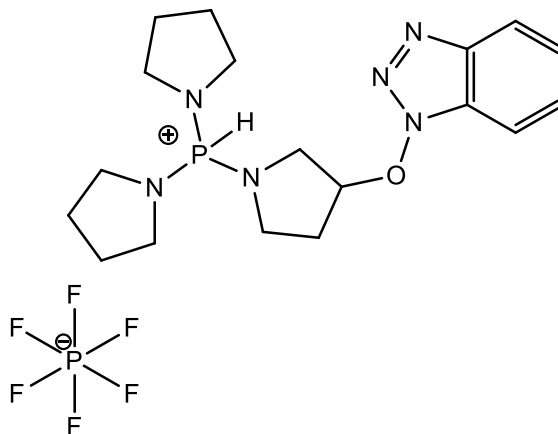


Figura 5: Estrutura química do agente acoplador PyBOP (Oliveira, 2018).

O PyBOP é um agente acoplador comumente utilizado para sintetizar peptídeos e é empregado como substituto do reagente BOP (benzotriazol-1-iloxi)-tris-(dimetil-amino)-phosphonium-hexafluoro-fosfato), evitando assim a formação do produto secundário Hexametilfosforamida (HMPA), gerado pela reação com BOP, que é uma substância cancerígena. Pode ser utilizado para sintetizar amidas utilizando como material de partida uma amina e o ácido carboxílico, solubilizados em solvente aprótico polar, nesse caso o diclorometano (CH₂Cl₂). Na reação utiliza-se também a dimetilformamida (DMF), que é um solvente aprótico, facilitando assim o processo de reação de substituição do tipo S_N2, aumentando a atividade nucleofílica dos ânions mais básicos. Quando a trietilamina (Et₃N) desprotona a hidroxila do ácido carboxílico de escolha, a DMF se encarrega de acelerar a reação do oxigênio nucleofílico com o PyBOP. O PyBOP em termos financeiros é um pouco mais caro do que o seu análogo (BOP), mas se torna indispensável para etapas de ciclização e que a ativação de aminoácidos fica impedida (CASTRO *et al.*, 1975; COSTE *et al.*, 1990; FRÉROT *et al.*, 1991; RAJAN *et al.*, 2001; VOLLHARDT & SCHORE, 2011).

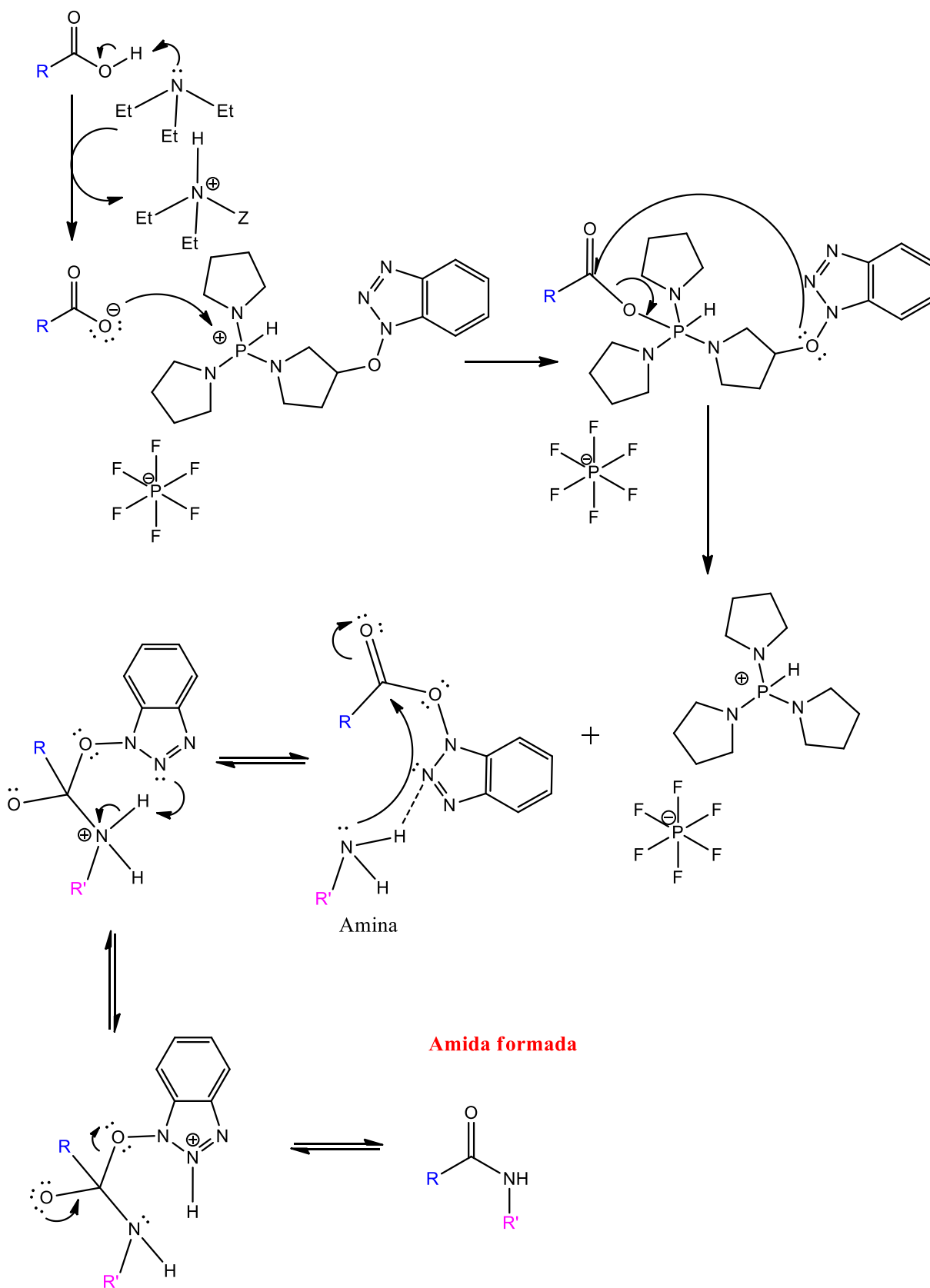


Figura 6: Proposta de ativação e mecanismo de reação por PYBOP (Adaptado de CASTRO et al., 1975; COSTE et al., 1990).

2.6.2. Agente acoplador DCC

As reações de amidação também podem ocorrer na presença de um agente desidratante, pertencente à classe das carbodiimidas, como a dicicloexilcarbodiimida (**DCC**), por exemplo, são frequentemente usadas para síntese de amidas, anidridos ou ésteres e na síntese de peptídeos por apresentar condições reacionais brandas e um protocolo experimental simples, preservando a integridade dos centros assimétricos (JONES, 1994; VALEUR AND BRADLEY, 2009).

Com base nos dados da literatura, Khan usou carbodiimidas para a síntese de amidas, e descreve em seu trabalho, a reação entre o ácido *cis*-15-*Z*-tetracosenóico e a benzilamina com o emprego de **DCC** e a dimetilaminopiridina (**DMAP**) para a obtenção por processo de síntese da *N*-benzil-15-*Z*-tetracosenamida, amida graxa encontrada no vegetal *Lepidium meyenii* (ZHAO et al., 2005).

A 4-dimetilaminopiridina (**DMAP**) é um derivado de piridina cuja fórmula molecular é $(\text{CH}_3)_2\text{NC}_5\text{H}_4\text{N}$. Apresenta-se na forma de sólido incolor e cristalino, e se torna mais básica do que a piridina, devido à estabilização de ressonância do substituinte NMe_2 . Devido à sua basicidade, o DMAP (**Figura 7**) é um catalisador nucleofílico útil para uma variedade de reações (BERRY et al., 2001).

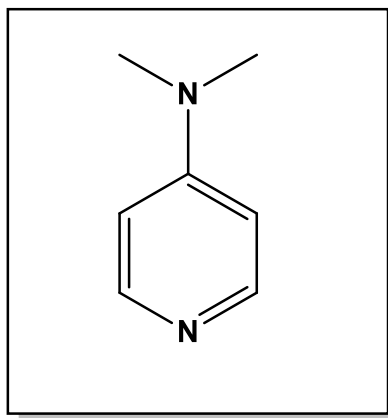


Figura 7: Estrutura química da DMAP (Adaptado de BERRY et al., 2001).

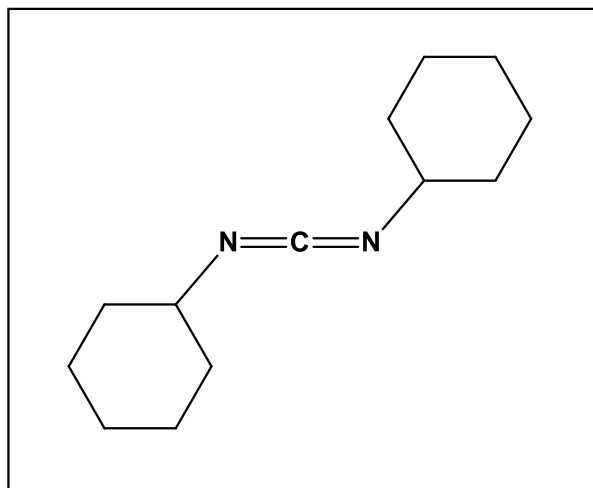


Figura 8: Estrutura química da DCC (Adaptado de BERRY et al., 2001).

A amidação com diciclohexilcarbodiimida (**DCC**) como reagente de acoplamento e a 4-dimetilaminopiridina (**DMAP**) como catalisador foi descrita pela primeira vez por Wolfgang Steglich em 1978 (NEISES AND STEGLICH, 1978).

A reação utilizando o **DCC** e **DMAP** ocorre à temperatura ambiente, utilizando com o solvente no meio reacional o diclorometano.

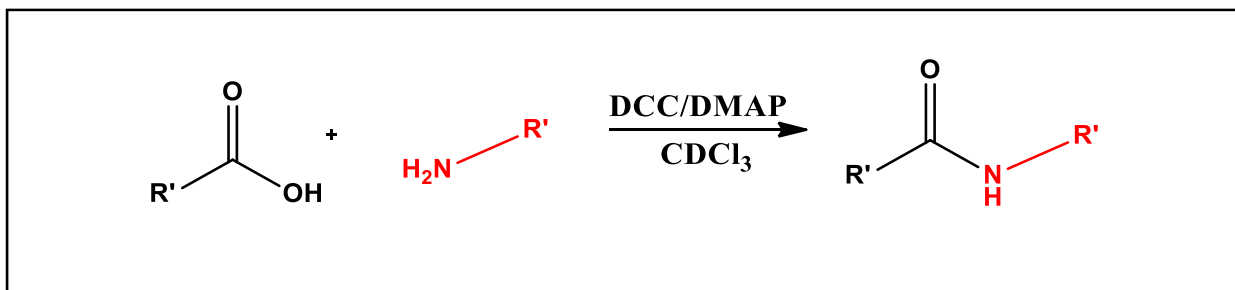


Figura 9: Mecanismo geral da reação de amidas por meio de DCC (Adaptado de NEISES AND STEGLICH, 1978).

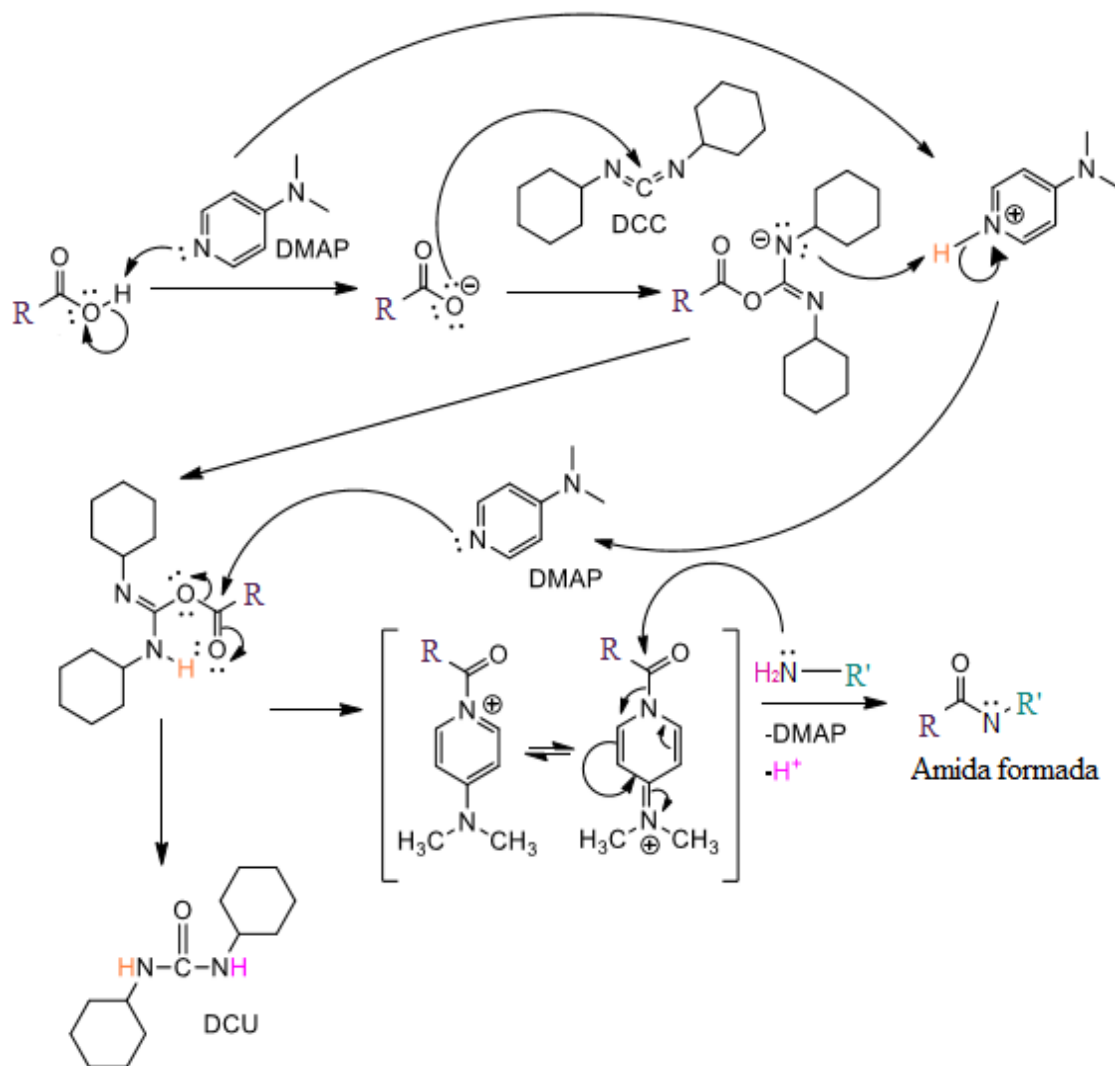


Figura 10: Mecanismo de ação da amidação por DCC (NEISES AND STEGLICH, 1978).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Preparar e avaliar atividade antimicrobiana de uma coleção de amidas derivadas do ácido vanílico, estabelecendo uma relação estrutura-atividade das substâncias avaliadas.

3.2. Específicos

- Preparar os derivados do ácido vanílico, via reação de acoplamento;
- Avaliar a atividade antimicrobiana;
- Traçar uma relação estrutura-atividade das substâncias avaliadas;

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.2. Etapa Química

4.2.1. Etapa de obtenção e preparação das amidas derivadas do ácido vanílico

Os procedimentos de preparação das amidas foram realizados no Laboratório de Química Farmacêutica do Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde (CCS) - Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

O ácido vanílico foi utilizado como material de partida (**Figura 11**) para a preparação de uma coleção de dez. Dentre as dez amidas obtidas, três delas são inéditas na literatura, são elas: 4-hidroxi-3-metoxi-N-(4-metoxibenzil) benzamida (**AN06**), N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il-metil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (**AN07**) e N-(3,4-dimetoxibenzil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (**AN08**).

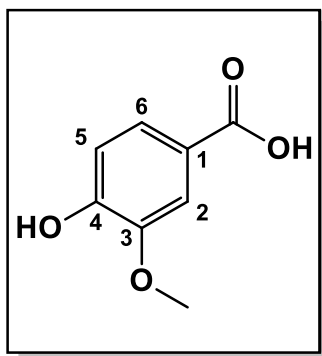


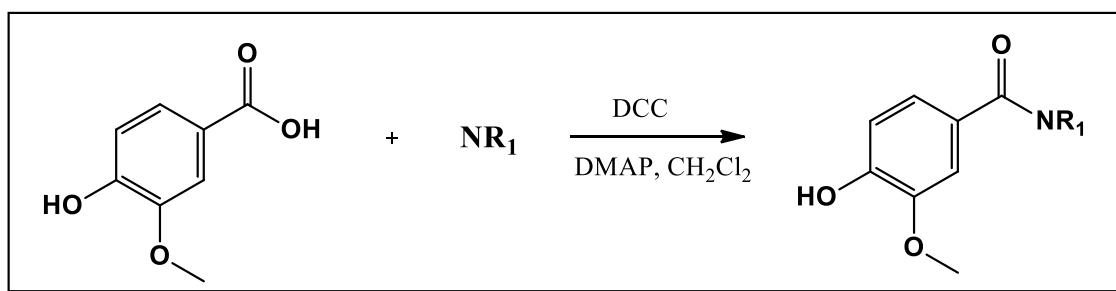
Figura 11: Estrutura química do ácido vanílico (Oliveira, 2018).

As substâncias sintetizadas foram obtidas por meio de dois tipos de reações: reação de acoplamento usando a **DCC** como agente acoplador e reação de acoplamento utilizando como reagente acoplador o **PyBOP**.

A primeira coleção de amidas foi obtida através da reação de acoplamento com **DCC**, na qual foi possível sintetizar quatro amidas (**AN05**, **AN06**, **AN07**, **AN08**) a partir da reação entre o ácido vanílico com quatro aminas: 4-metilbenzilamina, 4-metoxibenzilamina, Piperonilamina e 3,4-dimetoxibenzilamina, como demonstrado no **Esquema 2**.

Foi utilizado na reação o diclorometano, a **DMAP**, e o agente de acoplamento (**DCC**), a reação foi monitorado por cromatografia em camada delgada analítica, utilizando um sistema acetato de etila:hexano como fase móvel em gradiente

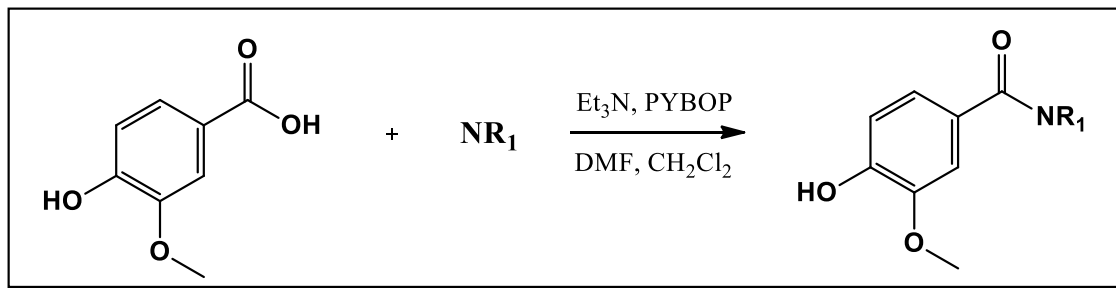
crecente de polaridade (JOSHUA et al., 2016; SIEWERT et al., 2013). De acordo com a **Tabela 1**, os tempos de reação foram de 24 - 48 horas, com rendimentos entre 29,95% – 49,90%, se destacando a amida **AN06** com maior rendimento (49,90%) e com maior tempo reacional (48 horas), enquanto a amida **AN07** apresentou menor rendimento (29,95%). As amidas foram identificadas por métodos espectroscópicos de infravermelho e RMN de ^1H e de ^{13}C .



(5) R1 = C₈H₁₁; (6) R1 = C₈H₁₁O; (7) R1 = C₈H₉O₂; (8) R1 = C₉H₁₃O₃.

Esquema 2. Reação de acoplamento com **DCC** para obtenção de amidas utilizando como material de partida o ácido vanílico (Oliveira, 2018).

A segunda coleção de amidas (**AN01**, **AN02**, **AN03**, **AN04**, **AN09**, **AN10**) foi preparada pela reação de acoplamento com **PyBOP**, com 6 aminas: isobutilamina, pirrolidina, ciclohexilamina, benzilamina, anilina e 4-fluorbenzilamina, conforme mostrado no **Esquema 3**, utilizando dimetilformamida (**DMF**), trietilamina (**Et₃N**), e agente de acoplamento **PyBOP**, onde todo o processo de síntese foi monitorado por cromatografia em camada delgada analítica. O tempo das reações foi entre 5-8 horas, tendo-se obtido rendimentos entre 28,81-86,44% (**Tabela 1**). A amida **AN02** teve maior rendimento (86,44%) e a amida **AN01** com o menor rendimento (28,81%). As amidas foram identificadas por métodos espectroscópicos de infravermelho e RMN de ^1H e de ^{13}C .



(1) R1 = C₄H₁₁; (2) R1 = C₄H₉; (3) R1 = C₆H₁₃; (4) R1 = C₇H₉; (9) R1 = C₇H₈ (10) R1 = C₆H₇

Esquema 3. Esquema geral da reação de acoplamento com PYBOP para obtenção de amidas utilizando como material de partida o ácido vanílico (Oliveira, 2018).

Tabela 1. Dados da reação e propriedades físico-químicas das amidas derivadas do ácido vanílico.

Composto	R	Fórmula molecular	Massa molar (g/mol)	Ponto de fusão	Tempo de reação (h)	Quantidade em massa (mg)	Sistema da coluna (Hexano:Acetato)	Rendimento (%)
AN01	C ₄ H ₁₁ N	C ₁₂ H ₁₇ NO ₃	223,27	-	I – 5	38,20	06:04	I – 28,81
AN02	C ₄ H ₉ N	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃	221,25	-	I – 7	114,50	02:08	I – 86,44
AN03	C ₆ H ₁₃ N	C ₁₄ H ₁₉ NO ₃	249,31	210-211°C	I – 5	76,30	02:08	I – 51,67
AN04	C ₇ H ₉ N	C ₁₅ H ₁₅ NO ₃	257,28	154-155°C	I – 7	101,00	03:07	I – 66,54
AN05	C ₈ H ₁₁ N	C ₁₆ H ₁₇ NO ₃	271,31	162-164°C	II – 48	47,80	04:06	II – 30,50
AN06	C ₈ H ₁₁ NO	C ₁₆ H ₁₇ NO ₄	287,31	-	II – 48	84,60	03:07	II – 49,90
AN07	C ₈ H ₉ NO ₂	C ₁₆ H ₁₅ NO ₅	301,29	130-132°C	II – 24	52,00	06:04	II – 29,25
AN08	C ₉ H ₁₃ NO ₃	C ₁₇ H ₁₉ NO ₅	317,34	-	II – 24	57,00	02:08	II – 30,44
AN09	C ₇ H ₈ FN	C ₁₄ H ₁₃ NO ₃	230,24	-	I – 8	93,40	06:04	I – 68,75
AN10	C ₆ H ₇ N	C ₁₅ H ₁₄ FNO ₃	275,27	161-165°C	I – 8	49,40	04:06	I – 30,41

Legenda – I - Reação de Amidação com PYBOP; II - Reação de Amidação com DCC/DMAP;

4.3. Análise espectroscópica das amidas derivadas do ácido vanílico

A caracterização estrutural dos compostos foi estabelecida através de dados de IV e RMN de ^1H e ^{13}C .

4.3.1. Interpretação dos espectros de infravermelho dos compostos AN01 a AN10

As análises dos espectros de infravermelho das amidas derivadas do ácido vanílico foram realizadas segundo os dados da literatura, SILVERSTEIN e colaboradores (2007) e PAVIA e colaboradores (2010). Pode-se evidenciar a presença de grupos funcionais, que são importantes para identificação da molécula.

Durante análise dos espectros das amidas sintetizadas (**AN01 a AN10**), constatou-se a presença de sinais do anel aromático, provenientes do ácido vanílico. O que se observa é a presença de sinais norteadores em comum com todos os análogos, referentes à vibração de estiramento axial da OH na faixa de 3300 a 3400 cm^{-1} . A presença de uma banda em aproximadamente, 3000 cm^{-1} no espectro é atribuída ao estiramento assimétrico do grupamento C-H sp^2 o estiramento axial simétrico carbonos sp^3 da metoxila em torno de 2974 cm^{-1} . A banda em aproximadamente 1630 cm^{-1} se deve ao estiramento do grupamento carbonila conjugado ao anel aromático e três bandas intensas e características na faixa de 1583, 1548, 1510 cm^{-1} , correspondentes às vibrações de deformação axial do anel aromático. O estiramento simétrico N-H das amidas não foi possível observar devido à sobreposição do pico largo referente à hidroxila (SAJJADI; SHOKOOHINIA; MOAYEDI, 2012; WANG et. al., 2011).

4.3.2. Interpretação dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos AN01 a AN10

(AN01) $\text{R1} = \text{C}_4\text{H}_{11}$;

(AN02) $\text{R1} = \text{C}_4\text{H}_9$;

(AN03) $\text{R1} = \text{C}_6\text{H}_{13}$;

(AN04) $\text{R1} = \text{C}_7\text{H}_9$;

(AN05) $\text{R1} = \text{C}_8\text{H}_{11}$;

(AN06) $\text{R1} = \text{C}_8\text{H}_{11}\text{O}$;

(AN07) $\text{R1} = \text{C}_8\text{H}_9\text{O}_2$;

(AN08) $\text{R1} = \text{C}_9\text{H}_{13}\text{O}_3$.

(AN09) $\text{R1} = \text{C}_7\text{H}_8$

(AN10) $\text{R1} = \text{C}_6\text{H}_7$

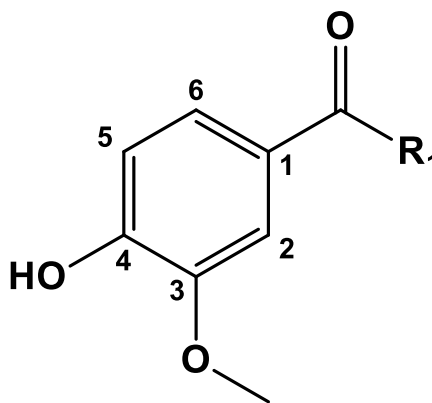


Figura 12. Esquema geral das amidas derivadas do ácido vanílico (Oliveira, 2018).

Conforme a **Figura 12**, os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos produtos obtidos, apresentam 6 (seis) hidrogênios em comum, sendo 3 (três) hidrogênios pertencentes ao anel aromático (**H2**, **H5**, **H6**) e 3 (três) hidrogênios pertencentes a metoxila (**OCH₃**) ligada diretamente ao anel aromático. Apresentam também 8 (oito) carbonos em comum, sendo que 6 (seis) carbonos (**C1**, **C2**, **C3**, **C4**, **C5**, **C6**) pertencem ao anel aromático, e 2 (dois) carbonos (**C=O**, **OCH₃**) que estão na forma de carbonila e metoxila. Os sinais observados em comum para cada molécula, juntamente com os sinais provenientes da amina adicionada à molécula, confirmam as suas respectivas estruturas.

Os sinais de hidrogênios obtidos em DMSO- d_6 , 400 MHz, ppm; evidenciados na **Tabela 4** que mais se diferenciaram, foram da amida **AN10**: para os hidrogênios aromáticos há dois dubletos e um duplo dubleto em 7,44 (*d*, $J = 2,0$ Hz, 1H), 6,79 (*d*, $J = 8,2$ Hz, 1H) e 7,38 (*dd*, $J = 8,3$; 2,1 Hz, 1H) atribuídos aos hidrogênios **H2**, **H5** e **H6**, respectivamente. As constantes de acoplamento semelhantes evidenciam o

acoplamento que ocorre entre os hidrogênios do anel aromático. Dessa forma, o **H6** acopla com o hidrogênio vizinho (**H5**), como também apresenta acoplamento a quatro ligações com o **H2**, que é comum em sistemas aromáticos. Pode-se observar também um singlete atribuído a hidrogênios metilênicos (**NH-CH₂**) referentes à ligação na região alifática que é proveniente da amina adicionada a molécula com deslocamento de 4,41 (*d*, *J* = 5,7 Hz, 2H).

Os dados de RMN ¹³C, evidenciados na **Tabela 5**, apresentam valores de deslocamentos químicos que confirmam também a identidade dos compostos. Para a substância **AN10**, os sinais obtidos em (DMSO-d₆, 100 MHz, ppm), foram: 166,05 característico de **C=O** de amida, um sinal na região de 162,20 atribuído a acoplamento C-F (Carbono-Flúor). Apresentou dois sinais em 149,53 e 147,25 atribuídos a carbonos **C4 e C3**, respectivamente e sinais como 125,23; 120,81; 115,01; 111,33 referentes aos carbonos **C1, C6, C5 e C2**, respectivamente.

Além desses sinais, também são evidenciados os deslocamentos químicos dos carbonos das cadeias laterais saturadas e aromáticas, confirmando a estrutura de cada composto.

Tabela 2. Assinalamentos de RMN de ^1H das amidas derivadas do ácido vanílico (**AN01** – **AN04**).

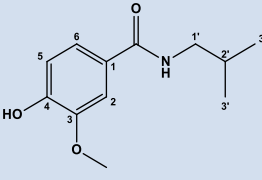
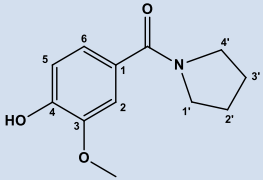
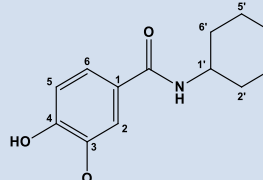
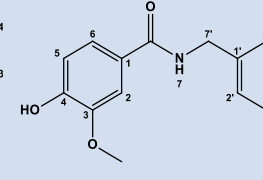
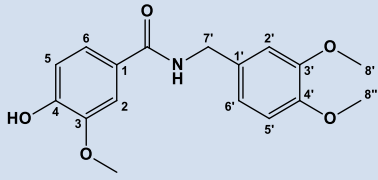
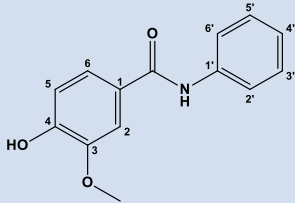
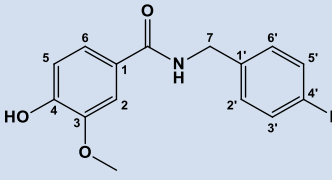
	AN01	AN02	AN03	AN04
Posição				
	δ_{H}	δ_{H}	δ_{H}	δ_{H}
1	-	-	-	-
2	7,46 (<i>d</i> , $J = 1,9$ Hz, 1H)	7,11 (<i>d</i> , $J = 1,8$ Hz, 1H)	7,29 (<i>q</i> , $J = 2,0$ Hz, 1H)	7,48 (<i>d</i> , $J = 1,9$ Hz, 1H)
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	6,91 (<i>d</i> , $J = 8,2$ Hz, 1H)	6,87 (<i>d</i> , $J = 8,2$ Hz, 1H)	6,68 (<i>d</i> , $J = 8,2$ Hz, 1H)	6,89 (<i>d</i> , $J = 8,2$ Hz, 1H)
6	7,18 (<i>dd</i> , $J = 8,2; 2,0$ Hz, 1H)	7,02 (<i>dd</i> , $J = 8,1; 1,9$ Hz, 1H)	7,23 (<i>dd</i> , $J = 8,2; 2,0$ Hz, 1H)	7,21 (<i>dd</i> , $J = 8,2; 1,9$ Hz, 1H)
OH	6,02 (<i>s</i> , 1H)	5,27 (<i>s</i> , 1H)	-	-
OCH₃	3,93 (<i>s</i> , 3H)	3,86 (<i>s</i> , 3H)	3,69 (<i>s</i> , 3H)	3,90 (<i>s</i> , 3H)
NH	-	-	-	8,24 (<i>s</i> , 1H)
1'	3,27 (<i>t</i> , $J = 6,2$ Hz, 2H)	3,61 (<i>t</i> , $J = 5,7$ Hz, 2H)	2,39 (<i>q</i> , $J = 1,8$ Hz, 1H)	-
2'	1,88 (<i>m</i> , Hz, 1H)	1,96 – 1,80 (<i>m</i> , 2H)	1,73 – 1,41 (<i>m</i> , 2H)	7,34 (<i>d</i> , $J = 4,4$ Hz, 1H)
3'	0,97 (<i>d</i> , $J = 6,7$ Hz, 6H)	1,96 – 1,80 (<i>m</i> , 2H)	1,24 – 1,11 (<i>m</i> , 2H)	7,34 (<i>d</i> , $J = 4,4$ Hz, 1H)
4'	-	3,48 (<i>t</i> , $J = 5,4$ Hz, 2H)	1,73 – 1,41 (<i>m</i> , 2H)	7,30 – 7,27 (<i>m</i> , 1H)
5'	-	-	1,24 – 1,11 (<i>m</i> , 2H)	7,34 (<i>d</i> , $J = 4,4$ Hz, 1H)
6'	-	-	1,73 – 1,41 (<i>m</i> , 2H)	7,34 (<i>d</i> , $J = 4,4$ Hz, 1H)
7'	-	-	-	4,61 (<i>d</i> , $J = 5,7$ Hz, 2H)

Tabela 3. Assinalamentos de RMN de ^1H das amidas derivadas do ácido vanílico (**AN05** – **AN07**).

	AN05	AN06	AN07
Posição			
	δ_{H}	δ_{H}	δ_{H}
1	-	-	-
2	7,45 (<i>d</i> , $J = 1,9$ Hz, 1H)	7,49 (<i>s</i> , 1H)	7,44 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz, 1H)
3	-	-	-
4	-	-	-
5	7,24 – 7,19 (<i>m</i> , 1H)	6,92 – 6,87 (<i>m</i> , 1H)	6,85 (<i>d</i> , $J = 8,2$ Hz, 1H)
6	6,87 (<i>dd</i> , $J = 8,2; 2,6$ Hz, 1H)	7,22 (<i>dd</i> , $J = 8,3; 2,0$ Hz, 1H)	7,21 (<i>dd</i> , $J = 6,2; 2,0$ Hz, 1H)
OH	-	-	5,28 (<i>s</i> , 1H)
OCH₃	3,86 (<i>s</i> , $J = 10,3$ Hz, 3H)	3,92 (<i>s</i> , 3H)	3,84 (<i>s</i> , 3H)
NH	-	-	-
1'	-	-	-
2'	7,24 – 7,19 (<i>m</i> , 1H)	6,92 – 6,87 (<i>m</i> , 1H)	6,76 (<i>dd</i> , $J = 6,3; 1,5$ Hz, 1H)
3'	7,13 (<i>d</i> , $J = 7,6$ Hz, 1H)	7,30 – 7,27 (<i>m</i> , 1H)	6,71 (<i>d</i> , $J = 7,9$ Hz, 1H)
4'	-	-	-
5'	7,13 (<i>d</i> , $J = 7,6$ Hz, 1H)	7,30 – 7,27 (<i>m</i> , 1H)	-
6'	7,24 – 7,19 (<i>m</i> , 1H)	6,92 – 6,87 (<i>m</i> , 1H)	6,80 (<i>d</i> , $J = 1,4$ Hz, 1H)
7'	4,55 (<i>d</i> , $J = 5,2$ Hz, 2H)	4,57 (<i>d</i> , $J = 5,6$ Hz, 2H)	4,47 (<i>d</i> , $J = 5,7$ Hz, 2H)
8'	2,32 (<i>s</i> , 3H)	3,81 (<i>s</i> , 3H)	5,90 (<i>s</i> , 2H)

Tabela 4. Assinalamentos de RMN de ^1H das amidas derivadas do ácido vanílico (**AN08** – **AN10**).

	AN08	AN09	AN10
Posição			
	δ_{H}	δ_{H}	δ_{H}
1	-	-	-
2	7,47 (<i>d</i> , $J = 1,8$ Hz, 1H)	7,50 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz, 1H)	7,44 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz, 1H)
3	-	-	-
4	-	-	-
5	6,81 (<i>d</i> , $J = 7,8$ Hz, 1H)	6,93 (<i>d</i> , $J = 8,2$ Hz, 1H)	6,79 (<i>d</i> , $J = 8,2$ Hz, 1H)
6	7,20 (<i>dd</i> , $J = 6,3; 1,9$ Hz, 1H)	7,33 (<i>t</i> , $J = 2,3$ Hz, 1H)	7,38 (<i>dd</i> , $J = 8,3; 2,1$ Hz, 1H)
OH	5,29 (<i>s</i> , 1H)	6,16 (<i>s</i> , 1H)	-
*C3-OCH₃	3,91 (<i>s</i> , 3H)	3,90 (<i>s</i> , 3H)	3,78 (<i>s</i> , 3H)
NH	-	8,00 (<i>s</i> , 1H)	8,77 (<i>s</i> , 1H)
1'	-	-	-
2'	6,88 (<i>q</i> , $J = 6,2; 2,1$ Hz, 1H)	7,63 (<i>dd</i> , $J = 8,6, 1,2$ Hz, 1H)	7,32 – 7,29 (<i>m</i> , 1H)
3'	-	7,36 (<i>dt</i> , $J = 3,0, 1,9$ Hz, 1H)	7,11 (<i>t</i> , $J = 9,0$ Hz, 1H)
4'	-	7,16 – 7,10 (<i>m</i> , 1H)	-
5'	6,88 (<i>q</i> , $J = 6,2; 2,1$ Hz, 1H)	7,36 (<i>dt</i> , $J = 3,0, 1,9$ Hz, 1H)	7,11 (<i>t</i> , $J = 9,0$ Hz, 1H)
6'	6,88 (<i>q</i> , $J = 6,2; 2,1$ Hz, 1H)	7,63 (<i>dd</i> , $J = 8,6, 1,2$ Hz, 1H)	7,32 – 7,29 (<i>m</i> , 1H)
7'	4,54(<i>d</i> , $J = 5,6$ Hz, 2H)	-	4,41 (<i>d</i> , $J = 6,0$ Hz, 2H)
*C4'-OCH₃	3,84 (<i>d</i> , $J = 3,1$ Hz, 3H)	-	-
*C5'-OCH₃	3,84 (<i>d</i> , $J = 3,1$ Hz, 3H)	-	-

*Sinais permutáveis

Tabela 5. Assinalamentos de RMN de ^{13}C das amidas derivadas do ácido vanílico (**AN01 – AN10**).

	AN01	AN02	AN03	AN04	AN05	AN06	AN07	AN08	AN09	AN10
	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c
1	126,90	128,60	125,65	126,60	126,46	126,78	126,52	126,64	127,10	125,23
2	111,02	110,67	111,42	110,70	110,66	110,69	110,68	111,53	110,72	111,33
3	146,71	146,36	147,02	146,83	146,83	147,25	148,05	148,68	146,95	147,25
4	148,81	147,43	149,11	148,98	148,98	149,04	149,01	149,33	149,23	149,53
5	114,07	113,73	114,53	114,09	114,13	120,12	114,10	114,07	114,14	115,01
6	119,51	120,72	120,50	119,88	119,92	122,94	119,88	119,84	120,43	120,81
OCH₃	56,01	55,85	55,50	56,21	56,09	56,48	56,19	56,21	56,27	55,93
C=O	167,50	169,39	164,72	167,13	167,21	167,16	167,09	167,03	165,60	166,05
1'	47,32	49,89	48,10	138,48	135,37	130,55	132,35	131,06	138,20	136,22
2'	28,44	46,30	32,40	127,90	127,96	129,21	121,27	120,35	124,53	129,20
3'	20,34	24,26	27,80	128,87	129,46	114,22	108,44	111,44	129,17	114,84
4'	-	26,32	25,13	127,67	137,29	159,47	147,12	146,83	124,53	160,30
5'	-	-	24,86	127,99	129,46	114,22	146,84	148,96	129,17	114,84
6'	-	-	32,40	127,80	127,96	129,21	108,60	110,67	129,88	129,14
7'	-	-	-	44,27	43,98	43,93	44,08	44,15	-	41,98
8'	-	-	-	-	21,17	55,28	101,18	56,08	-	-
8''	-	-	-	-	-	-	-	55,80	-	-
C-F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	162,20

4.3.3. Interpretação dos espectros de massas dos compostos AN06, AN07 e AN08

Os espectros de massas das amidas inéditas na literatura foram obtidos por espectrômetro de massas tipo MALDI de alta resolução, o qual permitiu a obtenção das massas com elevada exatidão das amidas derivadas do ácido vanílico. Segundo Brenton e Godfrey (2010), foram considerados como massas exatas, aqueles sinais cujos valores ficaram entre $\pm 20\%$ das massas calculadas teóricas, os quais estão descritos na tabela a seguir.

Tabela 6. Dados do espectro de massas tipo MALDI das amidas AN06, AN07 e AN08

Composto	Pico íon-molecular	Massa calculada	Massa do espectro	Erro percentual (%)
AN06	[M] ⁺	287,2980	287,3089	-0,0002
AN07	[M] ⁺	301,2914	301,2901	0,0004
AN08	[M] ⁺	317,3337	317,3380	-0,001

4.4. Atividade antimicrobiana das amidas derivadas do ácido vanílico

4.4.1. Relação estrutura-atividade das amidas derivadas do ácido vanílico no estudo antifúngico

A avaliação da atividade antifúngica das amidas derivadas do ácido vanílico foi realizada pela técnica da microdiluição em caldo de acordo com o protocolo do CLSI (2008), utilizando quatro cepas de *Candida*: *Candida albicans* ATCC 90028; *Candida glabrata* ATCC 90030; *Candida krusei* ATCC 34125 e *Candida guilliermondii* 207. A atividade antifúngica dos produtos foi descrita e considerada ativa ou não de acordo com os seguintes parâmetros da concentração inibitória mínima em $\mu\text{mol/mL}$.

O estudo da relação estrutura-atividade das amidas derivadas do ácido vanílico foi baseado nos resultados da concentração inibitória mínima sobre as cepas fúngicas testadas do gênero *Candida*. Na preparação dos compostos estruturalmente semelhantes, houve mudança no tamanho da cadeia alquílica e no tipo de substituintes no anel aromático como doadores ou retiradores de elétrons, ocasionando geralmente alterações significativas nas propriedades químicas dos compostos e resultando em diferentes atividades antifúngicas.

Os resultados dos ensaios de atividade antifúngica das amidas **AN01** a **AN10**, desenvolvido no Laboratório de Farmacologia Experimental e Cultivo Celular do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba (CCS/UFPB) estão explanados nas **tabelas 7 e 8**. As espécies de leveduras apresentaram sensibilidade a todas as amidas testadas. De acordo com a relação CFM/CIM descrita por Peixoto e colaboradores (2017) que estão explanadas na **tabela 9** todas as substâncias testadas apresentaram atividade fungicida frente às cepas testadas, ou seja, as amidas não só inibiram como causaram a morte das leveduras. As amidas 4-Hidroxi-N-isobutil-3-metoxibenzamida (**AN01**), N-Ciclo-hexil-3-metoxibenzamida (**AN03**), N-Benzil-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (**AN04**) e a 4-Hidro-3-metoxi-N-(4-metoxibenzil) benzamida (**AN06**) foram sensíveis à cepa de *Candida albicans* na maior concentração testada, enquanto as amidas 4-Hidroxi-3-metóxi-N-fenilbenzamida (**AN09**) e N-(4-fluorbenzil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (**AN10**) foram bioativas apresentando CIM = 2,17 e 1,81 $\mu\text{mol/mL}$, respectivamente, e as demais amidas não apresentaram atividade frente à cepa. Quando relacionamos

a amida 4-Hidroxi-3-metoxifenil(pirrolidina-1-il) metanona (**AN02**) com a **AN03** pode-se sugerir que a ligação do anel pirrolidínico diretamente ao nitrogênio (**AN02**) gera uma inatividade da molécula frente à cepa de *C. albicans*, diferente da amida **AN03** que apresenta um anel ciclohexano (não heterocíclico).

A presença de um grupo alquílico demonstrada na amida **AN01** conferiu também bioatividade à molécula frente à cepa de *C. albicans*. Ainda quando se compara a **AN03** com a **AN04** sugere-se que a presença do anel aromático na amida **AN04** não causou alteração significativa na CIM das moléculas, apresentando valores de CIM aproximados. Quando se compara as amidas 4-Hidroxi-3-metoxi-N-(4-metilbenzil) benzamida (**AN05**), **AN06**, N-Benzo[d][1,3]doxol-5-il-metil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (**AN07**) e a N-(3,4-dimetoxibenzil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (**AN08**), é possivelmente que a metoxila ligada ao anel aromático na posição *para* tenha contribuído para atividade antifúngica da amida **AN06**, identificando também que a presença de um análogo *para*-metílico (**AN05**), e com um grupo dioximetilênico (**AN07**) e de análogo dimetoxílico (**AN08**), podem estar influenciando em uma inatividade da molécula; como também se pode sugerir que a presença de dois substituintes metoxílicos nas posições *meta* e *para* na molécula gera uma inatividade frente à cepa de *C. albicans*.

Analisando a amida **AN03**, que foi ativa na maior concentração testada (CIM = 4,00 µmol/mL), com a **AN09**, que foi ativa apresentando CIM de 2,17 µmol/mL, podemos inferir que a aromaticidade resultou em uma diminuição da CIM da amida **AN09**, em relação ao ciclohexano presente na amida **AN03** e consequente potencialidade da bioatividade. Enquanto que na amida **AN10**, observa-se que a presença de um grupo retirador de elétrons como o flúor na posição *para* do anel aromático causa uma diminuição da CIM para 1,81 µmol/mL e consequente melhora da atividade em relação ao anel *para*-metílico (grupo doador) na **AN05** e **AN04**, frente à cepa de *C. albicans*. De Vita e colaboradores (2014) testaram moléculas tendo como substituinte metoxila na posição *para* e o flúor na posição *meta*, apresentando boa atividade antifúngica frente a cepas de *C. albicans*. Os dados indicam que o fluoreto contribuiu para a bioatividade da molécula.

A segunda cepa a ser testada foi a de *Candida glabrata*, as amidas bioativas foram **AN05**, **AN09** e **AN10**. A amida **AN05** apresentou atividade (CIM = 3,68 µmol/mL) na maior concentração testada e a **AN09** apresentou CIM = 2,17 µmol/mL

demonstrando que não houve alteração de atividade da **AN09** quando comparada com os valores de CIM frente à cepa de *C. albicans*. Enquanto que a amida **AN10** apresentou CIM no valor de 3,62 $\mu\text{mol/mL}$, na maior concentração testada e consequente diminuição da atividade na cepa de *C. glabrata*, quando comparada com a atividade na cepa da *C. albicans*.

Outra cepa utilizada nos testes biológicos foi a *Candida krusei*, onde as moléculas **AN09** e **AN10** foram bioativas com CIM na maior concentração testada, se confirma que a presença dos substituintes adicionados nas duas amidas contribuiu para a bioatividade, visto que, **AN09** e **AN10** foram bioativas a praticamente as quatro cepas testadas.

A última cepa testada foi a *Candida guilliermondii*, que apresentou um maior número de moléculas bioativas em relação às outras cepas já testadas. As amidas **AN01**, **AN02**, **AN03**, **AN04** e **AN09** apresentaram CIM no valor de 2,25 $\mu\text{mol/mL}$ a 1,94 $\mu\text{mol/mL}$, pode-se sugerir que a mudança do grupo substituinte na molécula não causou alteração significativa na bioatividade frente à cepa de *C. guilliermondii*. As amidas **AN07** e **AN08** apresentaram CIM no valor de 1,66 $\mu\text{mol/mL}$ e 1,57 $\mu\text{mol/mL}$ respectivamente, indicando que a diferença do substituinte, não potencializou de forma significativa a bioatividade das moléculas. Enquanto que a amida **AN05** foi bioativa com CIM no valor de 0,46 $\mu\text{mol/mL}$, apresentando assim a melhor atividade em relação às outras moléculas testadas, sendo mais potente do que a maioria das substâncias testadas. Dessa forma, pode-se ressaltar que a presença de um grupo doador de elétrons ligado diretamente ao carbono, a exemplo da metila, pode gerar um aumento da bioatividade da molécula frente à cepa de *C. guilliermondii*.

Não se tem muitos estudos sobre atividade de compostos vanílicos, no entanto, um estudo desenvolvido por REDDY, RAVINDER & KANJINAL (2012) demonstra que derivados vanílicos possuem atividade antifúngica sobre espécies do gênero *Candida*. Além disso, ALVES e colaboradores (2013) relataram que a presença de grupos hidroxilas nas posições *orto* e *para*, como também a presença de metoxila na posição *meta* são importantes para atividade antimicrobiana.

Dessa forma pode-se inferir que a amida **AN05** foi a que apresentou melhor perfil antifúngico, pelo fato de apresentar em sua estrutura um grupamento metil na posição *para* do anel aromático derivado da amina.

4.4.2. Relação estrutura-atividade das amidas derivadas do ácido vanílico no estudo antibacteriano

A avaliação da atividade antibacteriana das amidas derivadas do ácido vanílico foi medida pela técnica de microdiluição em caldo de acordo com o protocolo de Gerhardt e colaboradores (1994), utilizando quatro cepas, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 8027, *Pseudomonas aeruginosa* 102, *Staphylococcus aureus* ATCC 25925 e *Staphylococcus aureus* 47.

Todas as substâncias testadas apresentaram atividade antibacteriana frente à linhagem Gram-positiva, sob a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25925, sendo evidenciada pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), que permaneceu na maior concentração testada para todas as moléculas testadas.

As amidas **AN06**, **AN07** e **AN08** testadas apresentaram uma melhor atividade antibacteriana com valores de CIM entre 3,14 – 3,48 µmol/mL, quando comparadas com as demais amidas testadas, que não apresentaram diferença significativa de bioatividade, dessa forma, pode-se sugerir que a presença de um e/ou dois substituintes metoxílicos nas posições *meta* e *para* na molécula potencializa seu efeito, e é possível inferir que na maior parte das amidas testadas, não houve diferença significativa na CIM das amostras à medida que foi mudando o substituinte das moléculas.

Segundo o estudo de ALVES e colaboradores (2013) feito através de docking a partir da estrutura 3D da proteína PBP2a (transpeptidase de bactérias resistentes a β-lactâmicos) e testes *in vitro* de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, a presença de hidroxilas na posição *orto* e *para* como também a presença de metoxila na posição *meta* no anel benzênico são importantes para atividade antimicrobiana de compostos fenólicos.

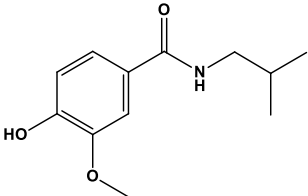
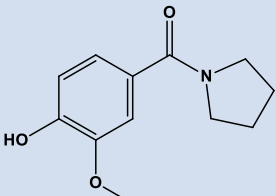
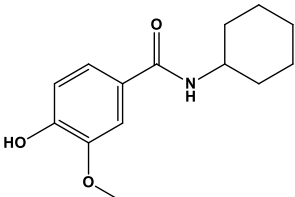
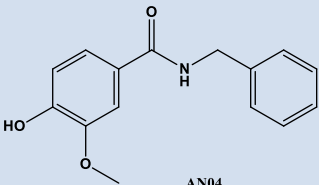
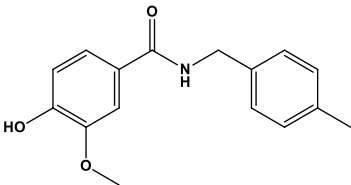
4.4.2.1 Mecanismo de ação da substância com melhor potencial bioativo frente à cepa de *Candida guilliermondii*

A molécula que mais se destacou foi a **AN05** com uma CIM = 0,46 µmol/mL frente às cepas de *Candida*, portanto, a presente molécula foi submetida ao teste de mecanismo de ação frente à cepa de *C. guilliermondii*, utilizando dois tipos de substância o ergosterol e o sorbitol.

Os esteróis constituem todos os tipos de células fúngicas, dessa forma o principal esteroide das leveduras é o ergosterol, que age modulando a fluidez da membrana, o crescimento e proliferação celular (CZUB; BAGINSKI, 2006; VANDEPUTTE et al., 2012). Com base nisso, o ensaio feito para detectar onde a molécula **AN05** estaria agindo, consistiu em adicionar mais ergosterol ao meio contendo o fungo e a substância, gerando um aumento da CIM da molécula para 1,84 $\mu\text{mol/mL}$, indicando que a substância agiu inibindo a síntese do ergosterol na membrana, e o fungo por sua vez, tentou aproveitar o ergosterol que adicionamos no teste para se regenerar, aumentando assim em número e gerando uma CIM bem maior.

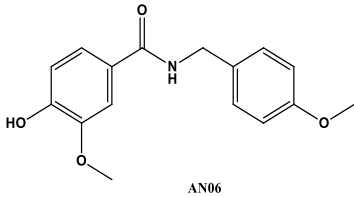
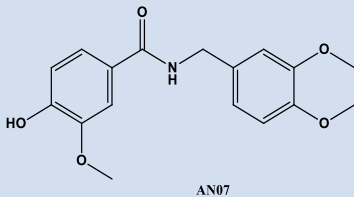
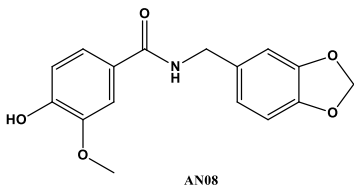
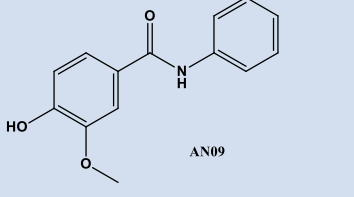
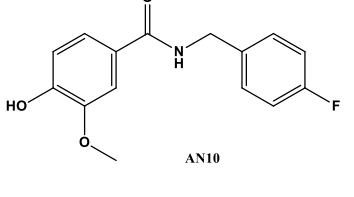
Já no segundo ensaio foi utilizado o sorbitol, que é um protetor osmótico, que age impedindo alterações na parede da célula fúngica, ou seja, a substância antifúngica sem o osmoprotetor age causando lise das células da parede celular, enquanto que na presença do sorbitol, o fungo continua se desenvolvendo e se reproduzindo. Dessa forma, no ensaio utilizando o sorbitol com a substância **AN05**, observou-se o aumento da CIM, crescendo em todas as concentrações, indicando que a substância também age interferindo na síntese de parede celular.

Tabela 7. Resultados dos testes antifúngicos realizados com as amidas (AN01 – AN10).

Amida	<i>Candida albicans</i> (ATCC 90028)	<i>Candida glabrata</i> (ATCC 90030)	<i>Candida krusei</i> (ATCC 34125)	<i>Candida guilliermondii</i> (207)
CIM (µmol/mL)				
 AN01	4,48	+	+	2,24
 AN02	+	+	+	2,25
 AN03	4,00	+	+	2,00
 AN04	3,88	+	+	1,94
 AN05	+	3,68	+	0,46

(+): Indica crescimento de microrganismo. (-): Não crescimento de microrganismo

Tabela 8. Continuação da **Tabela 7** que contém os resultados dos testes antifúngicos realizados com as amidas (AN01 – AN10).

Amida	<i>Candida albicans</i> (ATCC 90028)	<i>Candida glabrata</i> (ATCC 90030)	<i>Candida krusei</i> (ATCC 34125)	<i>Candida guilliermondii</i> (207)
CIM (µmol/mL)				
 AN06	3,48	+	+	+
 AN07	+	+	+	1,66
 AN08	+	+	+	1,57
 AN09	2,17	2,17	4,34	2,17
 AN10	1,81	3,62	3,62	1,81
Controle do meio	-	-	-	-
Nistatina	0,00043	0,00043	0,00043	0,00043
Controle do microrganismo	+	+	+	+

(+): Indica crescimento de microrganismo. (-): Não crescimento de microrganismo

Tabela 9. Valores de CFM ($\mu\text{mol/mL}$) e relação CFM/CIM para cada amida (AN01 – AN10).

Amida	<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*
AN01	4,48	1	+		+		2,24	1
AN02	+		+		+		2,25	2
AN03	4,00	1	+		+		2,00	1
AN04	3,88	1	+		+		1,94	1
AN05	+		3,68	+	+		0,46	1
AN06	3,48	1	+		+		+	
AN07	+		+		+		1,66	1
AN08	+		+		+		1,57	1
AN09	2,17	1	2,17	1	4,34	1	2,17	1
AN10	1,81	+	3,62	1	3,62	1	1,81	1

(+) A substância não possui CFM

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

Tabela 10. Efeitos da amida **AN05** na CIM de *C. guilliermondii* na presença ou ausência de um protetor osmótico (sorbitol 0,8 M), indicando uma ação potencial na biossíntese da parede celular.

Concentração μmol/mL	<i>Candida guilliermondii</i> (207)	
	Sem Sorbitol	Com Sorbitol
3,68	-	+
1,84	-	+
0,92	-	+
0,46	-	+
0,23	+	+
0,11	+	+
Caspofugina Sem Sorbitol	0,3 μmol/mL	
Caspofugina Com Sorbitol	4,5 μmol/mL	

(+): Indica crescimento de microrganismo.

(-): Não crescimento de microrganismo.

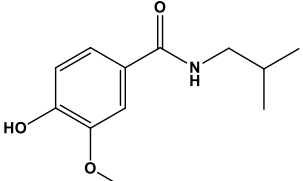
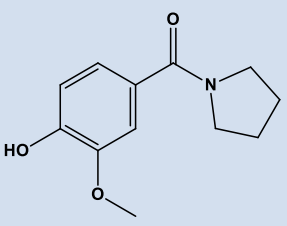
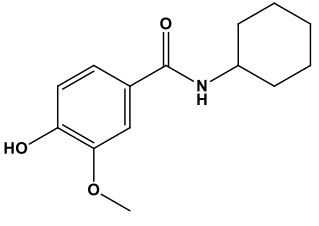
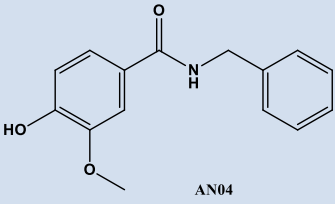
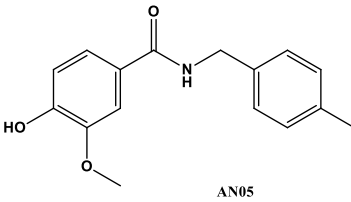
Tabela 11. Efeitos da amida **AN05** na CIM de *C. guilliermondii* na presença ou ausência de ergosterol, indicando uma ação potencial na membrana plasmática fúngica.

Concentração $\mu\text{mol/mL}$	<i>Candida guilliermondii</i> (207)	
	Sem ergosterol	Com ergosterol
3,68	-	+
1,84	-	+
0,92	-	+
0,46	-	+
0,23	+	+
0,11	+	+
Nistatina sem ergosterol	0.00043 $\mu\text{mol/mL}$	
Nistatina com ergosterol	0,26 $\mu\text{mol/mL}$	

(+): Indica crescimento de microrganismo.

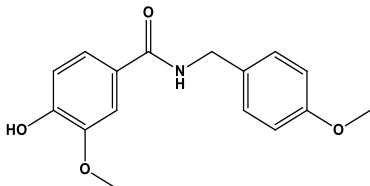
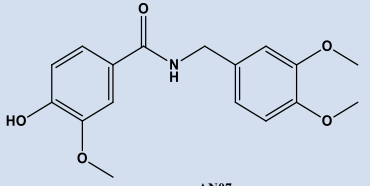
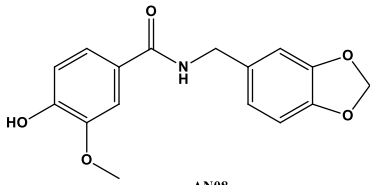
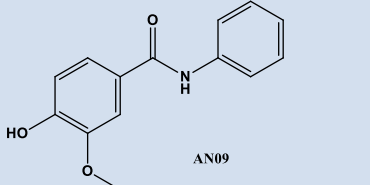
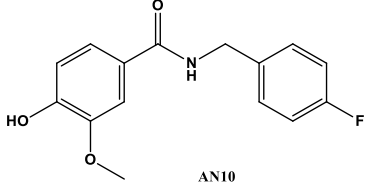
(-): Não crescimento de microrganismo.

Tabela 12. Resultados dos testes antibacterianos realizados com as amidas (AN01 – AN10).

Amida	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 8027	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 102	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25925	<i>Staphylococcus aureus</i> 47
CIM (µmol/mL)				
 AN01	+	+	4,48	+
 AN02	+	+	4,50	+
 AN03	+	+	4,01	+
 AN04	+	+	3,88	+
 AN05	+	+	3,68	+

(+): Indica crescimento de microrganismo. (-): Não crescimento de microrganismo.

Tabela 13. Continuação da tabela 12 que contém os resultados dos testes antibacterianos realizados com as amidas (AN01 – AN10).

Amida	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 8027	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 102	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25925	<i>Staphylococcus aureus</i> 47
CIM (µmol/mL)				
 AN06	+	+	3,48	+
 AN07	+	+	3,32	+
 AN08	+	+	3,14	+
 AN09	+	+	4,34	+
 AN10	+	+	3,63	+
Controle do meio	+	+	+	+
Cloranfenicol	0,3095	0,3095	0,3095	0,3095
Controle do microrganismo	-	-	-	-

(+): Indica crescimento de microrganismo. (-): Não crescimento de microrganismo.

5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

As dez amidas derivadas do ácido vanílico foram preparadas em uma única etapa e apresentaram bons rendimentos nas duas metodologias usadas. Todos os análogos foram purificados por cromatografia de coluna em sílica gel e caracterizados estruturalmente pelas técnicas de RMN ^1H e ^{13}C , IV (para os análogos **AN01** e **AN10**).

Em relação aos testes antifúngicos, todas as substâncias testadas apresentaram atividade frente à maioria das cepas testadas, tendo como destaque a amida **AN05** que apresentou a melhor atividade (menor CIM) frente à cepa de *C. guilliermondii* 207, sugerindo que a presença de um grupo metila (doador de elétrons) no anel aromático contribui para bioatividade da molécula. As demais substâncias apresentaram bioatividade fraca à moderada frente às cepas testadas.

Ainda nos testes antifúngicos foram feitos os ensaios de mecanismo de ação com a amida **AN05**, utilizando o sorbitol e o ergosterol e pode-se concluir que a substância age tanto na disponibilidade da parede celular como da membrana plasmática, ou seja, age por meio de dois mecanismos de ação.

No teste antibacteriano apenas a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25925 apresentou sensibilidade frente a todas as substâncias na maior concentração testada, de forma que as amidas **AN06**, **AN07** e **AN08** testadas apresentaram os menores valores de CIM, quando comparadas com as demais amidas testadas. Com base nisso, pode-se sugerir que a presença de um e/ou dois substituintes metoxílicos nas posições *meta* e *para* na molécula potencializa seu efeito, e que na maior parte das amidas testadas, não houve diferença significativa na CIM das amidas com a mudança dos substituintes.

O presente trabalho demonstra que a presença de grupos hidroxílicos nas posições *orto* e *para*, como também a metoxila na posição *meta* são importantes para atividade antimicrobiana, dessa forma, todos os resultados explanados no presente trabalho servem como base para a pesquisa de novos antimicrobianos mais potentes, sugerindo os possíveis substituintes de anel das amidas derivadas do ácido vanílico que potencializam ou não na sua ação antimicrobiana.

6. ETAPA EXPERIMENTAL

6.1. Reagentes utilizados na preparação das amostras

Os procedimentos de preparação das amidas foram realizados no Laboratório de Química Farmacêutica do Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde (CCS) - Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

As amidas foram obtidas a partir de reações das aminas com o ácido vanílico, com adição dos agentes acopladores como o **PyBOP** e **DCC** na presença da trietilamina, dimetilformamida e o diclorometano a temperatura ambiente.

As aminas utilizadas como materiais de partida foram obtidas da empresa sigma-aldrich e estão explanadas na **Figura 13** abaixo:

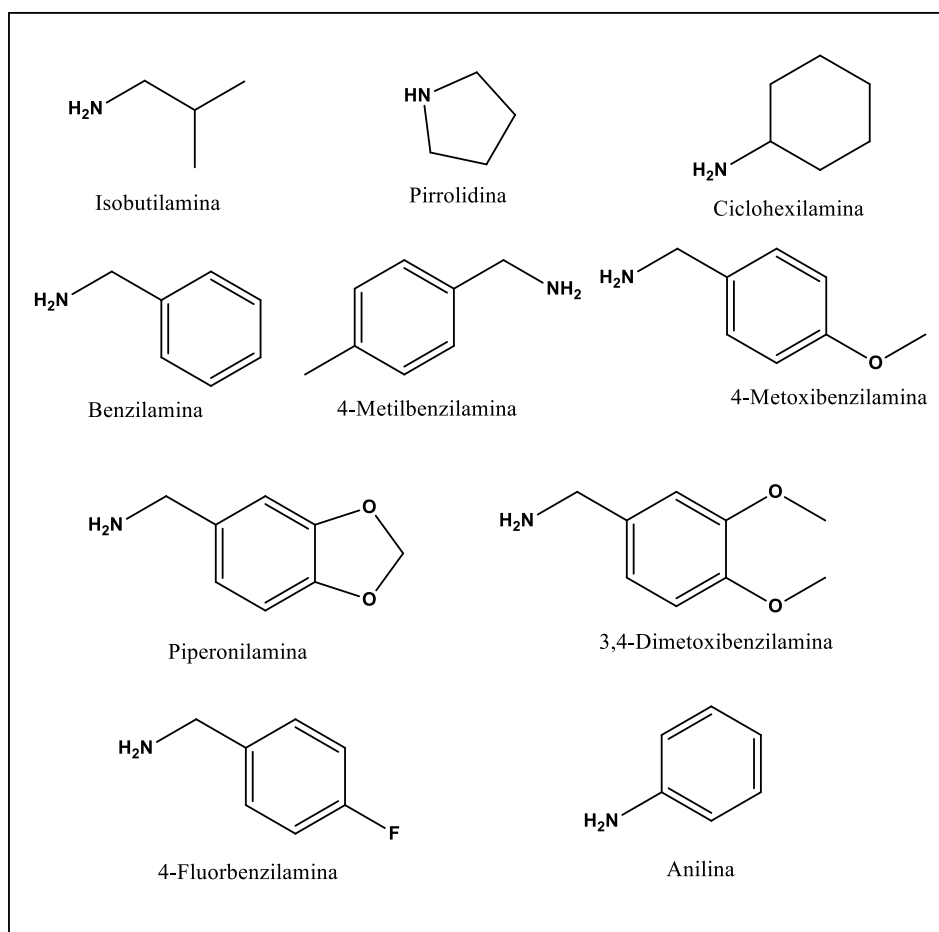


Figura 13. Aminas utilizadas como reagentes na preparação das amidas derivadas do ácido vanílico (Oliveira, 2018).

As estruturas químicas das amidas estão na figura 14.

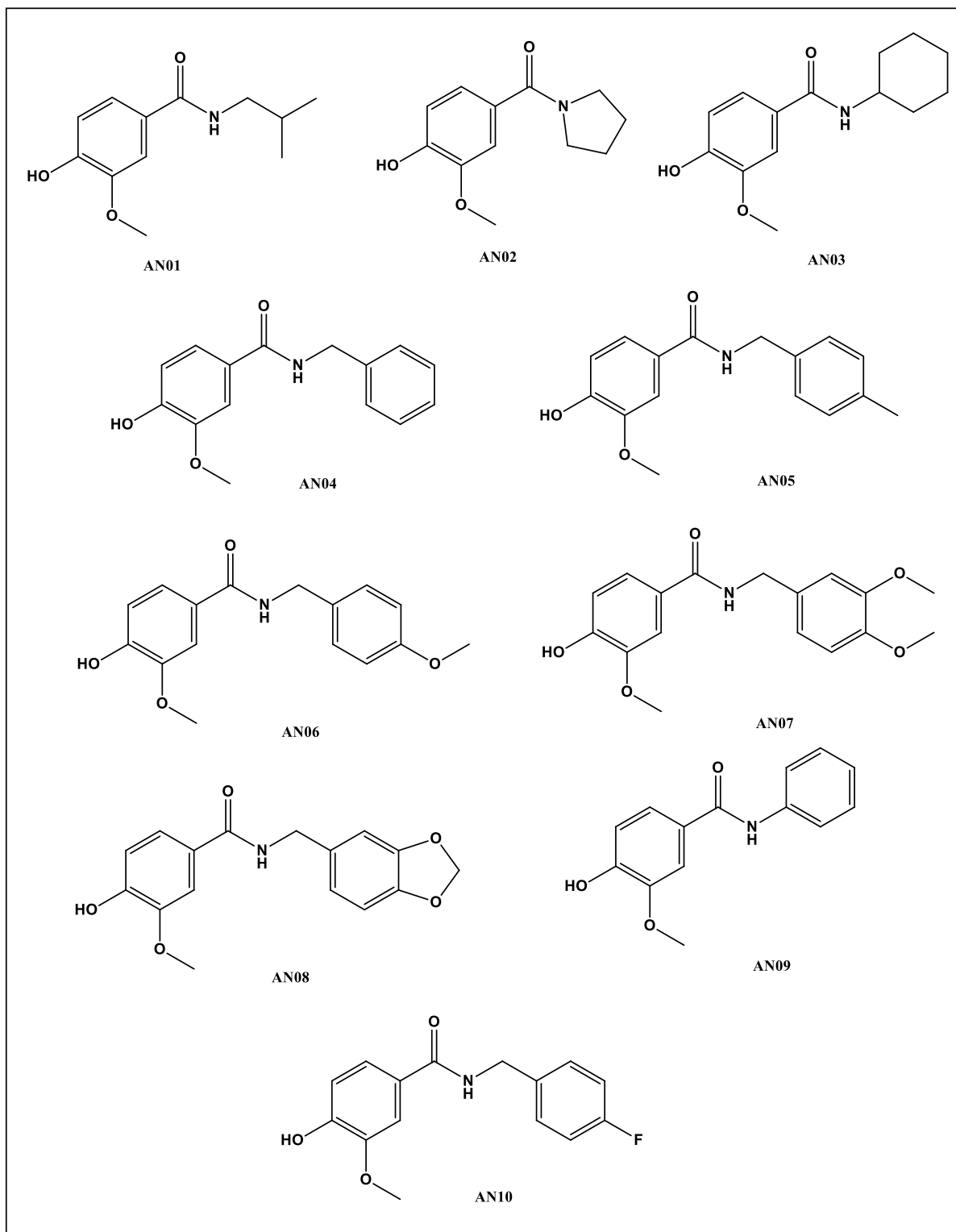


Figura 14. Amidas derivadas do ácido vanílico (AN01 – AN10) obtidas no presente trabalho (Oliveira, 2018).

6.2. Métodos cromatográficos

Para purificar as substâncias, foram utilizadas colunas cromatográficas de vidro 15x300 mm com torneira de teflon e preenchidas com sílica gel 60, ART 7734 da MERCK, com partículas nas dimensões entre 0,063 e 0,200 mm. E para acompanhar as reações e a purificação por cromatografia de coluna, foi utilizada a cromatografia de camada delgada analítica (CCDA), através de placas cromatográficas da MERCK, reveladas pela solução de 5% de H₂SO₄ em etanol, plotadas em placas de aquecimento, e pela exposição das cromatoplasas à lâmpada de irradiação ultravioleta em dois comprimentos de onda (254 e 366 nm) por meio do aparelho MINERALIGHT.

Os solventes utilizados como fase-móvel, tanto para a CCDA, quanto para a cromatografia de coluna, foram hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH), isolados ou em misturas binárias.

6.3. Ponto de fusão

O ponto de fusão foi determinado pelo aparelho da marca TECNAL, modelo PFM-II, a 220 V. A faixa de temperatura variou entre 0 e 350° C.

6.4. Análises espectroscópicas

6.4.1. Infravermelho

A espectroscopia de infravermelho foi realizada por espectrofotômetro FTIR, modelo Iprestige-21 do fabricante Shimadzu (Fourier Transform – Infrared Spectrophotometer), do Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal da Paraíba (CCEN-UFPB), utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr) e frequência medida em cm⁻¹.

6.4.2. Ressonância magnética nuclear

Os compostos foram identificados por espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ¹H) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN de ¹³C) unidimensional, através dos espectrômetros VARIAN-RMN-SYSTEM, operando a 400 MHz (¹H) e 100 MHz (¹³C) e a 500 MHz (¹H) e 125 MHz (¹³C) ambos do NUCAL-Núcleo de Caracterização e Análise/UFPB. Para as análises as amostras foram preparadas com dois tipos de solventes deuterados da MERCK, os quais foram: o DMSO deuterado utilizado para solubilizar as amostras **AN03 e**

AN10 e o clorofórmio deuterado (CDCl_3) para as demais. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm). Nas substâncias solubilizadas com o DMSO- d_6 , como referência para RMN de ^1H , pegaram-se os picos característicos dos hidrogênios pertencentes às frações não deuteradas do solvente DMSO ($\delta\text{H} = 2,50$ ppm). Para os espectros de RMN de ^{13}C , estes mesmos parâmetros foram utilizados, através dos picos do DMSO- d_6 ($\delta\text{C} = 39,5$ ppm). E nas substâncias solubilizadas com CDCl_3 , como referência para RMN de ^1H , pegou-se os picos característicos dos hidrogênios pertencentes às frações não deuteradas do solvente CDCl_3 ($\delta\text{H} = 7,26$ ppm). Para os espectros de RMN de ^{13}C , estes mesmos parâmetros foram utilizados, através dos picos do CDCl_3 ($\delta\text{C} = 77,2$ ppm).

6.4.3. Espectrometria de Massa de Alta Resolução

Os espectros de alta resolução foram desenvolvidos pelo Espectrômetro de Massas de Alta Resolução localizado no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE). Matrizes e produtos químicos de calibração foram adquiridos da Sigma-Aldrich. As medições foram realizadas utilizando um espectrômetro de massas Ultraflex II TOF / TOF equipado com um laser de alta performance de estado sólido ($\lambda = 355$ nm) e um reflector. O sistema é operado pelo pacote de software FlexControl 2,4 (Bruker Daltonics GmbSH, Bremen, Alemanha).

As amostras foram irradiadas com um laser de potência de 20% e medida em forma linear e refletida, em forma de íons positivos e negativos. As amostras foram carregadas numa placa formada de aço para amostra (base de aço MTP 384; Bruker Daltonics GmbSH). Os espectros de massas foram à soma de 100 a 300 disparos de laser individuais, dependendo das condições da amostra.

6.5. Testes de avaliação da atividade antimicrobiana

6.5.1. Teste antifúngico

6.5.1.1. Local de trabalho

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

6.5.1.2. 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 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).

6.5.1.3. Meio de cultura

O meio de cultura empregado nos testes de avaliação da atividade antifúngica foi o Agar Sabouraud Dextrose (ASD), da Kasvi, disposto segundo as normas do fabricante.

6.5.1.4. 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 foram concedidos pelo laboratório de Farmacologia Experimental e Cultivo Celular (CCS/UFPB).

6.5.1.5. 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 execução das análises foi adequada da seguinte forma: manipulando a absorbância (lida em espectrofotômetro) do inóculo inicial, observou-se o volume (em µL) essencial deste inóculo, que foi submetido, por conseguinte diluição em meio ASD e obtenção de um inóculo acertado com concentração de $2,5 \times 10^3$ UFC/mL (SANTOS et al., 2006; BARROS et al., 2006).

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

A Concentração Inibitória Mínima das substâncias analisadas foi obtida utilizando a técnica de microdiluição em placa de 96 poços com fundo em "U". Primeiramente foram distribuídos 100 µL do ágar sabouraud dextrose (ASD)

duplamente concentrado nos orifícios das placas de microdiluição, posteriormente, 100 µL da solução dos produtos foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. Na forma de uma diluição seriada a uma razão de dois, foi conseguida concentrações de 1000 µg/mL até 7,8 µg/mL. Por fim, foi adicionado 100 µL do inóculo da cepa fúngica em cada orifício das placas. Em paralelo foram executados os controles: controle do meio (ASD), controle dos microrganismos (ASD + inóculo), controle para as substâncias (ASD + 50µL de cada produto). Para confirmação da viabilidade do meio, do microrganismo e das substâncias. As placas foram fechadas e subordinadas a uma temperatura de 35 ± 2 °C por 24 horas.

Após o período de incubação foi acrescentado a cada poço, 50 µL de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) a 1% (Sigma-Aldrich®), um indicador colorimétrico de óxido-redução para fungos. As placas foram incubadas novamente 35 ± 2 °C por 24 horas (GRABE, 1976; DESWAL; CHAND, 1997; DUARTE et al., 2005).

Os testes foram realizados em duplicata. A análise dos ensaios foi executada através da visualização de coloração vermelha nas cavidades, mostrando o crescimento do microrganismo. A CIM para cada produto foi estabelecida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o desenvolvimento fúngico em µmol/mL (HOLETZ et al., 2002; HOUGHTON et al., 2007; SARTORATTO et al., 2004).

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

A Concentração Fungicida Mínima (CFM) das substâncias foi obtida após interpretação da CIM. Foram retiradas 3 alíquotas de 30 µL do sobrenadante dos orifícios onde foi analisado completa inibição do desenvolvimento fúngico e semeadas em placas de petri contendo 15 mL de ágar Sabouraud. A incubação foi a 35 ± 2 °C por 24 horas. Após o período de incubação a CFM foi lida da seguinte maneira: CFM = CIM: não houve desenvolvimento do microrganismo em nenhum ponto de aplicação da alíquota. CFM = CIM x 2: houve crescimento de microrganismos em uma das aplicações. Sem CFM: houve crescimento em 2 ou nos 3 pontos de aplicação das alíquotas (RASOOLI & ABYANEH, 2004; SIDDIQUI, FAROOQ, MUSTHAFA, AHMAD, & KHAN, 2013).

6.5.2. Mecanismo de ação

6.5.2.1. Ensaio de sorbitol

A técnica de microdiluição foi realizada na presença de sorbitol (D-sorbitol anidro) da INLAB Laboratório, que age como um protetor osmótico, para determinar o modo de ação da amida **AN05** nas paredes celulares de *C. guilliermondii* 207. Para este ensaio, o inóculo foi preparado com sorbitol em uma concentração final de 0,8 M. As placas foram incubadas a 37 ° C, e as leituras foram realizadas 24 horas e 48 horas após a incubação (ESCALANTE, GATTUSO, PÉREZ, & ZACCHINO, 2008; FREIRES et al., 2014; LIMA et al., 2013). Como controle positivo foi utilizada neste ensaio a Caspofungina, com uma concentração inicial de 5 mg/mL (diacetato de caspofungina - Sigma-Aldrich, São Paulo - SP), devido apresentar atividade conhecida na parede celular de leveduras (PERLIN, 2011; PIERCE, SRINIVASAN, UPPULURI, RAMASUBRAMANIAN, & LÓPEZ-RIBOT, 2013). A CIM na presença de sorbitol foi definida como a menor concentração da substância capaz de inibir o crescimento microbiano de forma visível.

6.5.2.2. Ensaio de ergosterol

O ensaio foi realizado utilizando a técnica de microdiluição, como descrito anteriormente, na presença de ergosterol exógeno (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) em concentrações crescentes (100, 200 e 400) mg/mL. As placas foram incubadas a 37 ° C e as leituras foram realizadas após (24-48 Horas) (Escalante et al., 2008; Freires et al., 2014; Lima et al., 2013). A nistatina foi utilizada como controle positivo, pelo fato de possuir atividade nas membranas celulares da levedura, por mecanismo de ligação aos esteróis da membrana, gerando alterações na permeabilidade da membrana (PERLIN, 2011; PIERCE et al., 2013). Foram utilizados etanol a 96% e Tween 80 para a preparação das soluções de ergosterol. A CIM no ensaio do foi definida como a menor concentração da substância que inibiu visivelmente o crescimento microbiano.

6.6. Teste antibacteriano

6.6.1. Local de trabalho

Os testes para avaliação da atividade antibacteriana das amidas foi executado no Laboratório de Ensaios Toxicológicos – Labetox, localizado no Instituto

de Pesquisa em Fármacos de Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba (IPeFarm/UFPB).

6.6.2. Produtos testados

Para a realização dos testes antibacterianos preparou-se uma solução com 10 mg/mL de cada uma das dez substâncias utilizando-se DMSO 25% em água.

6.6.3. Microrganismos

Foram manipuladas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas oriundas da American Type Culture Collection (ATCC) e de origem clínica, sendo elas: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 8027; *Pseudomonas aeruginosa* 102; *Staphylococcus aureus* ATCC 25925 e *Staphylococcus aureus* 47.

6.6.4. Meio de Cultura

As bactérias foram cultivadas em meio formado por: extrato de levedura (HIMEDIA) 5 g, peptona (MERCK) 10 g, NaCl (MERCK) 5 g, KH₂PO₄ (MERCK) 1,5 g; NaHPO₄.12 H₂O (MERCK) 9 g solubilizados em 1 L de água destilada e esterilizados em autoclave, a 121 °C, 1 atm, por 20 minutos.

6.6.5. Preparação do inóculo bacteriano

As bactérias foram inoculadas em meio de cultura estéril e incubadas a 37 °C por um período de 24 horas. A quantidade de bactérias para a realização dos testes foi adequada de acordo com o padrão 0,5 da escala de McFarland, contendo 1,5 x 10⁸ UFC/mL (HADACEK; GREGER, 2000).

6.6.6. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM foi executada por meio da técnica de microdiluição, utilizando-se placas de 96 poços para cada uma das cepas testadas, de acordo com Gerhardt et al. (1994). Para isso, dividiu-se 100 µL do meio de cultura em todos os poços, com exceção da 1^a e 2^a coluna que receberam 150 µL. Em seguida, adicionou-se 50 µL da solução a 10 mg/mL de cada uma das substâncias aos poços da 1^a e 2^a coluna. A partir da 2^a coluna se deu a diluição seriada a metade, obtendo-se as concentrações finais de 500; 250; 125; 62,5; 31,2 e 15,6 µg/mL para cada uma das substâncias testadas. O volume foi completado com 100 µL da cultura bacteriana perfazendo o volume final de 200 µL. Para testar 1000 µg de cada uma das substâncias foram utilizados volumes maiores (1 mL) em tubos Eppendorf para

manter o DMSO numa concentração que não apresenta efeito sobre as bactérias (\leq 8%).

As placas e tubos foram incubados a 37°C por 24 h para posterior leitura, executada com a adição de 20 μ L de uma solução 0,01% (p/v) de resazurina sódica (SIGMA), um indicador colorimétrico de atividade metabólica.

Foi considerada como CIM para os produtos testados a menor concentração que vetou completamente o desenvolvimento bacteriano sendo verificado pela manutenção da cor azul da resazurina. Os ensaios foram executados em duplicata e o resultado apresentado pela média aritmética das CIM's obtidas nos dois testes.

7. PREPARAÇÃO DAS AMIDAS DERIVADAS DO ÁCIDO VANÍLICO

7.1. Obtenção das amidas AN05-AN08

Em um balão de 10 mL com fundo redondo sob agitação magnética foi adicionado 0,1g do ácido vanílico (0,59 mmol), juntamente com 0,0072 g de DMAP, que corresponde a 10% de mol, seguido de 0,59 mmol da respectiva amina. Foi dissolvido em outro balão de fundo redondo de 10 mL, 0,122 g de DCC em 3 mL de diclorometano, que após completa dissolução foi transferido o seu volume para o balão contendo o DMAP e o ácido vanílico. As reações foram mantidas sob agitação magnética em temperatura ambiente por um período de 24 a 48 horas e foram monitoradas através de placas de cromatografia de camada delgada analítica (CCDA) de sílica gel, utilizando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etila. O término das reações foi indicado por meio da ausência de mancha do material de partida na placa cromatográfica. Ao fim dos procedimentos reacionais, as amostras (**AN05-AN08**) foram concentradas em rota-evaporador, e seguiram para os processos de extração.

Após a concentração em rota-evaporador, o conteúdo do balão foi transferido para um funil de separação, neste foi adicionado água destilada (10 mL), acetato de etila (10 mL), e separou-se a fase orgânica da fase aquosa; a fase aquosa foi extraída mais duas vezes com 10 mL de acetato de etila. A fração orgânica resultante foi então tratada com uma solução de ácido clorídrico (1N); seguindo-se, foi tratada com 10 mL de uma solução de bicarbonato de sódio a 5% (NaHCO_3), seguida de água destilada (10 mL) e por fim, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), filtrada e transferida para um balão de fundo redondo, onde foi posta para concentrar no rota-evaporador. A purificação foi feita através da coluna cromatográfica com sílica gel 60, utilizando como eluentes uma mistura de hexano e acetato de etila (KONGKATHIP et al., 2013).

7.2. Obtenção das amidas AN01, AN02, AN03, AN04, AN09 e AN10

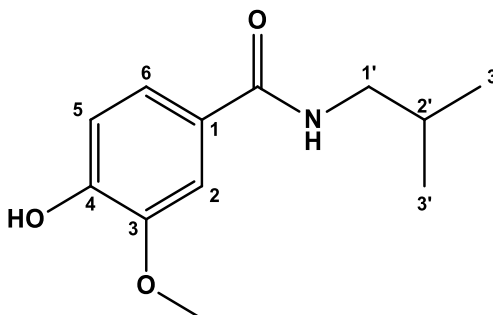
Cerca de 0,1 g do ácido vanílico foi dissolvido com aproximadamente 0,08 mL (0,59 mmol) de trietilamina e 1,2 ml (0,59 mmol) de dimetilformamida em balão de fundo redondo de 10 mL, sob banho de gelo e agitação magnética. Em seguida adicionou-se 0,59 mmol da respectiva amina, posteriormente foi diluído 0,313 g (0,59 mmol) de PyBOP em 1,2 mL (0,59 mmol) de diclorometano em outro balão de

fundo redondo de 10 mL, após completa dissolução, foram transferidos para o meio reacional. A reação foi mantida em banho de gelo por 30 minutos em constante agitação magnética, em seguida a reação foi conduzida a temperatura ambiente por um tempo de 3 a 7 horas. As reações foram monitoradas através de placas de cromatografia de camada delgada analítica (CCDA) de sílica gel, utilizando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etila. O final das reações foi indicado por meio da ausência mancha do material de partida na placa cromatográfica. Por fim, as amostras (**AN01, AN02, AN03, AN04, AN09 e AN10**) foram concentradas em rota-evaporador.

Após a concentração em rota-evaporador, o conteúdo do balão foi transferido para um funil de separação, neste foi adicionado água destilada (10 mL), acetato de etila do tipo P.A (10 mL), e separou-se a fase orgânica da fase aquosa; a fase aquosa foi extraída mais duas vezes com 10 mL de acetato de etila. A fração orgânica resultante foi então tratada com uma solução de ácido clorídrico (1N); seguindo-se, foi tratada com 10 mL de uma solução de bicarbonato de sódio a 5% (NaHCO_3), seguida de água destilada (10 mL) e por fim, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), filtrada e transferida para um balão de fundo redondo, onde foi posta para concentrar no rota-evaporador. A purificação foi feito através da coluna cromatográfica com sílica gel 60, utilizando como eluentes uma mistura de hexano e acetato de etila (RAJAN et al., 2001).

7.3. Dados físico-químicos, rendimentos e dados espectroscópicos das amidas derivadas do ácido vanílico (AN01 – AN10)

7.3.1. 4-Hidroxi-N-isobutil-3-metoxibenzamida (AN01)



Aspecto: Óleo marrom escuro;

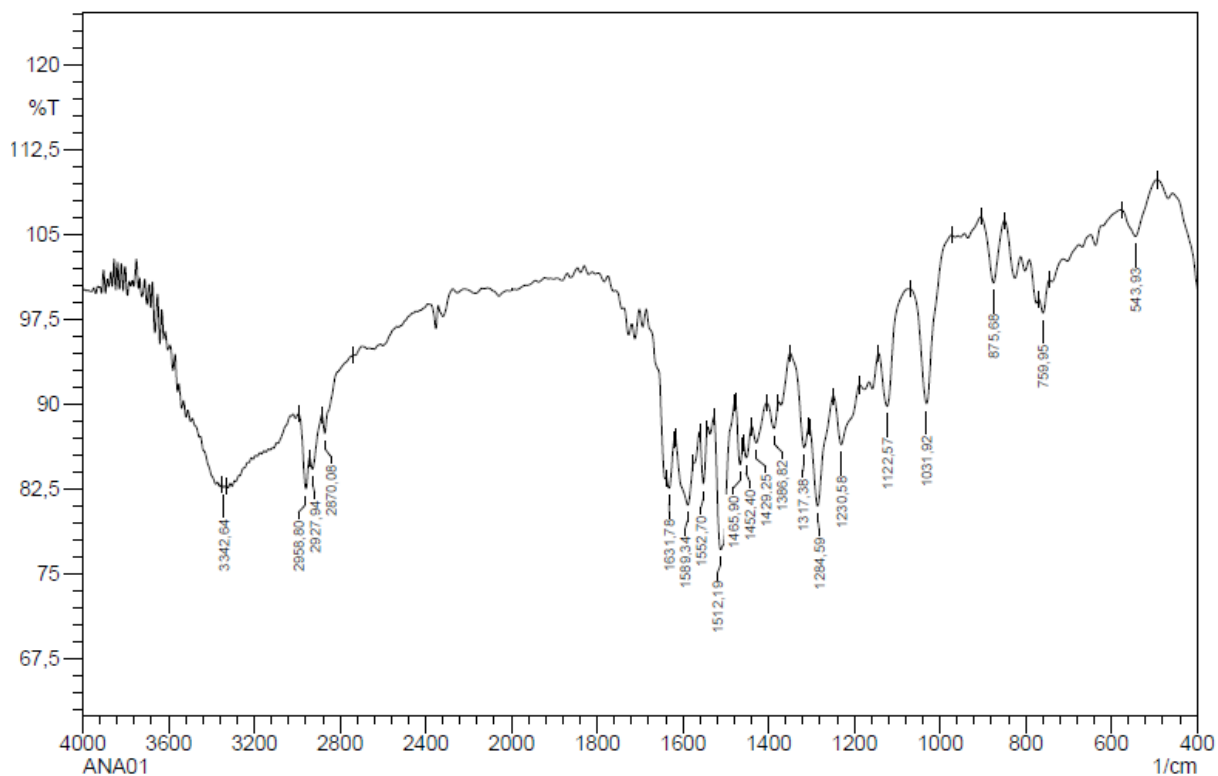
Rendimento: 28,81% (38,20 mg);

Tempo de reação: 5 horas;

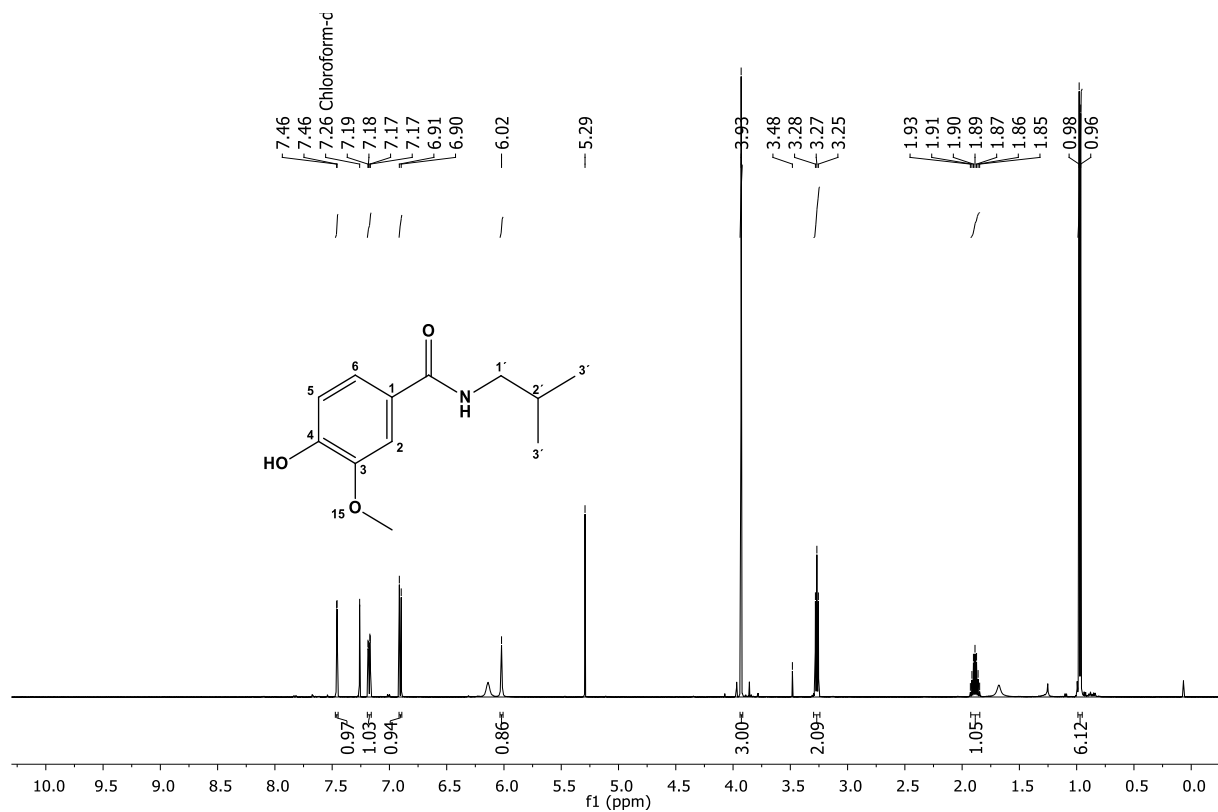
IV ν_{\max} (KBr, cm^{-1}): 3342, 2958, 2927, 2927, 1631, 1589, 1552, 1512.

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 7,46 (*d*, $J = 1,9$ Hz, 1H, H-2); 7,18 (*dd*, $J = 8,2; 2,0$ Hz, 1H, H-6); 6,91 (*d*, $J = 8,2$ Hz, 1H, H-5); 6,02 (*s*, 1H, OH); 3,93 (*s*, 3H, OCH_3); 3,27 (*t*, $J = 6,3$ Hz, 2H, H-1'); 1,88 (*m*, 1H, H-2'); 0,97 (*d*, $J = 6,7$ Hz, 6H, H-3').

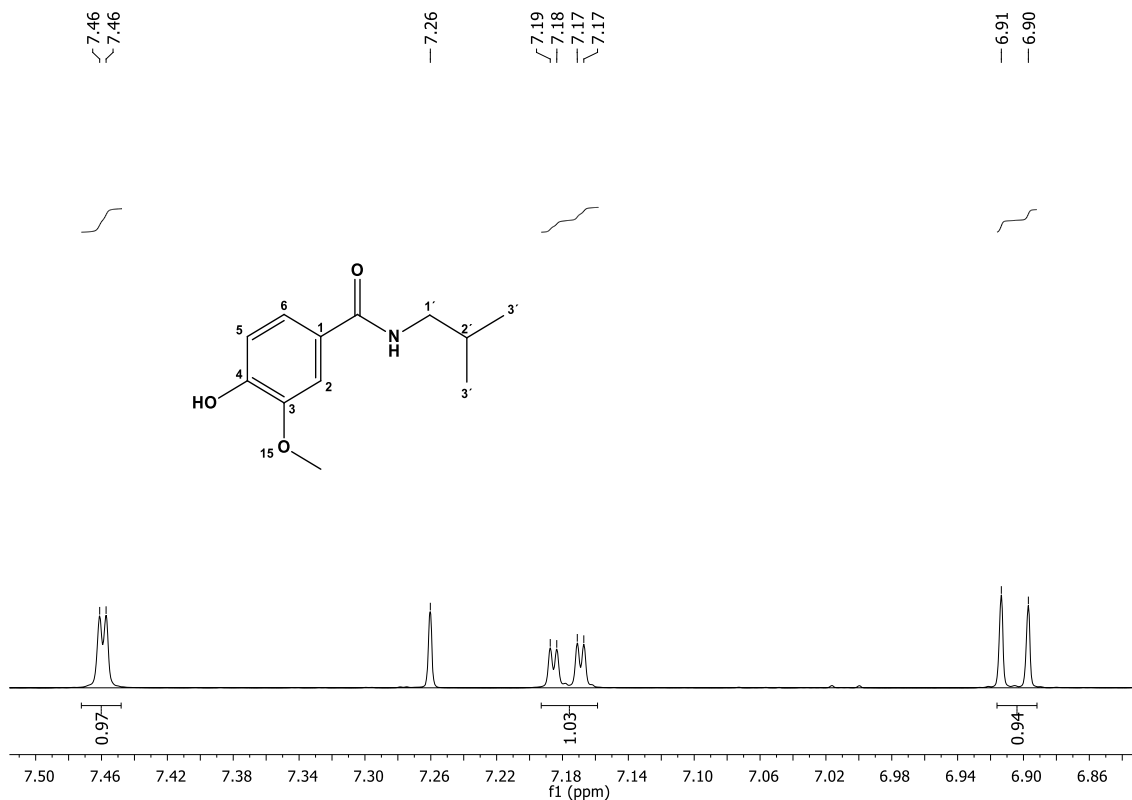
RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): δ 167,50 (C=O); 148,81 (C-4); 146,71 (C-3); 126,90 (C-1); 119,51 (C-6); 114,07 (C-5); 111,02 (C-2); 56,01 (OCH_3); 47,32 (C-1'); 28,44 (C-2'); 20,34 (C-3').



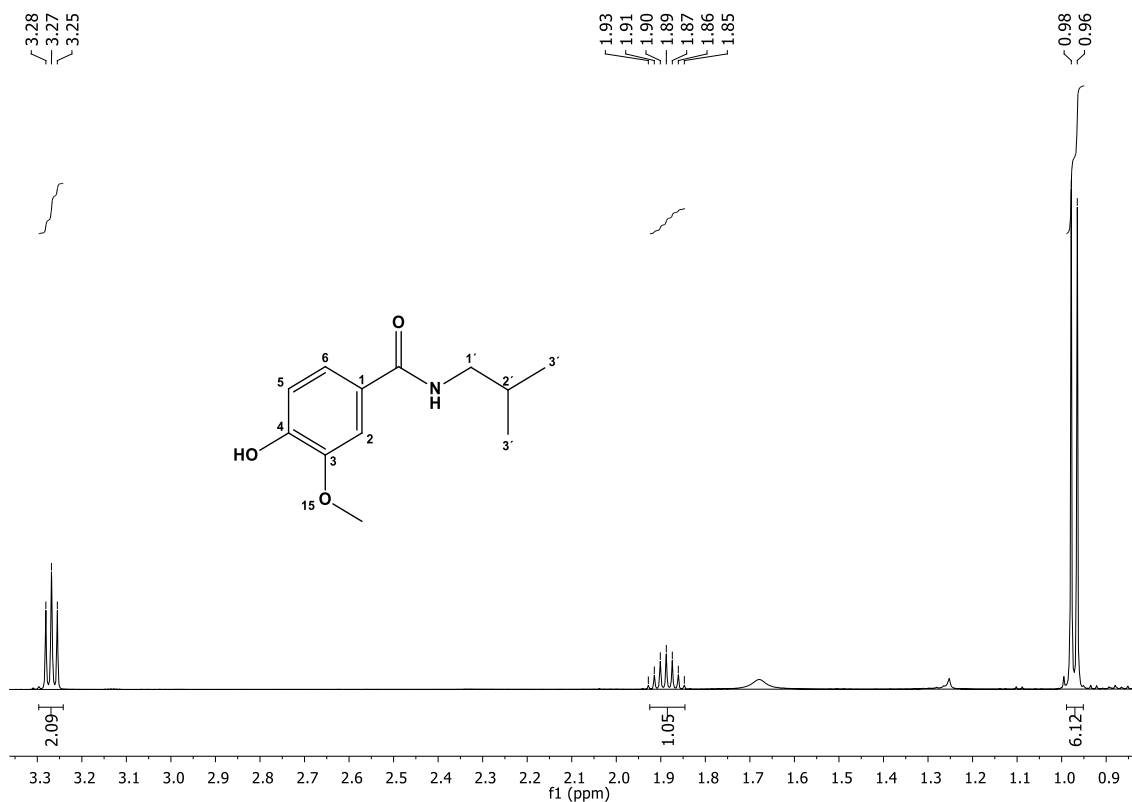
Espectro 1. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) da 4-Hidroxi-N-isobutil-3-metoxibenzamida (AN01).



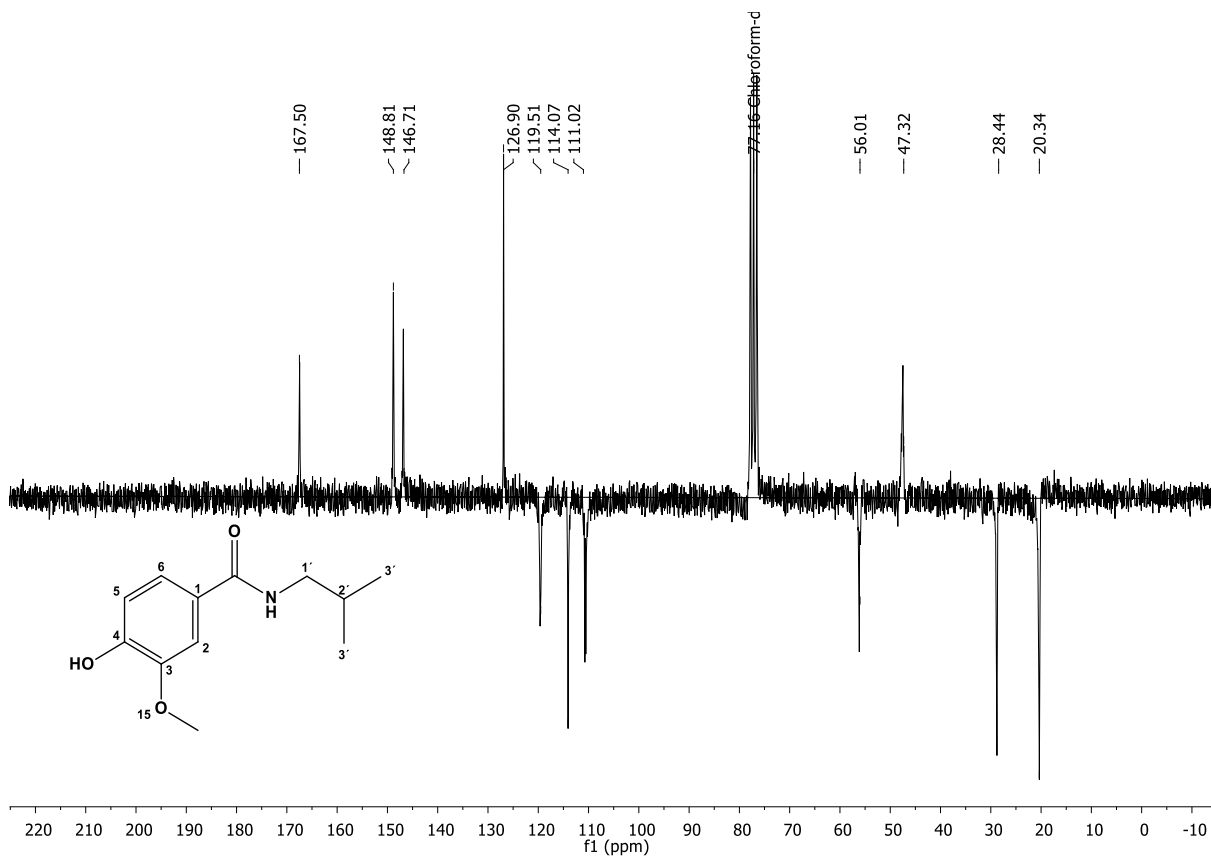
Espectro 2. Espectro de RMN ^1H da 4-Hidroxi-N-isobutil-3-metoxibenzamida (AN01), (CDCl_3 , 500 MHz).



Espectro 3. Expansão do espectro de RMN ^1H da 4-Hidroxi-N-isobutil-3-metoxibenzamida (AN01), (CDCl_3 , 500 MHz).

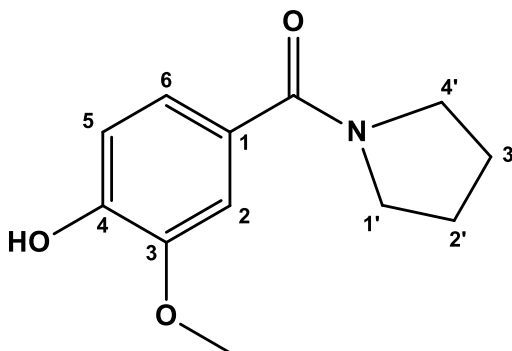


Espectro 4. Expansão do espectro de RMN ^1H da 4-Hidroxi-N-isobutil-3-metoxibenzamida (AN01), (CDCl_3 , 500 MHz).



Espectro 5. Espectro de RMN ¹³C-APT da 4-Hidroxi-N-isobutil-3-metoxibenzamida (AN01), (CDCl₃, 125 MHz).

7.3.2. (4-hidroxi-3-metoxifenil) (pirrolidina-1-il) metanona (AN02)



Aspecto: Óleo amarelo escuro;

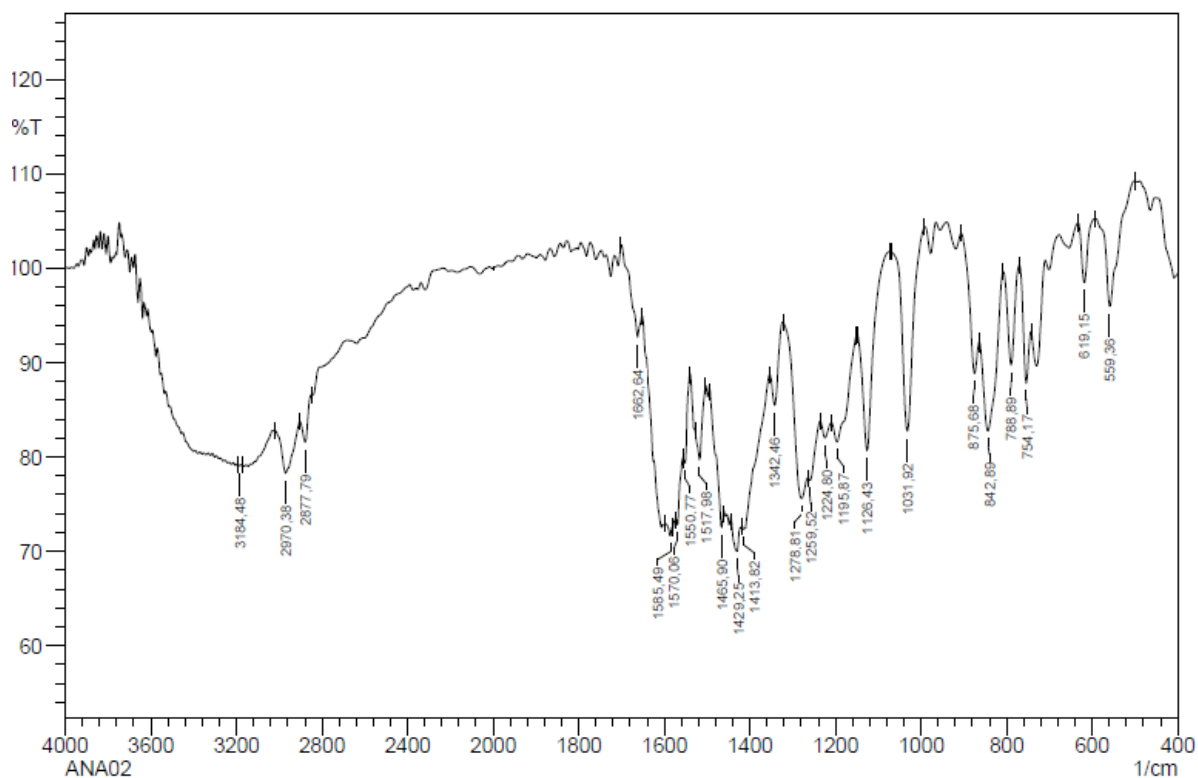
Rendimento: 86,44 % (114,50 mg);

Tempo de reação: 7 horas;

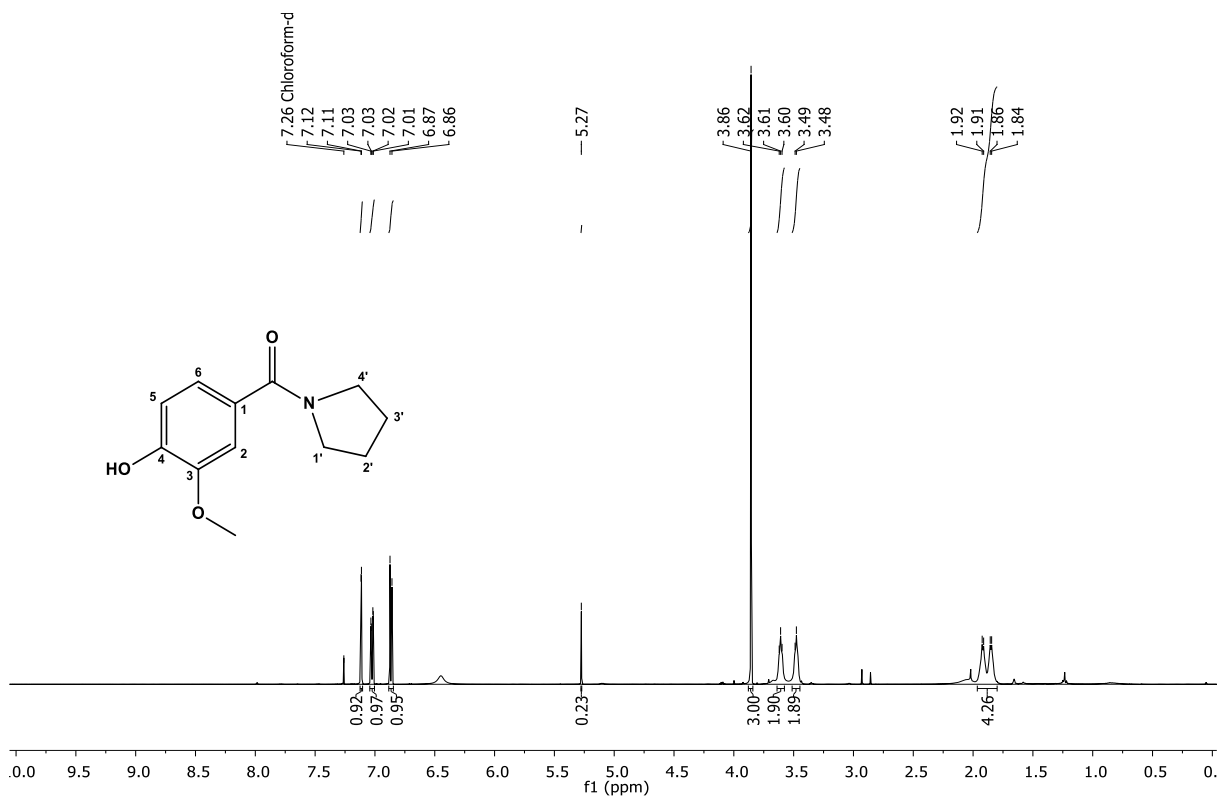
IV ν_{\max} (KBr, cm^{-1}): 3184, 2970, 2877, 1662, 1585, 1570, 1517.

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 7,11 (*d*, $J = 1,8$ Hz, 1H, H-2); 7,02 (*dd*, $J = 8,1, 1,9$ Hz, 1H, H-6); 6,87 (*d*, $J = 8,2$ Hz, 1H, H-5); 3,86 (*s*, 3H, OCH_3); 3,61 (*t*, $J = 5,9$ Hz, 2H, H-1'); 3,48 (*t*, $J = 5,4$ Hz, 2H, H-2'), 1,96 – 1,80 (*m*, 4H, H-3', H-4').

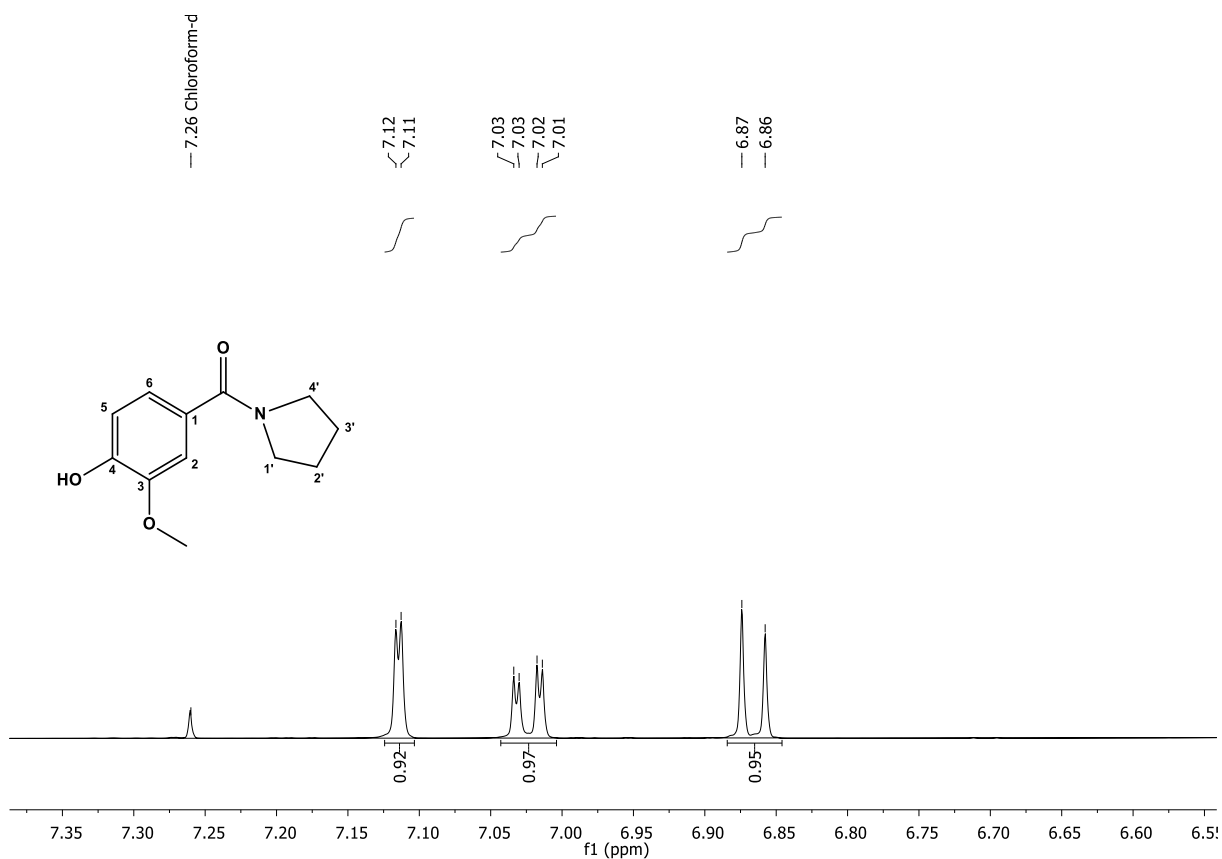
RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): δ 169,39 (C=O); 147,43 (C-4); 146,36 (C-3); 128,60 (C-1); 120,72 (C-6); 113,73 (C-5); 110,67 (C-2); 55,85 (OCH_3); 49,89 (C-1'); 46,30 (C-2'); 26,32 (C-3'); 24,26 (C-4').



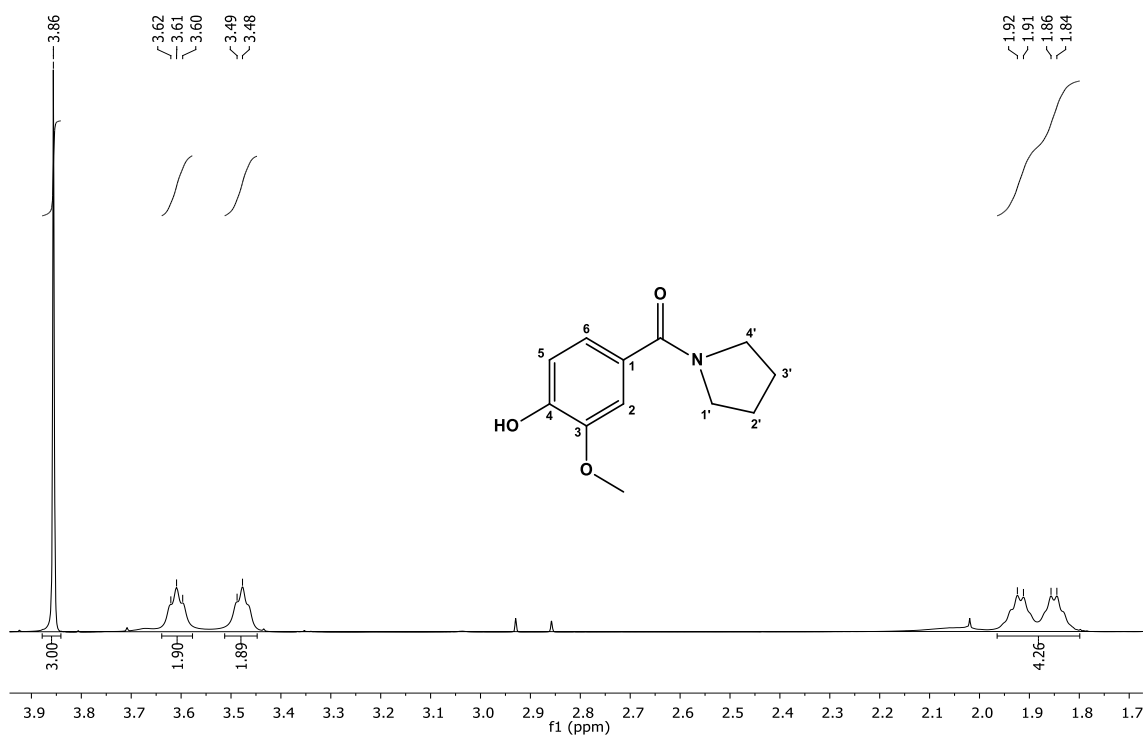
Espectro 6. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) da (4-Hidroxi-3-metoxifenil) (pirrolidin-1-il) metanona (AN02).



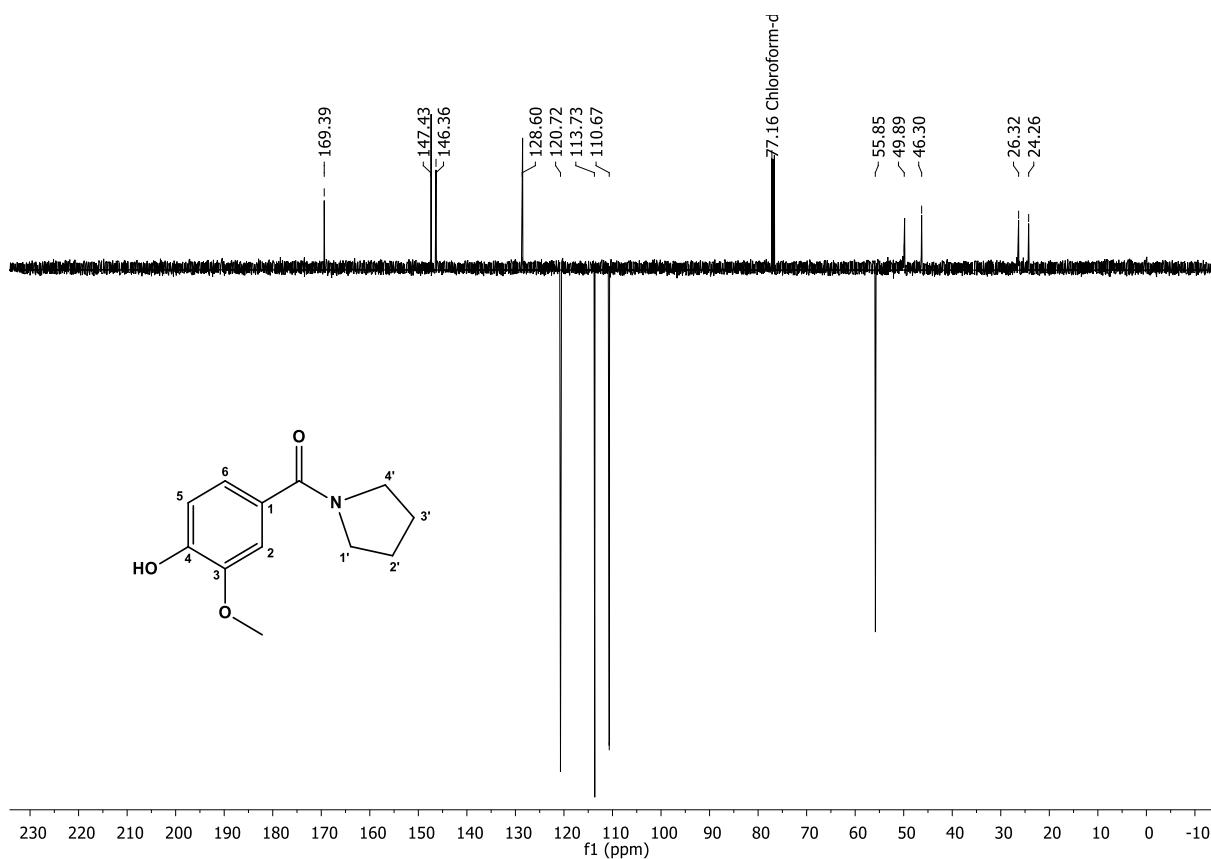
Espectro 7. Espectro de RMN ^1H da (4-Hidroxi-3-metoxifenil) (pirrolidin-1-il) metanona (AN02), (CDCl_3 , 500 MHz).



Espectro 8. Expansão de espectro de RMN ^1H da (4-Hidroxi-3-metoxifenil) (pirrolidin-1-il) metanona (AN02), (CDCl_3 , 500 MHz).

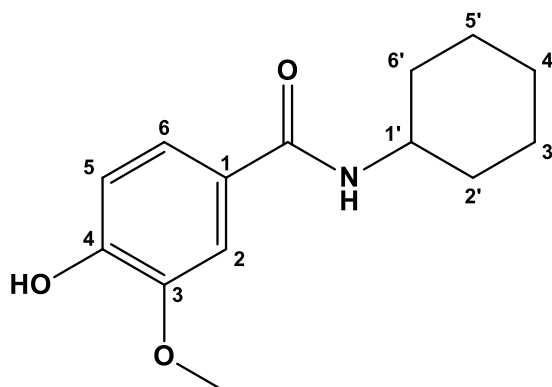


Espectro 9. Expansão de espectro de RMN ^1H da (4-Hidroxi-3-metoxifenil) (pirrolidin-1-il) metanona (AN02), (CDCl_3 , 500 MHz).



Espectro 10. Espectro de RMN ¹³C-APT da (4-Hidroxi-3-metoxifenil) (pirrolidin-1-il) metanona (AN02), (CDCl₃, 125 MHz).

7.3.3. N-ciclo-hexil-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN03)



Aspecto: Sólido cristalino branco;

Rendimento: 51,67 % (76,30 mg);

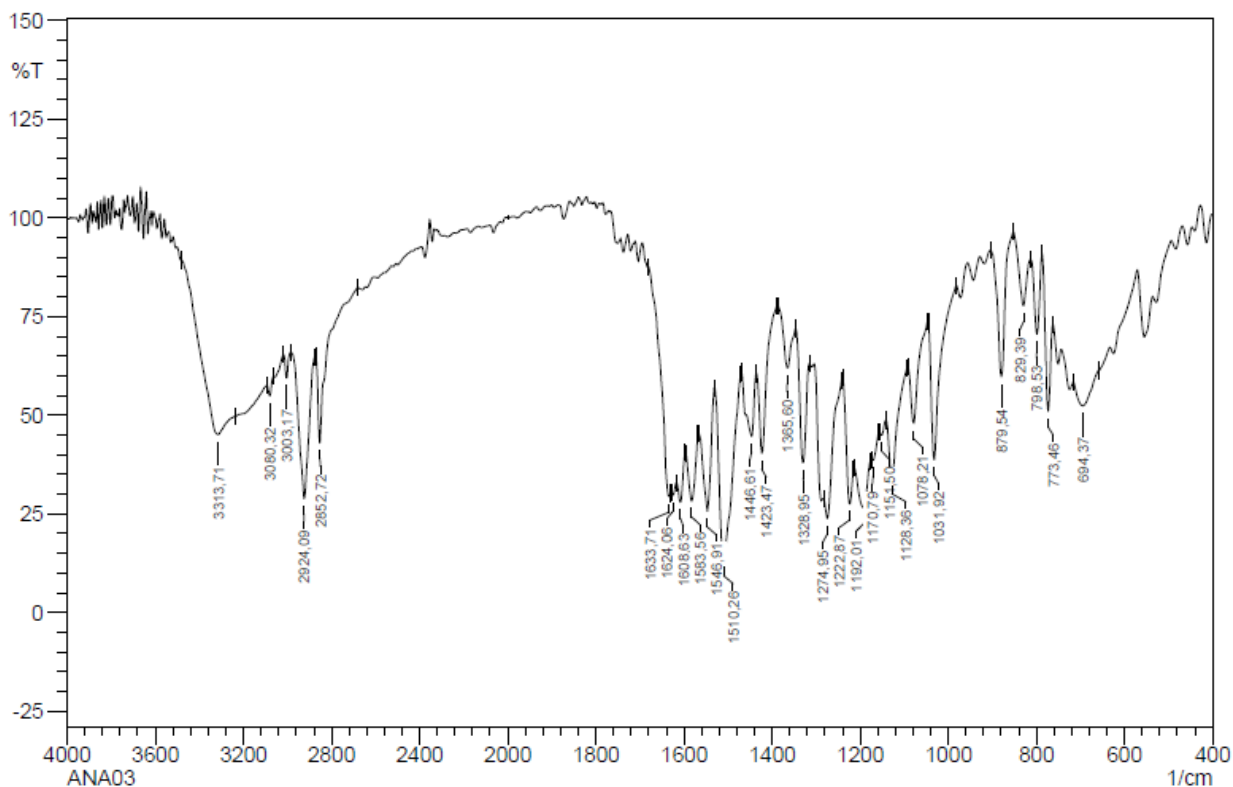
Ponto de Fusão: 210-211 °C;

Tempo de reação: 5 horas;

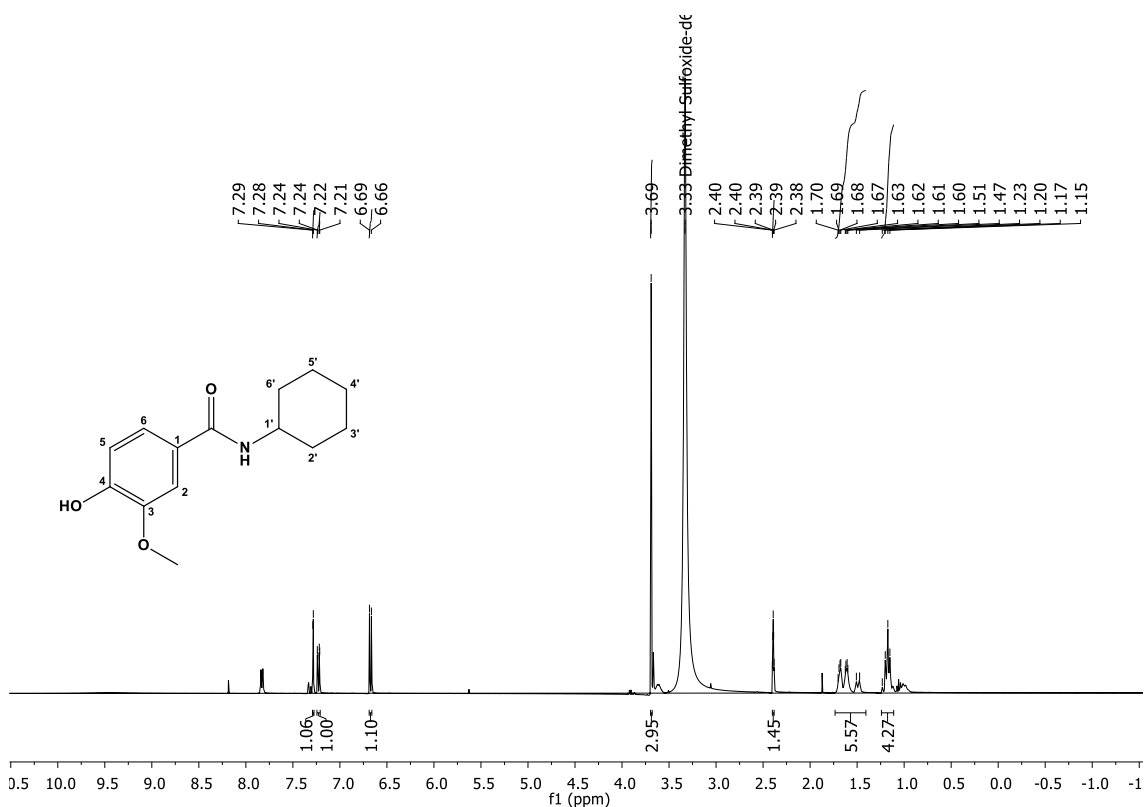
IV ν_{\max} (KBr, cm^{-1}): 3313, 2924, 2852, 1633, 1583, 1546, 1510.

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6): δ 7,29 (*q*, $J = 2,0$ Hz, 1H, H-2); 7,23 (*dd*, $J = 8,2$; 2,0 Hz, 1H, H-6); 6,68 (*d*, $J = 8,2$ Hz, 1H, H-5); 3,69 (*s*, 3H, OCH_3); 2,39 (*q*, $J = 1,8$ Hz, 2H, H-1'); 1,73 – 1,41 (*m*, 6H, H-2', H-4', H-6'); 1,24 – 1,11 (*m*, 4H, H-3', H-5').

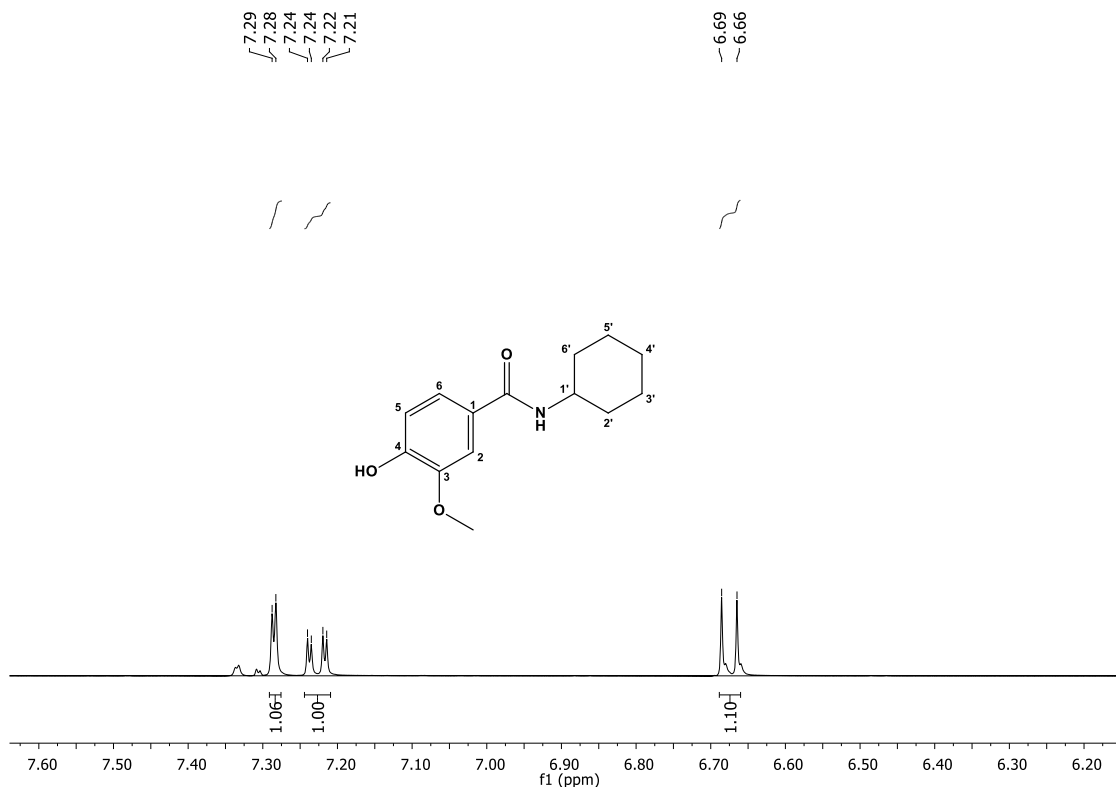
RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO-d_6): δ 164,72 (C=O); 149,11 (C-4); 147,02 (C-3); 125,65 (C-1); 120,50 (C-6); 114,53 (C-5); 111,42 (C-2); 55,50 (OCH_3); 48,10 (C-1'); 32,40 (C-2', C-6'); 25,13 (C-4'); 24,86 (C-3', C-5').



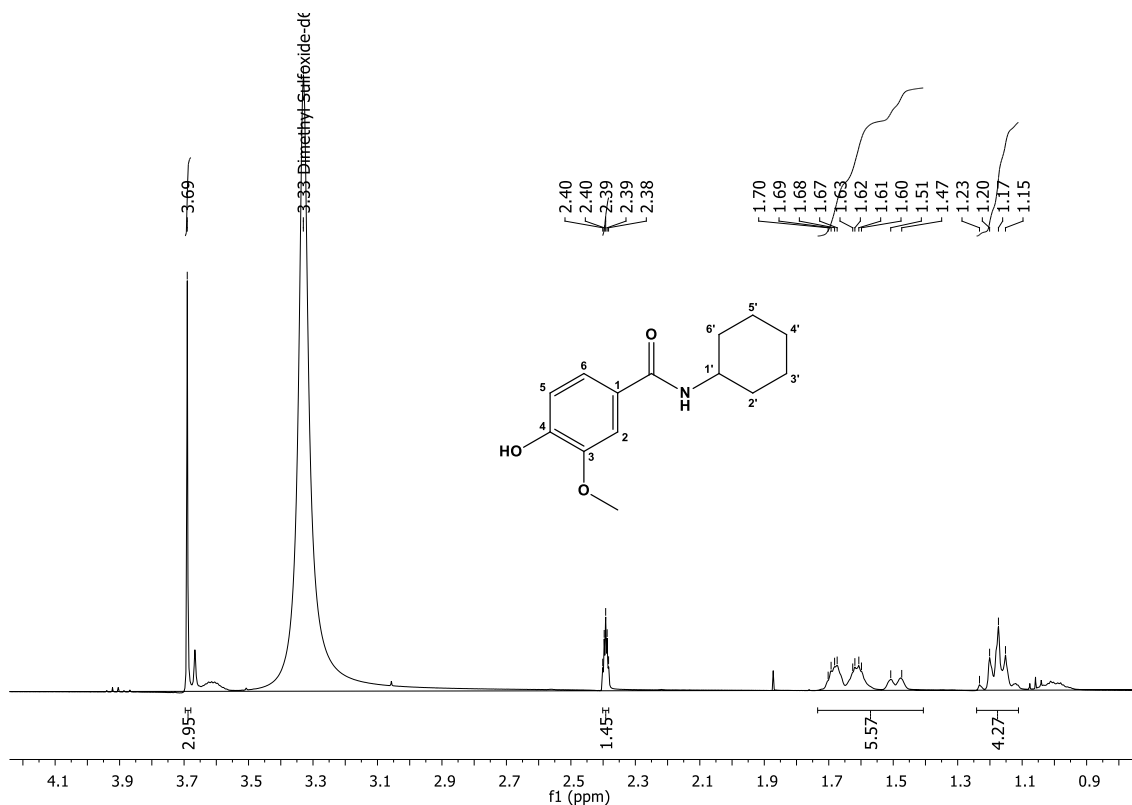
Espectro 11. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de N-Ciclo-hexil-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN03).



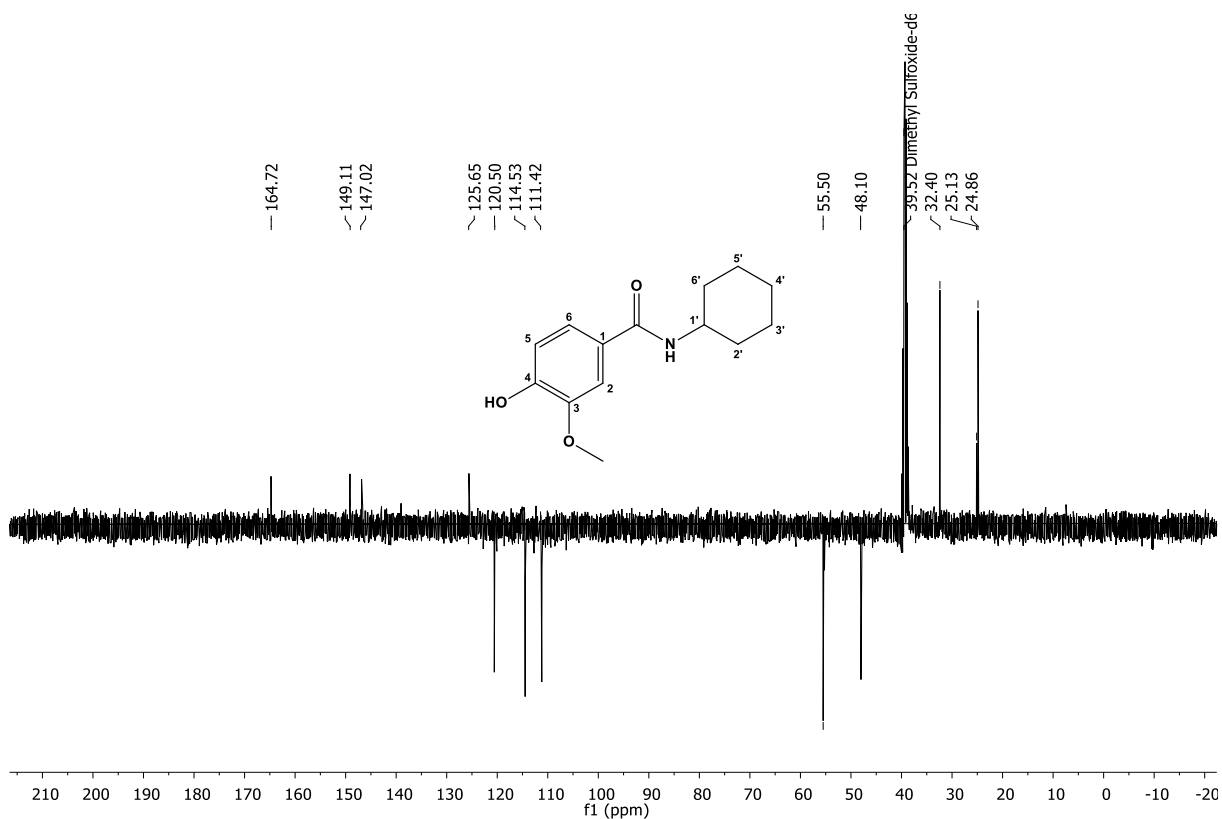
Espectro 12. Espectro de RMN ^1H de N-Ciclo-hexil-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN03), (DMSO- d_6 , 400 MHz).



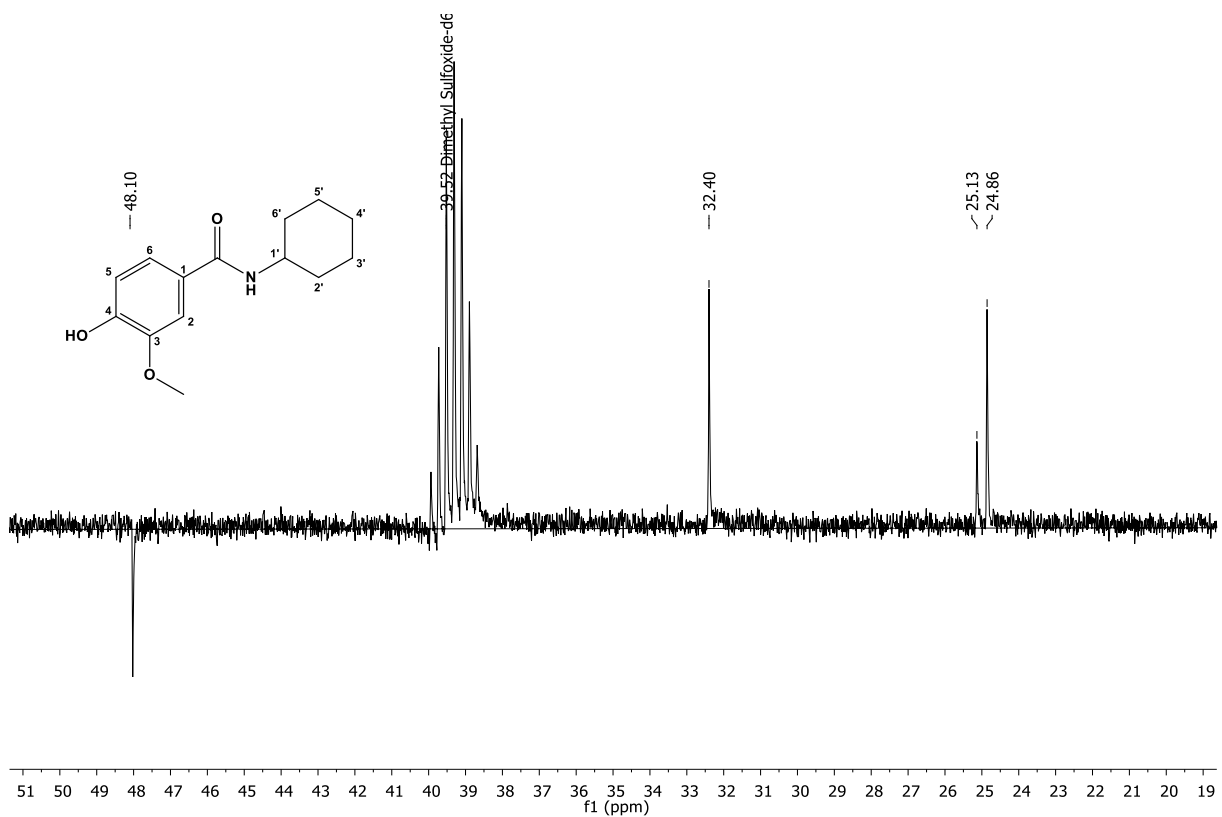
Espectro 13. Expansão do espectro de RMN ^1H de N-Ciclo-hexil-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN03), (DMSO- d_6 , 400 MHz).



Espectro 14. Expansão do espectro de RMN ^1H de N-Ciclo-hexil-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN03), (DMSO- d_6 , 400 MHz).

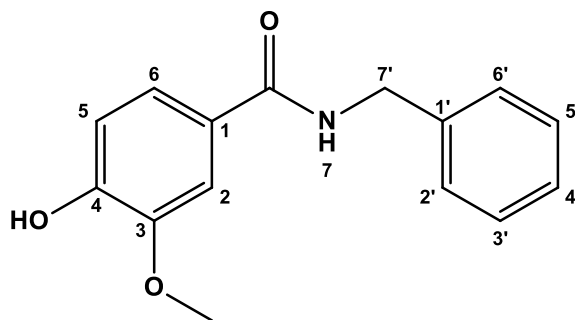


Espectro 15. Espectro de RMN ^{13}C -APT de N-Ciclo-hexil-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN03), (DMSO- d_6 , 100 MHz).



Espectro 16. Expansão de espectro de RMN ^{13}C -APT de N-Ciclo-hexil-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN03), (DMSO- d_6 , 100 MHz).

7.3.4. N-Benzil-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN04)



Aspecto: Sólido amorfo branco;

Rendimento: 66,54% (101 mg);

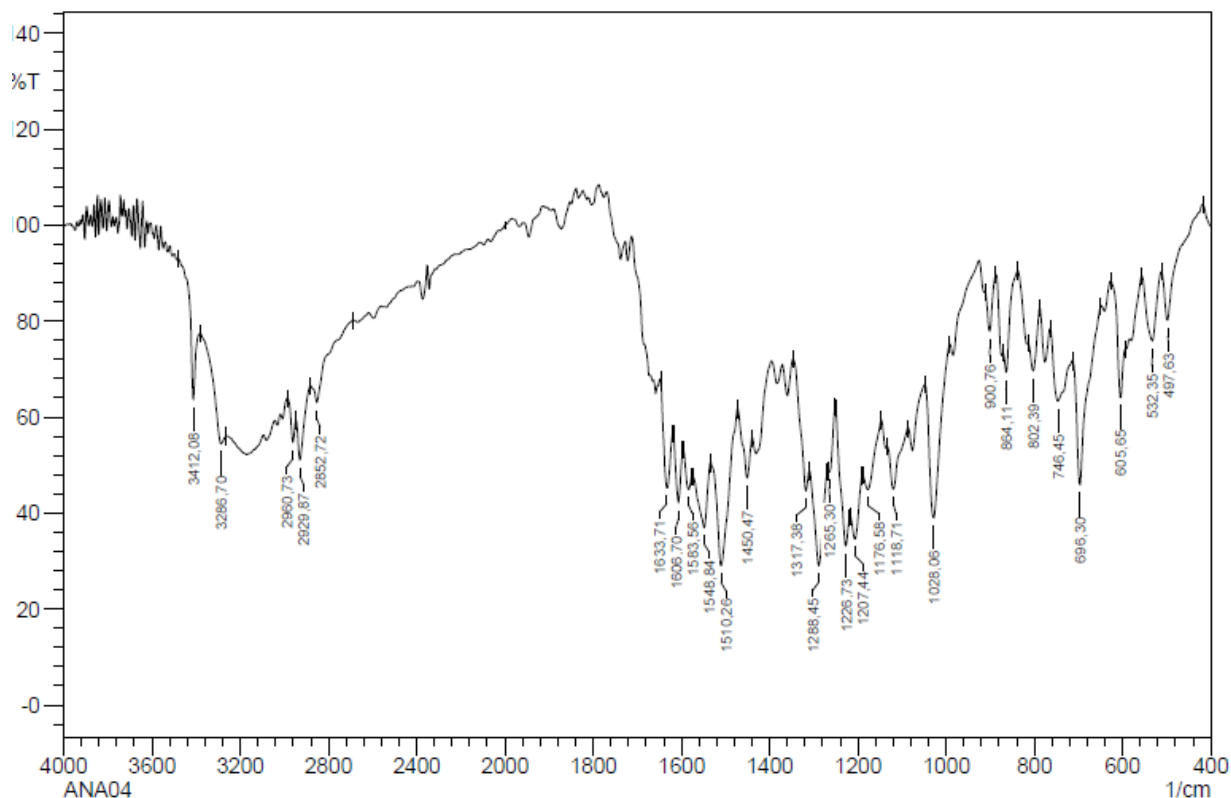
Ponto de Fusão: 154-155 °C;

Tempo de reação: 7 horas;

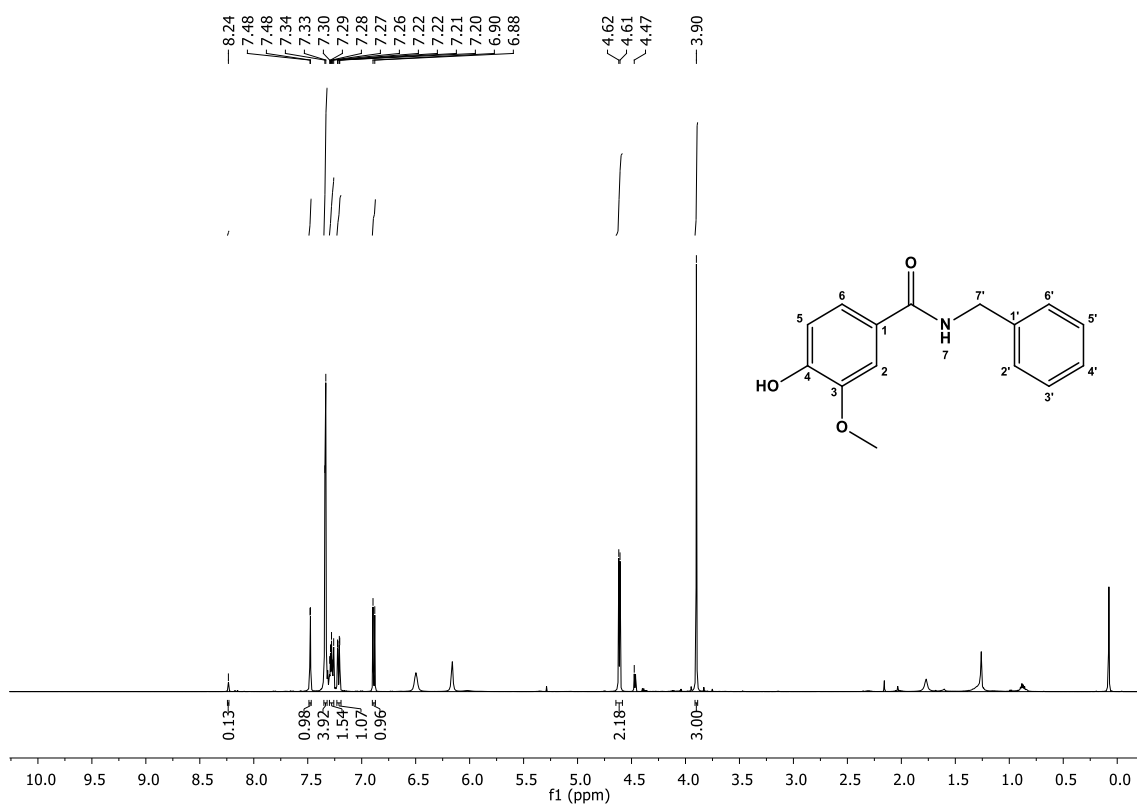
IV ν_{max} (KBr, cm^{-1}): 3286, 2960, 2852, 1633, 1583, 1548, 1510.

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 7,48 (*d*, $J = 1,9$ Hz, 1H, H-2); 7,34 (*d*, $J = 4,4$ Hz, 4H, H-2', H-3', H-5', H-6'); 7,30 – 7,26 (*m*, 1H, H-4'); 7,21 (*dd*, $J = 8,2; 1,9$ Hz, 1H, H-6); 6,89 (*d*, $J = 8,2$ Hz, 1H, H-5); 4,61 (*d*, $J = 5,7$ Hz, 2H, H-7'); 3,90 (*s*, 3H, OCH_3).

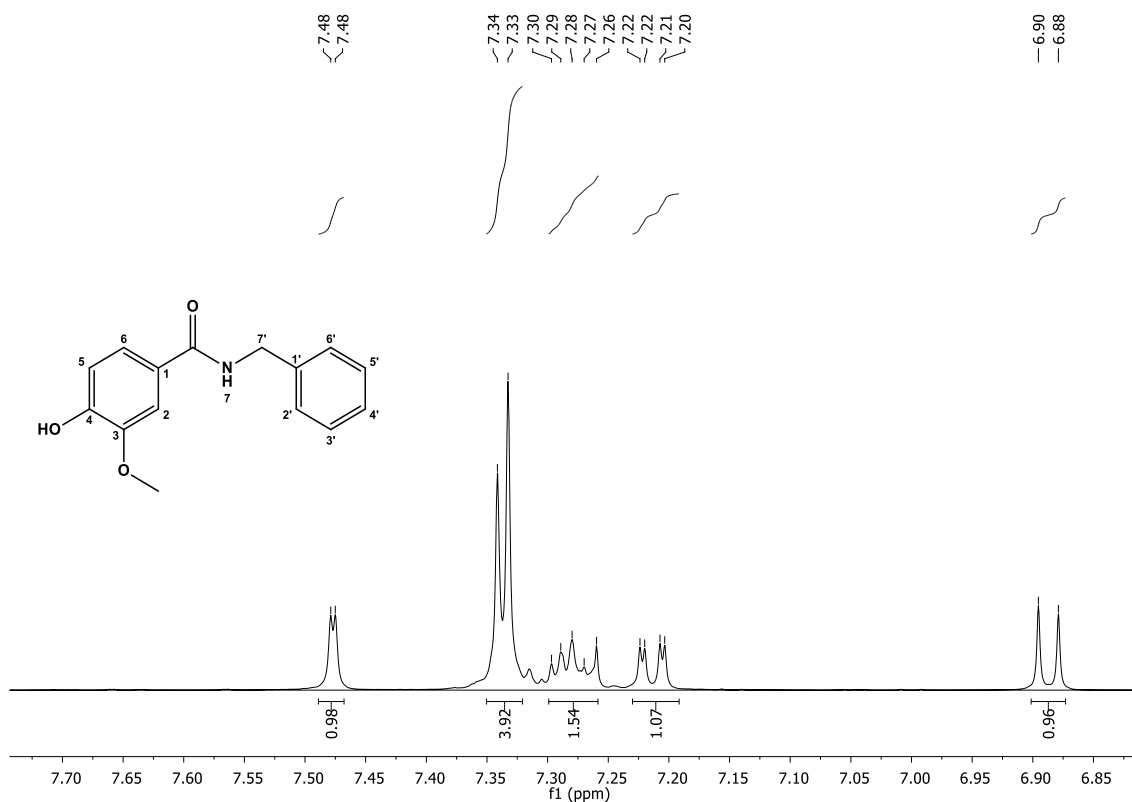
RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): δ 167,13 (C=O); 148,98 (C-4); 146,83 (C-3); 138,48 (C-1'); 128,87 (C-3'); 127,99 (C-5'); 127,90 (C-2'); 127,80 (C-6'); 127,67 (C-4'); 126,60 (C-1); 119,88 (C-6); 114,09 (C-5); 110,70 (C-2); 56,21 (OCH_3); 44,27 (C-7').



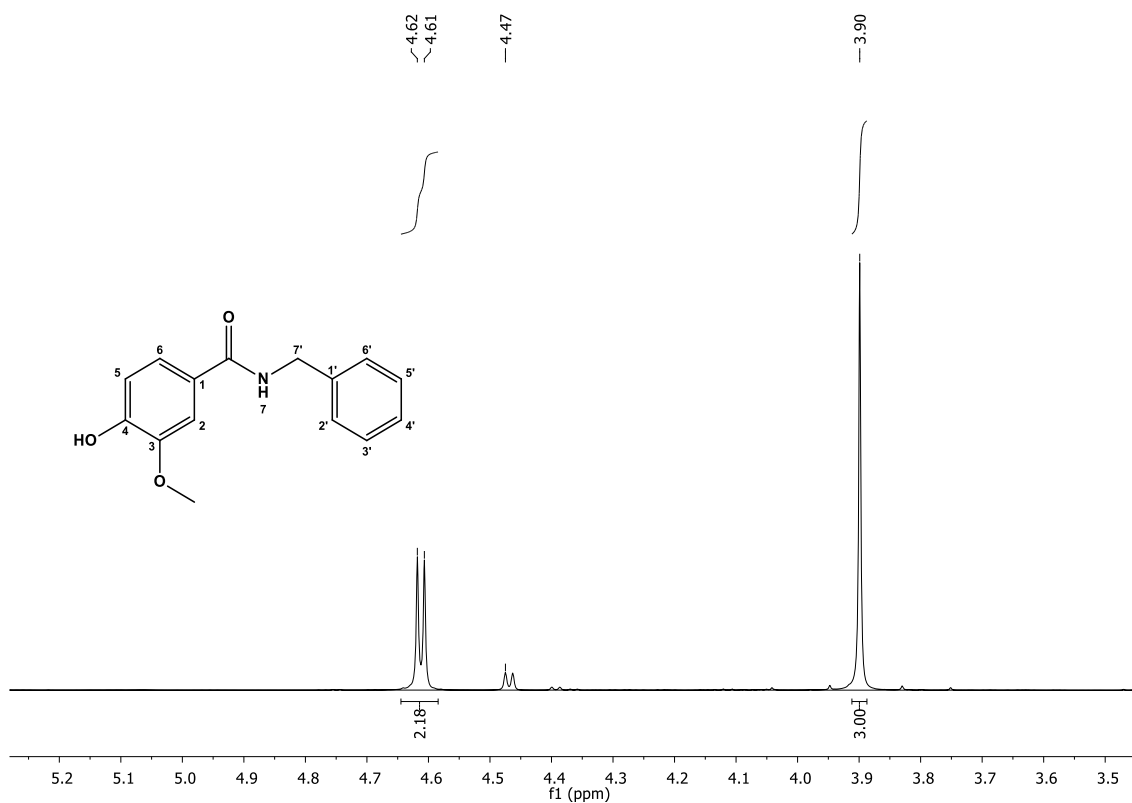
Espectro 17. Espectro de Infravermelho (KBr, cm⁻¹) de N-Benzil-4-hidroxi-3-metóxi-benzamida (AN04).



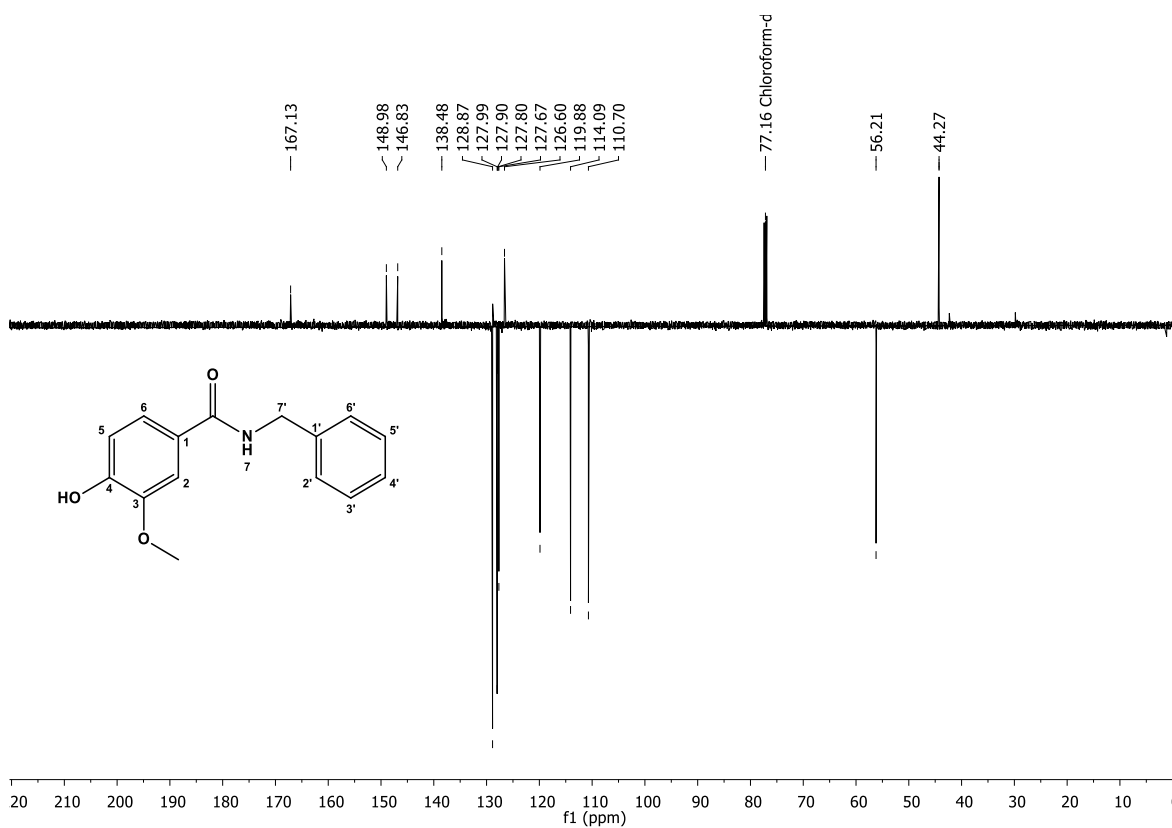
Espectro 18. Espectro de RMN ¹H de N-Benzil-4-hidroxi-3-metóxi-benzamida (AN04), (CDCl₃, 500 MHz).



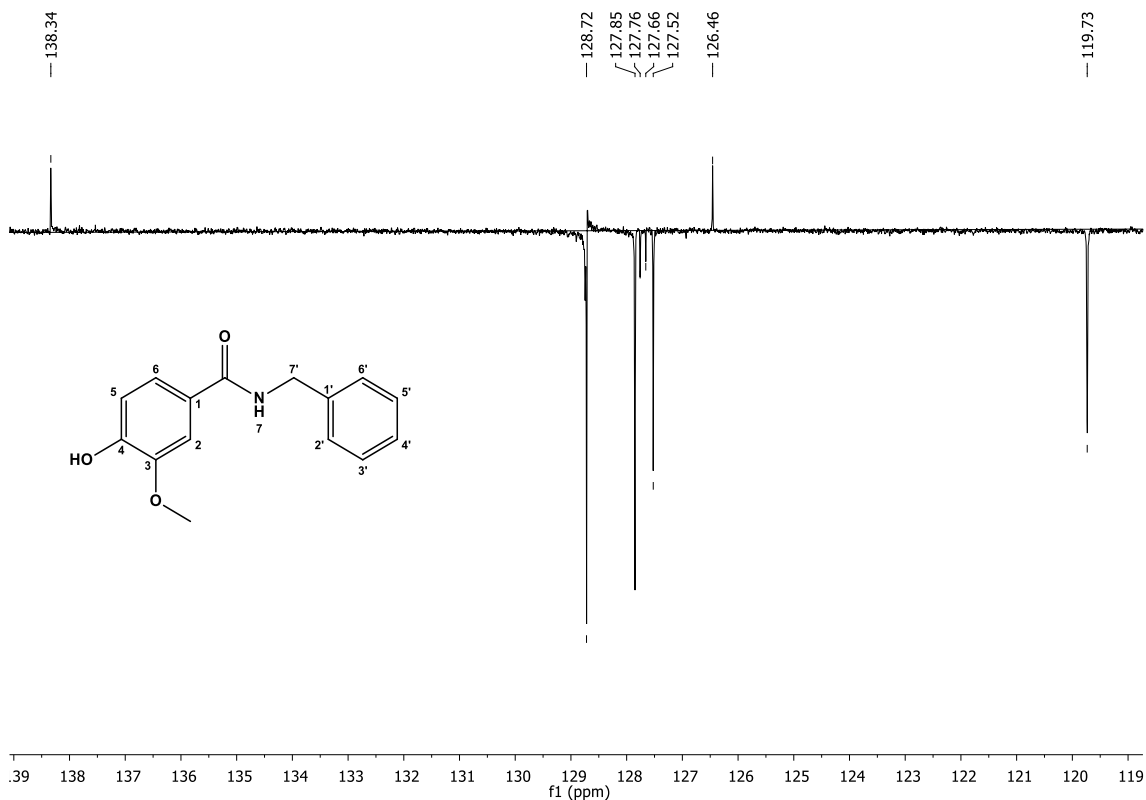
Espectro 19. Expansão de espectro de RMN ^1H de N-Benzil-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN04), (CDCl_3 , 500 MHz).



Espectro 20. Expansão de espectro de RMN ^1H de N-Benzil-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN04), (CDCl_3 , 500 MHz).

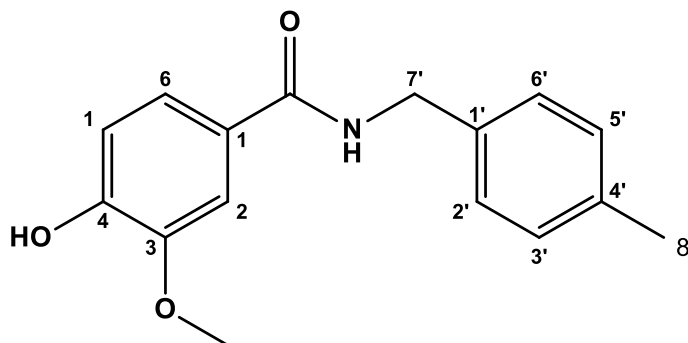


Espectro 21. Espectro de RMN ^{13}C -APT de N-Benzil-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN04), (CDCl_3 , 125 MHz).



Espectro 22. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de N-benzil-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN04), (CDCl_3 , 125 MHz).

7.3.5. 4-Hidroxi-3-metoxi-N-(4-metilbenzil) benzamida (AN05)



Aspecto: Sólido amorfo amarelo claro;

Rendimento: 30,50 % (47,80 mg);

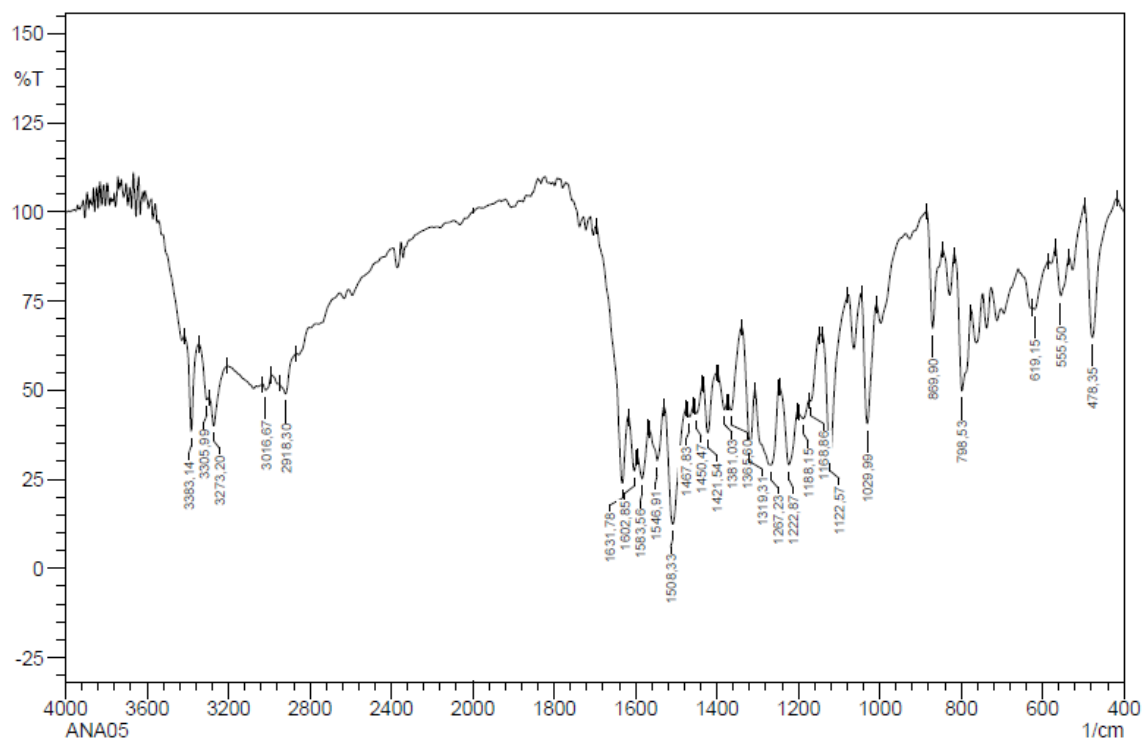
Ponto de Fusão: 162-164 °C;

Tempo de reação: 48 horas;

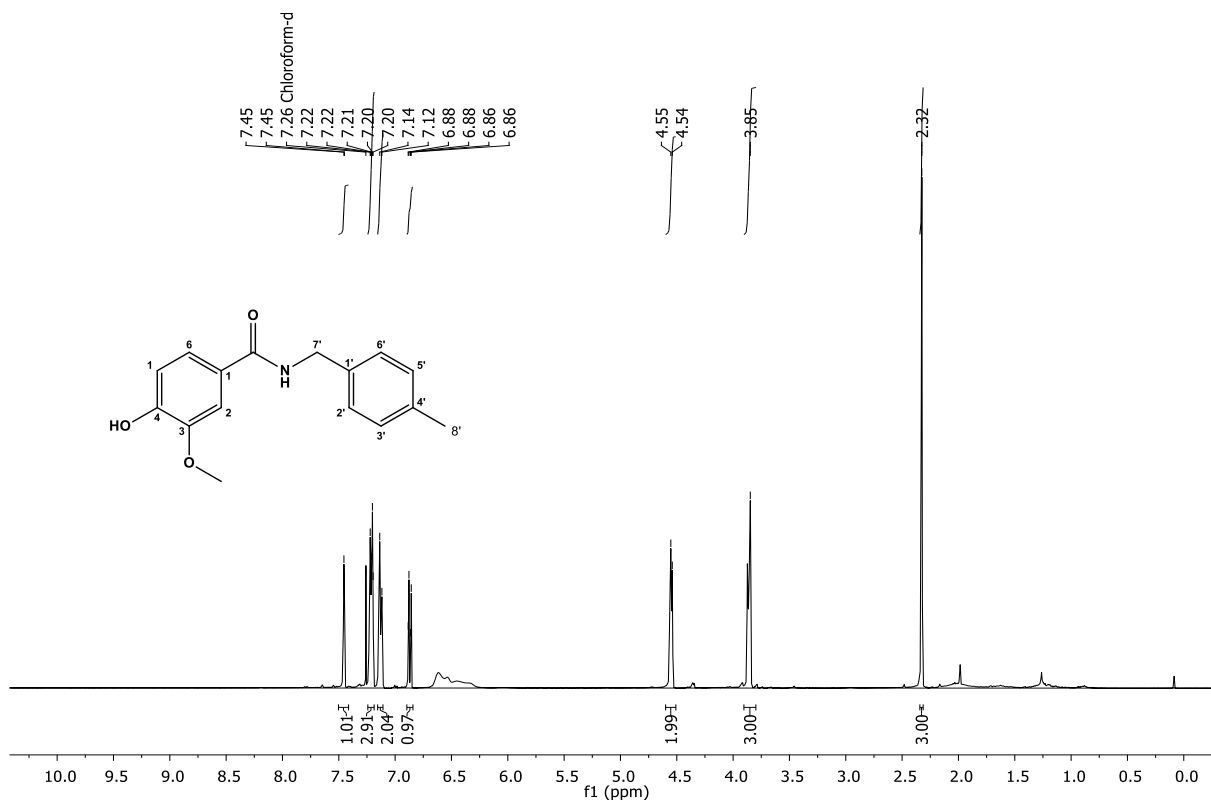
IV ν_{\max} (KBr, cm^{-1}): 3273, 3016, 2918, 1631, 1583, 1546, 1508.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 7,45 (*d*, $J = 1,9$ Hz, 1H, H-2); 7,24 – 7,19 (*m*, 3H, H-5, H-2', H-6'); 7,13 (*d*, $J = 7,6$ Hz, 2H, H-3', H-5'); 6,87 (*dd*, $J = 8,2; 2,6$ Hz, 1H, H-6), 4,55 (*d*, $J = 5,2$ Hz, 2H, H-7'), 3,86 (*s*, $J = 10,3$ Hz, 3H, OCH_3), 2,32 (*s*, 3H, CH_3)

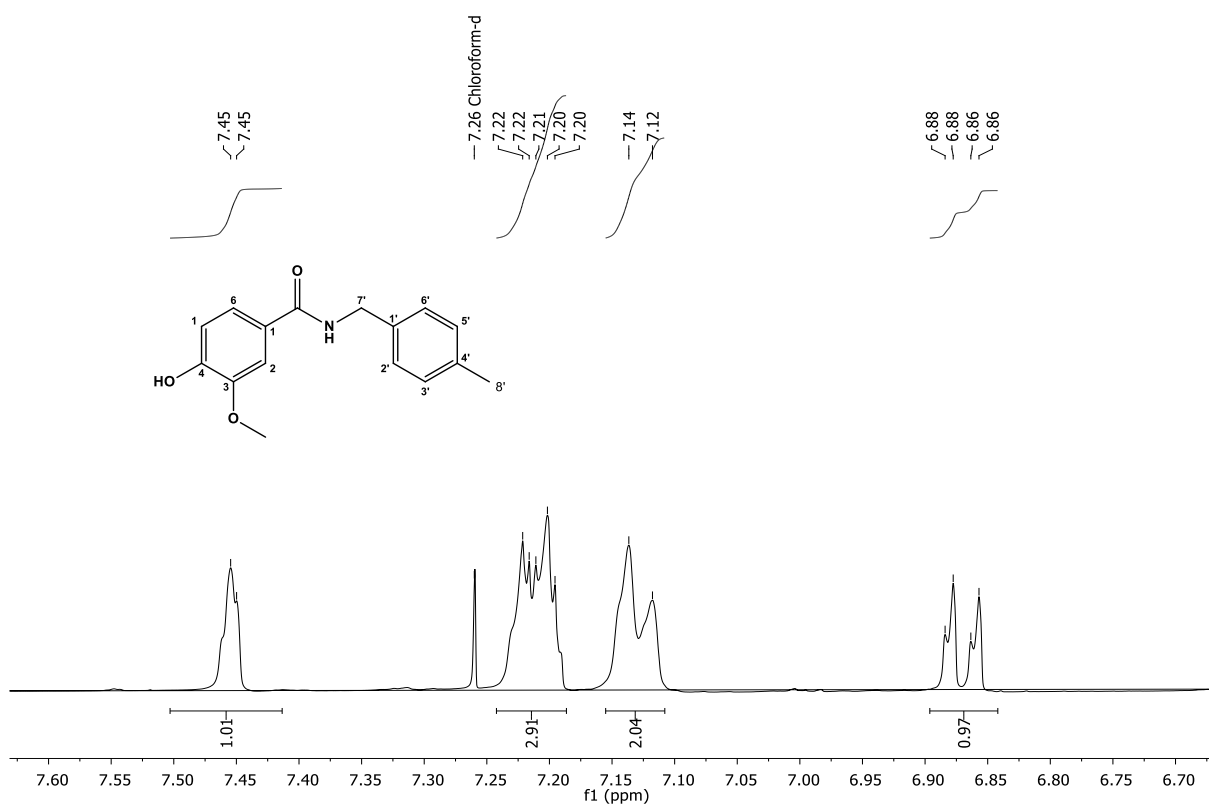
RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 167,21 (C=O); 148,98 (C-4); 146,83 (C-3); 137,29 (C-4'); 135,37 (C-1'); 129,46 (C-3', C-5'); 127,96 (C-4', C-6'); 126,46 (C-1); 119,92 (C-6); 114,13 (C-5); 110,66 (C-2); 56,09 (OCH_3); 43,98 (C-7'); 21,17 (CH_3).



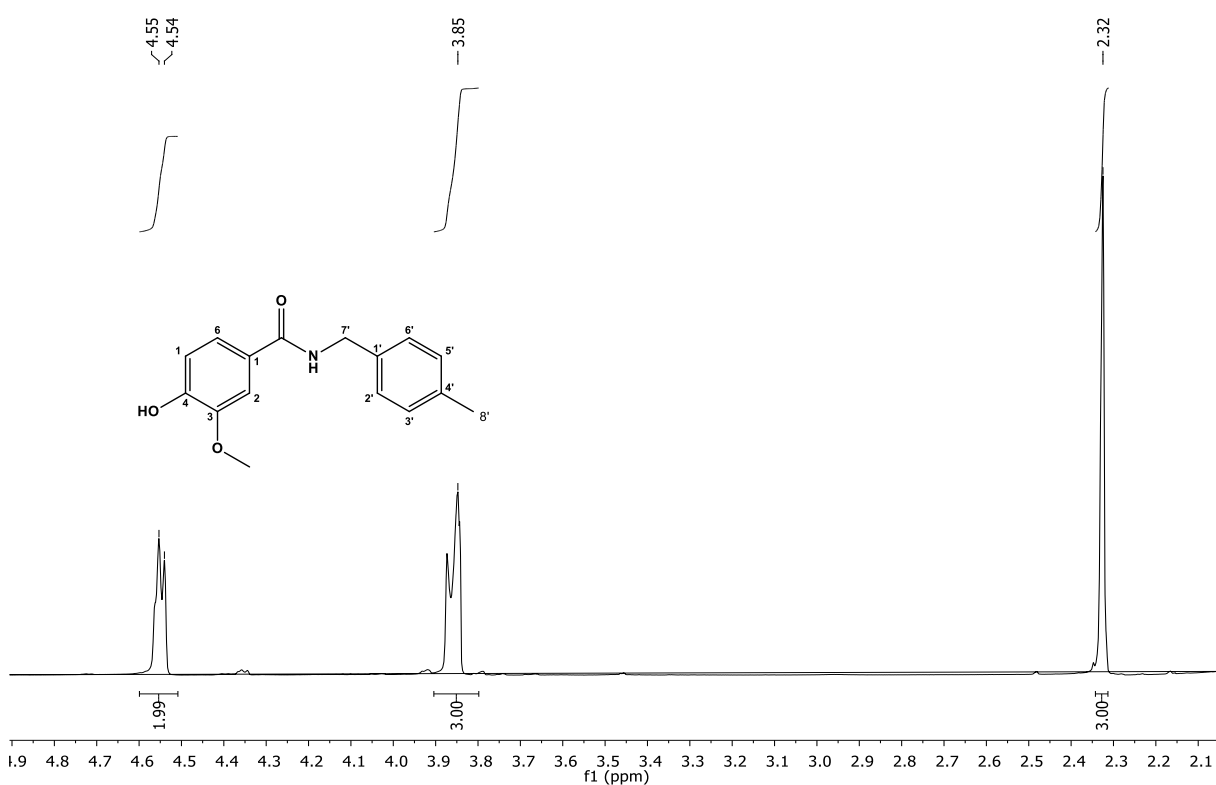
Espectro 23. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 4-Hidroxi-3-metoxi-N-(4-metilbenzil) benzamida (AN05).



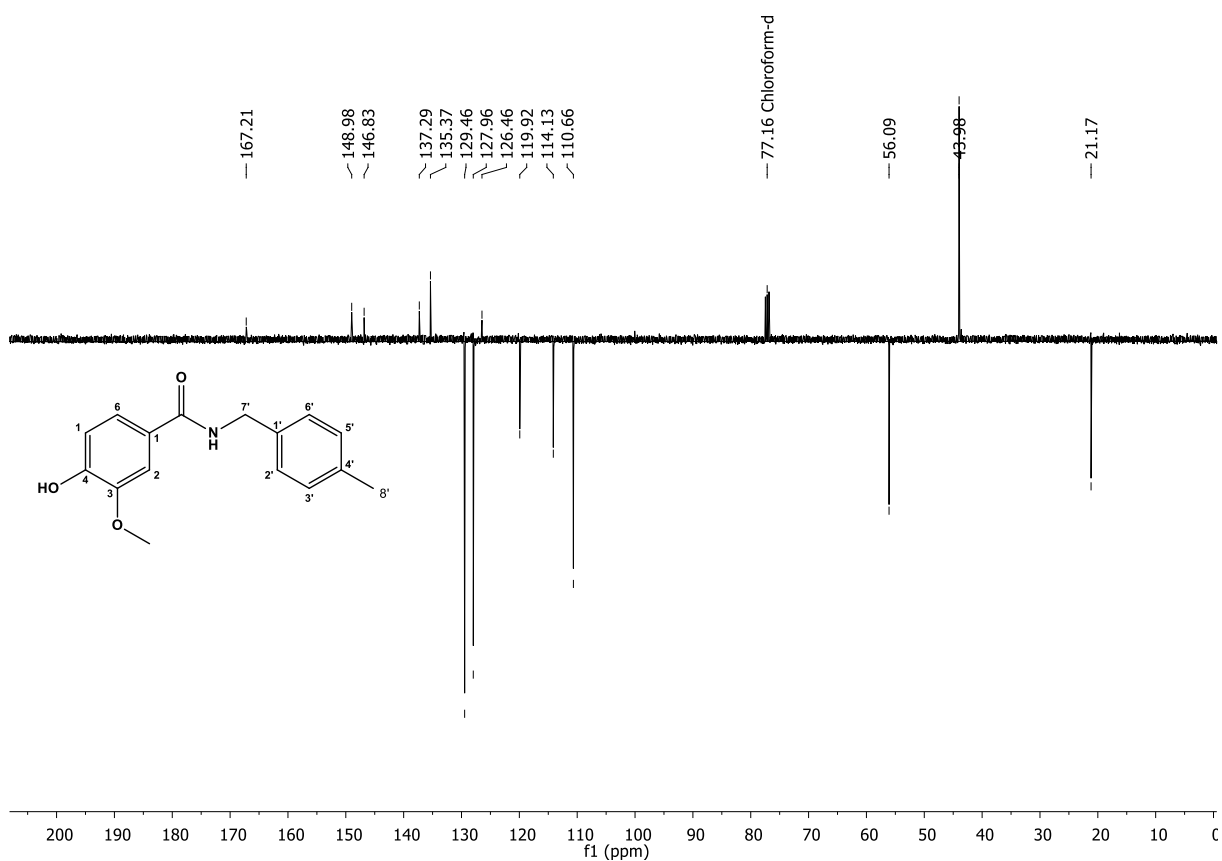
Espectro 24. Espectro de RMN ^1H de 4-Hidroxi-3-metoxi-N-(4-metilbenzil) benzamida (AN05), (CDCl_3 , 400 MHz).



Espectro 25. Expansão de espectro de RMN ^1H de 4-Hidroxi-3-metoxi-N-(4-metilbenzil) benzamida (AN05), (CDCl_3 , 400 MHz).

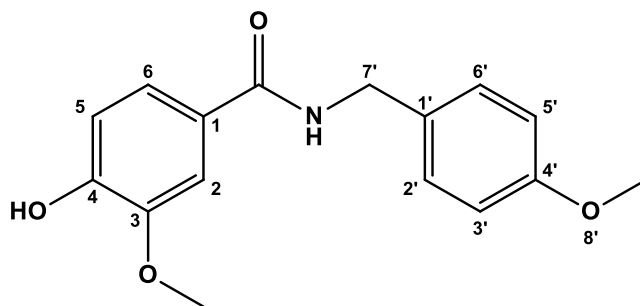


Espectro 26. Expansão de espectro de RMN ^1H de 4-Hidroxi-3-metoxi-N-(4-metilbenzil) benzamida (AN05), (CDCl_3 , 400 MHz).



Espectro 27. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 4-Hidroxi-3-metoxi-N-(4-metilbenzil) benzamida (AN05), (CDCl_3 , 100 MHz).

7.3.6. 4-hidroxi-3-metoxi-N-(4-metoxibenzil) benzamida (AN06)



Aspecto: Óleo marrom escuro;

Rendimento: 49,90% (84,60 mg);

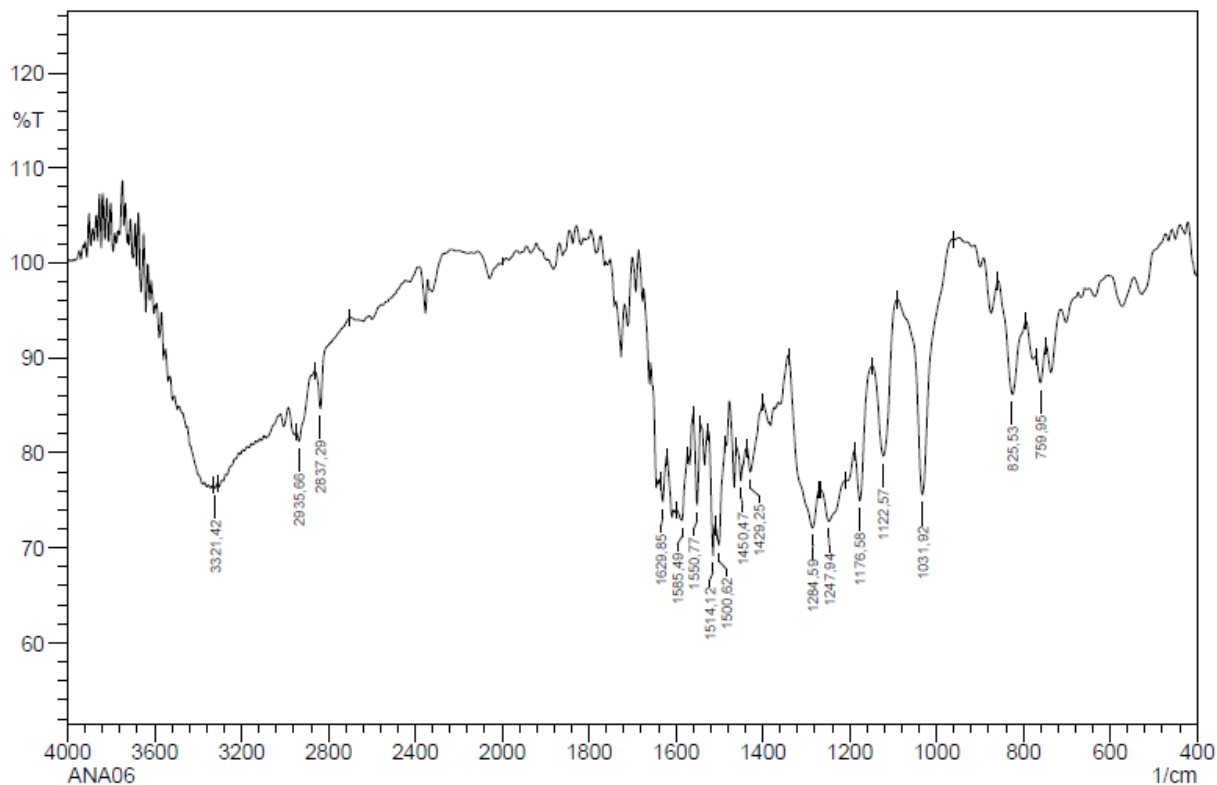
Tempo de reação: 48 horas;

IV ν_{max} (KBr, cm^{-1}): 3321, 2935, 2837, 1629, 1585, 1550, 1514.

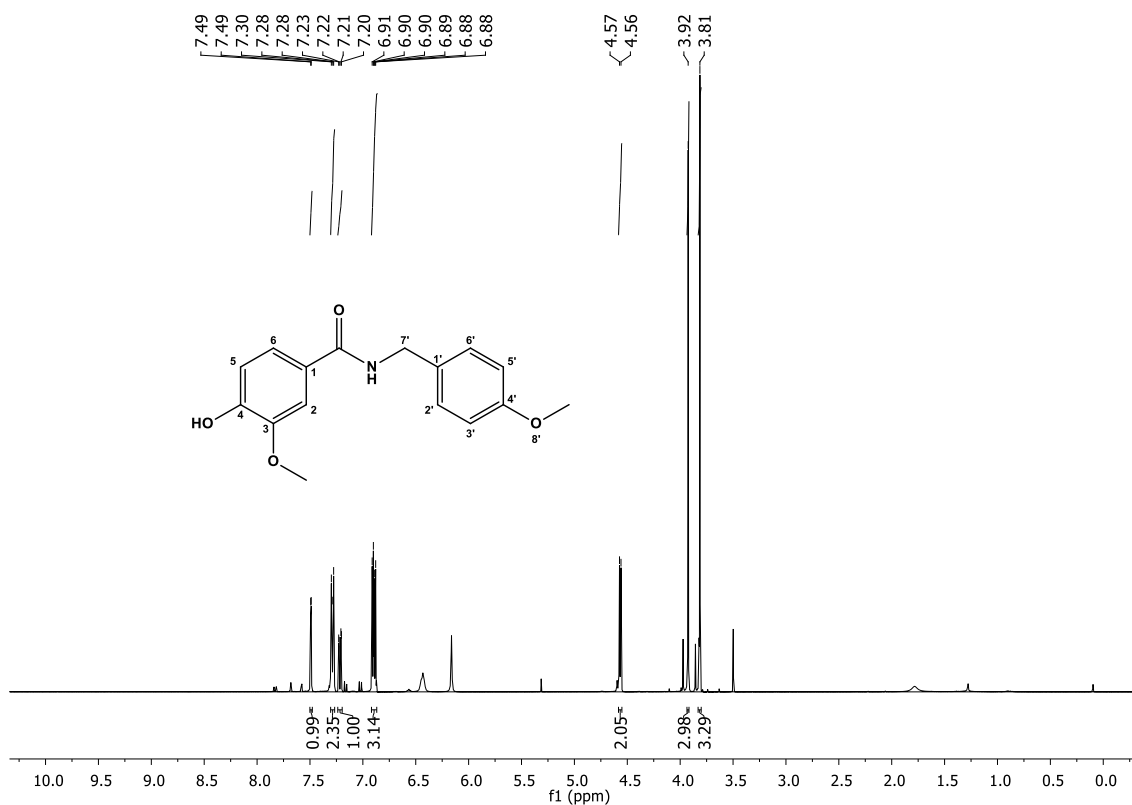
RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 7,49 (*d*, $J = 2,0$ Hz, 1H, H-2); 7,30 – 7,27 (*m*, 2H, H-3', H-5'); 7,22 (*dd*, $J = 8,3; 2,0$ Hz, 1H, H-6); 6,92 – 6,87 (*m*, 3H, H-5, H-2', H-6'); 4,57 (*d*, $J = 5,6$ Hz, 2H, H-7'); 3,92 (*s*, 3H, OCH_3); 3,81 (*s*, 3H, H-8').

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 167,16 (C=O); 159,47 (C-4'); 149,04 (C-4); 147,25 (C-3); 130,55 (C-1'); 129,21 (C-2', C-6'); 126,78 (C-1); 122,94 (C-6); 120,12 (C-5); 114,22 (C-3', C-5'); 110,69 (C-2); 56,36 (OCH_3); 55,48 (C-8'); 43,93 (C-7').

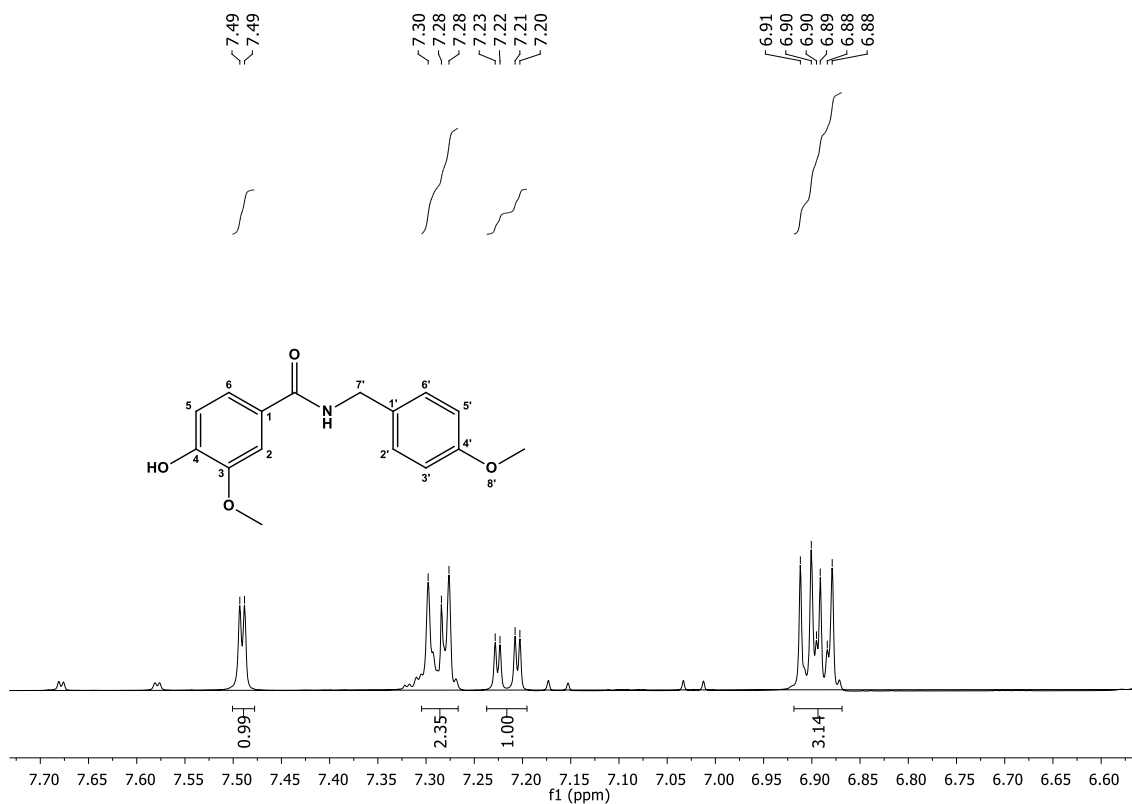
EMAR (MALDI) calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{NO}_4$ $[\text{M}]^+$: 287,3082; encontrado 287,3089.



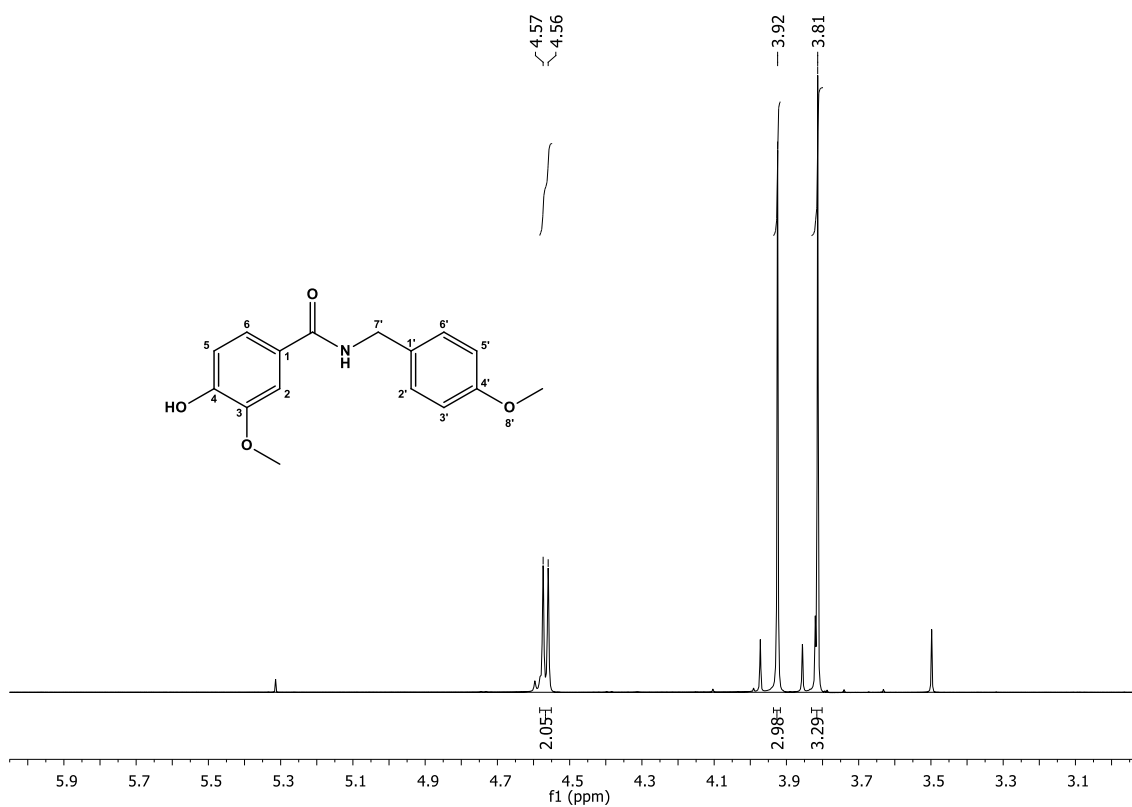
Espectro 28. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 4-Hidroxi-3-metoxi-N-(4-metoxibenzil) benzamida (AN06).



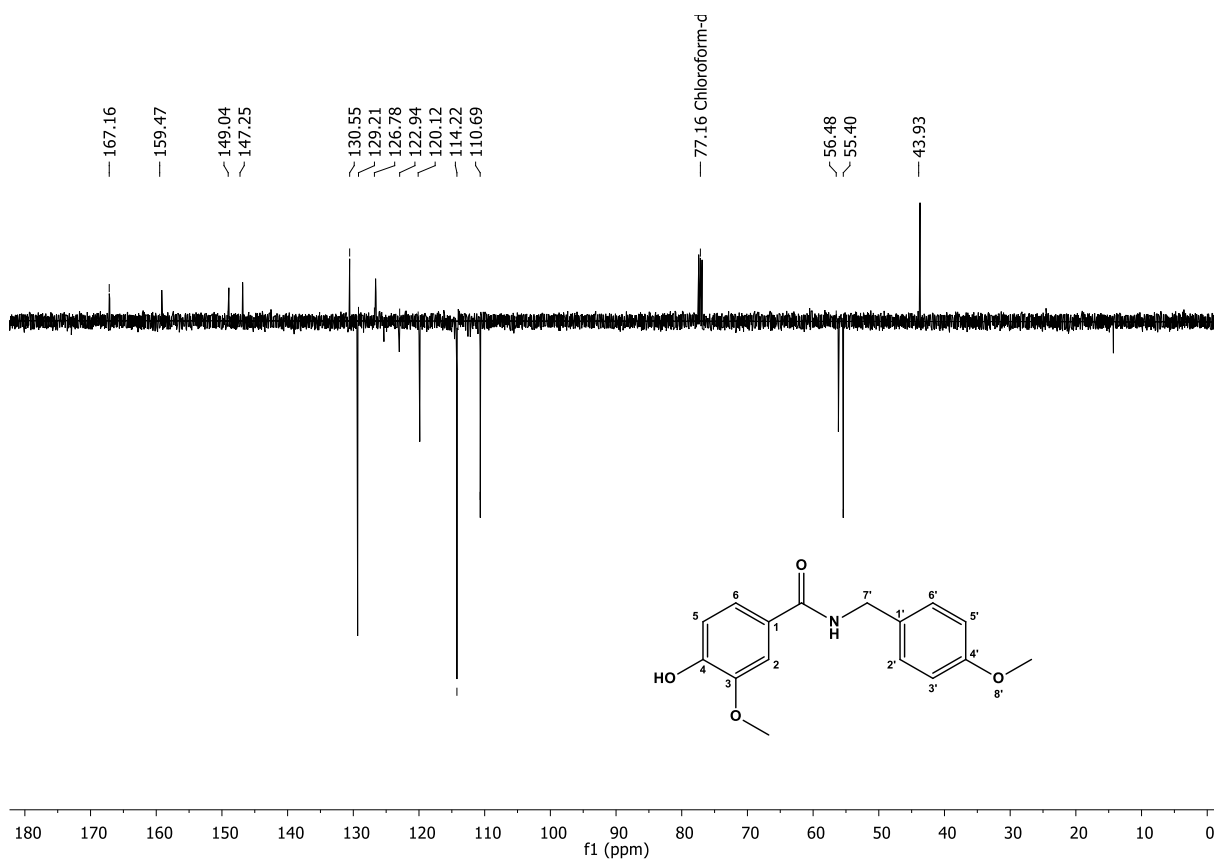
Espectro 29. Espectro de RMN ^1H de 4-Hidroxi-3-metoxi-N-(4-metoxibenzil) benzamida (AN06), (CDCl_3 , 400 MHz).



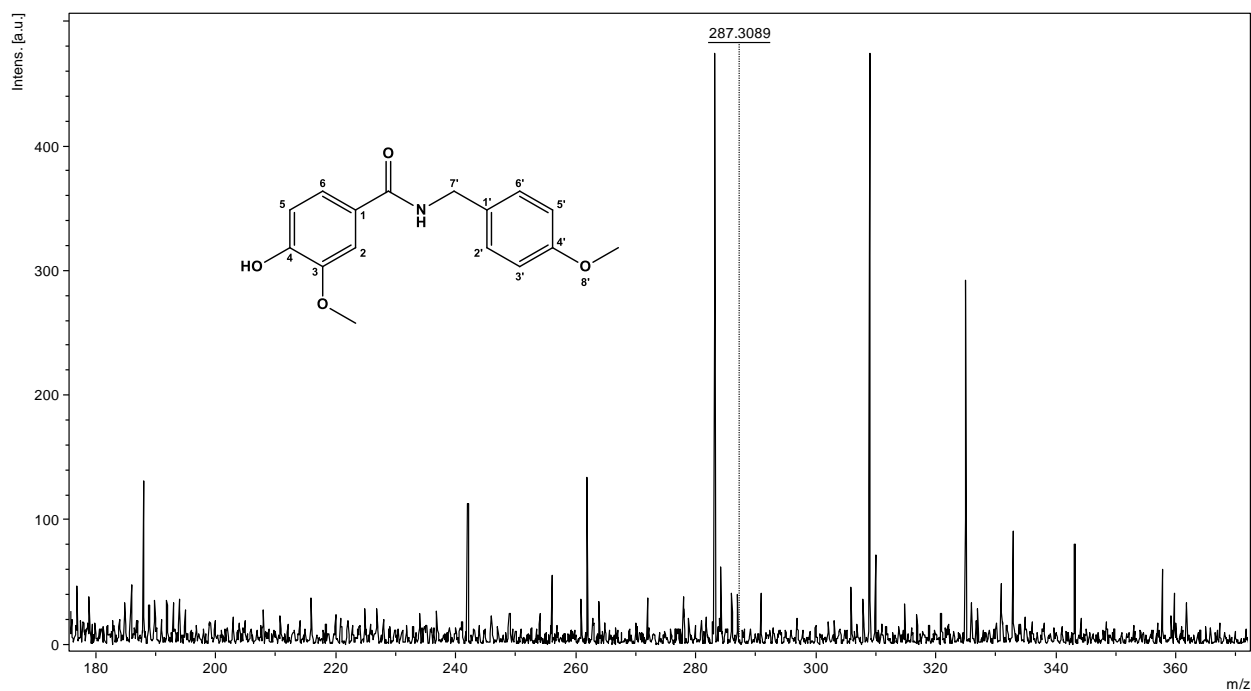
Espectro 30. Expansão do espectro de RMN ^1H de 4-Hidroxi-3-metoxi-N-(4-metoxibenzil) benzamida (AN06), (CDCl₃, 400 MHz).



Espectro 31. Expansão do espectro de RMN ^1H de 4-Hidroxi-3-metoxi-N-(4-metoxibenzil) benzamida (AN06), (CDCl₃, 400 MHz).

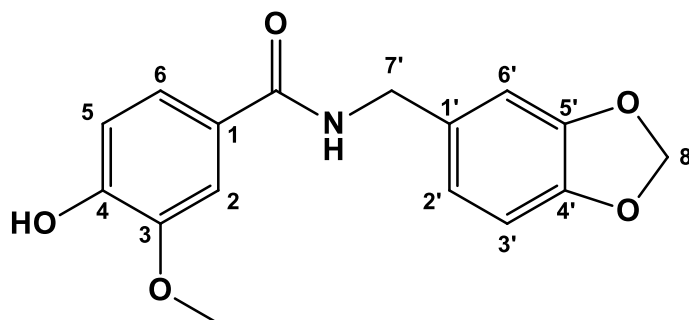


Espectro 32. Espectro de RMN ^{13}C -APT de 4-Hidroxi-3-metoxi-N-(4-metoxibenzil) benzamida (AN06), (CDCl_3 , 100 MHz).



Espectro 33. Espectro de massa de alta resolução do tipo MALDI de 4-Hidroxi-3-metoxi-N-(4-metoxibenzil) benzamida (AN06).

7.3.7. N-(benzo [d] [1,3]dioxol-5-il-metil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida
(AN07)



Aspecto: Sólido amorfo amarelo escuro;

Rendimento: 29,25% (52,00 mg);

Ponto de Fusão: 130-132 °C;

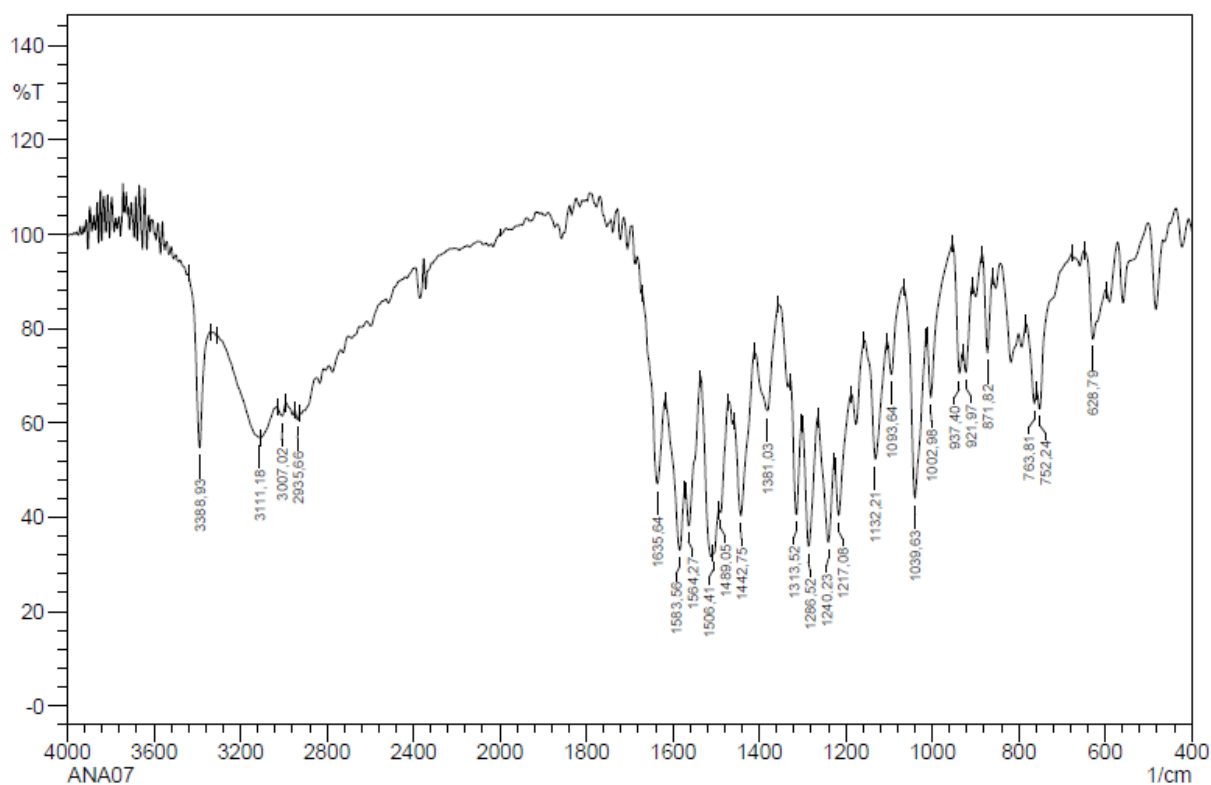
Tempo de reação: 24 horas;

IV ν_{max} (KBr, cm^{-1}): 3111, 2935, 1635, 1583, 1554, 1506.

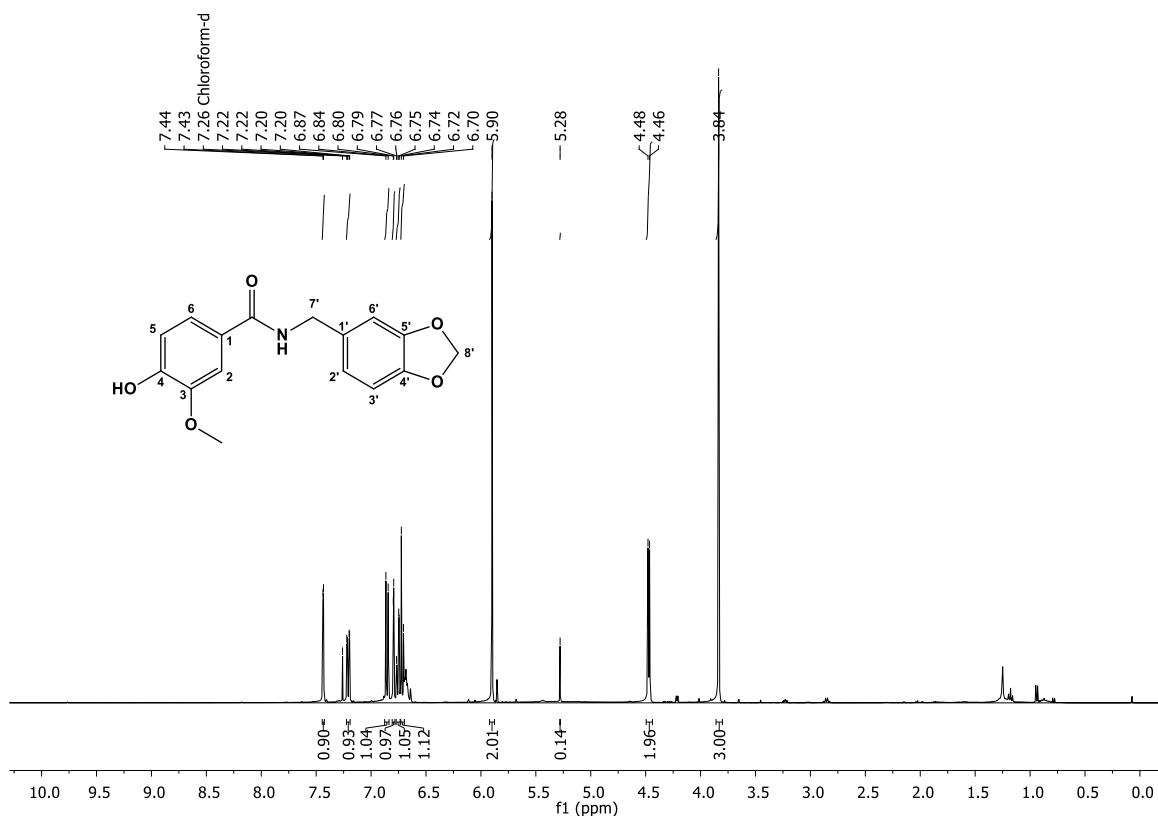
RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7,44 (*d*, $J = 2,0$ Hz, 1H, H-2); 7,21 (*dd*, $J = 6,2; 2,0$ Hz, 1H, H-6); 6,85 (*d*, $J = 8,2$ Hz, 1H, H-5); 6,80 (*d*, $J = 1,4$ Hz, 1H, H-6'); 6,76 (*dd*, $J = 6,3; 1,5$ Hz, 1H, H-2'); 6,71 (*d*, $J = 7,9$ Hz, 1H, H-3'); 5,90 (*s*, 2H, H-8'), 5,28 (*s*, 1H, OH), 4,47 (*d*, $J = 5,7$ Hz, 2H, H-7'); 3,84 (*s*, 3H, OCH_3).

RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$): δ 167,09 (C=O); 149,01 (C-4); 148,05 (C-3); 147,12 (C-4'); 146,84 (C-5'); 132,35 (C-1'); 126,52 (C-1); 121,27 (C-2'); 119,88 (C-6); 114,10 (C-5); 110,68 (C-2); 108,60 (C-6'); 108,44 (C-3'); 101,18 (C-8'); 56,19 (OCH_3); 44,08 (C-7').

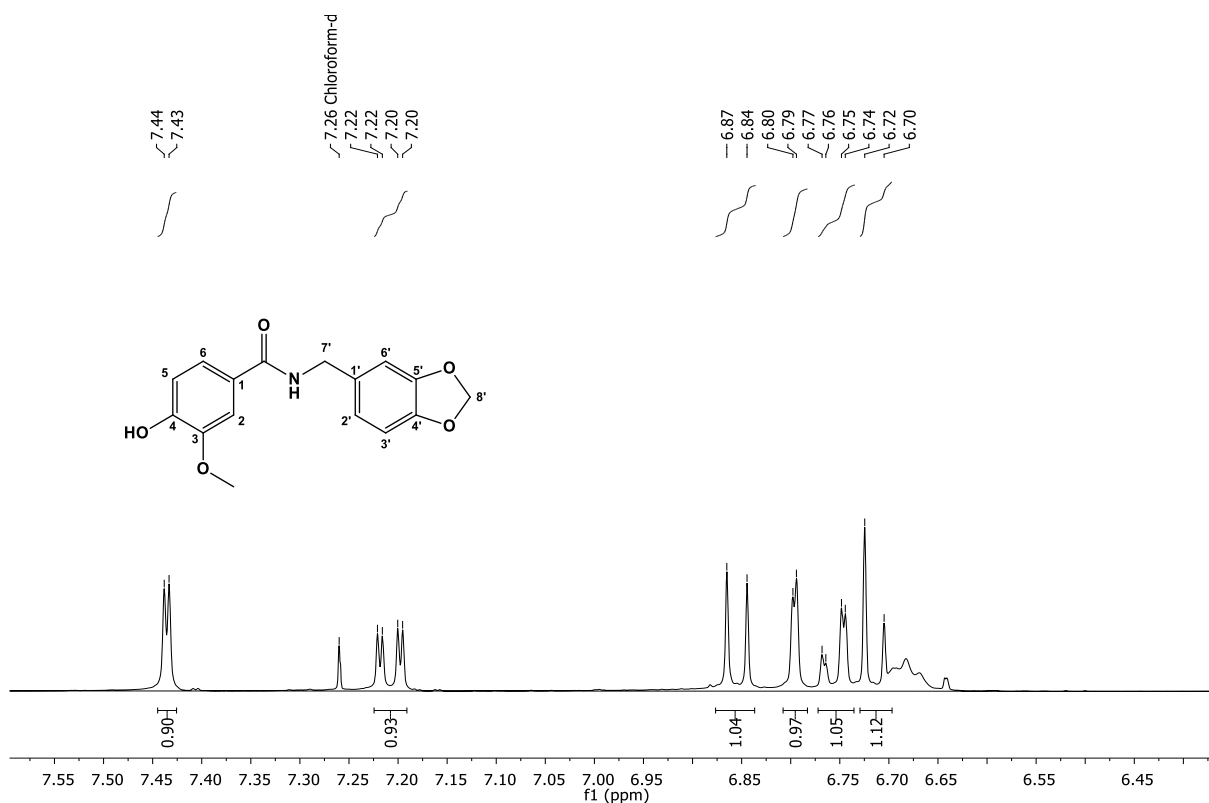
EMAR (MALDI) calculado para $C_{16}H_{15}NO_5$ $[M]^+$: 301,2914; encontrado 301,2901.



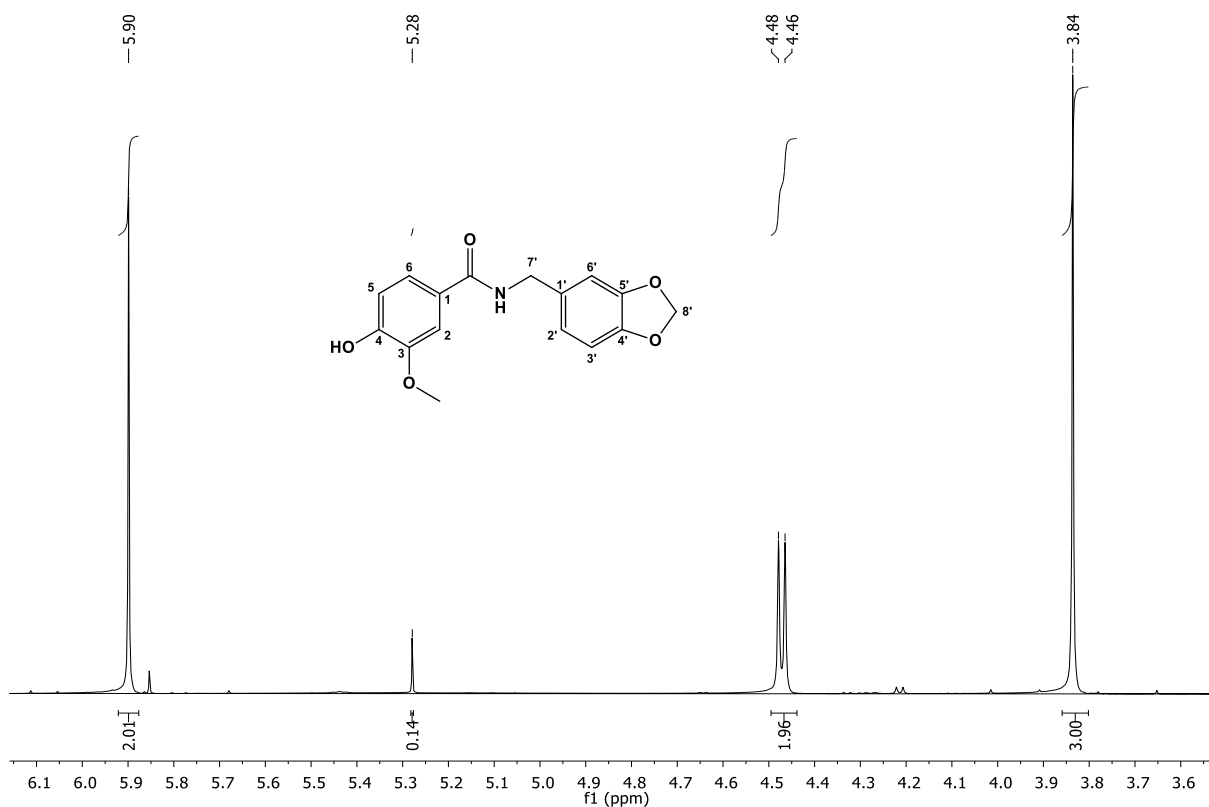
Espectro 34. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de N-(Benzo [d] [1,3] dioxol-5-ilmetil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN07).



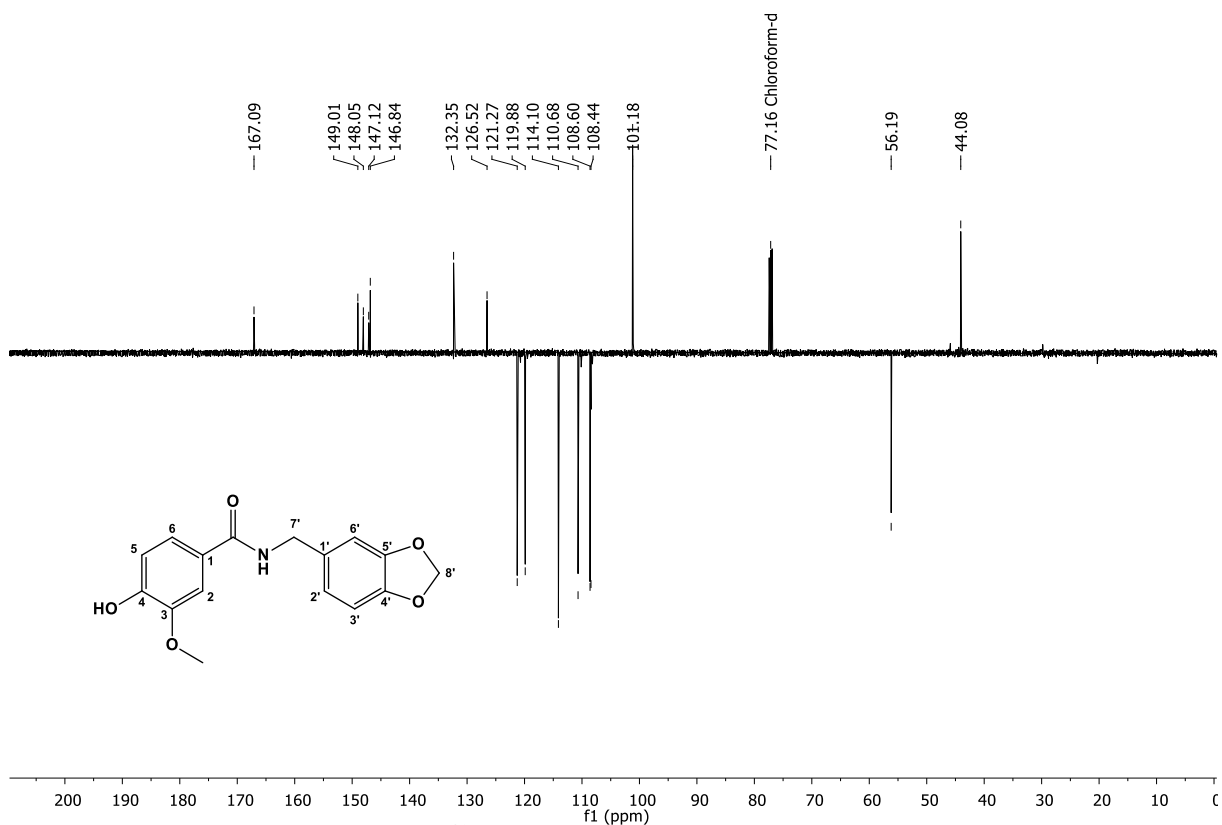
Espectro 35. Espectro de RMN ^1H de N-(Benzo [d] [1,3] dioxol-5-ilmetil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN07), (CDCl_3 , 400 MHz).



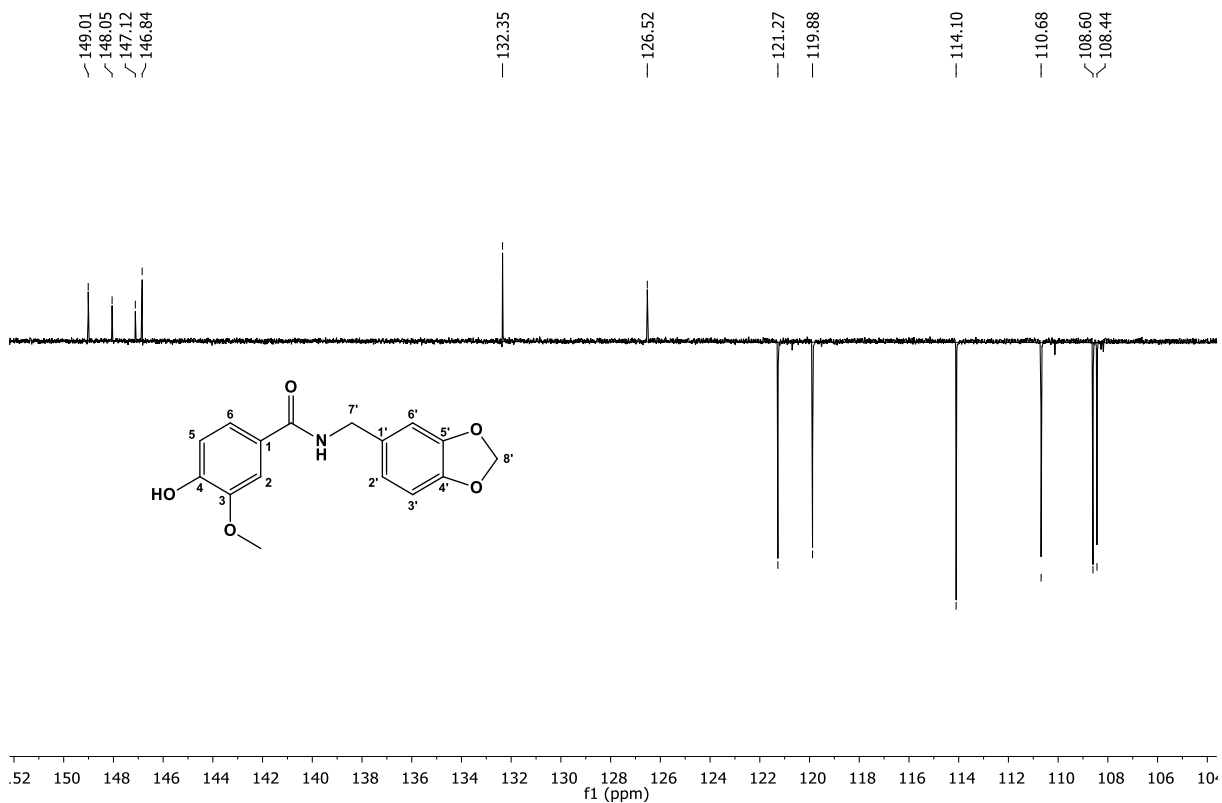
Espectro 36. Expansão espectro de RMN ^1H de N-(benzo [d] [1,3] dioxol-5-ilmetil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN07), (CDCl_3 , 400 MHz).



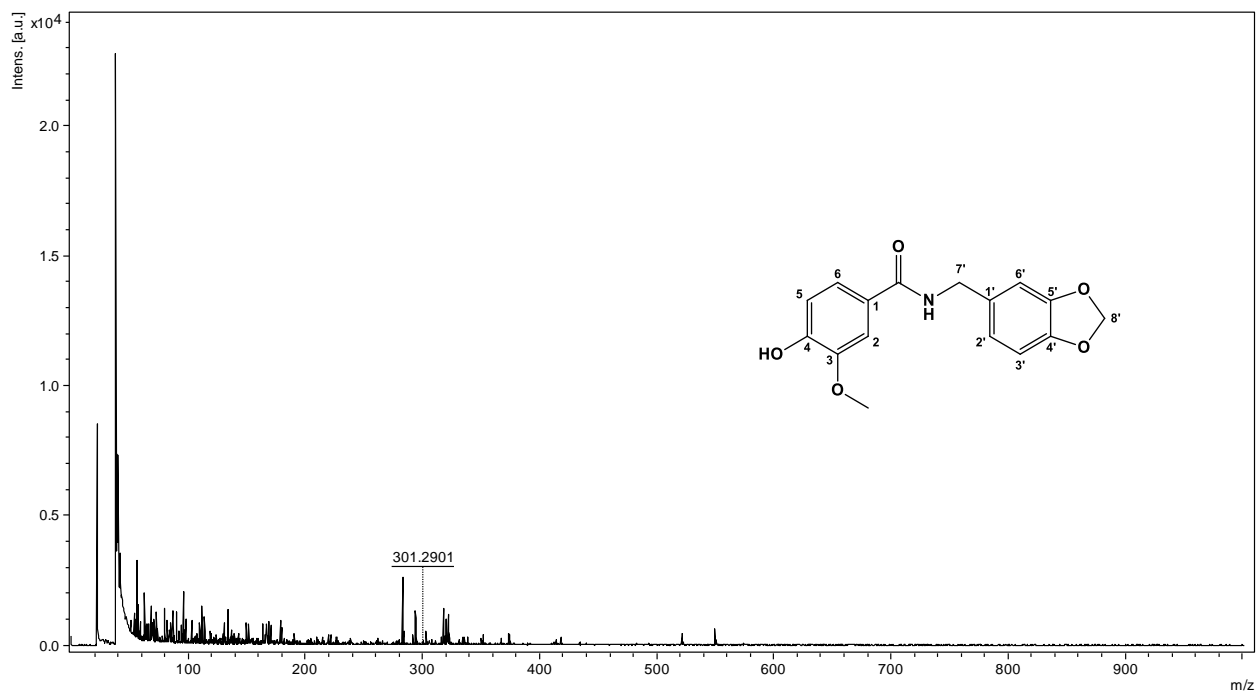
Espectro 37. Expansão espectro de RMN ^1H de N-(Benzo [d] [1,3] dioxol-5-ilmetil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN07), (CDCl_3 , 400 MHz).



Espectro 38. Espectro de RMN ^{13}C -APT de N-(Benzo [d] [1,3] dioxol-5-ilmetil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN07), (CDCl_3 , 100 MHz).

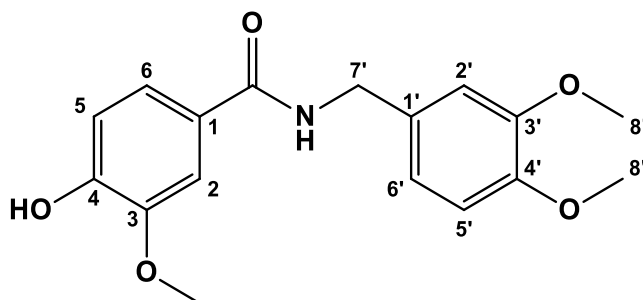


Espectro 39. Expansão espectro de RMN ^{13}C -APT de N-(Benzo [d] [1,3] dioxol-5-ilmetil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN07), (CDCl_3 , 100 MHz).



Espectro 40. Espectro de massa de alta resolução tipo MALDI de N-(benzo [d] [1,3]dioxol-5-ilmetil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN07).

7.3.8. N-(3,4-dimetoxibenzil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN08)



Aspecto: Óleo amarelo claro;

Rendimento: 30,44% (57,00 mg);

Tempo de reação: 24 horas;

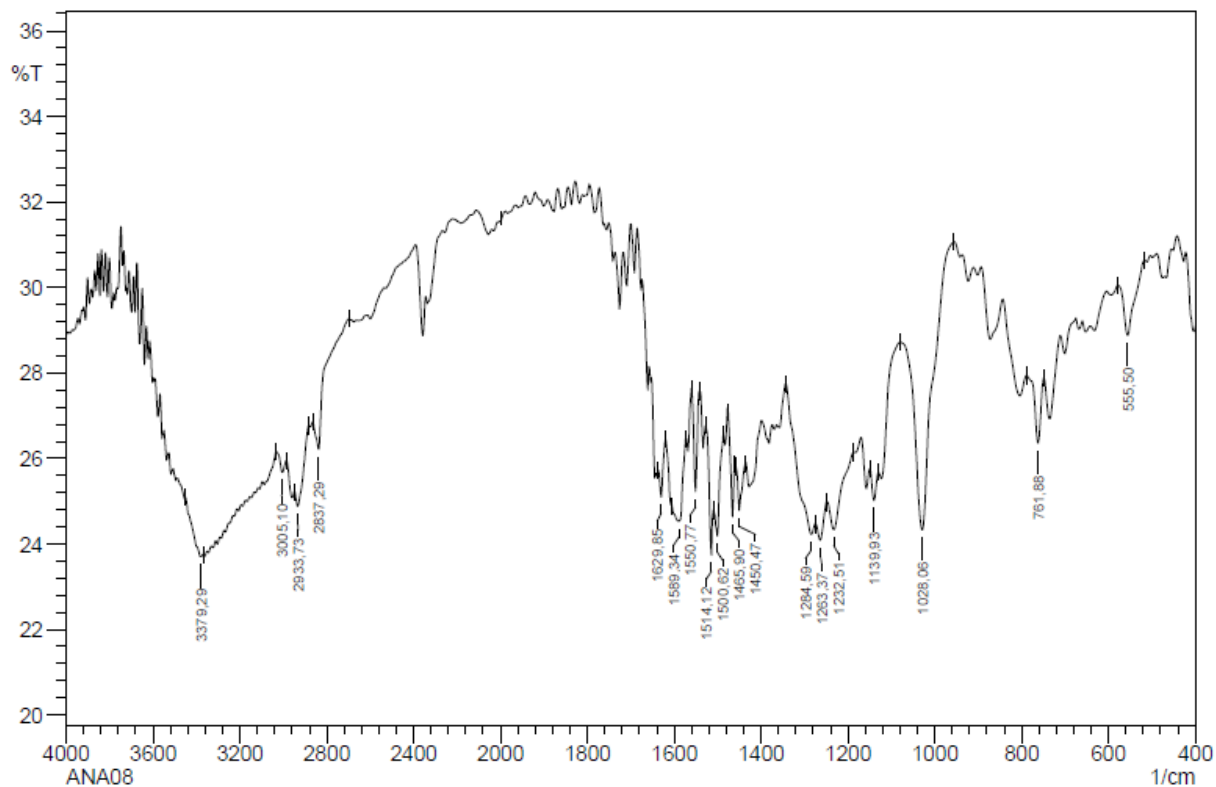
IV ν_{\max} (KBr, cm^{-1}): 3379, 2983, 2837, 1629, 1589, 1550, 1514.

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 7,47 (*d*, $J = 1,8$ Hz, 1H, H-2); 7,20 (*dd*, $J = 6,3; 1,9$ Hz, 1H, C-6); 6,88 (*q*, $J = 6,2; 2,1$ Hz, 3H, H-2', H-3', H-6'); 6,81 (*d*, $J = 7,8$ Hz, 1H, H-5); 5,29 (*s*, 1H, OH); 4,54 (*d*, $J = 5,6$ Hz, 2H, H-7'); *3,91 (*s*, 3H, OCH_3); *3,85 (*d*, $J = 3,1$ Hz, 6H, H-8', H-8'').

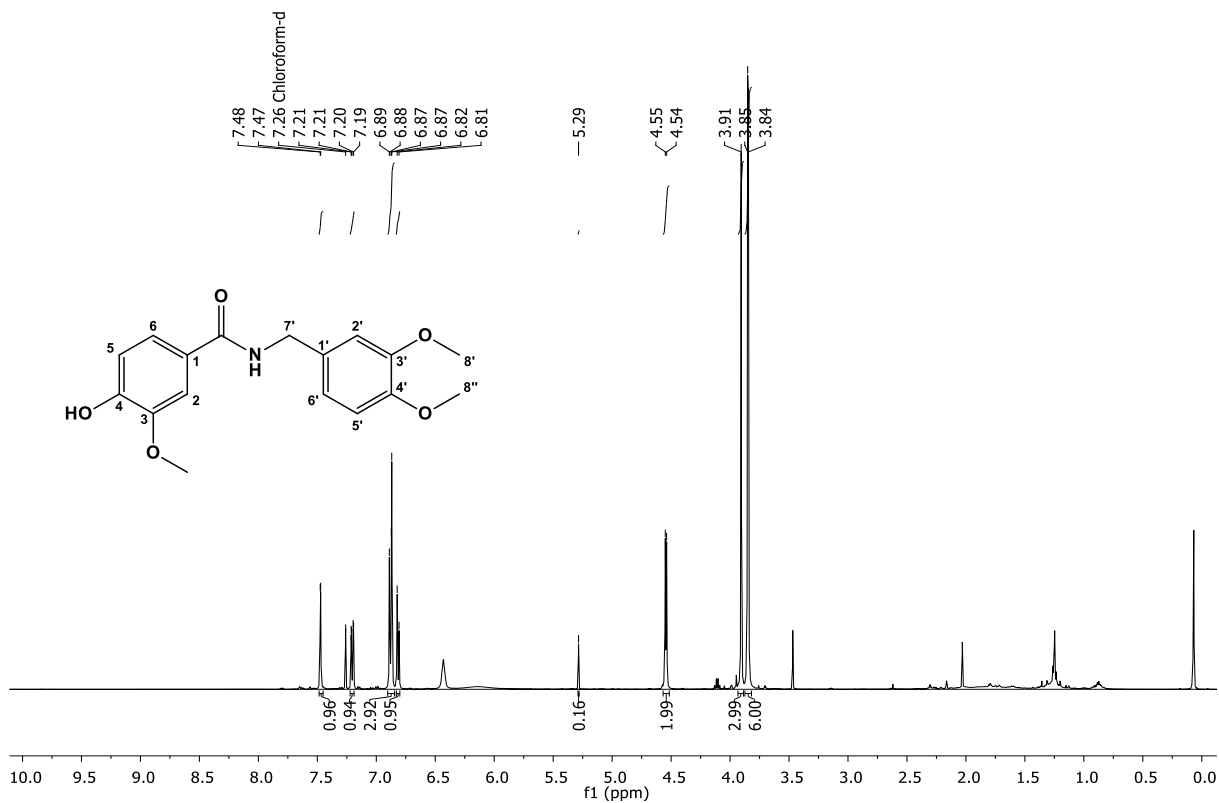
RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3): δ 167,03 (C=O); 149,33 (C-4); 148,96 (C-5'); 148,68 (C-3); 146,83 (C-4'); 131,06 (C-1'); 126,64 (C-1); 120,35 (C-2'); 119,84 (C-6); 114,07 (C-5); 111,53 (C-2); 111,44 (C-3'); 110,67 (C-6'); 56,21 (OCH_3); 55,08 (C-8'); 55,80 (C-8'); 44,15 (C-7').

*Sinais permutáveis.

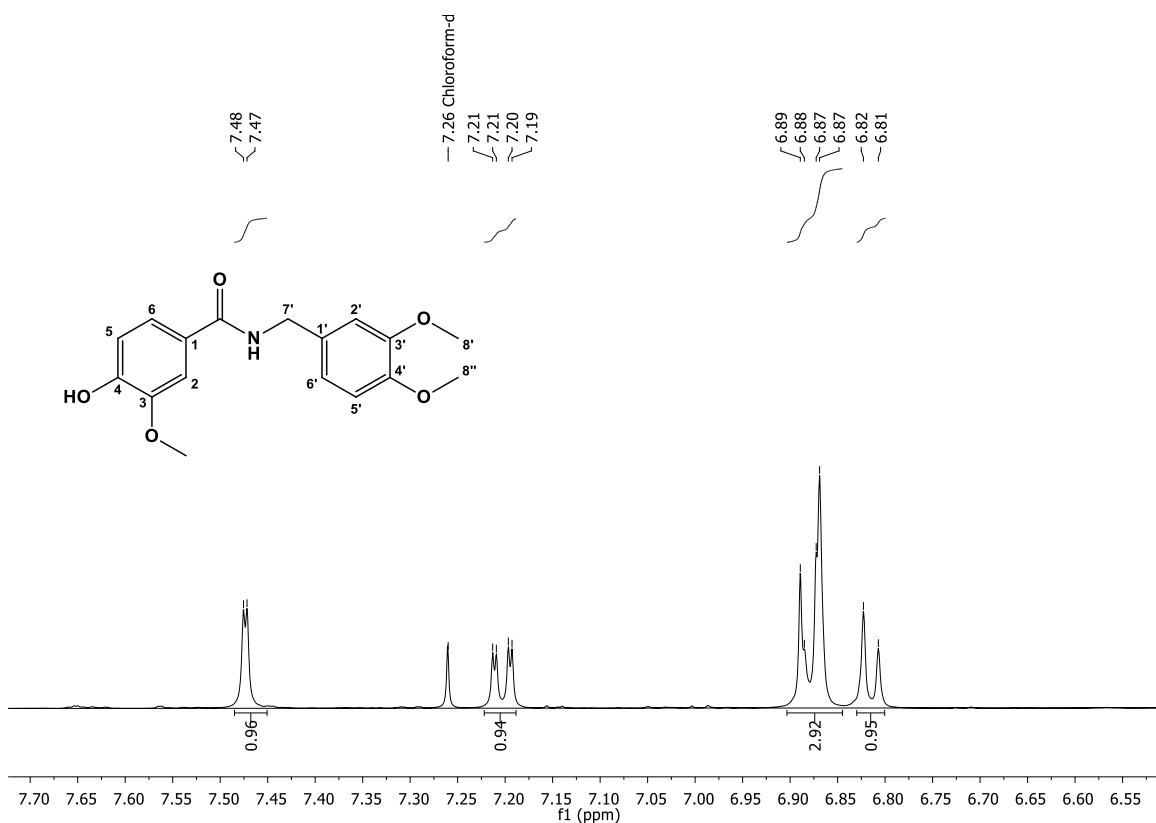
EMAR (MALDI) calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}_5$ [M] $^+$: 317,3337; encontrado 317,3380.



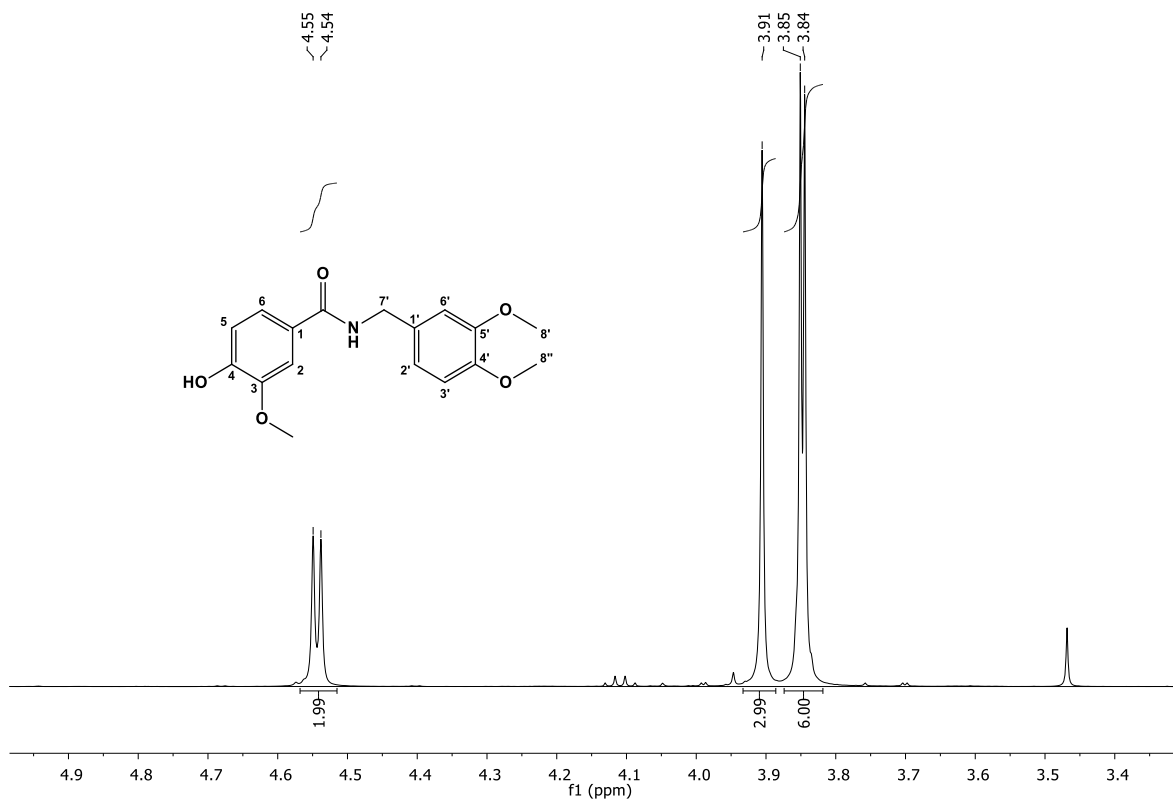
Espectro 31. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de N-(3,4-dimetoxibenzil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN08).



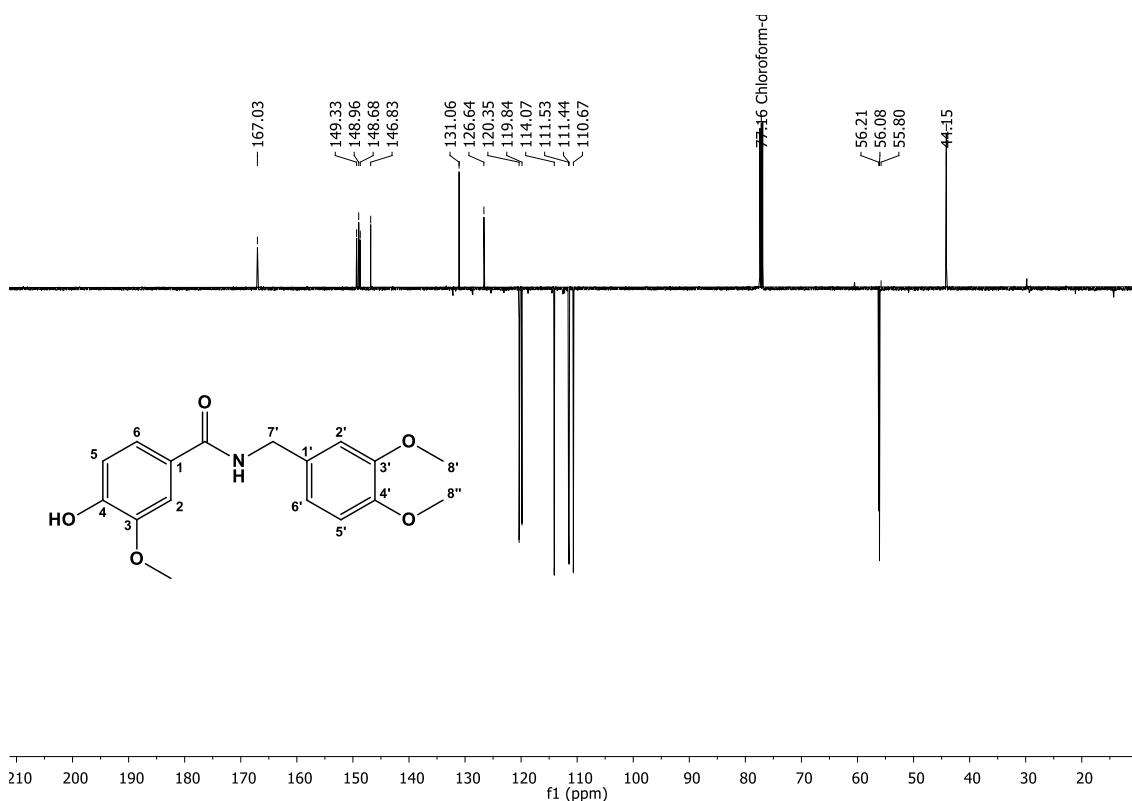
Espectro 42. Espectro de RMN ^1H de N-(3,4-dimetoxibenzil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN08), (CDCl_3 , 500 MHz).



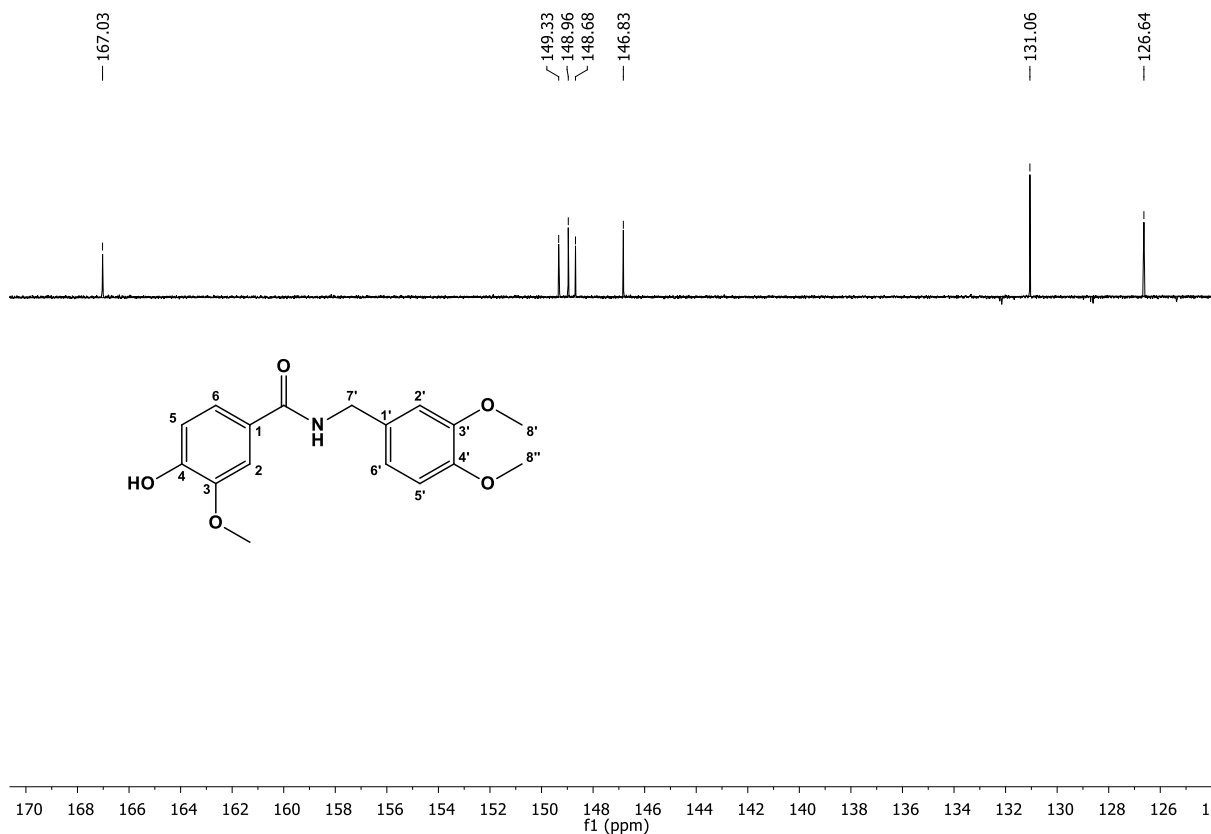
Espectro 43. Expansão espectro de RMN ^1H de N-(3,4-dimetoxibenzil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN08), (CDCl_3 , 500 MHz).



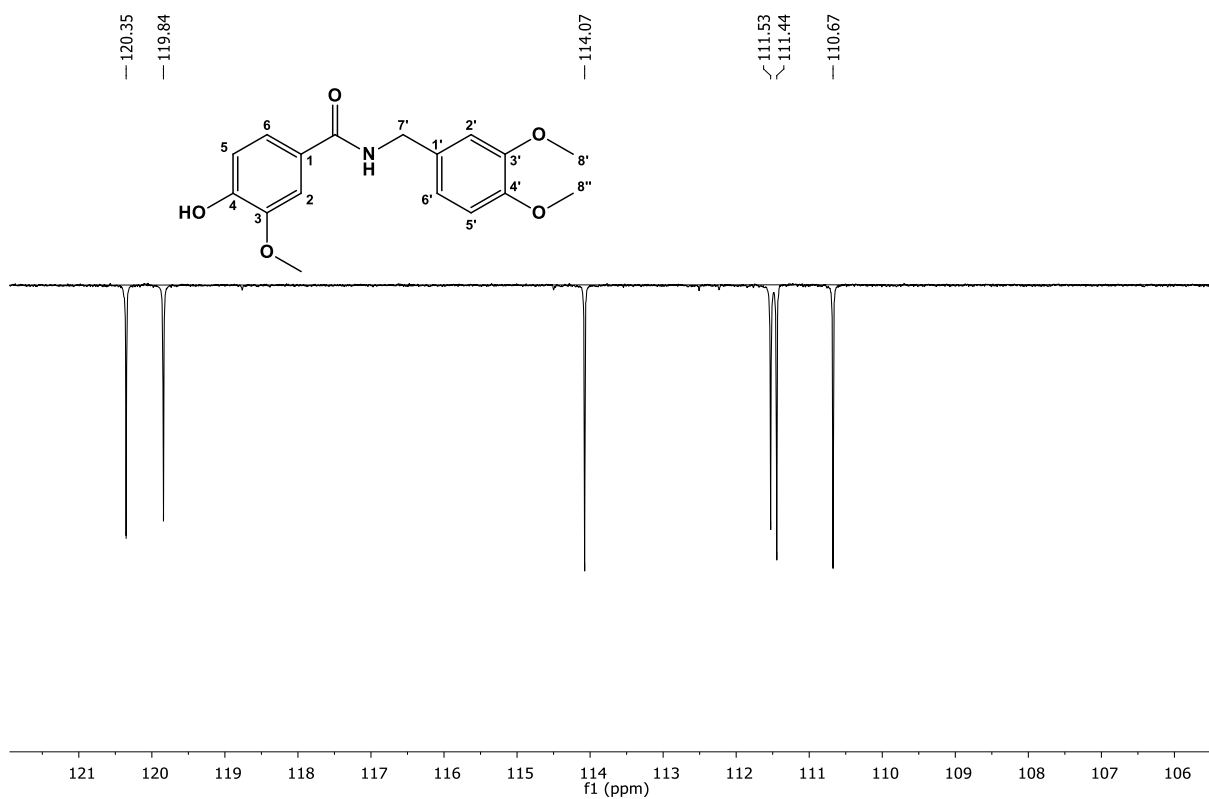
Espectro 44. Expansão espectro de RMN ^1H de N-(3,4-dimetoxibenzil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN08), (CDCl_3 , 500 MHz).



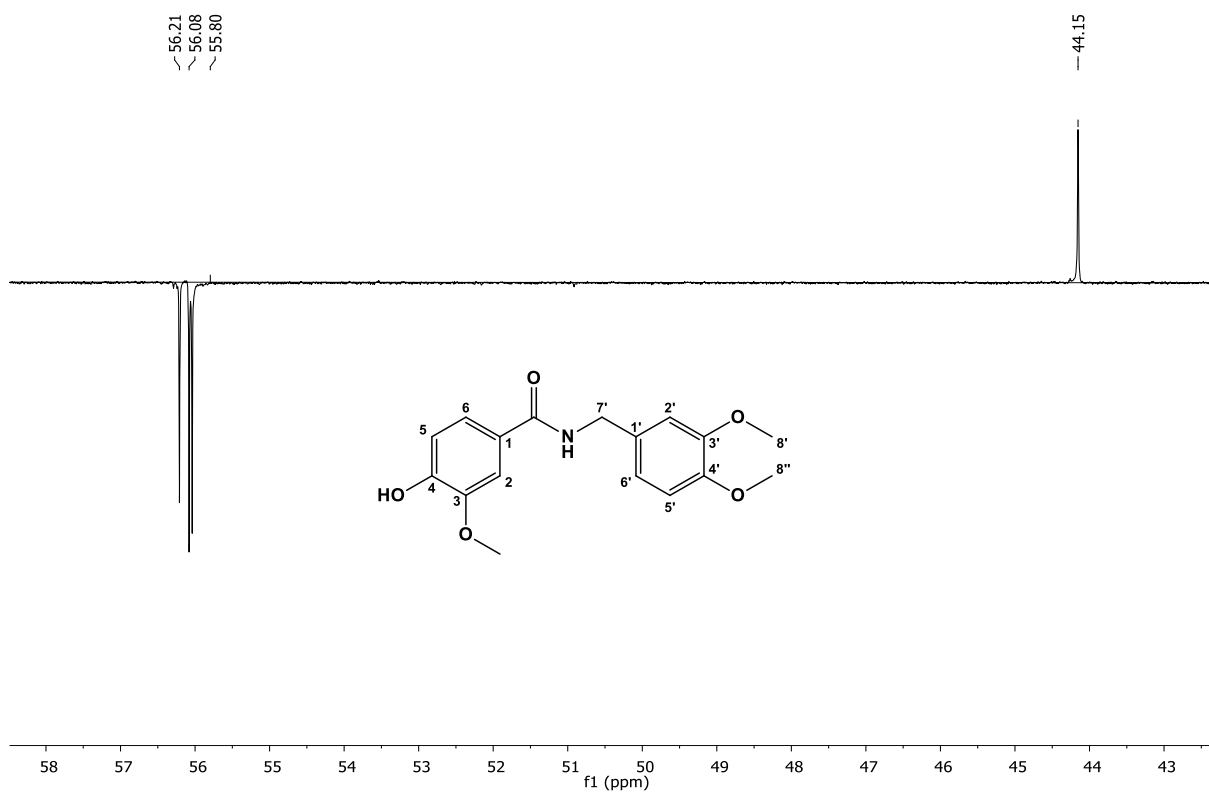
Espectro 45. Espectro de RMN ^{13}C -APT de N-(3,4-dimetoxibenzil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN08), (CDCl_3 , 125 MHz).



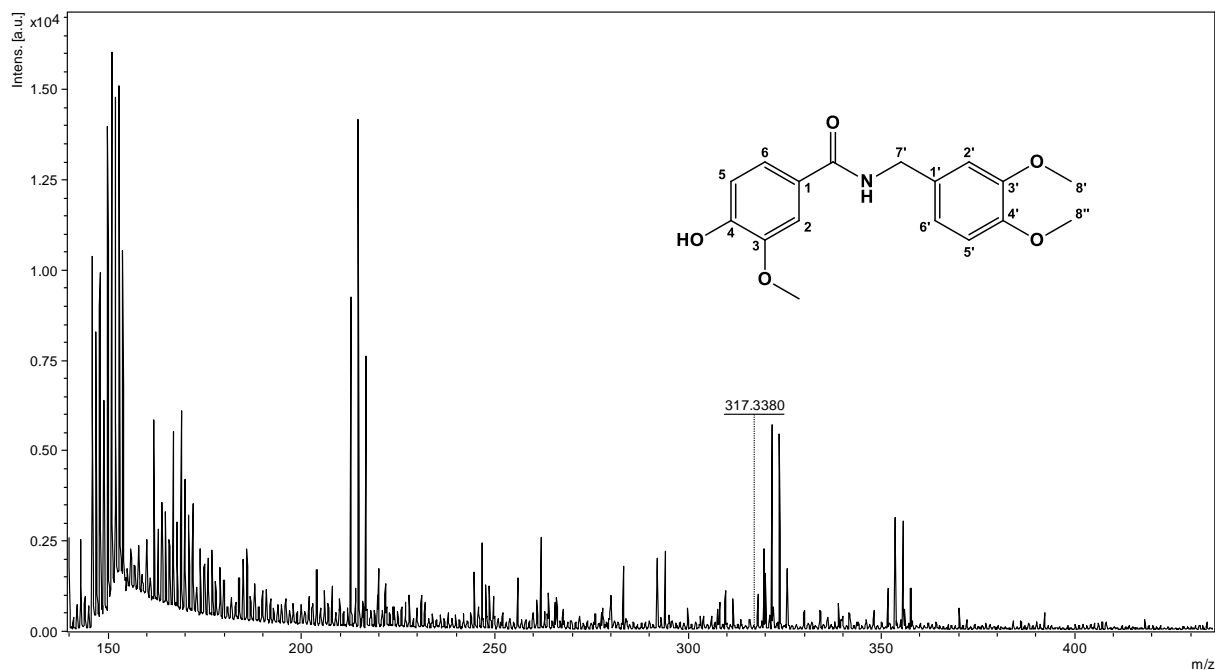
Espectro 46. Expansão espectro de RMN ^{13}C -APT de N-(3,4-dimetoxibenzil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN08), (CDCl_3 , 125 MHz).



Espectro 47. Expansão espectro de RMN ^{13}C -APT de N-(3,4-dimetoxibenzil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN08), (CDCl_3 , 125 MHz).

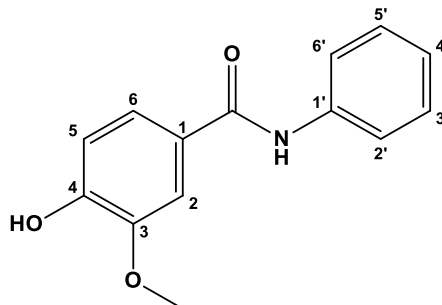


Espectro 48. Expansão espectro de RMN ^{13}C -APT de N-(3,4-dimetoxibenzil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN08), (CDCl_3 , 125 MHz).



Espectro 49. Espectro de massa de alta resolução tipo MALDI de N-(3,4-dimetoxibenzil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN08).

7.3.9. 4-Hidroxi-3-metóxi-N-fenilbenzamida (AN09)



Aspecto: Óleo marrom claro;

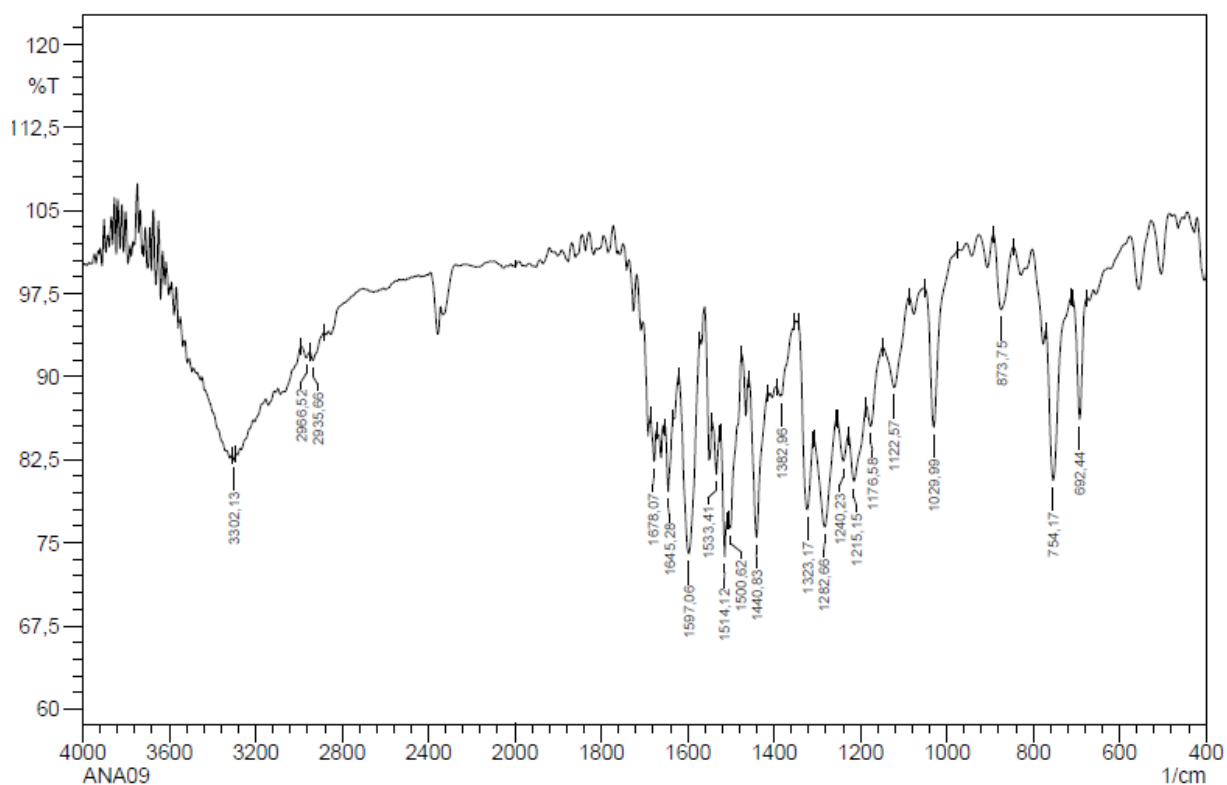
Rendimento: 68,75% (93,40 mg)

Tempo de reação: 8 horas;

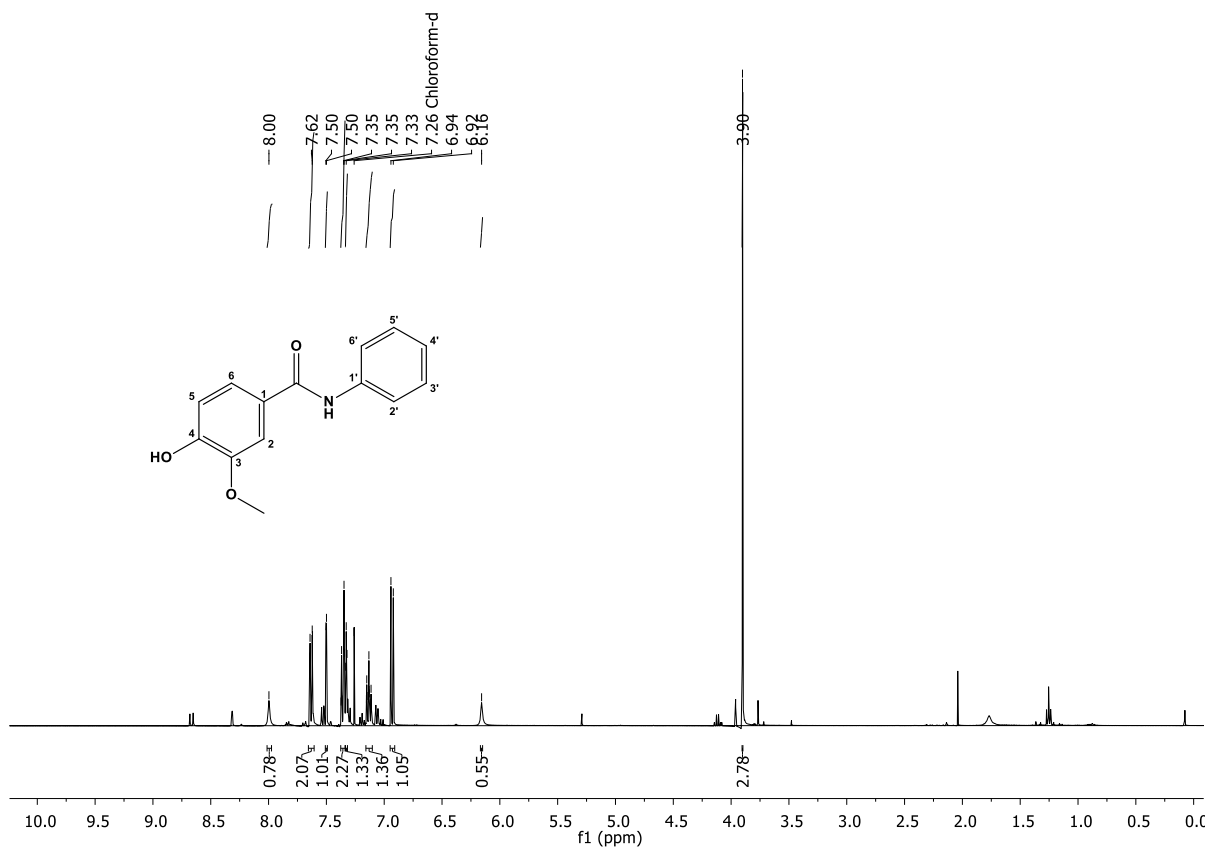
IV ν_{\max} (KBr, cm^{-1}): 3300, 2966, 2935, 1645, 1597, 1533, 1514.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): 8,00 (s, 1H, NH); 7,63 (dd, $J = 8,6; 1,1$ Hz, 2H, H-2', H-6'); 7,50 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, H-2); 7,36 (dt, $J = 3,0; 1,9$ Hz, 2H, H-3', H-5'); 7,33 (t, $J = 2,3$ Hz, 1H, H-6); 7,16 – 7,10 (m, 1H, H-4'); 6,93 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, H-5); 6,16 (s, 1H, OH); 3,90 (s, 3H, OCH_3).

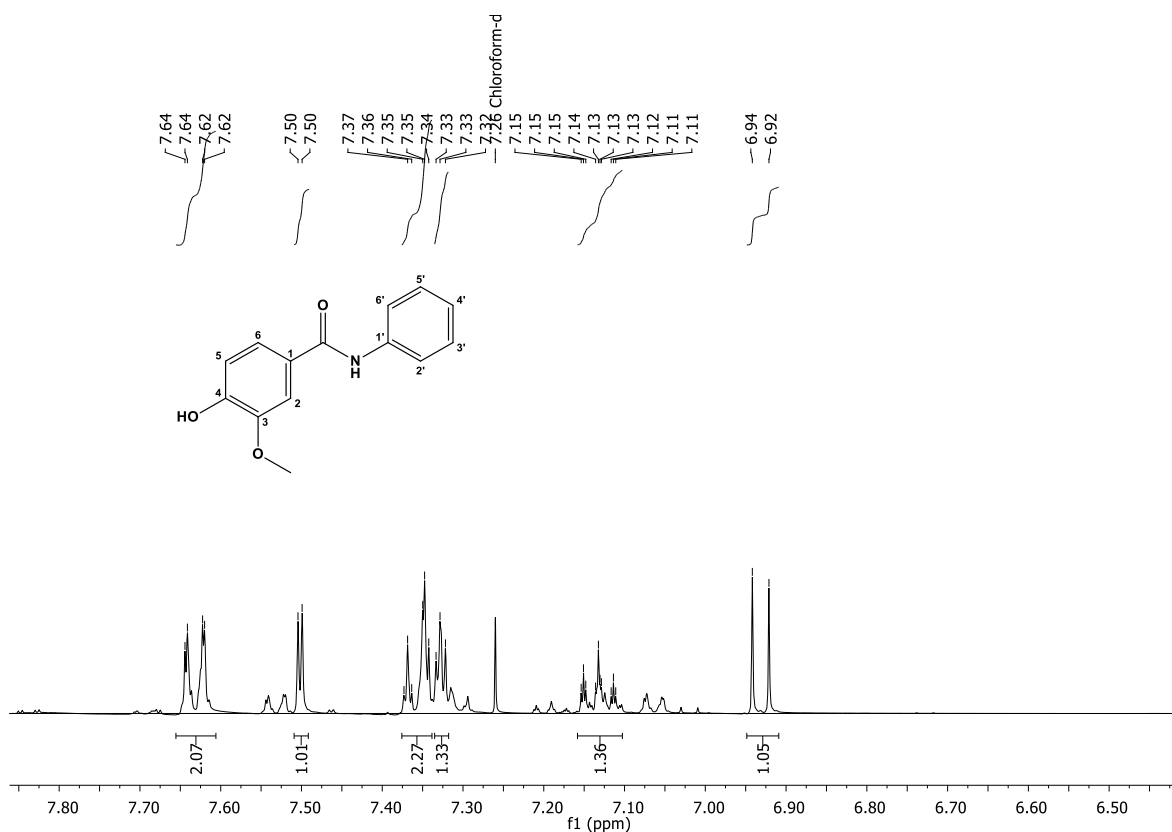
RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 165,60 (C=O); 149,23 (C-4); 146,95 (C-3); 138,20 (C-1'); 129,88 (C-6'); 129,17 (C-3', C-5'); 127,10 (C-1); 124,53 (C-2', C-4'); 120,43 (C-6); 114,14 (C-5); 110,72 (C-2); 56,27 (OCH_3).



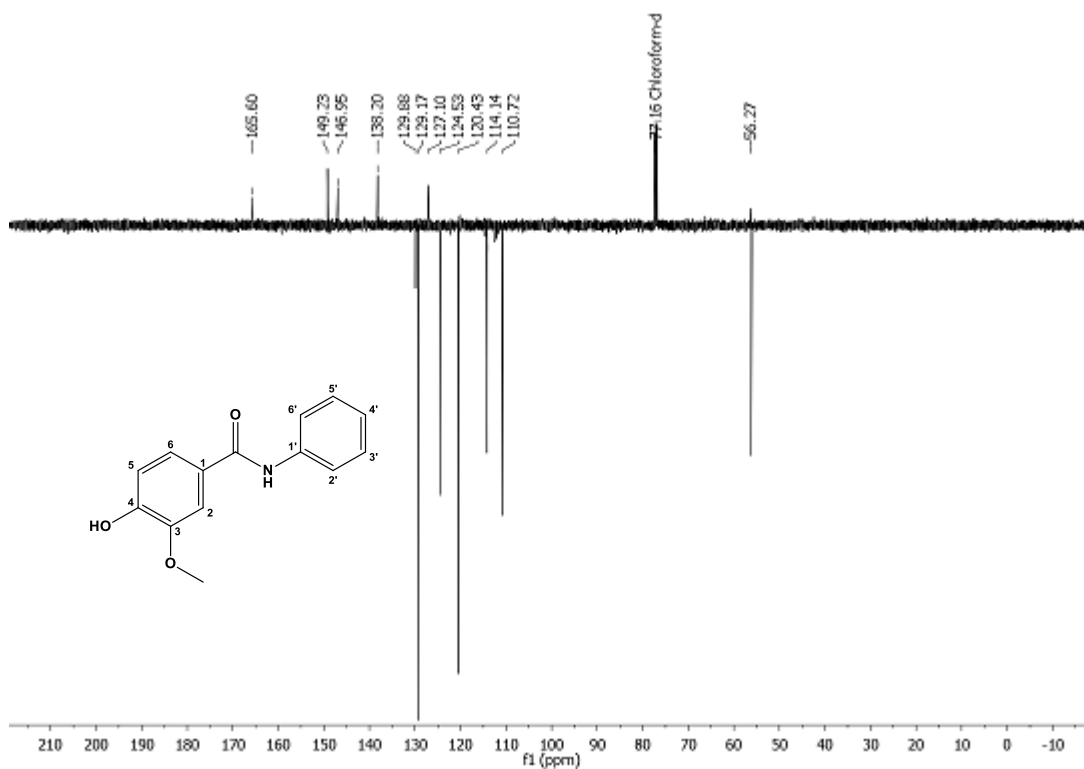
Espectro 50. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de 4-Hidroxi-3-metóxi-N-fenilbenzamida (AN09).



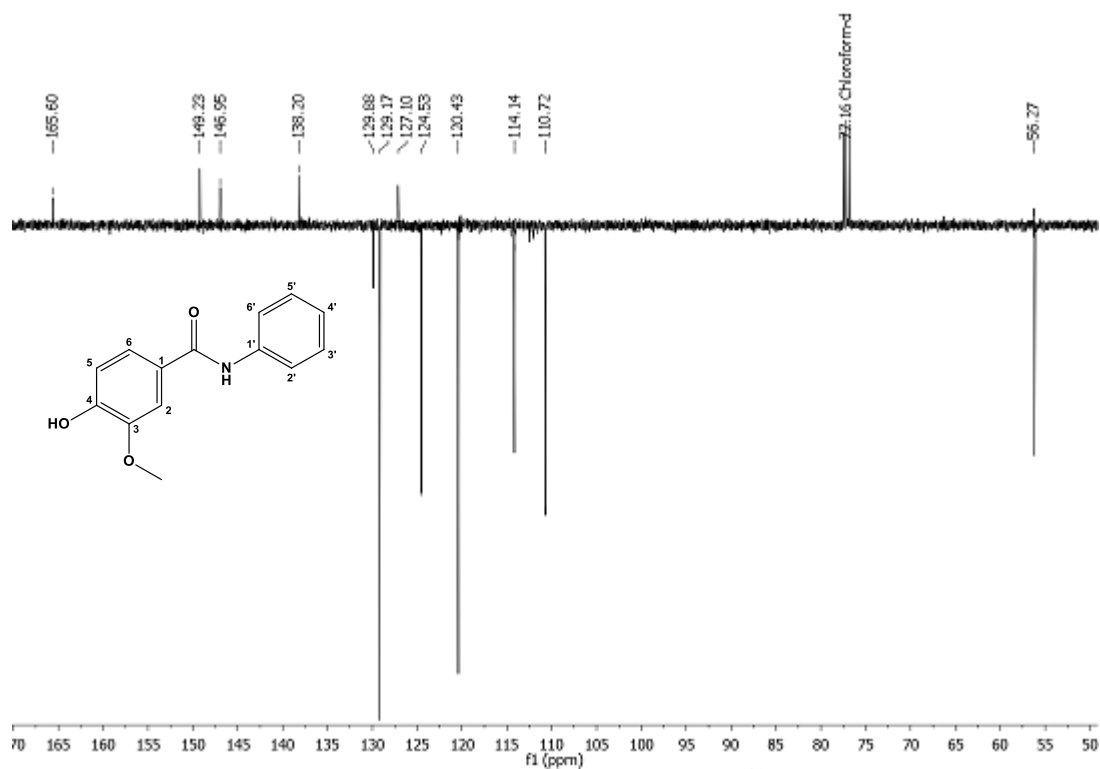
Espectro 51. Espectro de RMN ^1H de 4-Hidroxi-3-metóxi-N-fenilbenzamida (AN09), (CDCl_3 , 125 MHz).



Espectro 52. Expansão do espectro de RMN ¹H de 4-Hidroxi-3-metóxi-N-fenilbenzamida (AN09), (CDCl₃, 125 MHz).

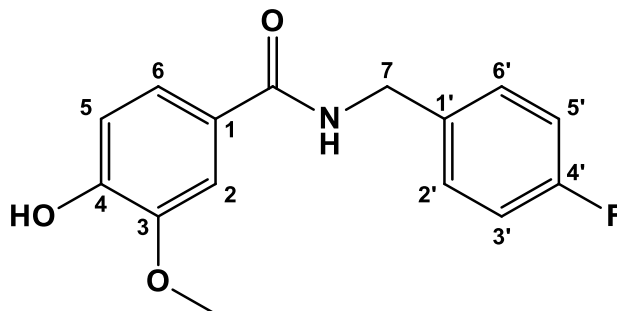


Espectro 53. Espectro de RMN ¹³C-APT de 4-Hidroxi-3-metóxi-N-fenilbenzamida (AN09), (CDCl₃, 125 MHz).



Espectro 54. Expansão do Espectro de RMN ^{13}C -APT de 4-Hidroxi-3-metóxi-N-fenilbenzamida (AN09), (CDCl_3 , 125 MHz).

7.3.10. N-(4-fluorbenzyl)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN10)



Aspecto: Sólido amorfo branco;

Rendimento: 30,41% (49,40 mg)

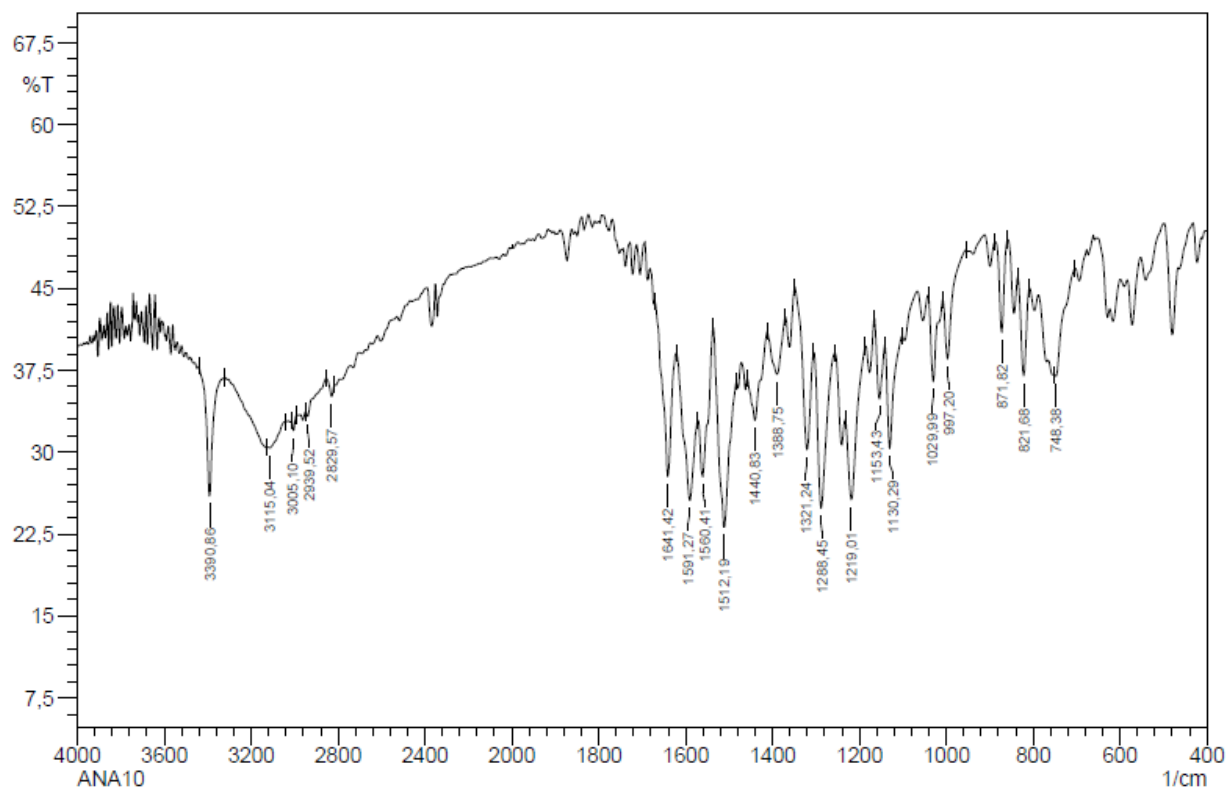
Ponto de Fusão: 161-165°C;

Tempo de reação: 8 horas;

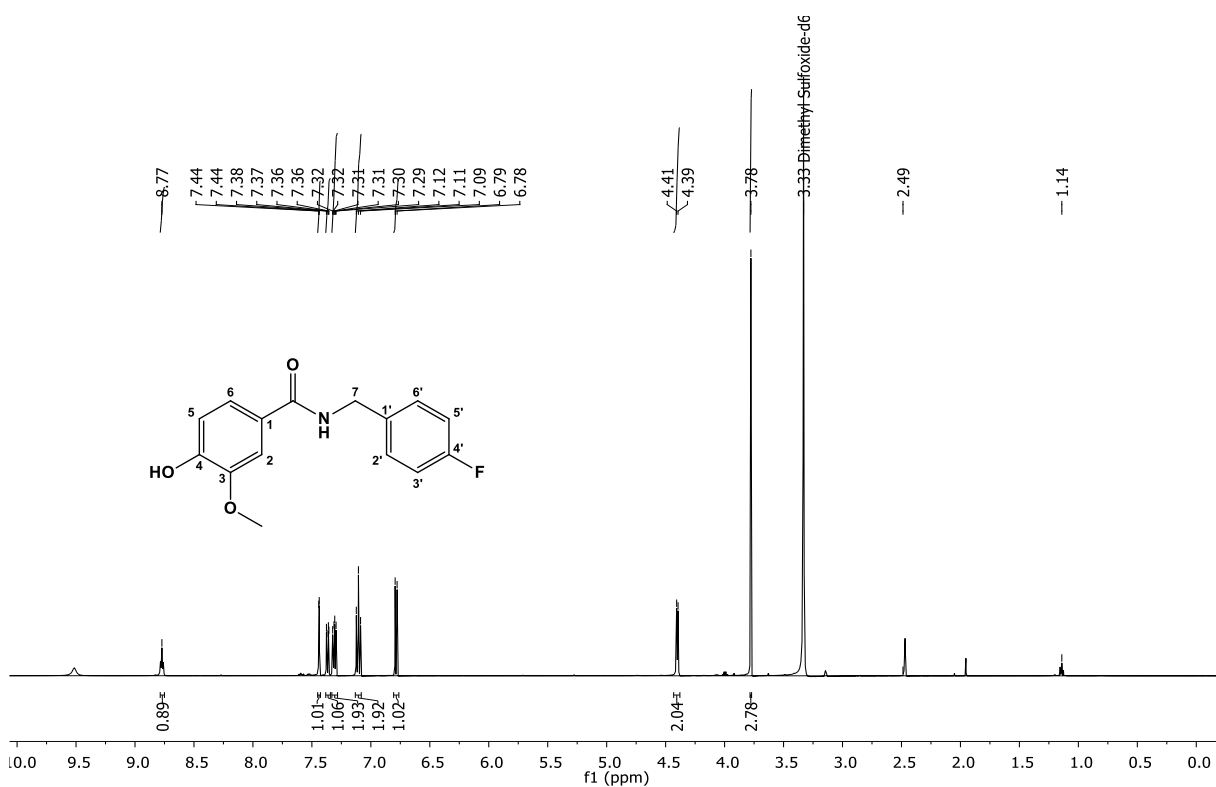
IV ν_{max} (KBr, cm^{-1}): 3115, 2939, 2829, 1641, 1591, 1560, 1512.

RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6): δ 8,77 (s, 1H, NH); 7,44 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, H-2); 7,38 (dd, $J = 8,3; 2,1$ Hz, 1H, H-6); 7,32 – 7,29 (m, 2H, H-2', H-6'); 7,11 (t, $J = 9,0$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 6,79 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, H-5); 4,41 (d, $J = 6,0$ Hz, 2H, H-7'); 3,78 (s, 3H, OCH₃).

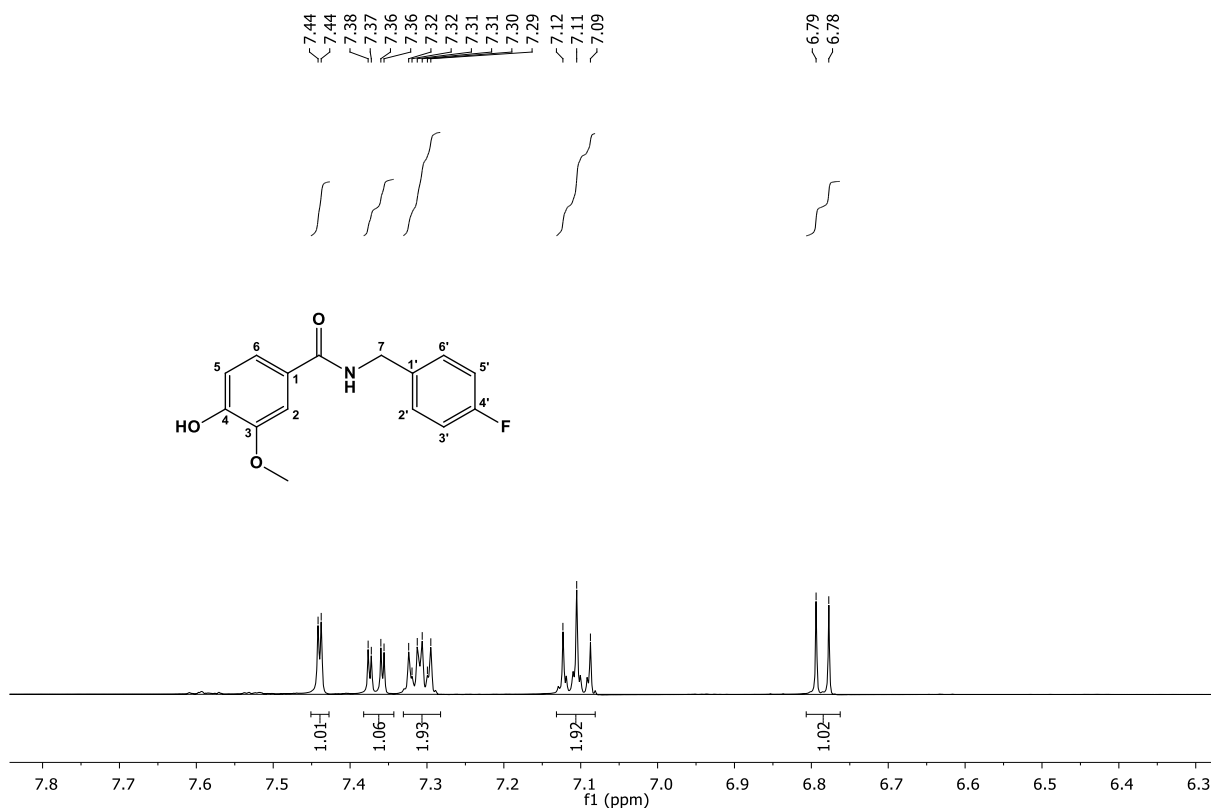
RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6): δ 166,05 (C=O); 162,20 (C-F); 160,30 (C-4'); 149,53 (C-4); 147,25 (C-3); 136,22 (C-1'); 129,20 (C-2'); 129,14 (C-6'); 125,23 (C-1); 120,81 (C-6); 115,01 (C-5); 114,84 (C-3', C-5'); 111,33 (C-2); 55,93 (OCH₃); 41,98 (C-7').



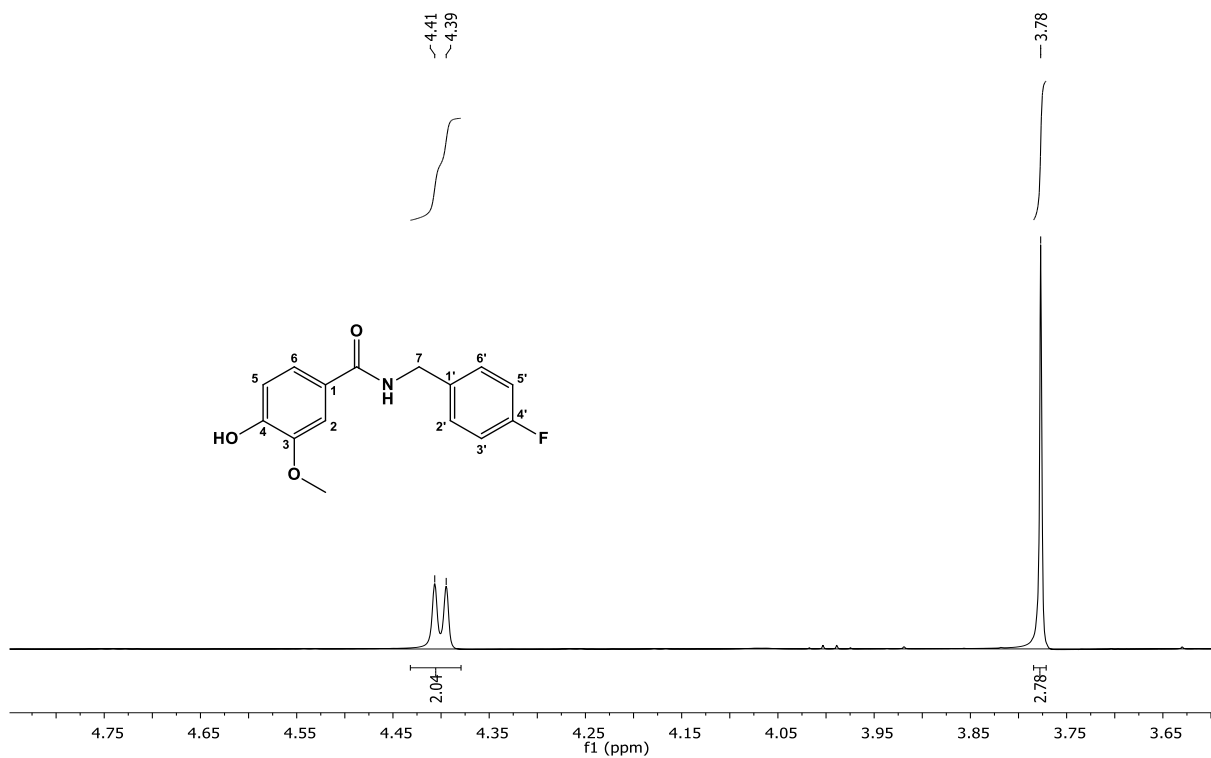
Espectro 55. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de N-(4-fluorobenzil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN10).



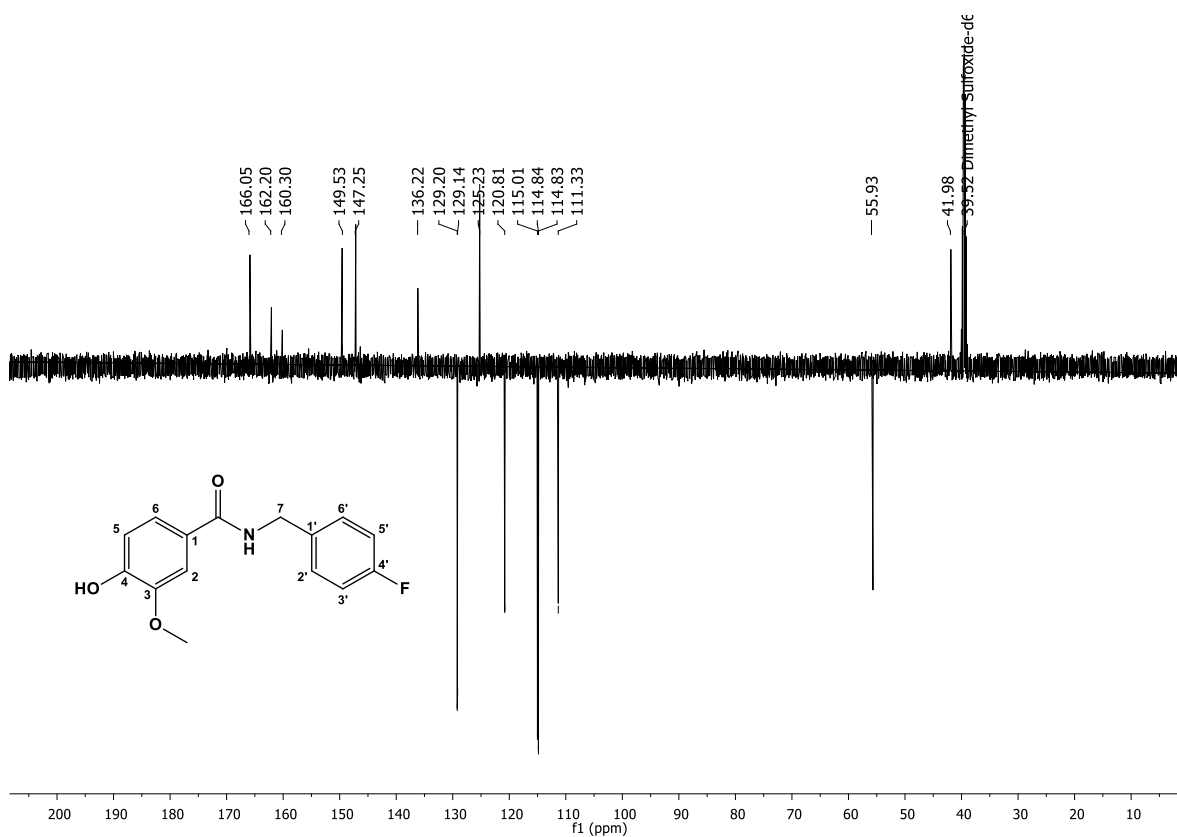
Espectro 56. Espectro de RMN ^1H de N-(4-fluorobenzil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN10), (DMSO-d_6 , 500 MHz).



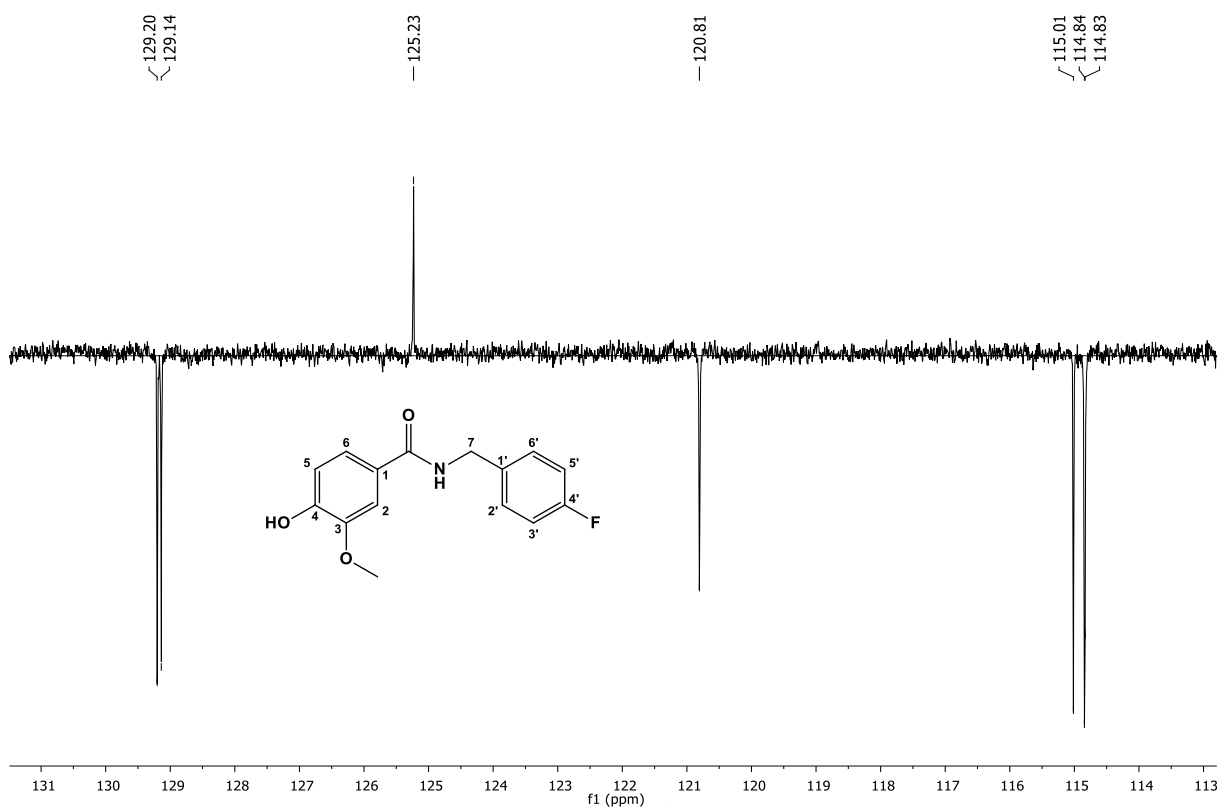
Espectro 57. Expansão espectro de RMN ^1H de N-(4-fluorobenzil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN10), (DMSO- d_6 , 500 MHz).



Espectro 58. Expansão espectro de RMN ^1H de N-(4-fluorobenzil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN10), (DMSO- d_6 , 400 MHz).



Espectro 59. Espectro de RMN ^{13}C -APT de N-(4-fluorobenzil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN10), (DMSO- d_6 , 125 MHz).



Espectro 60. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT de N-(4-fluorobenzil)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida (AN10), (DMSO- d_6 , 125 MHz).

8. REFERÊNCIAS

ÁLVARES, C. A.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. Vulvovaginal candidiasis: susceptibility factors of the host and virulence of the yeasts. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 5, p. 319-327, 2007.

ALVES, M. J.; FERREIRA, I. C. F. R.; FROUFE, H. J. C.; ABREU, R. M. V.; MARTINS, A.; PINTADO, M. Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, n. 2, p. 346-357, 2013.

ANDRADE, E. D. Terapêutica Medicamentosa em Odontologia. 2ª ed. São Paulo: **Artes Médicas**, 2006

ARAÚJO, J. C. L. V.; LIMA, E. O.; CABALLOS, B. S. O.; FREIRE, K. R. L.; SOUZA, E. L. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microorganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Revista de Patologia Tropical**, v. 33, p. 55-64, 2004.

AZIZ, N. H.; FARAG, S. E.; MOUSA, L. A.; ABO-ZAID, M. A. Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. **Microbios**, v. 93, n. 374, p. 43-54, 1998.

BERGER, R. G. Flavours and fragrances chemistry: bioprocessing and sustainability. New York: **Springer**, p. 646, 2007.

BERRY D. J.; DIGIOVANNA, C. V.; METRICK, S. S.; MURUGAN, R. Catalysis by 4-dialkylaminopyridines. **Arkivoc**, v. 2, p. 201-226, 2001.

BLACK, J. G. Capítulo 11 – Microrganismos Eucariontes e Parasitas. In: Black J. G. **Microbiologia: Fundamentos e perspectivas**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p. 267-294, 2002.

BRENTON, A. G.; GODFREY A. R. Accurate mass measurement: terminology and treatment of data. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 21, n. 11, p. 1821-35, 2010.

BRUNTON, L. L. GOODMAN & GILMAN: **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12^a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012.

CARVALHO, G. C. **Química moderna**. Editora scipione, p. 469, 1997.

CASTRO, B.; DORMOY, J. R.; EVIN, G.; CASTRO, B. Peptide coupling reagents IV (1) benzotriazole N-oxytrisdimethylamino phosphonium hexafluorophosphate (B.O.P.). **Tetrahedron Letters**, v. 50, p. 1219 - 1922, 1975.

COSTE, J.; LENGUYEN. AND CASTRO B. PyBOP: A new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product. **Tetrahedron Letters**, v. 31, n. 2, p. 205-208, 1990.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials —*in vitroll* and in experimental animal infections. In: LORIAN, V. M. D. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. Baltimore: Willians & Wilkins. p. 39-788, 1991.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute, **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. 3. ed, v. 28, n. 14, CLSI document M27-A3, 2008.

COHEN, M. L. Epidemiology of drug resistance: implications for a post—antimicrobial era. **Science**, v. 257, n. 5073, p. 1050–1055, 1992.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T.; CAMARGO, L. F.; RICHTMANN, R.; QUEIROZ-TELLES, F. D.; SALLES, M. J.; CUNHA, C. A.; YASUDA, M. A.; MORETTI, M. L.; NUCCI, M. 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.

COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; SIQUEIRA-JR, J. P.; LIMA, E. O. Effect of *Momordica charantia* L. in the resistance to aminoglycosides in ethicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v. 33, p. 467–471, 2010.

CZUB, J.; BAGINSKI, M. Comparative molecular dynamics study of lipid membranes containing cholesterol and ergosterol. *Biophysical Journal*, v. 90, n. 7, p. 2368-2382, 2006.

DESNOS-OLLIVIER, M.; RAGON, M.; ROBERT, V.; RAOUX, D.; GANTIER, J. C.; DROMER, F. *Debaryomyces hansenii* (*Candida famata*), a rare human fungal pathogen often misidentified as *Pichia guilliermondii* (*Candida guilliermondii*). *Journal Clinical Microbiology*, v. 46, p. 3237–3242, 2008.

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.

DE VITA, D.; FRIGGERI, L.; D'AURIA, F. D.; PANDOLFI, F.; PICCOLI, F.; PANELLA, S.; PALAMARA, A. T.; SIMONETTI, G.; SCIPIONE, L.; DI SANTO, R.; COSTI, R.; TORTORELLA, S. Activity of caffeic acid derivatives against *Candida albicans* biofilm. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters*, v. 24, n. 6, p. 1502–1505, 2014.

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Review*, v. 13, p. 16-34, 2000.

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

DUNETZ, J. R.; MAGANO, J.; WEISENBURGER, G. A. Large-scale applications of amide coupling reagents for the synthesis of pharmaceuticals. **Organic Process Research & Development**, v. 20, p. 140–177, 2016.

EADY, E. A.; COVE, J. H. Staphylococcal resistance revisited: community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* - an emerging problem for the management of skin and soft tissue infections. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p.103-124, 2003.

ESCALANTE, A.; GATTUSO, M.; PÉREZ, P.; ZACCHINO, S. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 1720–1725, 2008.

FERNANDEZ, M. A.; SAENZ, M. T.; GARCIA, M. D. Antiinflammatory activity in rats and mice of phenolic acids isolated from *Scrophularia frutescens*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 50, n. 10, p. 1183-1186, 1998.

FREIRES, I. A.; MURATA, R. M.; FURLETTI, V. F.; SARTORATTO, A.; DE ALENCAR, S. M.; FIGUEIRA, G. M.; et al. *Coriandrum sativum* L. (coriander) Essential oil: Antifungal activity and mode of action on *Candida* spp., and molecular targets affected in human whole-genome expression. **Plos One**, v. 9, p. 1 - 13, 2014.

FREITAS, F.; MENKE, C. H.; RIVOIRE, W. A.; PASSOS, E. P. **Rotinas em ginecologia**. 4.ed. São Paulo: Artmed, 2003.

FRÉROT, E.; COSTE, J.; PANTALONI, A.; DUFOUR, M-N.; JOUIN, P. PyBOP and PyBroP: Two reagentes for the difficult coupling of the difficult coupling of the α , α -dialkyl amino acid, **Aib. Tetrahedron**, v. 47, p. 259, 1991.

GAMACHE, P.; RYAN, E.; ACWORTH, I. N. Analysis of phenolic and flavonoid compounds in juice beverages using high-performance liquid chromatography with coulometric array detection. **Journal of Chromatography**, v. 635, n. 1, p. 143-150, 1993.

GAÑAN, M.; MARTÍNEZ-RODRIGUEZ, A. J; CARRASCOSA, A. V. Antimicrobial activity of phenolic compounds of wine against *Campylobacter jejuni*. **Food Control**, v. 20, p. 739-742, 2009.

GAWNE, G.; KENNER, G. W.; SHEPPARD, R. C.; Acyloxyphosphonium salts as acylating agentes. Synthesis of peptides. **Journal of the America Chemical Society**. v. 91, p. 5669-5670, 1969.

GELATTI, L. C.; BONAMIGO, R. R.; BECKER, A. P.; D'AZEVEDO, P. A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: emerging community dissemination. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 5, p. 501-506, 2009.

GERHARDT, P.; MURRAY, R. G. E.; WOOD, W. A.; KRIEG, N. R. **Methods for General and Molecular Bacteriology**. Washington: American Society for Microbiology, 2. ed, 1994.

GHOSE, A. K.; VISWANDHAN, V. N.; WENDOLOSKI, J. J. A. knowledge-based approach in desingning combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative charavterization of known drug databases, **Journal of Combinatorial Chemical**, v. 1, p. 55-68, 1999.

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 3, p. 225-234, 2010.

GIRMENIA, C.; PIZZARELLI, G.; CRISTINI, F.; BARCHIESI, F., SPREGHINI, E.; SCALISE, G. & MARTINO, P. *Candida guilliermondii* fungemia in patients with hematologic malignancies. **Journal Clininical Microbiology**, v. 44, p. 2458–2464, 2006.

GOLD, H. S.; MOELLERING JUNIOR, R. C. Antimicrobial-drug resistance. **The New England Journal of Medicine**, v. 335, n. 19, p. 1445–1453, 1996.

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

HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparatibility of results and assay choice. **Phytochemical Analyses**, v. 11, p. 137-147, 2000.

HARTMANN, A.; MISSIO, R.; HAMMAD, M. P.; ALVES, I. A. Incidência de *Candida* spp. na mucosa oral de pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) no município de Santo Ângelo-RS. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 6, n. 3, p. 1-12, 2016.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. 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.

HOLLMAN, P. C.; KATAN, M. B. Bioavailability and health effects of dietary flavonoids in man. **Archives of Toxicology Supplement**, v. 20, p. 237-248, 1998.

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.

INKENO, T.; FUKUDA, K.; OGAWA, M.; HONDA, M.; TANABE, T.; TANIGUCHI, H. Small and rough colony *Pseudomonas aeruginosa* with elevated biofilm formation ability isolated in hospitalized patients. **Microbiology Immunology**, v. 51, n. 10, p. 929-938, 2007.

IVANOVA, A.; MILKOVA, T.; GALABOV, A. S.; NIKOLAEVA, L.; VOYNOVA, E. Transformation of cholanic acid derivatives into pharmacologically active esters of phenolic acids by heterogeneous Wittig reaction. **Zeitschrift fuer Naturforschung**, v. 52, n. 7-8, p. 516-521, 1997.

IUPAC, **Compendium of Chemical Terminology**, 2ed. the "Gold Book", 1997.

JONES, J. Amino acid and Peptide Synthesis, **Oxford**, 7th ed., 1994.

JORDAN, A. M. & ROUGHLEY, S. D. Drug discovery chemistry: a primer for the non-specialist. **Drug Discovery Today**. v. 14, p. 15/16, 2009.

KABIR, M. A.; HUSSAIN, M. A.; AHMAD, Z. *Candida albicans*: A model organism for studying fungal pathogens. **International Scholarly Research Network**, v. 2012, p. 1-15, 2012.

KAWATE, T.; GOUAUX, E. Arresting and releasing Staphylococcal alpha-hemolysin at intermediate stages pore formation by engineered disulfide bonds. **Protein Science**, v. 12, p. 997-1006, 2003.

KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 99, n. 2, p. 213-218, 1999.

KLEVENS, R. M.; J. R. EDWARDS, F. C. TENOVER; L. C. MCDONALD; T. HORAN, AND R. GAYNES. National nosocomial infections surveillance system. Changes in the epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in intensive care units in US hospitals, 1992-2003. **Clinical Infectious Diseases**. v. 42, p. 389–391, 2006.

KLEVENS, R. M.; M. A. MORRISON; J. NADLE; S. PETIT; K. GERSHMAN; S. RAY; L.H. HARRISON; R. LYNFIELD; G. DUMYATI; J.M. TOWNES, ET AL. Active Bacterial Core surveillance (ABCs) MRSA Investigators. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. **JAMA**. v. 298, p. 1763–1771, 2007.

KONGKATHIP, B.; AKKARASAMIYO, S.; HASITPAN, K.; SITTIKUL, P.; BOONYALAI, N.; KONGKATHIP, N. Synthesis of novel naphthoquinone aliphatic

amides and esters and their anticancer evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, p. 271-284, 2013.

KULLAR, R.; S.L. DAVIS; D.P. LEVINE AND M.J. RYBAK. Impact of vancomycin exposure on outcomes in patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia: support for consensus guidelines suggested targets. **Clinical Infectious Diseases**. v. 52, p. 975–981, 2011.

LESAGE-MEESSEN, L.; DELATTRE, M.; HAON, M.; THIBAUT, J. F.; COLONNA, C. B.; BRUNERIE, P.; ASTHER, M. A two-step bioconversion process for vanillin production from ferulic acid combining *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*. **Journal of Biotechnology**, v. 50, p. 107-113, 1996.

LIMA, I. O.; PEREIRA, F. O.; OLIVEIRA, W. A.; LIMA, E. O.; MENEZES, E. A.; CUNHA, F. A.; ET AL. Antifungal activity and mode of action of carvacrol against *Candida albicans* strains. **Journal of Essential Oil Research**, v.25, p.138–142, 2013.

LINDSAY, J. A.; HOLDEN, M. T. *Staphylococcus aureus*: super bug, super genome? **Trends in Microbiology**, v. 12, n. 8, p. 378-385, 2004.

MAHAJAN-MIKLOS, S.; RAHME, L. G.; AUSUBEL, F. M. Elucidating the molecular mechanisms of bacterial virulence using non-mammalian hosts. **Molecular Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 981-988, 2000.

MARKLE, W. H.; FISCHER, M. A.; SMEGO JÚNIOR, R. A. **Compreendendo a Saúde Global**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 586, 2015.

MARQUES, F. Z; MARKUSA, A.; MORRIS, B. J. Resveratrol: celular actions of a potente natural chemical that confers a diversity of health benefits. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 41, p. 2125-2128, 2009.

MARTINS-DINIZ, J. N.; SILVA, R. A.; MIRANDA, E. T.; MENDES-GIANNINNI M. J. S. Monitoramento de fungos anemófilos e de leveduras em unidade hospitalar. **Revista Saúde Pública**, v. 39, p. 98-405, 2005.

MENEZES, R. P.; BORGES, A. S.; ARAUJO, L. B.; PEDROSO, R. S.; RÖDER, D. V. Related factors for colonization by *Candida* species in the oral cavity of hiv-infected individuals. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 5, p. 413-419, 2015.

MONTALBETTI, C. A. G. N.; FALQUE, V.; **Tetrahedron**, v. 61, p. 10827-10852, 2005.

MONTES, R. C. **Amidas halogenadas: reações de acoplamento e investigação *in silico* da atividade antimicrobiana** – Tese de Doutorado – UFPB/CCS, João Pessoa, f.276, 2016.

NAGEN, T. J.; ALBUQUERQUE, T. T. O.; MIRANDA, L. C. G. Ácidos fenólicos em cultivares de soja: ação antioxidante. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 35, n. 1, p. 129-138, 1992.

NEISES, B., STEGLICH, W. Simple method for the esterification of carboxylic acids. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 17, p. 522–524, 1978.

NICHENAMETLA, S. N.; TARUSCIO, T. G.; BARNEY, D. L.; EXON, J. H. A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in Cancer. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, p. 161-183, 2006.

PACHECO, S. M. V.; MORGADO, A. F.; JÚNIOR, A. F. Biossíntese de vanilina por três isolados de *Pycnoporus sanguineus*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 2008, Recife. **CD Anais COBEQ 2008**. Recife, 2008.

PAPON, N.; COURDAVAULT, V.; CLASTRE, M; BENNETT, R. J. Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm. **PLoS Pathogens**, v.9, p. 1 – 4, 2013.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. & VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. Tradução da 4ªed. São Paulo-SP: Cengage Learning, 2010.

PEIXOTO, L. R.; ROSALEN, P. L.; FERREIRA, G. L. S.; FREIRES, I. A.; CARVALHO, F. G.; CASTELLANO, L. R.; CASTRO, R. D. Antifungal activity, mode of action and anti-biofilm effects of *Laurus nobilis* Linnaeus essential oil against *Candida* spp. **Archives of Oral Biology**, v. 73, p. 179-185, 2017.

PELEG, H.; BODINE, K. K.; NOBLE, A. C. The influence of acid on adstringency of alum and phenolic compounds. **Chemical Senses**, v. 23, n. 3, p. 371-378, 1998.

PERLIN, D. S. Current perspectives on echinocandin class drugs. **Future Microbiology**, v. 6, p. 441–457, 2011.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; MENDEZ, M.; KIBBLER, C.; ERZSEBET, P.; CHANG, S. C.; GIBBS, D. L.; NEWELL, V. A. *Candida guilliermondii*, an opportunistic fungal pathogen with decreased susceptibility to fluconazole: geographic and temporal trends from the artemis disk antifungal surveillance program. **Journal Clinical Microbiology**, v. 44, p. 3551–3556, 2006.

PIERCE, C. G.; SRINIVASAN, A.; UPPULURI, P.; RAMASUBRAMANIAN, A. K.; LÓPEZ-RIBOT, J. L. Antifungal therapy with an emphasis on biofilms. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 13, p. 726–730, 2013.

POWERS, J. H. Antimicrobial drug development—The past, the present, and the future. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, n. 4, p. 23–31, 2004.

RAJAN, P.; VEDERNIKOVA, I.; COS, P.; BERGHE, D. V.; AUGUSTYNS, K.; HAEMERS, A. Synthesis and evaluation of caffeic acid amides as antioxidants. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, p. 215-217, 2001.

RAO, S. R.; RAVISHANKAR, G. A. *Vanilla flavour*: production by conventional and biotechnological routes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p.209-304, 2000.

RASOOLI, I.; & ABYANEH, M. R. Inhibitory effects of thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Food Control**, v. 15, p. 479–483, 2004.

REDDY, K. K.; RAVINDER, T.; KANJILAL, S. T. Synthesis and evaluation of antioxidant and antifungal activities of novel ricinolate-based lipoconjugates of phenolic acids. **Food Chemistry**, v. 134, p. 2201-2207, 2012.

SÁEZ-LLORENS, X.; DE WONG, M. M. C.; CASTAÑO, E.; DE SUMAN, O.; DE MORÖS, D.; DE ATENCIO, I. Impact of an antibiotic restriction policy on hospital expenditures and bacterial susceptibilities: a lesson from a pediatric institution in a developing country. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 19, n. 3, p. 200-206, 2000.

SALLES, J. M. C.; SALLES, M. J. C. **Antimicrobianos (antibacterianos, antifúngicos, antivirais, antiparasitários) Quando indicar, como usar**. 20ªed. Belém: Editora Universitária da UFPA, 2000.

SANGLARD, D.; ODDS, F. C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanism and clinical consequences. **Lancet**, v. 2, p. 73-85, 2002.

SANTOS, B. M. O.; DARINI, A. L. C. Colonização por *Staphylococcus aureus* em portadores são relacionados de uma creche de hospital universitário. **Medicina**, v. 35, p. 160-172, 2002.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELENA, 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.

SAVINI, V.; CATAVITELLO, C.; ONOFRILLO, D.; MASCIARELLI, G.; ASTOLFI, D.; BALBINOT, A.; FEBBO, F.; D'AMARIO, C. & D'ANTONIO, D. What do we know about *Candida guilliermondii*? A Voyage throughout past and current literature about this emerging yeast. **Mycoses**, v. 54, p. 431-441, 2011.

SIDDIQUI, Z. N.; FAROOQ, F.; MUSTHAFA, T. N. M.; AHMAD, A.; KHAN, A. U. Synthesis: Characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 17, p. 237–243, 2013.

SIEWERT, B.; PIANOWSKI, E.; CSUK R. Esters and amides of maslinic acid trigger apoptosis in human tumor cells and alter their mode of action with respect to the substitution pattern at C-28. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 70, p. 259-72, 2013.

SILBY, M. W.; WINSTANLEY, C.; GODFREY, S. A. A; LEVY, S. B.; JACKSON, R. M. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, n. 4, p. 652-680, 2011.

SILVEIRA, G. P.; NOME, F.; GESSER, J. C.; SÁ, M. M. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 29, p. 844-855, 2006.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 7^a.ed. LTC Livros Técnicos e Científicos, Rio de Janeiro, 2007.

SOARES S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOYSA, N. S.; SAMARANAYAKE, L. P.; ELLEPOLA, N. A. Antimicrobials as a contributory factor in oral candidosis - a brief overview. **Oral Diseases**, v. 14, n. 2, p. 138-143, 2008.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, p. 281-301, 2000.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. 3ª ed. São Paulo: Atheneu; 2001.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8ª ed. São Paulo: Editora Artmed, 2005.

VALEUR, E & BRADLEY, M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagentes. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 2, p. 606-631, 2009.

VELIKOVA, M.; BANKOVA, V.; SORKUN, K.; HOUCINE, S.; TSVETKOVA, I.; KUJUMGIEV, A. Propolis from the Mediterranean region: chemical composition and antimicrobial activity. *Z. Naturforsch.* **Biological Sciences**. v. 55, p. 790-793, 2000.

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A. T. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. **Internacional Journal of Microbiology**, v. 2012, p. 1-26, 2012.

VOLLHARDT, K.P.C., SCHORE, N. E. Organic chemistry: structure and function, **W. H. Freeman and Company**, 6th ed, New York, 2011.

WANG, J.; LIAO, C.; HU, W.; SHEN, H. Synthesis of 2-(4-aminophenyl) benzothiazole derivatives and use thereof. **Bioorganic & Medicinal Chemical**, v. 18, p. 6197-6207, 2012.

WASSEMBERG, M. W. M., DE WIT, G. A., VAN HOUT, B. A. and BONTEN, M. J. M., Quantifying cost–effectiveness of controlling nosocomial spread of antibiotic–resistant bacteria: The case of MRSA, **Public Library of Science**, v. 5, p. 1–7, 2010.

ZHAO, Z.; MOGHADASIAN, M. H. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. **Food Chemistry**, v. 109, p. 691-702, 2008.